

表 3.サルモネラの用量反応関係に関するベータ・ポアソンモデルを元にした ALOP から FSO の変換例

ALOP	FSO ( <i>Salmonella</i> cells/serving)	FSO
5 cases in 100,000	0.0194	1 <i>Salmonella</i> in 51 servings
2 cases in 100,000	0.0078	1 <i>Salmonella</i> in 129 servings
1 case in 100,000	0.0039	1 <i>Salmonella</i> in 257 servings

鶏卵からの Q 熱感染リスクの検討

分担研究者	岸本壽男	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	室長
協力研究者	安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	主任研究官
	小川基彦	同	主任研究官
	柳 陳堅	同	流動研究員
	佐藤 梢	同	協力研究員
	棚林 清	国立感染症研究所獣医科学部第三室	室長
	藤田 修	同	研究員
	堀田明豊	同	研究員
	宇田晶彦	同	研究員
	山本茂貴	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部	部長
	貞升健志	東京都健康安全研究センター 微生物部	主任研究官
	平井昭彦	同	主任研究官
	甲斐明美	同	科長
	諸角 聖	同	部長
	百田隆祥	栄研化学株式会社 生物化学研究所	研究員
	小島 禎	同	課長
	池戸正成	同	部長

研究要旨：鶏卵や関連食品が Q 熱コクシエラ (*Coxiella burnetii*, *C. burnetii*) に汚染されているとする一部の指摘を踏まえ、鶏卵からの高感度な検出方法の開発と汚染実態調査を進めてきた。平成 17 年度は、前年度に開発した多検体処理が効率よくできる抽出法を用い、507 個の鶏卵から得られた遺伝子検出用鋳型 DNA から、栄研化学で開発された LAMP 法によって *C. burnetii* の遺伝子検出を試みた。また、高率に鶏卵から *C. burnetii* 遺伝子を検出したと報告している J 民間検査機関の検出法についても、それを再現し、同じ遺伝子検出用鋳型 DNA から特異的遺伝子の検出を試みた。LAMP 法では、供試した検体すべてで *C. burnetii* 遺伝子は陰性であった。J 民間検査機関の検出法を再現した方法でも結果はすべて陰性であった。また本年度はマヨネーズからの *C. burnetii* 検出法の検討を、real-time PCR 法を用いて実施するとともに、東京都内で市販されているマヨネーズ中の *C. burnetii* 汚染調査を 50 製品について実施したが、すべて陰性であった。現時点の結果からは、鶏卵の *C. burnetii* 汚染は確認できず、もし存在したとしても人への感染リスクは低いと考えられた。

A. 研究目的：近年、鶏卵や関連食品の一部が Q 熱コクシエラ (*Coxiella burnetii*, *C. burnetii*) に汚染されているとの J 民間検査機関 (J 機関) からの指摘があり、鶏卵等の *C. burnetii* による汚染実態を調査・検証し、感染リスクを検討する必要が生じている。前年度は国立感染症研究所 (感染研) で DNA 抽出機によって多検体処理が効率よくできる抽出法を開発し、市販鶏卵

507 個の調査をしたが陰性であった。

本年度は、その抽出法を用いて得られた遺伝子検出用鋳型 DNA を材料に、高率に鶏卵から *C. burnetii* の遺子を検出したとする J 機関の検出法を再現し、特異的遺伝子の検出を試みた。さらに、同じ遺伝子検出用鋳型 DNA 検体について、栄研化学研究所(栄化研)で開発された LAMP 法による *C. burnetii* の遺伝子検出を試みた。

また、マヨネーズからの *C. burnetii* 検出法の検討、ならびに市販マヨネーズの *C. burnetii* 汚染調査を東京都健康安全研究センター微生物部にて施行した。

## B.研究方法

材料と方法：

### 1. *Coxiella* 菌株と鋳型 DNA の抽出

*C. burnetii* ホルマリン不活化精製Ⅱ相死菌の粒子をこれまでと同様に計測し、前年度と同様にスピнкаラムを用いた抽出キット(QIAGEN QIAamp DNA mini)と、磁気ビーズを用いた抽出装置によって DNA 抽出を行った。

### 2. J 機関における検出方法の再現

J 機関から食品監視委員会に提出された報告書には詳細が記載されていないため、報告書提出時に J 機関ホームページに公表されていた検出方法を再現した。

(<http://www.jinjuuken.gr.jp/pubPCR/jp/rough.htm>)

まず、LightCycler によって OMP1 と OMP4 をプライマーに用いた増幅を行い、その増幅サンプルを OMP3 と OMP4 を用いて nested PCR を行い、アガロース電気泳動による特異バンドの確認とダイレクト・シーケンスによる塩基配列の解析を行った。用いたプライマーは、岐阜大によって開発された Outer membrane protein をコードする遺伝子 com1 を標的とした OMP1, OMP3, OMP4 である。

詳細は以下のとおりである。

### 1) Master Mix の調整と供試検体(template)の量

(LightCycler Faststart DNA SYBR Green 1Kit, Roche Diagnostics)

DW	2.4 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.6 $\mu$ L
OMP1 (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
OMP4 (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
Master Mix	2.0 $\mu$ L
Template	2.0 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

### 2) LightCycler の反応条件

Denature 95°C 600seconds (Slope 20°C/sec)

PCR 95°C 10seconds\* (Slope 20°C/sec)

57°C 10seconds\* (Slope 20°C/sec)

72°C 20seconds\* (Slope 20°C/sec)

\*=40 cycle

Melting 95°C 0seconds (Slope 20°C/sec)

60°C 15seconds (Slope 20°C/sec)

95°C 0seconds (Slope 0.1°C/sec)

Cooling 40°C 30seconds (Slope 20°C/sec)

### 3) Nested PCR

(GeneAmp PCR System 9700)

Master Mix の調整と供試検体(template)の量

DW	13.0~17.9 $\mu$ L
10×buffer	2.5 $\mu$ L
dNTP (2.5mM)	2.0 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0.5 $\mu$ L
OMP3 (100 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
OMP4 (100 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
Taq ポリメラーゼ	0.1 $\mu$ L
定量 PCR 産物	0.1~5.0 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

#### 4) Nested PCR の反応条件

96°C 240seconds

96°C 60seconds\*

57°C 60seconds\*

72°C 60seconds\*

\*=30 cycle

72°C 240seconds

4°C forever

増幅終了後、チューブを 4°C で 30 分間静置

5) アガロース電気泳動と OMP3 と OMP4 によるダイレクトシーケンス

### 3.市販鶏卵の Q 熱コクシエラ汚染調査

昨年度感染研において DNA 抽出機によって市販鶏卵から抽出した DNA サンプル 507 検体について検討した。

#### ① 感染研での検討

J 機関の上記検出法の再現による検出を試みた。

#### ② 栄化研での検討

栄化研で開発した Q 熱病原体 *C. burnetii* に対する LAMP 法にての遺伝子検出を試みた。

4. マヨネーズからの *C. burnetii* 検出法の検討ならびに市販マヨネーズの *C. burnetii* 汚染調査(東京都健康安全研究センター微生物部にて施行)

#### 1) 供試試料

マヨネーズからの効果的な *C. burnetii* 検出法の検討には、卵黄または全卵を材料とした市販マヨネーズを使用した。さらに、市販マヨネーズの本菌汚染調査には、東京都内で市販されている全卵タイプのマヨネーズ 23 製品、卵黄タイプのマヨネーズ 27 製品(計 15 社 50 製品)を供試した。

#### 2) 試薬

##### ① 菌液

*C. burnetii* Nine Mile 株 II 相菌を実験室内株化細胞である BGM 細胞で培養後、培養上清を -80°C にて凍結保存し、直前に溶解後、実験に使用した。なお、*C. burnetii* の培養およびマヨネーズへの *C. burnetii* の添加回収実験については、バイオハザードレベル 3 実験室内で操作を実施した。

##### ② real-time PCR 用試薬

マヨネーズ中に添加した *C. burnetii* 量を測定する目的で、real-time PCR 法による DNA 定量を行った。real-time PCR 用試薬として TaqMan Universal Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン社)を使用した。また、プライマーは *C. burnetii* の *com1* 領域をターゲットとする TCOM-1 および TCOM-2、蛍光プローブは TCOM-P (FAM-TAMRA) を用いた (Table 1)。なお、プライマーおよび合成蛍光プローブはアプライドバイオシステムズジャパンに合成依頼を行った。

