

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122304

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

開發新興立克次體快速等溫核酸增殖方法

年度研究報告

執行機構：研檢及疫苗研製中心

計畫主持人：楊素鈴

研究人員：舒佩芸、陳湘妃、彭士桓

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

目 錄

	頁碼
封面	
目錄	
壹、摘要	
一、中文摘要	3
二、英文摘要	4
貳、本文	
一、前言	5
二、材料與方法	8
三、結果	11
四、討論	16
五、結論與建議	17
六、重要研究成果及具體建議	18
七、參考文獻	19
八、圖、表	22

共 36 頁

一、中文摘要

由於國際間交通往來頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，使得新興/再浮現立克次體(*Rickettsia* spp.)傳染病在全世界散佈範圍擴大，對人類健康所造成的威脅日益嚴重。近年來立克次體如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人顆粒球艾利希氏體症皆引起急性高燒、淋巴結腫大等臨床症狀，有時會併發肺炎或肝功能異常。因立克次體的臨床診斷不易判定，且許多病原體的感染都會引發類似的症狀，難於區別。因此常見立克次體的誤診或延誤了正確治療時機，所以有亟需建立高靈敏、快速的核酸檢測系統，檢測出各種新興/再浮現立克次體傳染病。我們所開發立克次體快速等溫核酸增殖方法，優點為核酸增殖可在等溫條件下進行，可在極短時間完成實驗結果與判定，有利於開發出定點照護(point-of-care) 核酸檢測方法，及時幫助傳染病的防治及病人的醫療照顧。本年度計畫完成人類顆粒艾利希氏體及人類顆粒細胞無形體症建立快速等溫核酸增殖方法，該方法快速、靈敏度與專一性高，可作為重要診斷試劑之依據。

關鍵詞：恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人顆粒球艾利希氏體

二、英文摘要

Due to frequently international traffic, global warming and climate change, rickettsia infectious disease have expanded their geographical distributions and threaten the health of human population. Rickettsia such as *Orientia tsutsugamushi*, endemic typhus, human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis are caused by the absolute parasite that infects humans and animals. Rickettsia bacteria, cause acute symptoms are high fever, swollen lymph nodes and other symptoms, sometimes complicated by organ failure exception. Due to clinical diagnosis very difficult to distinguish. Therefore, the misdiagnosis or delayed Rickettsia correct timing of treatment is common.

Therefore, there is a need for establishment of a laboratory based surveillance and diagnostic system for the effective detection of unknown / emerging rickettsia spp. diseases. Therefore, this purpose of this study is to establish the isothermal nucleic acid amplification assays for detection of emerging rickettsia spp. To diagnosis the rickettsia spp. infectious diseases in the shortest time, and to improve the sensitivity and specificity of the detection system, there will be helps to quickly detect the pathogen of infectious disease, and implement the corrected medical care, surveillance, prevention and control policies. Isothermal nucleic acid amplification assays for detecting *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* have been accomplished in this study. These assays are suitable for diagnosis tool development due to its high sensitivity and specificity.

keywords : *Orientia tsutsugamushi*, endemic typhus, human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis

貳、計劃內容

一、前言

由於國際間交通往來日益頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，使得新興再浮現立克次體傳染病在全世界散佈範圍擴大，對人類健康所造成的威脅日益嚴重。其中尤以 Rickettsiaceae family 的恙蟲病(Scrub typhus)、地方性斑疹傷寒(Murine typhus)及 Anaplasmataceae family 重要的人類顆粒細胞無形體症(human granulocytic anaplasmosis)、人顆粒球艾利希氏體症傳染病(human monocytic ehrlichiosis) 傳染病最為重要。

立克次體如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人顆粒球艾利希氏體症之臨床症狀皆引起急性高燒、淋巴結腫大等臨床症狀，有時會併發肺炎或肝功能異常。和許多病原體的感染都會引發類似的症狀，例如 leptospirosis, murine typhus, malaria, dengue fever 及 viral hemorrhagic fevers 也會引起相同的徵兆及症狀，難於區別。因此常見立克次體的誤診或延誤了正確治療時機。

艾利希氏體是一種絕對細胞內寄生，為感染人畜的艾利希體立克次體。最早是在1986年發現會造成人類單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis；簡稱HME)。Human monocytic ehrlichiosis 主要是由被感染蜱叮咬所感染引起新興傳染病。*Ehrlichi* 主要感染顆粒球(嗜中性球)、單核球、紅血球及血小板等。大部份受感染的人無症狀或症狀輕微，主要症狀是發燒、頭痛、肌肉關節疼痛、腸胃道不適、肝脾腫大、淋巴結腫大、偶有出現皮膚斑疹。少數會發展成呼吸衰竭、腎衰竭、中樞神經症狀。目前在台灣對細菌嗜吞噬細胞無形體、艾利希氏體感染所引起的HGA, HME研究與臨床診斷極為有限，HGA, HME現今所面臨最大的挑戰是如何在感染的早期快速被有效診斷出使能及早治療，因此對human granulocytic anaplasmosis, human monocytic

ehrlichiosis診斷建置一個簡單又有效的快篩檢測系統亟為重要。

細菌嗜吞噬細胞無形體 (*Anaplasma phagocytophilum*) 是一種絕對細胞內寄生細菌，主要是由被感染蜱叮咬所感染引起新興傳染病 human granulocytic anaplasmosis (HGA)，*Anaplasma phagocytophilum* 不只會感染人也會感染家畜(馬、狗、牛、羊等)，在2006年大陸安徽省也曾發現 HGA 也能經由感染的血液或呼吸懸浮造成院內感染。*Anaplasma phagocytophilum* 感染所引起的臨床症狀與一般細菌或病毒感染症狀極為類似，會出現發燒、頭痛、肌肉痛、不舒服、冷顫、腹痛、咳嗽、出現皮膚紅疹、白血球減少症或血小板減少症等。其臨床症狀與某些病毒性疾病相似，亦容易發生誤診。HGA 若沒有及時給予正確治療將會導致嚴重的呼吸困難、出血、多重器官衰竭、腦神經病變等。

雖然 real time-qPCR 可用來檢測立克次體，但其缺點是 real time-qPCR 反應進行時需要一個能升降溫度的儀器，而且往往需要較長的時間進行核酸擴增反應。另一種常見的等溫核酸檢測的方法為 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)，能夠在恆溫條件下(約 60-65°C)，快速擴增核酸。需設計4至6個特殊Primers，並利用 Bst DNA polymerase 具有強的 strand displacement activity 特性進行核酸擴增反應，此種反應稱之為 strand displacement DNA synthesis。因為在 LAMP 反應過程沒有 DNA denaturation 步驟，與傳統的 PCR 反應不同，所以在恆溫下即可進行反應。目前 LAMP 已應用於各種微生物和病原體的檢測。本計畫將利用等溫核酸檢測技術應用於立克次體傳染病之偵測，對疑似病患進行檢驗，並研發使提高試驗的靈敏度及專一性，應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，將有助於快速檢測出傳染病種類，提早進行防疫措施，對病人實施正確的醫療照顧，對新興立克次體傳染病的監測與防治具有極大的幫助，作為未來研究及防疫政策的

重要参考。

二、材料與方法

(一) LAMP 方法

1. **血清及全血檢體及病毒株來源**:血清檢體來源為通報自疾管署之各種立克次體感染之血清及全血，全部檢體（血清或全血 3c.c.），以保持低溫之國內快捷郵件寄送或由專人親送方式送達實驗室。而實驗室於收到檢體後立即置於 4°C 冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。各種菌株毒之來源為購自 ATCC、由其他實驗室取得或自行分離建立的病毒株。
2. **新興立克次體分離法**:檢體為病患急性期(1~7 病日)含 heparin(10U/mL)之全血，分離出周邊血液單核細胞(PBMC)，再將其接種至 L929 或 HL60 細胞株 (shell-vial 細胞培養瓶)。每隔 3~4 天更換培養基，並觀察是否有細胞病變發生，並以間接免疫螢光法偵測是否有立克次體生長。2 週後若無新興立克次體生長，則將細胞凍解 3 次後再行細胞株接種 1-2 次。所有實驗過程應於 P3 實驗室生物安全操作台內操作，慎防感染自己及他人。培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素。
3. **血液標本及細胞培養製備新興立克次體核酸**:首先將含抗凝血劑之全血檢體加入 4 mL 10X PBS 洗滌，接著緩慢加入 5 mL Ficoll-paque (Amersham Bioscience, Sweden, Cat. No. 17-1440-02)，離心 2500xg 25 分鐘，取上清液加入 6 mL 10X PBS 洗滌，離心 2000xg 10 分鐘，丟棄上清液，以細胞培養液回溶後即完成檢體前處理步驟。取前一步驟完成前處理檢體 200 μ l，以 QIAmp DNA blood Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 51106) 萃取出立克次體細胞內核酸。分別加入 20 μ l Proteinase K 與 200 μ l Lysis buffer (AL) 放入 1.5 mL 離心管，震盪混合，56 °C 水浴槽靜置 10 分鐘。加入 200 μ l 96-100% 乙醇震盪均勻混合，以抽氣方式通過含矽土-膠膜的管柱

(Column)，檢體中核酸會結合於膜上。加入清洗液 (AW1) 750 μ l，抽氣一分鐘，清洗膜上所吸附的雜質，重複本動作三次。再以清洗液 (AW2) 750 μ l 作第二次清洗，抽氣一分鐘，重複兩次。完成抽氣後在抽氣一分鐘，徹底去除膜上所殘留的酒精。最後將管柱放在新的 1.5 mL 離心管上，加入 75 μ l 萃取液 (AE) 靜置 10 分鐘，以 8000xg 離心轉速離心 1 分鐘，離心管中的液體即為欲萃取之核酸。

4. 引子(Primer)的設計與合成：依 LAMP 原理設計立克次體傳染病專一性引子以檢測 Anaplasmataceae family 重要的人類顆粒細胞無形體症(human granulocytic anaplasmosis)、人類粒球艾利希氏體症傳染病(human monocytic ehrlichiosis) 等重要立克次體病原。針對 human monocytic ehrlichiosis ntrX、human granulocytic anaplasmosis hsp70 基因片段進行引子設計。

5. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)：LAMP 是一種能夠在恆溫條件下(60-65 ° C)快速擴增核酸的方法。需設計 4 至 6 個 Primers，包括兩個 outer、兩個 inner 和兩個 loop primers，6 primers 需認識 target sequence 上的 8 個位置，Primer 的設計可採用 LAMP 設計軟體 (Eiken, Japan, <http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>)。Primer 名稱如下：

Forward outer primer (F3), backward outer primer (B3)，forward inner primer (FIP) and backward inner primer(BIP)，forward loop primer (FLP) 及 backward loop primer (BLP)。FIP 包含 F1c 和 F2，BIP 包含 B1c 和 B2，FIP 及 BIP primers 需經 HPLC 純化。FLP 和 BLP primers 包含 complementary to the sequence between F1&F2 and B1&B2 regions。LAMP 擴增反應稱為 strand displacement DNA synthesis，是由於 Bst DNA polymerase 具有強的 strand displacement activity。在 LAMP 反應過程不需 DNA denaturation 步驟，故可在恆溫下進行反應。另外，將以實驗

室所建立的 plasmid(ntrX、Hsp70)及從實驗室培養的立克次體中萃取 DNA 作為對照組，並進行確效評估及比較方法的靈敏度與專一性。

6. LAMP 產物之偵測：以螢光染劑、DNA 電泳、real-time fluorescence 方法偵測產物，以了解其方法的偵測極限。

(二) 螢光定量 PCR 方法

1. 引子(Primer)的設計與合成：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版 DNA 序列，引子(Primer)的設計與合成將依不同抗原選定，進行聚合酶鏈鎖反應以新興立克次體基因為 template，設計不同的 primers 加入反應試劑內，進行 PCR 反應。取 1 μ l 立克次體 genomic DNA 加入含有 2X buffer Mix(50mM KCl、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、dNTP mixture 1mM)、5 units *Taq* polymerase 共 50 μ l，於 94 $^{\circ}$ C 變性(denature)10 分鐘後，以 94 $^{\circ}$ C：30 秒、60 $^{\circ}$ C：30 秒、72 $^{\circ}$ C：1 分鐘，進行 30 次反應 (上述反應依不同 primer 特性而有不同的溫度及反應 設定)，最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘。經 PCR 增幅放大之片段，須以 DNA 電泳確認產物大小,DNA sequencing 定序基因。針對 human monocytic ehrlichiosis ntrX、human granulocytic anaplasmosis hsp70 基因片段進行引子設計。