##### ③ real-time PCR 用標準コントロール

TCOM-1、TCOM-P 塩基配列および TCOM-2 に相補的な塩基配列を有する合成長鎖 DNA (ファスマック社に合成依頼) を Tris・EDTA (pH8.0) に溶解後、希釈し、 $1.5 \times 10^9$  から  $1.5 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L までの段階希釈系列を作り、real-time PCR 用標準 DNA とした。

##### ④ その他の試薬類

DNA 抽出試薬は QIAamp DNA mini kit (QIAGEN 社) を使用した。リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline、PBS、NaCl 濃度約 0.14mol/L PB 溶液) は市販品の PBS (-) 粉末 (日水製薬) を、リン酸緩衝液 (Phosphate buffer、PB) はリン酸緩衝液末 (和光純薬) を、それぞれ精製水で溶解後、滅菌して使用した。試薬類はすべてキットまたは試薬添付の説明書に従って調製した。その他の試薬はすべて特

級品を用いた。

### 3) 装置

real-time PCR 装置：ABI PRISM 7900 Genetic Analyser (アプライドバイオシステムズジャパン)

PCR 装置：プログラムテンプコントロールシステム PC-708 (アステック)

### 4) マヨネーズからの DNA 抽出法

マヨネーズから NaCl 加 PB 溶液で抽出を行い、最終的に得られた検査用溶液 200  $\mu$ L を材料とし、QIA Amp DNA mini kit を用いて DNA を抽出した。

### 5) real-time PCR および nested-PCR 法の反応条件

DNA 抽出液 5  $\mu$ L を取り、real-time PCR 法を用いて標的遺伝子の増幅を行った。real-time PCR の反応条件は、50°C (2分) -95°C (10分) の反応後、[95°C (15 秒) - 57°C (1分)] を 1 サイクルとした。計 45 サイクルの反応を行った。マヨネーズおよび抽出液中の *C. burnetii* 量は、標準 DNA を real-time PCR により同一条件で測定し、作成した検量線により算定した。nested-PCR は Zhang らの方法に従い実施した。

### 6) マヨネーズからの効果的な *C. burnetii* 回収率の検討

#### ① PBS によるマヨネーズからの *C. burnetii* の回収率

500mL 容器に卵黄タイプマヨネーズまたは全卵タイプマヨネーズ 100g を入れ、*C. burnetii* Nine Mile 株 II 相菌  $1 \times 10^7$  個を添加後、60 秒間ブレンダーで撹拌した。PBS を 4 倍量 (400mL) 加え、マヨネーズが PBS に完全に溶解するまで 30 秒間撹拌し、全量を 500mL 容分液ロートに移し、2 日間室温にて静置した (図 1-A)。下部層 (P0 分画) を回収後、上部層を

500mL 容器に移し-80°Cにて 2 日間凍結後、室温で解凍することにより、マヨネーズより油成分を分離した。その後、500mL 容分液ロートに移し、境界線が明瞭に分離されるまで静置した。上部の油層 (Oil layer: OL) を回収後、PBS 400mL を加え 30 秒間撹拌した。上部層と下部層 (P1 分画) が明瞭になるまで静置し、下部層 (P1 分画) を採取した。同様に、PBS を加え 30 秒間撹拌後、静置した。この操作を計 4 回繰り返して、下部層 (P2~P5 分画) を回収した。回収した P0~P5 分画については、各分画ごとに 50mL 容遠沈管に分取し、20,000 $\times$ g、60 分間遠心後、沈渣を PBS 4 mL に溶解し、PBS 溶液 200  $\mu$ L から DNA を抽出した。油層 OL については、PBS 2 mL を加え 30 秒間振とう混和後、PBS を回収し、同様に 200  $\mu$ L より DNA を抽出し、検査用溶液とした。検査用溶液 5  $\mu$ L を real-time PCR により定量し、各分画における回収率を測定した。

#### ② モル濃度の異なる NaCl 添加 PB 溶液による *C. burnetii* 回収効率の検討

PBS (NaCl 濃度約 0.14mol/L) および NaCl を 0.5mol/L、1.0mol/L、1.5mol/L あるいは 2.0mol/L の濃度となるように加えた PB 溶液を作製し、これらを用いて *C. burnetii* 添加マヨネーズからの *C. burnetii* 回収率を測定した (図 1-B)、すなわち、150mL 容器に卵黄または全卵を材料としたマヨネーズ 20g を入れ、*C. burnetii* Nine Mile 株 II 相菌  $1 \times 10^7$  個を添加後ブレンダーでよく混ぜるように 60 秒間撹拌した。その後、各濃度の NaCl 加 PB 溶液 80mL (マヨネーズ 4 倍量) を加え、マヨネーズが溶解するまで 30 秒間撹拌し、遠心操作 (550 $\times$ g、5 分間) によりマヨネーズと PB 液層を分離後、-80°Cにて 16 時間凍結処理した。室温解凍後、100mL の分液ロートに全溶液を移し静置後、油

層 OL および下部層 (P1 分画) を回収した。残存する上部層に同濃度の NaCl 加 PB を加えそれぞれ計 5 回の抽出を行い、下部層 (P2~P6 分画) を得た。得られた各分画を 6) の①項と同様に処理後、real-time PCR 法により定量し、NaCl 濃度による回収率の比較検討を行った。

### ③NaCl 濃度 2.0mol/L PB 溶液によるマヨネーズ 50g からの *C. burnetii* 添加回収実験

150mL 容器に卵黄または全卵を材料としたマヨネーズ 50g を採取し、*C. burnetii* Nine Mile 株 II 相菌  $1 \times 10^7$  個を添加後ブレンダーで 60 秒間よく攪拌した(図 2-B)、その後、マヨネーズの 2 倍量の NaCl 濃度 2.0mol/L PB 溶液 100mL を加え 30 秒間よく攪拌後、550×g、5 分間遠心し、マヨネーズと PB 溶液を分離後、-80℃にて 16 時間凍結処理した。室温解凍後、200mL 容の分液ロートに溶液を移し、分離した油層を除去後、下部層 (P1 分画) を回収した。さらに、上部層に 100mL の NaCl 濃度 2.0mol/L PB 溶液を加え、30 秒間よく攪拌後静置し、P2 を回収した。その後さらに 2 回同様の抽出を行い、P3 および P4 分画を得た。得られた各分画を 6) ①の項と同様に処理後、real-time PCR 法により各分画の回収率を測定した。

### 7)PCR 法によるマヨネーズ 50g からの *C. burnetii* 検出感度の検討

50g の全卵マヨネーズに *C. burnetii* Nine Mile 株 II 相菌  $1 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$  および  $1 \times 10^4$  個をそれぞれ加え、ブレンダーにより 60 秒間攪拌後、図 2-B に従って P1~P4 分画を回収後、得られた各分画を混合後、50mL 容遠沈管に分取した。遠沈管を 20,000×g、60 分間遠心後、沈渣を 4mL の PBS で溶解した。PBS 溶液 200  $\mu$ L より DNA を抽出した後、さらに抽出した DNA 溶液をエタノール沈澱により濃縮し、滅菌蒸留水 20  $\mu$ L で溶解した。内 5  $\mu$ L を採取し

nested-PCR 法および real-time PCR 法を用いて検出感度を調べた。

8)市販マヨネーズの *C. burnetii* 汚染状況調査  
全卵タイプのマヨネーズ 23 製品、卵黄タイプのマヨネーズ 27 製品、合計 50 製品についてその 50g を供試し、NaCl 濃度 2.0mol/L PB 溶液により *C. burnetii* 分画を回収後、DNA を抽出し nested-PCR および real-time PCR 法により *C. burnetii* 遺伝子の検出を試みた (図 2-A)。