2. SYBR Green 即時螢光定量反轉錄酶／聚合酶鏈鎖反應 (SYBR Green Real-time RT-PCR)：利用 One-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR，詳細的檢驗方法如前所述(15)：(1)使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μ l。再進行 SYBR Green one-step qPCR 反應：50 $^{\circ}$ C RT 作用 30 分鐘，PCR 作

用 95°C 15 分鐘，40 至 50 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 20 秒、77°C 30 秒（讀取螢光值）。另外，以 plasmid (ntrX、Hsp70) 及培養的立克次體中萃取的 DNA 作為對照組，並進行確效及比較方法的靈敏度與專一性。

- 3. 熔點曲線分析(Melting curve analysis)：**real time-PCR 反應完成後，再進行熔點曲線分析：95°C, 1 分鐘、68°C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5°C/30 秒/循環。

三、結果

1. 人類顆粒球艾利希氏體傳染病與人類顆粒細胞無形體症的 LAMP 系統之引子設計與合成：

Table 1 所示為針對人類顆粒球艾利希氏體與人類顆粒細胞無形體所設計之引子組。

- (a) 設計一組新穎的 *Ehrlichia chaffeensis* (EC) LAMP 引子組，target 為 NtrX，針對人類顆粒球艾利希氏之偵測(**Table 2**)。
- (b) 設計一組新穎的 *Anaplasma phagocytophilum* (AP) LAMP 引子組，target 為 Hsp70，針對人類顆粒細胞無形體之偵測(**Table 4**)。

2. 人類顆粒球艾利希氏體 LAMP 對人類顆粒球艾利希氏體菌株之敏感性測試

(a) 檢測 LAMP 敏感性，以 6.15 ng *Ehrlichia chaffeensis* 核酸進行 10 倍序列稀釋，進行 LAMP 測試，檢測之靈敏度為 6.15 pg。**(Fig. 1A)**。

(b) 核酸放大產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 20 分鐘內增殖**(Fig. 1B)**。

(c) 以 LAMP L3 及 B3 2 條 primer 進行 Qiagen Quanti Nova SYBR Green 於 Roche Light Cycler 480 進行即時螢光偵測 PCR，結果 qPCR 的 LOD 可偵測到 8.7 pg 的核酸**(Fig. 1C)**。

(d) qPCR 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 50 個 cycle 內增殖**(Fig. 1D)**。

3. 人類顆粒球艾利希氏體 LAMP 對 pCR2.1-ntrX plasmid 之敏感性測試

建置帶有 ntrX 目標核酸片段的 pCR2.1 plasmid，用以進行敏感性測試。

- (a) pCR2.1-ntrX plasmid 從 10^6 copy 進行十倍稀釋至 1 copy，再進行即時 LAMP 測試，結果顯示 LAMP 系統對 pCR2.1-ntrX plasmid 的 limit of detection (LOD)可偵測到約 10 個 copy 的核酸(Fig. 2A)。
- (b) 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 15 分鐘內增殖(Fig. 2B)。
- (c) 以 LAMP L3, B3 2 條 primer 進行 Qiagen Quanti Nova SYBR Green 於 Roche Light Cycler 480 進行即時螢光偵測 PCR，結果 qPCR 的 LOD 可偵測到 10 個 copy 的核酸(Fig. 3A)。
- (d) 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 50 個 cycle 內增殖(Fig. 3B)。

4. 人類顆粒球艾利希氏體 LAMP 及 qPCR 引子組之專一性測試

- (a) 萃取多種立克次體 (*R.typhi*、*R.prowazekii*、*O.tsutsugamushi*、*R.rickettsii*、*R.felis*、*R.conorii*、*R.japonica*、*A.phagocytophilum* 與 *E.chaffeensis*)的核酸(Lanes 1 to 10)進行測試，每個反應加入 0.7 ng 核酸進行 LAMP 測試，LAMP 系統只專一性的放大 *E. chaffeensis*，結果顯示 LAMP 具高專一性(Fig. 4A)。
- (b) *E. chaffeensis* 核酸產物會在 6.8 分鐘開始增幅 (Fig. 4B)。
- (c) *E. chaffeensis* 核酸產物可清楚見於 2% 洋菜膠上(Fig. 4C)。
- (d) qPCR 系統也只專一性的放大 *E. chaffeensis*，結果顯示 qPCR 具高專一性(Fig. 5A)。
- (e) qPCR 所放大的 *E. chaffeensis* 核酸產物可清楚見於 2% 洋菜膠上(Fig. 5B)。

5. 所開發之人類顆粒球艾利希氏體 LAMP 進行臨床檢體測試

Table 3 所示為測試臨床檢體資料與試驗結果統整

- (a) 測試檢體來源為民國 107 年疑似恙蟲病送驗檢體共 33 個，16 個經 qPCR 與 LAMP 確認為陽性，17 個 qPCR 陰性。
- (b) 結果 16/16 個 qPCR 陽性檢體可被 LAMP 驗出，0/17 陰性檢體皆未驗出。結果顯示 LAMP 對於臨床檢體之敏感性約為 100% (16/16)，具有高度試劑發展潛力。

6. 人類顆粒細胞無形體症 LAMP 對人類顆粒細胞無形體菌株之敏感性測試

- (a) 檢測 LAMP 敏感性，以 10 ng *Anaplasma phagocytophilum* 核酸進行 10 倍序列稀釋，進行 LAMP 測試，檢測之靈敏度為 1 pg。(Fig. 7A)。
- (b) 核酸放大產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 40 分鐘內增殖(Fig. 7B)。
- (c) 以 LAMP L3 及 B3 2 條 primer 進行 Qiagen Quanti Nova SYBR Green 於 Roche Light Cycler 480 進行即時螢光偵測 PCR，結果 qPCR 的 LOD 可偵測到 8.7 pg 的核酸(Fig. 7C)。
- (d) qPCR 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 40 個 cycle 內增殖(Fig. 7D)。

7. 人類顆粒細胞無形體症 LAMP 及 qPCR 對 pCR2.1-hsp70 plasmid 之敏感性測試

建置帶有 hsp70 目標核酸片段的 pCR2.1 plasmid，用以進行敏感性測試。

- (a) pCR2.1-hsp70 plasmid 從 10^6 copy 進行十倍稀釋至 1 copy，再進行即時 LAMP 測試，結果顯示 LAMP 系統對 pCR2.1-hsp70 plasmid 的 limit of detection (LOD) 可偵測到約 100 個 copy 的核酸(Fig. 8A)。產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可 30 分鐘內增殖(Fig. 8B)。
- (b) 以 LAMP L3, B3 2 條 primer 進行 Qiagen Quanti Nova SYBR Green 於 Roche Light Cycler 480 進行即時螢光偵測 PCR，結果 qPCR 的 LOD 可偵測到 100 個 copy 的核酸(Fig. 8C)。
- (c) 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 45 個 cycle 內增殖 (Fig. 8D)。