## C.研究結果

### 1.市販鶏卵の Q 熱コクシエラ汚染調査と J 機関の検出方法の検証

#### 1)感染研での検討結果

J 機関の検出法再現による検出を行ったが、供試した 507 検体すべて陰性であった。

#### 2)栄化研での検討結果

供試した 507 検体すべて陰性であった。

### 2.マヨネーズからの *C. burnetii* 検出法の検討

ならびに市販マヨネーズの *burnetii* 汚染調査

#### 1)マヨネーズからの効果的な *C. burnetii* 回収率の検討

##### ①PBS によるマヨネーズからの *C. burnetii* の回収率

喬らの自然静置法を参考に、卵黄タイプマヨネーズおよび全卵タイプマヨネーズ 100g を材料とし ( $1 \times 10^7$  個の *C. burnetii* を添加)、抽出液としては PBS を、液量はマヨネーズの 4 倍量である 400mL を使い、マヨネーズからの *C. burnetii* 抽出の検討を開始した。

PBS により *C. burnetii* の抽出を試みた結果、卵黄タイプおよび全卵タイプ、いずれのマヨネーズにおいても、2 日間静置後の下部層 (P0 分画) から *C. burnetii* はほとんど回収されな

かった。マヨネーズは低温保存により、油成分が分離することが知られており、我々の検討でも下部層 (P0 分画) 採取後に、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 2 日間の凍結保存することにより、油成分が分離することが確認された、そこで、凍結保存処理により得られた各層における *C. burnetii* を測定した結果、油層 OL 中から *C. burnetii* はほとんど回収されなかったが、油層 OL を除いた下部層 (P1~P5 分画) から PBS により抽出を続けた結果、P1 分画以降で *C. burnetii* が回収された。全卵タイプのマヨネーズでは、P1 分画で 0.8%、P2 分画で 33.9%、P3 分画で 26.5% と抽出操作を重ねることに総回収率が増加し、P2 分画で最大となった。P1~P5 分画のすべてを合わせた回収率は 64.7% であった (Table 2)。

一方、卵黄タイプのマヨネーズでは、P1 分画で 0.8%、P2 分画で 4.6%、P3 分画で 15.8% と全卵タイプより回収率は少ないが、同様に抽出操作を重ねるごとに総回収率が増加し、P3 分画でピークが認められた。P1~P5 分画のすべてを合わせた回収率は 30.4% であった。

## ②モル濃度の異なる NaCl 添加 PB 溶液による *C. burnetii* 回収効率の検討

PB 溶液に添加した NaCl 濃度による *C. burnetii* の回収効率を検討する目的で、マヨネーズ 20g を材料とし、5 種の NaCl 濃度による *C. burnetii* 回収率を比較検討した。

図 1-B のように、マヨネーズに NaCl 加 PB 溶液を加え、遠心操作を行った後に、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結したところ、マヨネーズからの油成分分離のための凍結保存期間を 2 日間から 16 時間に短縮できたが、卵黄タイプのマヨネーズにおける NaCl 濃度 0.14 および 0.5mol/L PB 溶液による抽出で、油層 OL から *C. burnetii* が検出された (Table 3)。

全卵タイプのマヨネーズの場合、P1 分画に

における *C. burnetii* 回収率は、PBS (NaCl 濃度約 0.14mol/L) の 4.8% に比べて、NaCl 濃度 0.5mol/L PB 溶液では 62.4%、1.0mol/L では 52.3%、1.5mol/L では 65.0% といずれも高く、2.0mol/L を用いた場合に、84.1% と最も高い回収率が得られた。P2 分画の回収率は、PBS では 62.0% と P1 分画より高かったが、その他の溶液では、8.0~15.4% と P1 分画より低い値であった。P1~P6 分画全てを合わせた回収率は、NaCl 濃度 2.0mol/L PB を用いた場合が 99.9% と最も高く、次いで、0.5mol/L PB の 90.7% であった。また、どの溶液を用いた場合も、油層 OL から *C. burnetii* は検出されなかった。

一方卵黄タイプのマヨネーズでは、PBS で抽出した場合、P1 分画で 23.4%、P2 で 29.6%、P3 で 24.4% であり、全体では 88.7% の回収率であった。NaCl のモル濃度を上げた場合、P1 分画の回収率は、0.5mol/L では 23.9%、1.0mol/L では 25.9%、1.5mol/L では 40.4%、2.0mol/L では 55.6% と高くなっていった。P1~P6 分画全てを合わせた回収率は、PBS (NaCl 濃度約 0.14mol/L) が 88.7% と最も高く、次いで 2.0mol/L が 73.1%、0.5mol/L PB が 69.9% であった (Table 3)。

## ③NaCl 濃度 2.0mol/L PB 溶液によるマヨネーズ 50g からの *C. burnetii* 添加回収実験

一般に、食鳥卵や食肉製品の細菌学的検査は規格基準では検査に使用する量を 25g としている。マヨネーズは油成分や食酢を含有しているため、25g では食品検査として不十分と推察されたため、サンプル量を 50g として検討を行った。抽出溶液には NaCl 濃度 2.0mol/L PB 溶液を用い、図 2-B に示した方法で、マヨネーズ 50g からの *C. burnetii* 回収率を調べた。その結果、全卵を材料としたマヨネーズからの

回収率は、P1 分画で 70.8%、P2 分画で 10.0%、P3 分画で 3.2%、P4 分画で 1.0%、P1~P4 分画の合計 85.0%であった (Table 4)。一方、卵黄を材料としたマヨネーズからの回収率は、P1 分画で 48.8%、P2 分画では 20.5%、P3 分画では 1.7%、P4 分画では 1.0%、P1~P4 分画の合計 72.0%であった。どちらのタイプのマヨネーズも、P1 および P2 分画の合計回収率が総回収率 (P1~P4 分画合計) の 95~96%を占めており、P1 および P2 分画までの処理でも、高い回収率が得られることが判明した。

#### 2) PCR 法によるマヨネーズ 50g からの *C. burnetii* 検出感度の検討

150mL のボトルに 50g のマヨネーズを入れ、*C. burnetii* Nine Mile 株 II 相菌  $1 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$  および  $1 \times 10^4$  個をそれぞれ加え、図 2-B に従って *C. burnetii* 分画を回収後、DNA を抽出・濃縮し、nested-PCR 法および real-time PCR 法により検出感度を調べた結果、 $1 \times 10^2$  個の *C. burnetii* を添加したマヨネーズでは検出できなかったが、 $5 \times 10^2$  個添加したマヨネーズでは両法で検出できたことから、本法による検出感度は、マヨネーズ 50g あたり *C. burnetii* 500 個であることが判明した (Table 5)。

#### 3) 市販マヨネーズの *C. burnetii* 汚染状況調査

全卵タイプのマヨネーズ 23 製品、卵黄タイプのマヨネーズ 27 製品、合計 50 製品について、その 50g を供試して、NaCl 濃度 2.0mol/L PB 溶液を用いて図 2-A に従って DNA の抽出を行い、*C. burnetii* 遺伝子検索を行った結果、*C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。

#### D. 考察

市販鶏卵の Q 熱コクシエラ汚染調査では、J 機関の検出方法の検証を 507 個で行ったがす

べて陰性で、さらに栄化研での LAMP 法での遺伝子検出でも 507 検体すべて陰性であった。すなわち、昨年度我々の検討した市販卵 507 個からは、3 つの方法でも全く *C. burnetii* 検出は検出しなかった。またこれに加えて昨年度、東京都健康安全研究センターにおいても、市販鶏卵から nested PCR による *C. burnetii* 特異遺伝子の検出を行っているが、300 個についてはすべて陰性であった。

市販マヨネーズも同様に J 機関からの報告では高率に汚染されているとの指摘がなされているが、今回 50 品目を調査した限りではすべて陰性であった。

以上のことから、検出限界以下の汚染が全くないとはいえないが、仮に存在したとしても人への感染リスクは低いと推測された。

#### E. 結論

現時点の結果からは、市販鶏卵や関連食品の *C. burnetii* 汚染は確認できず、もし存在したとしても人への感染リスクは低いと考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

1) 岸本寿男, 小川基彦, 安藤秀二. 呼吸器感染症の最新診断法の評価—Q 熱. 呼吸器科, 7, 40—47, 2005.

2) 岸本寿男, 安藤秀二, 小川基彦. オウム病および Q 熱—診断における現状と課題—カレントセラピー, 24, 98—100, 2006.