8. 人類顆粒細胞無形體症 LAMP 及 qPCR 引子組之專一性測試

- (a) 萃取多種立克次體 (*R.typhi*、*R.prowazekii*、*O.tsutsugamushi*、*R.rickettsii*、*R.felis*、*R.conorii*、*R.japonica*、*A.phagocytophilum* 與 *E.chaffeensis*) 的核酸(Lanes 1 to 10) 進行測試，每個反應加入 0.7 ng 核酸進行 LAMP 測試，LAMP 系統只專一性的放大 *A. phagocytophilum*，結果顯示 LAMP 具高專一性(Fig. 9A)。
- (b) *A. phagocytophilum* 核酸產物會在 17.5 分鐘開始增幅 (Fig. 9B)。
- (c) *A. phagocytophilum* 核酸產物可清楚見於 2% 洋菜膠上 (Fig. 9B)。
- (d) qPCR 系統也只專一性的放大 *A. phagocytophilum*，結果顯示 qPCR 具高專一性(Fig. 9C)。
- (e) qPCR 所放大的 *A. phagocytophilum* 核酸產物可清楚見於

2% 洋菜膠上(Fig. 9D)。

9. 所開發之人類顆粒細胞無形體症 LAMP 進行臨床檢體測試

Table 5 所示為測試臨床檢體資料與試驗結果統整

- (a) 測試檢體來源為民國 108 年疑似恙蟲病送驗檢體共 88 個，其中 4 個經 qPCR 與 LAMP 確認為人類顆粒細胞無形體症陽性，84 個 qPCR 為陰性。
- (b) 結果 4/4 個 qPCR 陽性檢體可被 LAMP 驗出，0/84 陰性檢體皆未驗出。結果顯示 LAMP 對於臨床檢體之敏感性約為 100% (4/4)，具有高度試劑發展潛力。

10. 人類顆粒細胞無形體症之血清學檢驗

- (a) 利用免疫螢光染色法確認 qPCR 所檢驗出之其中一位病患，其血清中在恢復期具有人類顆粒細胞無形體症 IgG 抗體，且比其急性期血清抗體高四倍，因此可確認為人類顆粒細胞無形體症感染(Fig. 10A)。
- (b) 利用西方墨點法，確認三位病患血清內皆具有抗人類顆粒細胞無形體症 msp2 之抗體 (Fig. 10B)。
- (c) 人類顆粒細胞無形體症 msp2 ELISA 結果也顯示病患血清中具有抗人類顆粒細胞無形體症 msp2 之抗體 (Fig. 10C)。

四、討論

本計畫的目標在建立等溫核酸檢測技術，應用於新興立克次體傳染病之偵測。LAMP 與 real-time qPCR 兩種核酸檢測方法，約可在 1.5 小時內完成核酸增殖反應，若配合螢光檢測儀器，則可以即時偵測結果。未來配合核酸純化方法的開發，將可以發展出高靈敏度、高專一性之 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑。本研究也開發出第一個專門針對人類艾利希氏體傳染病的 LAMP 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在 10 copy/reaction 之間並能在 40 分鐘內進行增幅反應，對於臨床檢體，LAMP 具有高敏感度。最後，本研究也開發出針對人類顆粒細胞無形體症的 LAMP 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在 100 copy/reaction 之間並能在 40 分鐘內進行增幅反應，對於臨床檢體，LAMP 具有高敏感度。未來將繼續改良引子、試劑、反應濃度、溫度及檢體製備等，發展核酸增殖反應之最適化條件並應用於臨床檢驗。此外，所開發之 LAMP primer 也可應用於 qPCR 方法。未來我們也將進一步積極開發針對此類新興立克次體之分子診斷方法，希望及時篩檢出病原體，有效降低傳染病在臺灣的流行。未來仍應持續對本土及境外移入立克次體進行篩檢，使國人免於受傳染病之威脅。

五、結論與建議

在全球氣候變遷的環境下，各種新興及再浮現傳染病對人類健康所造成的威脅日益嚴重，立克次體傳染病在世界各地散佈情形也正急速增加，因此建立一套完整的立克次體傳染病快速檢驗系統，監測台灣地區已知存在及未來可能會侵入的立克次體傳染病是十分重要。本年度計畫已成功開發出可偵測人類顆粒球艾利希氏體、人類顆粒細胞無形體症的等溫核酸檢測 LAMP 方法及 real-time qPCR 方法，具有高度專一性與敏感性，LAMP 較現行之 qPCR 方法有更高或相同的敏感性。未來可進一步發展為 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑組，應用於醫療及監測，一旦發現傳染病，可及時實施防治工作，有效降低傳染病的流行，解決公共衛生上的危機。未來仍應持續監測臺灣本土及境外移入立克次體傳染病原體，並持續精進新興立克次體等病原體之檢測工具，使國人免於受立克次體傳染病之威脅。

六、計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

我們開發出人類顆粒球艾利希氏體、人類顆粒細胞無形體等溫核酸檢測方法(LAMP 所用之 primer 也可應用於 qPCR 方法)。未來可發展為 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑，應用於偏遠地區之醫療及監測。我們也藉由所開發之方法，首次確認感染人類顆粒球艾利希氏體與人類顆粒細胞無形體之病患。未來我們也將開發不同新興立克次體等溫核酸檢測方法，具簡易操作、可及時篩檢出病原體，有效降低傳染病的擴散及流行以利進行防疫措施。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、實施病人自我管理、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現因立克次體感染而發燒患者，減少境外移入的引進及本土擴散。對於非特異性、無症狀之患者，能及早進行篩檢診斷，避免病患延誤就醫減少惡性病情發展。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於國際間交通往來頻繁、氣候變遷等因素，各種人畜共通傳染病如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、發熱伴血小板減少綜合症、斑點熱、人類顆粒細胞無形體、艾利希氏體症、病蜱媒腦炎病毒等已成為目前全球公共衛生防疫上的重大問題，建議應積極加強境外及本土人畜共通傳染病之監測。