3) Setiyono A, Ogawa M, Cai Y, Shiga S, Kishimoto T, Kurane I. New criteria for immunofluorescence assay for Q fever diagnosis in Japan. J of Clin. Microbiol. 43, 5555-5559, 2005.



4) 貞升健志, 田部井由紀子, 新開敬行, 長谷川道弥, 金子誠二, 平井昭彦, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐 恵, 鎌田信一, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖. マヨネーズからの Real-time PCR を用いた効果的な *Coxiella burnetii* 検出法の開発と都内流通マヨネーズの *C. burnetii* 汚染調査成績. 食品衛生学雑誌, 47,1-8,2006

## 2.学会発表

1) Kishimoto T, Ando S, Ogawa M. Laboratory diagnosis and surveillance of Q fever in Japan. Japan-Taiwan Symposium on Zoonotic Diseases, Tokyo, September 7-8, 2005.

2) 山本徳栄, 近真理奈, 山口正則, 小川雅也, 前野直弘, 東久, 深井正之, 板屋民子, 斉藤利和, 木村弘, 安藤秀二, 小川基彦, 岸本寿男. 埼玉県内のイヌ, ネコにおける *Coxiella* 属および *Rickettsia* 属に対する血清抗体価. 第23回日本クラミジア研究会・第12回リケッチア研究会合同研究発表会, 東京, 平成17年11月

3) 西城卓也, 堀江典克, 胡曉晨, 伴信太郎, 安藤秀二, 古屋由美子, 小川基彦, 岸本寿男. 慢性疲労を訴える患者における Q 熱リケッチア保菌の可能性に関する検討. 第23回日本クラミジア研究会・第12回リケッチア研究会合同研究発表会, 東京, 平成17年11月

4) 安藤秀二, 荒川香南子, 小川基彦, 柳陳堅, 佐藤梢, 藤田修, 堀田明豊, 宇田晶彦, 棚林清, 岸本寿男. 鶏卵からの Q 熱コクシエラ検出に関する研究(第2報). 第23回日本クラミジア研究会・第12回リケッチア研究会合同研究発表会, 東京, 平成17年11月

5) 岸澤有華, 安藤秀二, 渡部直己, 三好正浩, 上野弘志, 岸本寿男. 非常に高い抗体価を示し国内感染が示唆された急性

Q熱症例. 第23回日本クラミジア研究会・第12回リケッチア研究会合同研究発表会, 東京, 平成17年11月

## H.知的財産権の出願・登録状況

### 1.特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3.その他

なし。

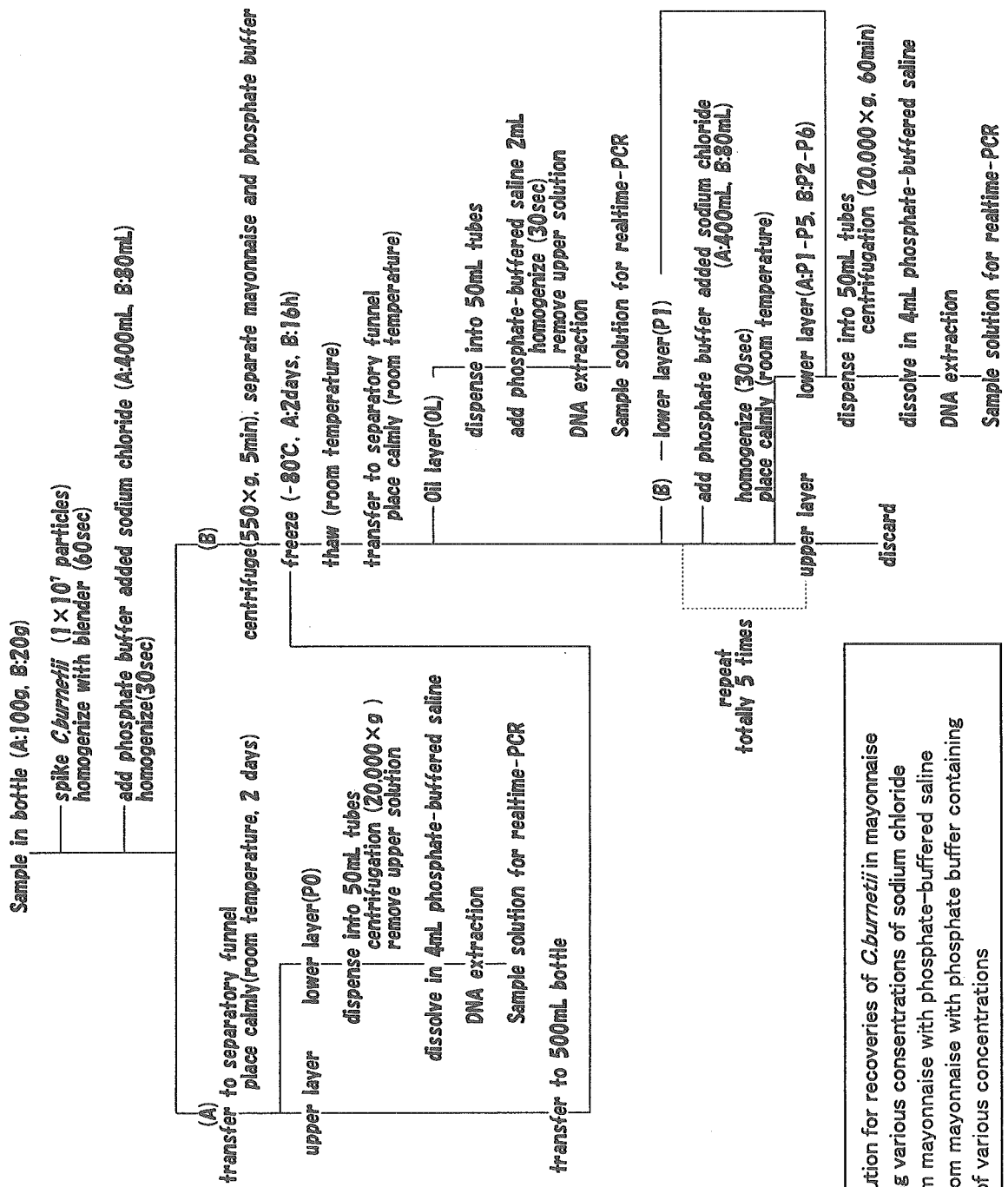
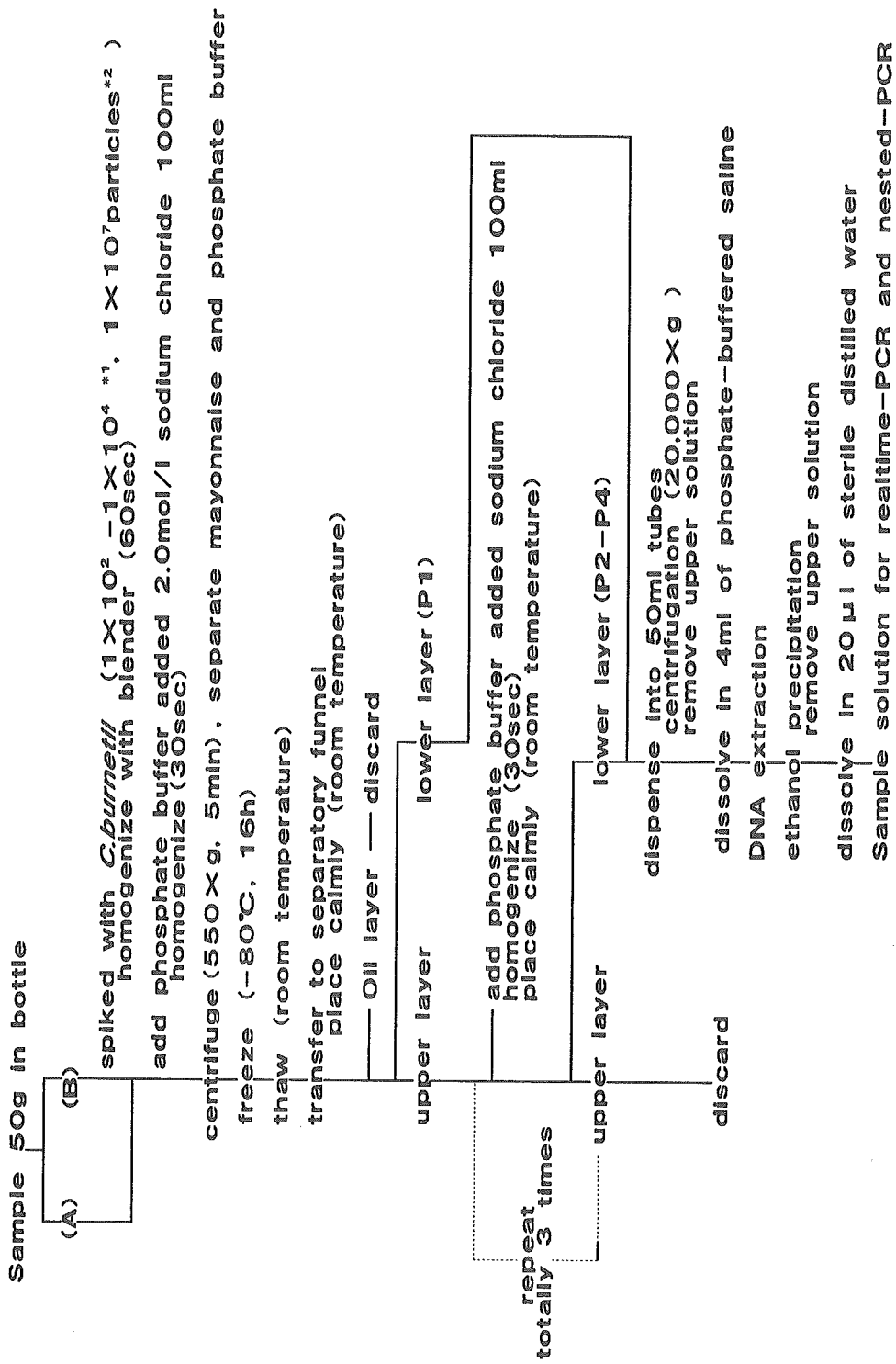