七、参考文献

1. Wilson ME, Weld LH, Boggild A, Keystone JS, Kain KC, von Sonnenburg F, Schwartz E; GeoSentinel Surveillance Network. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin Infect Dis.* 2007 Jun 15;44(12):1560-8.
2. Wilson ME, Freedman DO. Etiology of travel-related fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2007 Oct;20(5):449-53. Review.
3. Kievits, T., B. van Gemen, D. van Strijp, R. Schukkink, M. Dircks, H. Adriaanse, L. Malek, R. Sooknanan, P. Lens. 1991. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol. Methods* 35:273–286.
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12):E63.
5. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10:694-719, 1997
6. Saisongkroh W, Chenchittikul M, Silpapojakul K. Evaluation of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus among patients with acute pyrexia of unknown origin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98:360-366, 2004.
7. Hanaoka N, Matsutani M, Satoh M, Ogawa M, Shirai M, Ando S. Development of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Detection of Rickettsia spp. *Jpn J Infect Dis.* 2017 Jan 24;70(1):119-123
8. Dittrich S, Castonguay-Vanier J, Moore CE, Thongyoo N, Newton PN, Paris DH. Loop-mediated isothermal amplification for Rickettsia typhi (the causal agent of murine typhus): problems with diagnosis at the limit of detection. *J Clin Microbiol.* 2014 Mar;52(3):832-8.

9. Pan L, Zhang L, Wang G, Liu Q. Rapid, simple, and sensitive detection of the ompB gene of spotted fever group rickettsiae by loop-mediated isothermal amplification. BMC Infect Dis. 2012 Oct 11;12:254
10. Blacksell SD, Paris DH, Chierakul W, Wuthiekanun V, Teeratakul A, Kantipong P, Day NP.
11. Prospective evaluation of commercial antibody-based rapid tests in combination with a loop-mediated isothermal amplification PCR assay for detection of Orientia tsutsugamushi during the acute phase of scrub typhus infection. Clin Vaccine Immunol. 2012 Mar;19(3):391-5.
12. Paris DH, Blacksell SD, Nawtaisong P, Jenjaroen K, Teeraratkul A, Chierakul W, Wuthiekanun V, Kantipong P, Day NP. Diagnostic accuracy of a loop-mediated isothermal PCR assay for detection of Orientia tsutsugamushi during acute Scrub Typhus infection. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Sep;5(9):e1307
13. Paris DH, Blacksell SD, Newton PN, Day NP. Simple, rapid and sensitive detection of Orientia tsutsugamushi by loop-isothermal DNA amplification. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008 Dec;102(12):1239-46.
14. Li HT¹, Sun LS¹, Chen ZM¹, Hu JS¹, Ye CD¹, Jia K¹, Wang H¹, Yuan LG¹, Zhang GH¹, Li S Detection of Anaplasma platys in dogs using real-time loop-mediated isothermal amplification. Vet J. 2014 Mar;199(3):468-70.
15. Pinhanelli VC, Costa PN, Silva G, Aguiar DM, Silva CM, Fachin AL, Marins M. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Ehrlichia canis DNA in naturally infected dogs using the p30 gene. Genet Mol Res. 2015 Dec 22;14(4):17885-92.
16. Muangchuen A, Chaumpluk P, Suriyasomboon A, Ekgasit S. Colorimetric

detection of Ehrlichia canis via nucleic acid hybridization in gold nano-colloids. Sensors (Basel). 2014 Aug 8;14(8):14472-87

17. Nakao R, Stromdahl EY, Magona JW, Faburay B, Namangala B, Malele I, Inoue N, Geysen D, Kajino K, Jongejan F, Sugimoto C Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of Ehrlichia ruminantium. BMC Microbiol. 2010 Nov 19;10:296

八、圖、表

Table 1. LAMP primer sets for detecting *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*.

Primer Name	Sequence (5'-3')
EC - F3	TGCCGGTAGATATAGTATCGA
EC - B3	ATTTGCGATGAAGTGCGG
EC - FIP	GTGCTTGGCGAAGAGGAACA-ATTCTCCTATCAATGATGTTCTG
EC - BIP	TGAAAACCTCAGTTGTCACGTTTTG-TCCATACCAACAAATTCAGC
EC - LF	GATATGACTTTAGCA
EC - LB	GAGGTAATGTGTCA
AP-F3	CTGTAGGTGCTGCGATAC
AP-B3	ATCTTCAGCCGTAGAGAAC
AP-FIP	TACCCAAAGATAGCGGAGCAAC-GTATCTTAACAGGTGATGTTCCG
AP-BIP	AACTTTGGGTGGTGTATTTACGC-CCTGCGACTTCTTAGTAGGA
AP-LF	ACTACAGAACAACAACC
AP-LB	GATTGAGCGTAATAC

Table. 2 The *Ehrlichia chaffeensis* ntrX gene indicating names and binding sites of primer for LAMP.

```

1      TGCCGGTAG ATATAGTATC GAATTCTCCT ATCAATGATG TTCTGAGTGC 49
      LF      F1c
50     TAAAGTCATA TCTGTTCCCTC TTCGCCAAGC ACGTGAGGAG TTTGAAAGAC 99
      B1c      LB
100    AGTATTTGAA AACTCAGTTG TCACGTTTTG GAGGTAATGT GTCAAAAACT 149
      B2      B3
150    GCTGAATTTG TTGGTATGGA GCGTTCCGCA CTTCATCGCA AAT 192

```

NtrX

Primer	Sequence (5'-3')
F3	TGCCGGTAGATATAGTATCGA
B3	ATTTGCGATGAAGTGCGG
FIP (F1c-F2)	GTGCTTGCCGAAGAGGAACA-ATTCTCCTATCAATGATGTTCTG
BIP (B1c-B2)	TGAAAACTCAGTTGTCACGTTTTG-TCCATACCAACAAATTCAGC
LF	GATATGACTTTAGCA
LB	GAGGTAATGTGCA