图 1. Preparation of sample solution for recoveries of *C. burnetii* in mayonnaise with phosphate buffer containing various concentrations of sodium chloride  
 (A): Recovery of *C. burnetii* from mayonnaise with phosphate-buffered saline  
 (B): Recoveries of *C. burnetii* from mayonnaise with phosphate buffer containing sodium chloride of various concentrations



2. Preparation of sample solution for recoveries of *C. burnetii* in mayonnaise with phosphate buffer containing 2.0 mol/L sodium chloride

(A): Investigation of *C. burnetii* in mayonnaise

(B): *C. burnetii* spiked examination for sensitivity\*1 and recovery\*2

Table 1. Structures of the PCR Primers(TCOM-1,TCOM-2) and a Fluorogenic Probe (TCOM-P) for Real-time PCR

TCOM-1 : CGCTGCCAAAGTATCATTAGCA
TCOM-2 : GCGGTTTGAAGGGTGATTTGT
TCOM-P : [FAM]-ATATTATGCTTTCCACGCGACGCTGCT-[TAMRA]

Table 2. Recovery of *C.burnetii* from Mayonnaise with Phosphate-buffered Saline

Fraction	Type Solution	Whole Egg-Type mayonnaise <sup>*1</sup>	Egg Yolk-Type mayonnaise <sup>*1</sup>
		Recovery(%) <sup>*2</sup>	Recovery(%)
Lower layer	P0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil layer	OL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Lower layer	P1	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.1
Lower layer	P2	33.9 ± 4.5	4.6 ± 2.9
Lower layer	P3	26.5 ± 2.8	15.8 ± 1.6
Lower layer	P4	1.8 ± 0.8	5.4 ± 1.3
Lower layer	P5	1.7 ± 0.3	3.8 ± 0.8
Total (%)		64.7 ± 2.7	30.4 ± 2.1

<sup>\*1</sup>Mayonnaise (100g) samples were spiked with  $1 \times 10^7$  particles of *C.burnetii*.

<sup>\*2</sup>Recovery is mean (%) ± S.D.(n=3)

Table 3. Recovery of *C.burnetii* from Mayonnaise with Phosphate Buffer Containing Various Concentrations of Sodium Chloride

Type		Whole Egg-Type mayonnaise*1					
		NaCl concentration (mol/L)					
Fraction	Solution	0.14*3	0.5	1.0	1.5	2.0	
Oil layer	OL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Lower layer	P1	4.8 ± 0.3	62.4 ± 0.2	52.3 ± 1.3	65.0 ± 0.9	84.1 ± 4.3	4.3
Lower layer	P2	62.0 ± 5.8	15.4 ± 0.2	8.0 ± 1.4	10.5 ± 1.6	12.1 ± 0.6	0.6
Lower layer	P3	20.6 ± 0.2	6.5 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.0 ± 0.4	2.5 ± 0.0	0.0
Lower layer	P4	1.7 ± 0.0	4.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.2 ± 0.6	1.2 ± 0.2	0.2
Lower layer	P5	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0
Lower layer	P6	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0
Total (%)		89.9 ± 5.9	90.7 ± 0.8	67.0 ± 1.0	79.7 ± 3.4	99.9 ± 3.9	

Type		Egg Yolk-Type mayonnaise*1					
		NaCl concentration (mol/L)					
Fraction	Solution	0.14*3	0.5	1.0	1.5	2.0	
Oil layer	OL	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Lower layer	P1	23.4 ± 0.1	23.9 ± 0.2	25.9 ± 0.7	40.4 ± 0.2	55.6 ± 0.1	0.1
Lower layer	P2	29.6 ± 0.6	26.3 ± 6.4	11.9 ± 0.2	9.2 ± 0.4	7.9 ± 0.1	0.1
Lower layer	P3	24.4 ± 1.3	7.1 ± 0.2	4.3 ± 0.6	2.9 ± 0.1	4.4 ± 0.1	0.1
Lower layer	P4	7.1 ± 0.1	5.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.4 ± 0.0	0.0
Lower layer	P5	2.4 ± 0.6	5.3 ± 0.1	2.1 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.2
Lower layer	P6	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.0	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3
Total (%)		88.7 ± 2.2	69.9 ± 6.6	49.0 ± 1.5	57.3 ± 0.5	73.1 ± 0.6	

\*1 Mayonnaise(20g) samples were spiked with  $1 \times 10^7$  particles of *C.burnetii*.

\*2 Recovery is mean (%) ± S.D.(n=3)

\*3 PBS: about 0.14mol/L Sodium Chloride

Table 4. Recovery of *C.burnetii* from Mayonnaise with Phosphate Buffer Containing 2.0mol/L NaCl

Type		Whole Egg-Type mayonnaise <sup>*1</sup>	Egg Yolk-Type mayonnaise <sup>*1</sup>
Fraction	Solution	Recovery (%) <sup>*2</sup>	Recovery (%)
Lower layer	P1	70.8 ± 6.7	48.8 ± 2.7
Lower layer	P2	10.0 ± 0.7	20.5 ± 2.5
Lower layer	P3	3.2 ± 0.2	1.7 ± 0.5
Lower layer	P4	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.4
Total (%)		85.0 ± 6.0	72.0 ± 0.4

<sup>\*1</sup>Mayonnaise(50g) samples were spiked with  $1 \times 10^7$  particles of *C.burnetii*.

<sup>\*2</sup>Recovery is mean (%) ± S.D.(n=3)

Table 5 . Sensitivity of the PCR Assay from Mayonnaise Samples (50g) Spiked with *C.burnetii*

Detection method	Spiked <i>C.burnetii</i> particles /50g			
	$1 \times 10^2$	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$
Realtime-PCR	-	+	+	+
Nested-PCR	-	+	+	+

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Setiyono A, Ogawa M, Cai Y, Shiga S, Kishimoto T, Kurane I.	New criteria for immunofluorescence assay for Q fever diagnosis in Japan.	J. Clin. Microbiol	43	5555-5559	2005
岸本寿男, 小川 基彦, 安藤秀二.	呼吸器感染症の最新 診断法の評価—Q熱.	呼吸器科	7	40-47	2005
中澤宗生、秋庭正 人	動物における腸管出血 性大腸菌の疫学.	化学療法領域	20	1320-1327	2004
Kijima Tanaka M, Ishihara K, Kojima A, Morioka A, Nagata R, Kawanishi M, Nakazawa M, Tamura Y, Takahashi T	A national surveillance of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in food-producing animals in Japan.	J Vet Med B	52	230-237	2005

## New Criteria for Immunofluorescence Assay for Q Fever Diagnosis in Japan

A. Setiyono,<sup>1,3</sup> M. Ogawa,<sup>1\*</sup> Y. Cai,<sup>1</sup> S. Shiga,<sup>1</sup> T. Kishimoto,<sup>1</sup> and I. Kurane<sup>2</sup>

Laboratory of Rickettsia and Chlamydia,<sup>1</sup> and Department of Virology I,<sup>2</sup> National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-Ku, Tokyo 162-8640, Japan, and Laboratory of Pathology, Department of Parasitology and Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, Indonesia<sup>3</sup>

Received 26 October 2004/Returned for modification 24 January 2005/Accepted 9 August 2005

A study was made to evaluate the cutoff value of indirect immunofluorescent-antibody (IFA) test for Q fever diagnosis in Japan. We used 346 sera, including 16 from confirmed Q fever cases, 304 from Japanese pneumonia patients, and 26 from negative cases. Thirteen sera from the confirmed Q fever cases with an immunoglobulin M (IgM) titer of  $\geq 1:128$  and/or IgG titer of  $\geq 1:256$  by the IFA test were positive by both enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting assay (WBA), whereas 298 sera from pneumonia patients and 26 negative sera with an IgM titer of  $\leq 1:16$  and an IgG titer of  $\leq 1:32$  by the IFA test were negative by both ELISA and WBA. In the proposed “equivocal area,” with an IgM titer of  $\geq 1:32$  and  $\leq 1:64$  and/or an IgG titer of  $\geq 1:64$  and  $\leq 1:128$ , we found 9 sera, 3 from confirmed Q fever cases and 6 from Japanese pneumonia patients, by the IFA test. Three sera from the confirmed Q fever cases and one of the sera from pneumonia patients were IgM and/or IgG positive by both ELISA and WBA. These results suggest that a single cutoff value for the IFA test may cause false-positive and false-negative results. In conclusion, this study showed that an “equivocal area” should be used for the IFA test rather than a single cutoff value and that sera in the equivocal area should be tested by additional serological assays for confirmation.

Q fever is a zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular rickettsial organism. The clinical manifestations of Q fever are readily divided into acute and chronic forms. The most common clinical presentation of acute Q fever in human is an influenza-like illness, often accompanied by pneumonia. The chronic Q fever form, particularly endocarditis, may appear several years after the primary episode (1, 2, 6, 21). Because the clinical presentation of the infection is not specific, serological confirmation is required for the diagnosis of Q fever. In Japan, the currently used serological method is the indirect immunofluorescent-antibody (IFA) test, and more recently, some attempts have been made to use other methods, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The unique characteristic of *C. burnetii* is its antigenic phase variation (17). Virulent phase I can be isolated from natural infection of humans or from laboratory infections of animals. Phase II develops during serial passage in an immunologically incompetent host, such as cell cultures or fertilized eggs (1). Serologically, anti-phase I antibodies are normally found at high levels only during the chronic form of the disease, whereas specific anti-phase II antibodies predominate primarily in acute Q fever (14).

The IFA test has previously been used to detect immunoglobulin M (IgM) antibodies in the sera of Q fever patients within the first 2 weeks of illness (8, 12). The estimation of anti-*C. burnetii* IgM antibody using the IFA test in a single serum sample has been proven useful in confirming acute in-

fection in humans (8). The IFA method is more sensitive and specific than the complement fixation test; however, it is less sensitive than the ELISA (15). Therefore, the validation of the immunofluorescent threshold value for Q fever serology should be important for the establishment of the diagnosis.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by immunoblotting assay, has been used to identify the biologically important antigen in a complex mixture of proteins (9). The outer membrane-associated protein of *C. burnetii* is believed to be the antigenic target for the detection of antibody in clinical serum samples. This protein has been well characterized, with a molecular mass of approximately 27 kDa (18), and its usefulness as a immunodiagnostic reagent had also been evaluated (23).

In a preliminary study, we found some unsure results in the Q fever diagnosis by our IFA test and then compared them with ELISA results (data not published). Several samples reacted to phase II *C. burnetii* antigen in the IFA test but were negative by ELISA. On the other hand, a few of these sera were positive by ELISA but nonreactive in the IFA test. This phenomenon led us to reevaluate the criteria for the IFA test for the diagnosis of Q fever.

### MATERIALS AND METHODS

**Serum samples.** A total of 346 human serum samples were included in this study. The specimens consisted of 16 serum samples from patients diagnosed with Q fever in past examinations by the IFA test, ELISA, and complement fixation test, which also served as a positive control, including three imported cases (13) and others kindly provided by Werner Slenczka (Institut für Virologie, Marburg, Germany), Barrie P. Marmion (Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia), and E. Kovacova (Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Slovak Republic), 150 paired and 4 single sera from Japanese pneumonia patients in Okayama Prefecture with unknown fever and no clinical information regarding the microbes in those pneumonia cases, and 26

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Rickettsia and Chlamydia, Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-Ku, Tokyo 162-8640, Japan. Phone: 81-3-5285-1111, ext. 2563. Fax: 81-3-5285-1208. E-mail: ogawam@nih.go.jp.



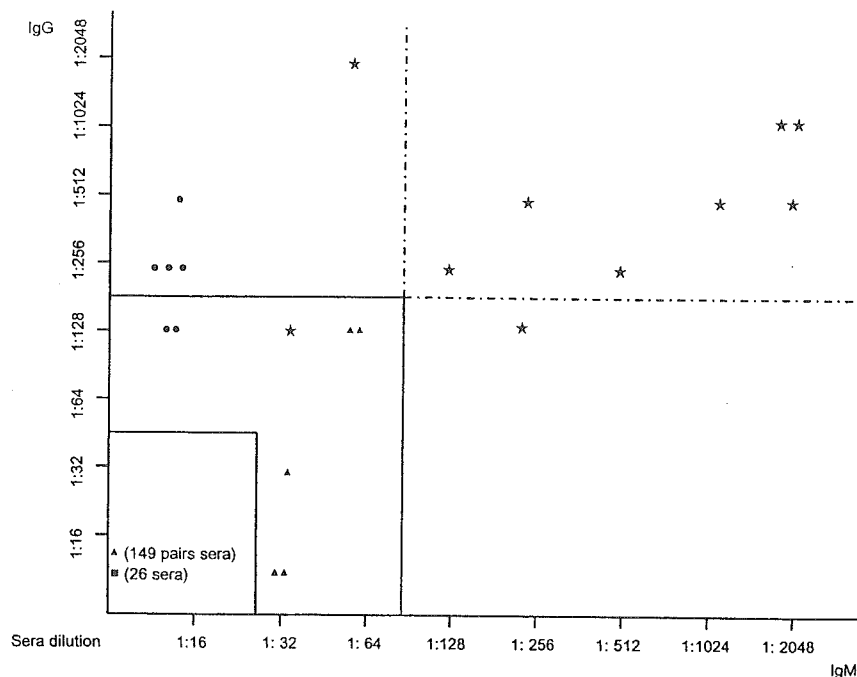


FIG. 1. Determination of IgM and IgG titers to phase II *C. burnetii* in 346 serum samples by immunofluorescence assay. \*, acute-phase sera from confirmed Q fever patients; ●, chronic- and convalescent-phase sera from confirmed Q fever patients; ▲, sera from Japanese pneumonia patients; ■, negative sera.

negative sera from healthy donors, including 1 serum sample from Slovakia and 25 sera from Japan.