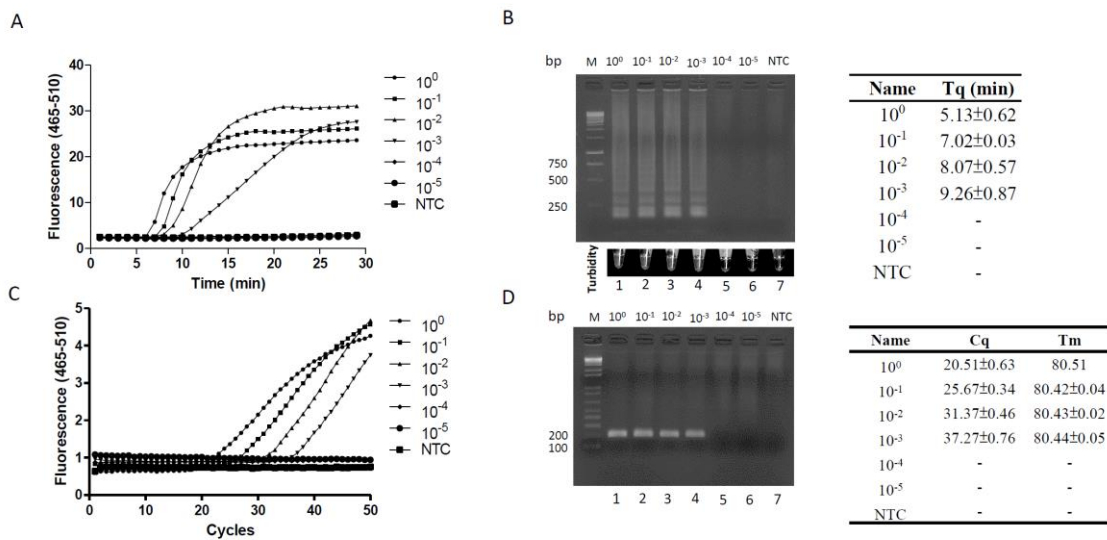


Figure 1. Comparison of the detection limit of ntrX LAMP and qPCR for cultured *Ehrlichia chaffeensis*.

(A-B) Sensitivity of the LAMP assay was monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (C-D) The L3 and B3 primers from LAMP were used for real-time qPCR. The PCR product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

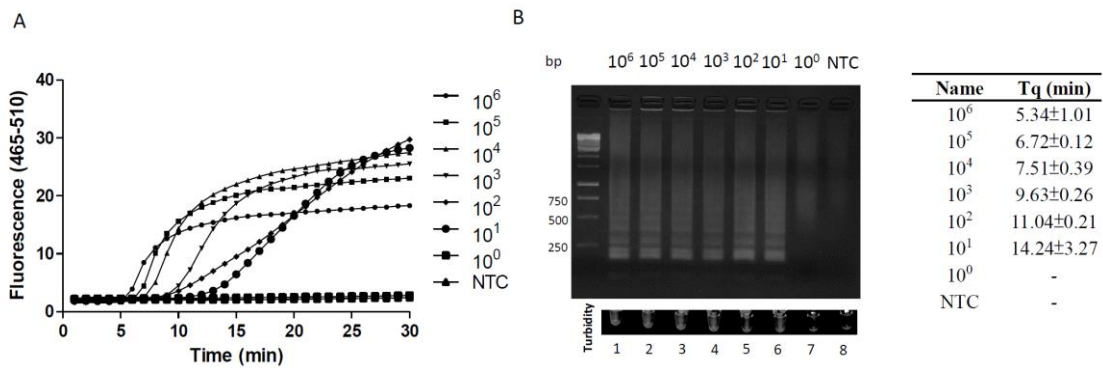


Figure 2. Limit of the detection of ntrX LAMP for recombinant plasmid containing target sequence of ntrX gene.

(A) Serially diluted plasmid (10^6 to 10^0 copies/reaction) were used to evaluate the limit of detection of LAMP assay. Sensitivity of the LAMP assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

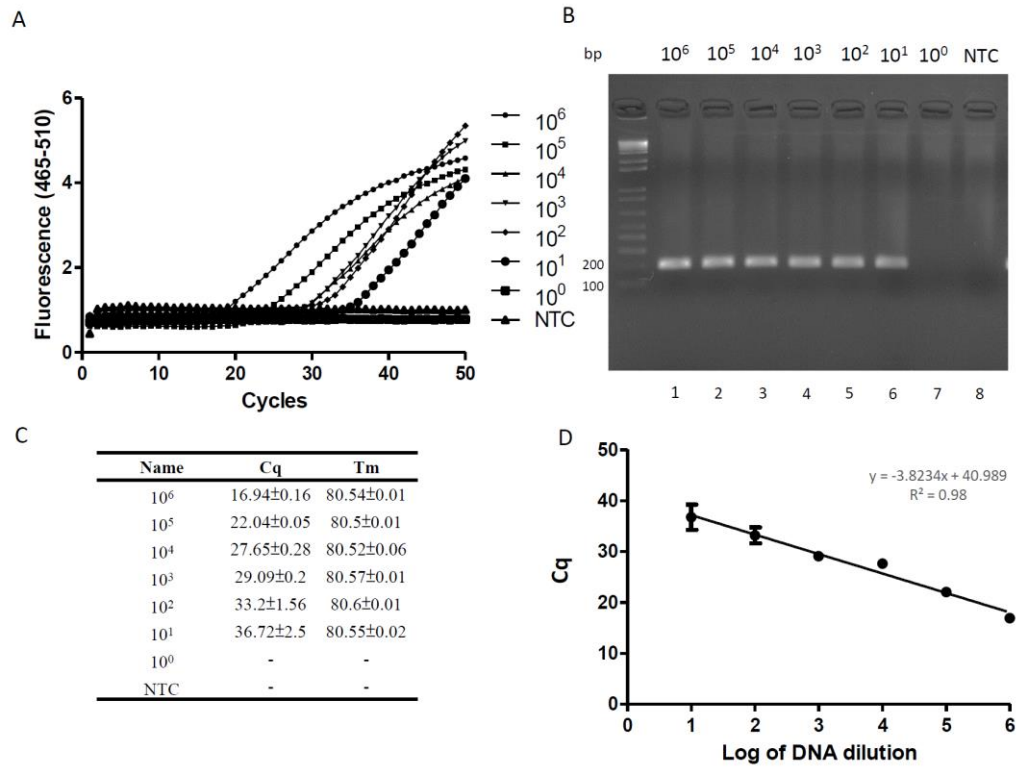


Figure 3. Limit of the detection of ntrX qPCR for recombinant plasmid containing target sequence of ntrX gene.

(A) Serially diluted plasmid (10^6 to 10^0 copies/reaction) were used to evaluate the limit of detection of real-time qPCR assay. Sensitivity of the real-time qPCR assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

(C) The Cq and Tm results of real-time qPCR. (D) qPCR standard curve.