***C. burnetii* antigen.** A total of  $10^7$  *C. burnetii* phase II strain Nine Mile (ATCC VR615) bacteria with a high passage number were purified by differential centrifugation and formalin treatment as described previously (20), with minor modifications. Briefly, after 3 to 5 days of inoculation of *C. burnetii* to Vero cell lines, the medium was discarded and the cells were collected with a cell scraper. The cells were then resuspended by Dounce homogenization in 0.02% formalin-phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2) 20 times. The cell solution was centrifuged at  $1,300 \times g$  for 5 min, and the supernatant was collected. Subsequently, the collected supernatant was filtered through a 5.0- $\mu$ m-pore-size filter (Millipore Corp., Bedford, MA) to remove soluble cell culture debris and centrifuged at  $13,000 \times g$  at 4°C for 15 min. The supernatant was then discarded, and the pellets were washed with PBS twice. The concentration of *C. burnetii* antigen was measured with a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Lab., Hercules, CA). After microscopic examination of impression smears checked by the IFA test, the partially purified *C. burnetii* was pooled and stored at -80°C until use.

**IFA test.** The IFA test was performed by using prepared *C. burnetii* antigen with twofold dilutions of serum from 1:16 to 1:2,048 in PBS. In brief, 4  $\mu$ l of antigen was dotted in triplicate onto a clean 15-well multitest slide (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio) and allowed to air dry. Once dry, the slides were fixed in acetone for 15 min at room temperature. The diluted serum samples were then overlaid onto the antigen spots and incubated at 37°C in a humidified chamber for 1 h. After one wash with distilled water, two washes with 0.05%

PBS-Tween, and one more wash with distilled water, 8  $\mu$ l of fluorescein isothiocyanate-labeled anti-human IgM or IgG (Biosource, Camarillo, CA) diluted 1:200 in 0.001% Evans blue solution was added to each antigen spot and the slides were incubated for 1 h at 37°C. Finally, they were washed as before, dried in air, and mounted in 50% glycerol-PBS (pH 8.6). The slides were examined with a 40 $\times$  objective ( $\times 400$  magnification) using a fluorescence microscope (Axioskop 2 plus; Zeiss) equipped for visualizing brilliant green staining of *C. burnetii* microorganisms.

**ELISA.** A commercial ELISA kit (PanBio Co Ltd., Windsor, Queensland, Australia) was used as recommended by the manufacturer. The bound conjugates were detected by using tetramethyl benzidine as a substrate, and the color change was assessed in a microplate reader at a test wavelength of 450 nm. The ELISA index can be obtained by calculating the ratio of the cutoff absorbance to the sample absorbance and multiplying by 10. The serum samples were considered positive if they had an index of more than 11, equivocal if the index was between 9 and 11, and negative if the index was less than 9.

**WBA.** The outer membrane complex of *C. burnetii* was extracted by trichloroacetic acid and the temperature treatment method as described elsewhere (22). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out with a 12% polyacrylamide gel as a separating gel (12), and a Western blotting assay (WBA) was performed using prepared outer membrane complex with 1:400 dilutions of the sera. The assay result was considered positive if the sera recognized the approximately 27-kDa protein of *C. burnetii*.

TABLE 1. Grouping of results

Group no.	Serum origin	No. of samples with result:			Total no. of:		
		Q fever	Negative	Equivocal	Serum samples	Patients	
1	Confirmed Q fever patients	13		3	16	16	
2	Japanese pneumonia patients		149 pairs	1 pairs, 4 single	304	150	
3	Negative samples		26		26	4	
Total						346	196

TABLE 2. Results of IFA test, ELISA, and Western blotting assay

Subtype	Test	Assay result <sup>a</sup>			
		Chronio- and convalescent-phase sera (4 samples)	Acute-phase sera (9 samples)	Negative	
				149 pairs of sera	26 samples
IgM	IFA	--	+	-	-
	ELISA	-	+	-	-
	WBA	-	+	-	-
IgG	IFA	+	+	-	-
	ELISA	+	+	-	-
	WBA	+	+	-	-

<sup>a</sup> +, positive; -, negative. Equivocal results were obtained for three samples from confirmed Q fever cases and six samples (one paired and four single sera) from Japanese pneumonia patients. See Table 3 for details regarding equivocal results.

## RESULTS

**Serological analysis.** Three hundred forty-six human sera, including 16 sera from confirmed Q fever cases, 304 sera from pneumonia patients, and 26 negative sera, were tested by the IFA test (Fig. 1), ELISA, and WBA (Table 1). Thirteen sera with an IgM titer of  $\geq 1:128$  and/or an IgG titer of  $\geq 1:256$  by the IFA test were positive by both ELISA and WBA, whereas 302 sera with an IgM titer of  $\leq 1:16$  and an IgG titer of  $\leq 1:32$  by the IFA test were negative by both ELISA and WBA. In the case of an IgM titer of  $\geq 1:32$  and  $\leq 1:64$  and/or an IgG titer of  $\geq 1:64$  and  $\leq 1:128$  by the IFA test, 4 sera were IgM and/or IgG positive by both ELISA and WBA, whereas 2 sera were negative by ELISA but positive by WBA. In this study, we labeled this area the "equivocal area" and divided the results of the IFA test into 3 groups, as shown in Table 1. The detailed results of the 3 groups are discussed in the next section.

**Groups.** Group I included 13 sera from confirmed Q fever cases. Four of these sera were IgG positive by both ELISA and WBA, indicating convalescent or chronic cases, whereas 9 of these sera were IgM and IgG positive by both ELISA and WBA, suggesting acute or subacute cases (Table 2). Group II included 298 sera from pneumonia patients and 26 confirmed negative sera that were negative by ELISA and WBA. Group III, which was proposed as the "equivocal area" in this study, included 3 sera from confirmed Q fever cases and 6 sera from pneumonia patients. The 3 confirmed Q fever sera and one serum from a pneumonia patient were IgM and/or IgG positive by both ELISA and WBA (Table 3). However, 2 of the sera from pneumonia patients were negative by ELISA but positive by WBA, and the other 3 sera were negative by both ELISA and WBA.

## DISCUSSION

We evaluated new criteria for the IFA test in the diagnosis of Q fever in Japan. We used 346 human sera, including 16 from confirmed Q fever cases, 304 from Japanese pneumonia patients, and 26 that were negative. Thirteen sera from the confirmed Q fever cases were positive by the IFA test, ELISA, and WBA, whereas 298 sera from pneumonia patients and 26 negative sera were negative by the IFA test, ELISA, and WBA. In the proposed "equivocal area," we found 9 sera with various

results by the IFA test, ELISA, and WBA for each serum sample.

The high cutoff value should emphasize the predictive value of a positive result with a high probability. In our temporary criteria, the combination of a phase II IgM titer of  $\geq 1:128$  and/or a phase II IgG titer of  $\geq 1:256$  gave a positive result for 13 sera from confirmed Q fever patients. Under these conditions, the diagnosis can be made even with only a single serum sample. Additionally, the serum samples recognized an approximately 27-kDa protein of *C. burnetii* by WBA, which other workers suggested as an immunodominant component in certain acute cases of the disease (18, 19), and were positive by ELISA. These criteria can be considered more reliable than those of a recent study that defined the high sensitivity of the IFA test at a cutoff titer of 1:400 (16).

The low cutoff value for either IgM or IgG should give a high predictive value of a negative result; thus, diagnosis cannot be made below this titer with a high probability. We may consider phase II IgM and phase II IgG titers of  $\leq 1:16$  and  $\leq 1:32$ , respectively, as the low cutoff values (Fig. 1). Most samples under the low cutoff values, including 149 paired and 26 negative-control sera, were negative and also did not recognize the

TABLE 3. Confirmation of equivocal IFA test results with ELISA and Western blot assay

Subtype	Test	Result for sample no. with serum origin:							
		Confirmed Q fever patients			Japanese pneumonia patients				
		1	2	3	1 <sup>a</sup>	2	3	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
IgM	IFA <sup>c</sup>	32	<16	<16	32	32	32	64	64
	ELISA <sup>d</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-
	WBA <sup>e</sup>	+	-	-	+	-	-	+	+
IgG	IFA	128	128	128	<16	<16	<16	128	128
	ELISA	+	+	+	-	-	-	-	-
	WBA	+	+	+	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Probable acute case.

<sup>b</sup> Suspected acute case.

<sup>c</sup> The numbers show titers as twofold dilutions.

<sup>d</sup> +, positive, if the index was more than 11 units; -, negative, if the index was less than 9 units.