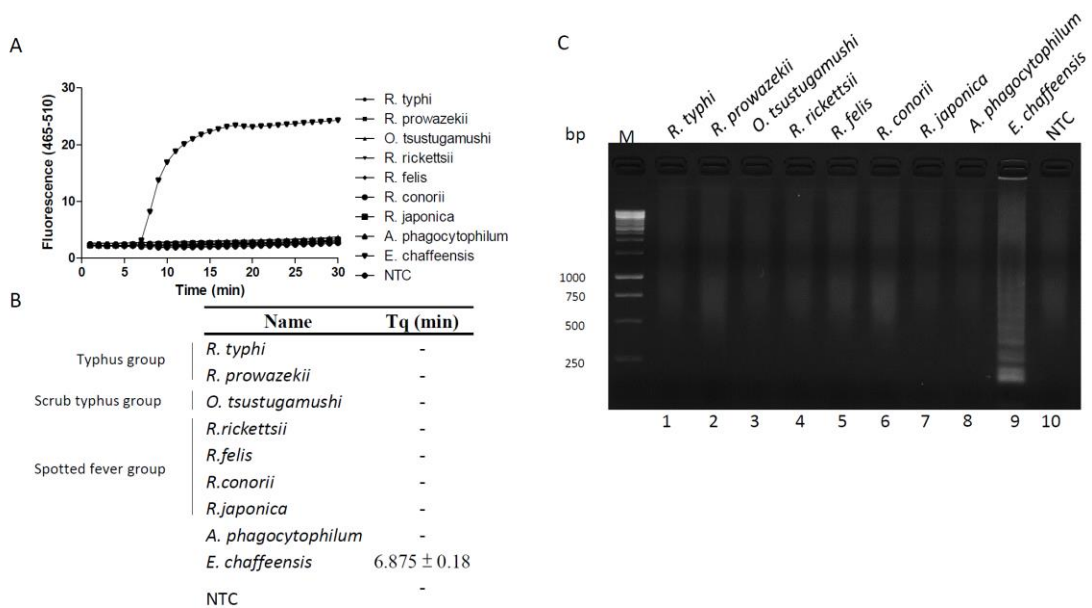


Figure 4. ntrX LAMP specifically detect *Ehrlichia chaffeensis* but not the other members of Rickettsiales.

(A) DNA from different members of Rickettsiales including *R. typhi*, *R. prowazekii*, *O. tsutsugamushi*, *R. rickettsia*, *R. felis*, *R. conorii*, *R. japonica*, *A. phagocytophilum* and *E. chaffeensis* were used to evaluate the specificity of the LAMP assay. The LAMP assay was monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) Quantitative time of the amplification by LAMP (C) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

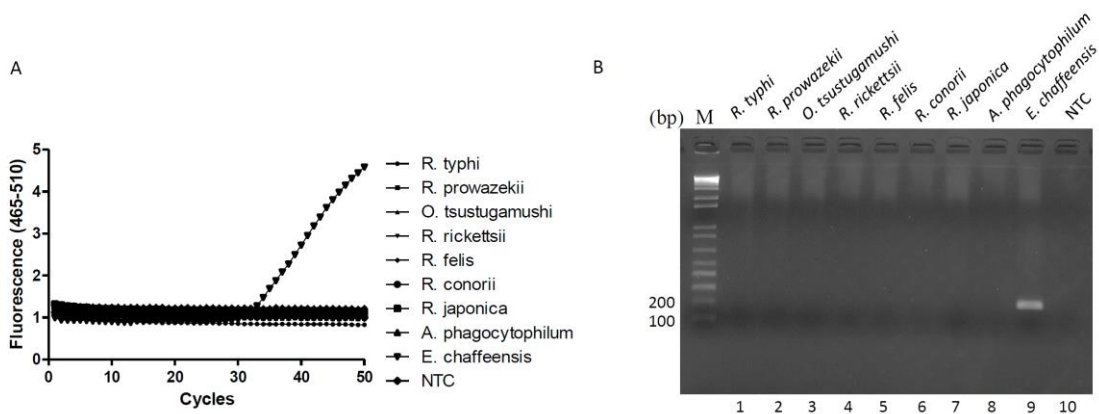


Figure 5. *nrX* real-time qPCR specifically detect *Ehrlichia chaffeensis* but not the other members of Rickettsiales.

(A) DNA from different members of Rickettsiales including *R. typhi*, *R. prowazekii*, *O. tsutsugamushi*, *R. rickettsia*, *R. felis*, *R. conorii*, *R. japonica*, *A. phagocytophilum* and *E. chaffeensis* were used to evaluate the specificity of the real-time qPCR assay. The real-time qPCR was monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

Table. 3 List of *Ehrlichia chafeensis* infected samples, Taiwan, 2017

	檢體編號	居住地	性別	年齡	發病日	qPCR	LAMP	IgG IFA 一採	IgG IFA 二採
1	L070913	花蓮縣花蓮市	F	71	2	+	+	1:128	NA
2	L070923	台中市清水區	M	53	6	+	+	<1:64	NA
3	L070931	新北市三重區	F	23	1	+	+	<1:64	NA
4	L070957	台北市大安區	F	22	11	+	+	<1:64	NA
5	L071005	新北市新莊區	M	62	4	+	+	<1:64	1:64
6	L071010	彰化縣彰化市	F	47	1	+	+	1:64	NA
7	L071027	台南市柳營區	M	26	7	+	+	1:64	NA
8	L071035	新北市樹林區	M	41	5	+	+	<1:64	NA
9	L071049	台中市潭子區	F	37	9	+	+	<1:64	1:64
10	L071050	宜蘭縣礁溪鄉	M	68	23	+	+	<1:64	NA
11	L071055	台中市南屯區	M	48	11	+	+	<1:64	NA
12	L071057	彰化縣二林鎮	M	58	9	+	+	<1:64	NA
13	L071068	台南市南區	M	20	2	+	+	1:256	NA
14	L071070	彰化縣員林市	M	35	6	+	+	<1:64	NA
15	L071077	彰化縣二林鎮	F	61	9	+	+	<1:64	NA
16	L071164	高雄市武仁區	M	52	7	+	+	<1:64	NA
17	L071004	高雄市鳳山區	F	61	16	-	-	<1:64	<1:64
18	L071006	台北市內湖區	F	57	9	-	-	<1:64	NA
19	L071007	高雄市鳳山區	M	32	6	-	-	<1:64	<1:64
20	L071012	桃園市觀音區	F	35	1	-	-	<1:64	NA
21	L071013	新北市新莊區	F	75	2	-	-	<1:64	NA
22	L071014	花蓮縣壽豐鄉	M	44	2	-	-	<1:64	<1:64
23	L071015	新北市永和區	M	53	2	-	-	<1:64	<1:64
24	L071017	台東縣關山鎮	M	69	5	-	-	<1:64	NA
25	L071020	高雄市桃源區	M	45	6	-	-	<1:64	<1:64
26	L071025	金門縣金沙鎮	M	89	6	-	-	<1:64	<1:64
27	L071028	台北市北投區	M	76	9	-	-	<1:64	NA
28	L071030	屏東縣春日鄉	F	70	8	-	-	<1:64	NA
29	L071031	雲林縣古坑鄉	F	24	26	-	-	<1:64	NA
30	L071036	新北市新莊區	F	67	4	-	-	<1:64	NA
31	L071037	新北市新莊區	F	51	5	-	-	<1:64	NA
32	L071039	台東縣太麻里鄉	M	52	11	-	-	<1:64	NA
33	L071042	花蓮縣光復鄉	F	66	2	-	-	<1:64	NA