<sup>e</sup> +, positive, if sera recognized the approximately 27-kDa protein; -, negative, if sera did not recognize the protein.

TABLE 4. Confirmation of equivocal ELISA results with IFA test and Western blotting assay

Subtype	Test	Result for indicated sample no. with serum origin:																	
		Confirmed Q fever patients				Japanese clinical specimen													
		1	2	3	4	1 <sup>a</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
IgM	ELISA <sup>b</sup>	15.1	13.8	8.3	8.8	12.8	14	12.5	3.4	7.3	7.9	10.4	4.2	8.3	13.5	11.1	11.2	15.7	5.1
	IFA <sup>c</sup>	32	+	<16	<16	32	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	WB <sup>d</sup>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgG	ELISA	14.7	14	15.1	14.7	9.7	4.3	5.2	15.8	13	14.8	11.9	19.4	14.1	4.1	2.7	4.5	4.6	12.2
	IFA	128	+	128	+	<16	32	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	WB	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Probable acute case.

<sup>b</sup> The numbers indicate the ELISA index.

<sup>c</sup> The numbers indicate the IFA titer of the diluted sera (see details in the text).

<sup>d</sup> +, positive; -, negative in the recognition of the approximately 27-kDa protein.

specific protein by WBA, although a few of them had a significant index by ELISA (Table 4). This is in accordance with a previous study showing that ELISA is suitable for use as a screening assay for Q fever diagnosis, with the IFA test used to confirm negative results (3, 4). We may explain this difference by the fact that a nonspecific reaction by ELISA may still occur due to cellular debris in the antigen preparation from culture. Although a recent study showed that LightCycler nested PCR can also be applied as a secondary tool in the diagnostic strategy for the early diagnosis of acute Q fever (5), the result of this study showed a good correlation between IFA titers and ELISA index values. A higher IFA titer correlated with a higher index in the ELISA result. Based on this clarification, confirmation with another serological test might not be required for samples categorized as negative by the IFA test.

We proposed the titer equivocal area and found 9 sera, including 3 from confirmed Q fever cases and 6 from Japanese pneumonia patients in the area, by the IFA test. Three sera from the confirmed Q fever cases and one serum from a pneumonia patient were positive by ELISA and WBA. However, 2 sera from pneumonia patients were negative by ELISA but positive by WBA, which left 3 sera negative by both ELISA and WBA. These results suggest that a single cutoff value for the IFA test may cause false-positive and false-negative results. In addition, only the IgM titer was positive, and the titer was very low in the positive case of pneumonia. This result suggests that serological assay with paired sera should be done for confirmation.

The results presented here illustrate the new criteria for the IFA test for Q fever. We recommended that an "equivocal area" should be used for the IFA test, rather than a single cutoff value and that sera in the equivocal area should be tested by additional serological assays to eliminate false-positive and false-negative results.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the physicians who kindly provided the clinical samples for this study and Werner Slenczka, Barrie P. Marmion, and Elena Kovacova for kindly providing the control human sera.

This work was financially supported by The Japan Human Sciences Foundation.

#### REFERENCES

- Baca, O. G., and D. Paretsky. 1983. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol. Rev.* 47:127-149.
- Brouqui, P., H. Tissot Dupont, M. Drancourt, Y. Berlan, J. Etienne, C. Lepout, F. Goldstein, P. Massip, M. Micoud, A. Bertrand, and D. Raoult. 1993. Chronic Q fever: 92 cases from France including 27 cases without endocarditis. *Arch. Intern. Med.* 153:642-648.
- Field, P. R., J. L. Mitchell, A. Santiago, D. J. Dickeson, S.-W. Chan, D. W. T. Ho, A. M. Murphy, A. J. Cuzzubbo, and P. L. Devine. 2000. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with immunofluorescence and complement fixation tests for detection of *Coxiella burnetii* (Q fever) immunoglobulin M. *J. Clin. Microbiol.* 38:1645-1647.
- Field, P. R., A. Santiago, S.-W. Chan, D. B. Patel, D. Dickeson, J. L. Mitchell, P. L. Devine, and A. M. Murphy. 2002. Evaluation of a novel commercial enzyme-linked immunosorbent assay detecting *Coxiella burnetii*-specific immunoglobulin G for Q fever prevaccination screening and diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3526-3529.
- Fournier, P. E., and D. Raoult. 2003. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J. Clin. Microbiol.* 41:5094-5098.
- Haldane, E. V., T. J. Marrie, R. S. Faulkner, S. H. Lee, J. H. Cooper, D. D. MacPherson, and T. J. Montague. 1983. Endocarditis due to Q fever in Nova Scotia: experience with five patients in 1981-1982. *J. Infect. Dis.* 148:978-985.
- Hendrix, L. R., L. P. Mallavia, and J. E. Samuel. 1993. Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene *com1*. *Infect. Immun.* 61:470-477.
- Hunt, J. G., P. R. Field, and A. M. Murphy. 1983. Immunoglobulin responses to *Coxiella burnetii* (Q fever): single-serum diagnosis of acute infection, using an immunofluorescence technique. *Infect. Immun.* 39:977-981.
- Kenneth, O., and K. M. Yamada. 1977. Direct detection of antigens in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 78:483-490.
- Kovacova, E., J. Gallo, S. Schramek, J. Kazar, and R. Brezina. 1987. *Coxiella burnetii* antigens for detection of Q fever antibodies by ELISA in human sera. *Acta Virol.* 31:254-259.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Murphy, A. M., and L. Magro. 1980. IgM globulin response in Q fever (*Coxiella burnetii*) infections. *Pathology* 12:391-396.
- Ogawa, M., T. Kawamoto, A. Kawamoto, T. Yamashita, Y. Uchida, K. Kato, A. Setiyono, S. Shiga, and T. Kishimoto. 2003. Time course of the levels of antibodies to *Coxiella burnetii* and detection of *C. burnetii*-DNA in three imported cases of acute Q fever. *Kansenshogaku Zasshi* 77:127-132. (In Japanese.)
- Peacock, M. G., R. N. Philip, J. C. Williams, and R. S. Faulkner. 1983. Serological evaluation of Q fever in humans: enhanced phase I titers of immunoglobulins G and A are diagnostic for Q fever endocarditis. *Infect. Immun.* 41:1089-1098.
- Peter, O., G. Dupuis, W. Burgdorfer, and M. Peacock. 1985. Evaluation of complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the early diagnosis of primary Q fever. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4:394-396.
- Rollain, J. M., C. Lecam, and D. Raoult. 2003. Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and *Bartonella*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:1147-1148.
- Stocker, M. G. P., and P. Fiset. 1956. Phase variation of the Nine Mile and other strains of *Rickettsia burnetii*. *Can. J. Microbiol.* 2:310-321.
- To, H., A. Hotta, G. Q. Zhang, S. V. Nguyen, M. Ogawa, T. Yamaguchi, H. Fukushi, K. Amano, and K. Hirai. 1997. Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. *Microbiol. Immunol.* 42:81-85.
- To, H., A. Hotta, T. Yamaguchi, H. Fukushi, and K. Hirai. 1997. Antigenic characteristics of the lipopolysaccharides of *Coxiella burnetii* isolates. *J. Vet. Med. Sci.* 60:267-270.
- To, H., K. K. Htwe, N. Yamasaki, G. Q. Zhang, M. Ogawa, T. Yamaguchi, H.

- Fukushi, and K. Hirai. 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol. Immunol.* 39:663-671.
21. Turk, W. P., G. Howitt, L. A. Turnberg, H. Fox, M. Longson, M. B. Matthews, and R. DasGupta. 1976. Chronic Q fever. *Q. J. Med.* 45:193-217.
22. Vavrekova, M., F. Ciampor, and M. Lukacova. 1992. Electron-microscopic study of the effect of various extractants on the morphology of *Coxiella burnetii*. *Folia Microbiol.* 37:87-92.
23. Zhang, G. Q., A. Hotta, T. Ho, T. Yamaguchi, H. Fukushi, and K. Hirai. 1998. Evaluation of a recombinant 27-kDa outer membrane protein of *Coxiella burnetii* as an immunodiagnostic reagent. *Microbiol. Immunol.* 42:423-428.