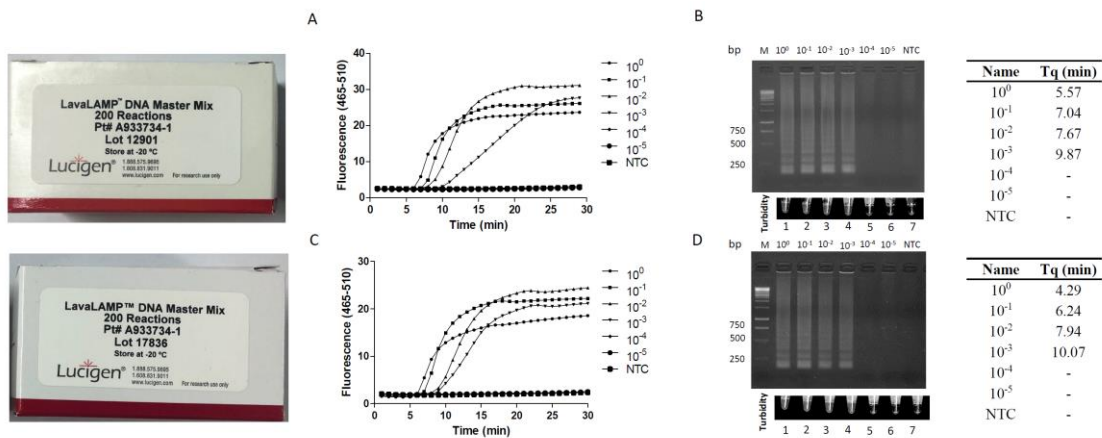


Figure 6. Different lot of the LAMP kit show similar sensitivity.

(A and C) Sensitivity of the LAMP assay was monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B and D) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

Table. 4 The *Anaplasma phagocytophilum* hsp70 gene indicating names and binding sites of primer for LAMP.

```

      F3                               F2
1  CTGTAGGTGCTGCGATACAGGGTGGTATCTTAACAGGTGATGTTC 45
      LF                               F1c
46 GTGATGTCTTGTGTTGGATGTTGCTCCGCTATCTTTGGGTATAG 90
      B1c                               LB
91 AAAC TTTGGGTGGTGTATTTACGCCTTTGATTGAGCGTAATACTA 135
      B2                               B3
136 CAATTCCTACTAAGAAGTCGCAGGTGTTCTCTACGGCTGAAGAT 179

```

HSP70 (179 bp)

Primer	Sequence (5'-3')
F3	CTGTAGGTGCTGCGATAC
B3	ATCTTCAGCCGTAGAGAAC
FIP (F1c-F2)	TACCCAAAGATAGCGGAGCAAC-GTATCTTAACAGGTGATGTTCG
BIP (B1c-B2)	AACTTTGGGTGGTGTATTTACGC-CCTGCGACTTCTTAGTAGGA
LF	ACTACAGAACAACAACC
LB	GATTGAGCGTAATAC

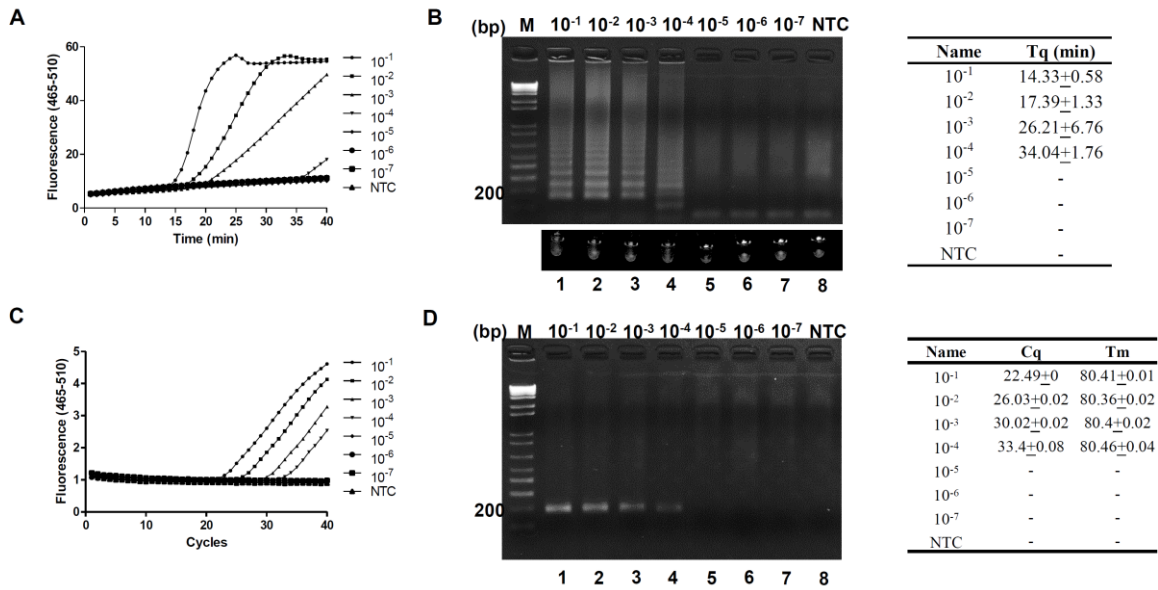


Figure 7. Comparison of the detection limit of hsp70 LAMP and qPCR for cultured *Anaplasma phagocytophilum*.

(A-B) Sensitivity of the LAMP assay was monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (C-D) The L3 and B3 primers from LAMP were used for real-time qPCR. The PCR product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

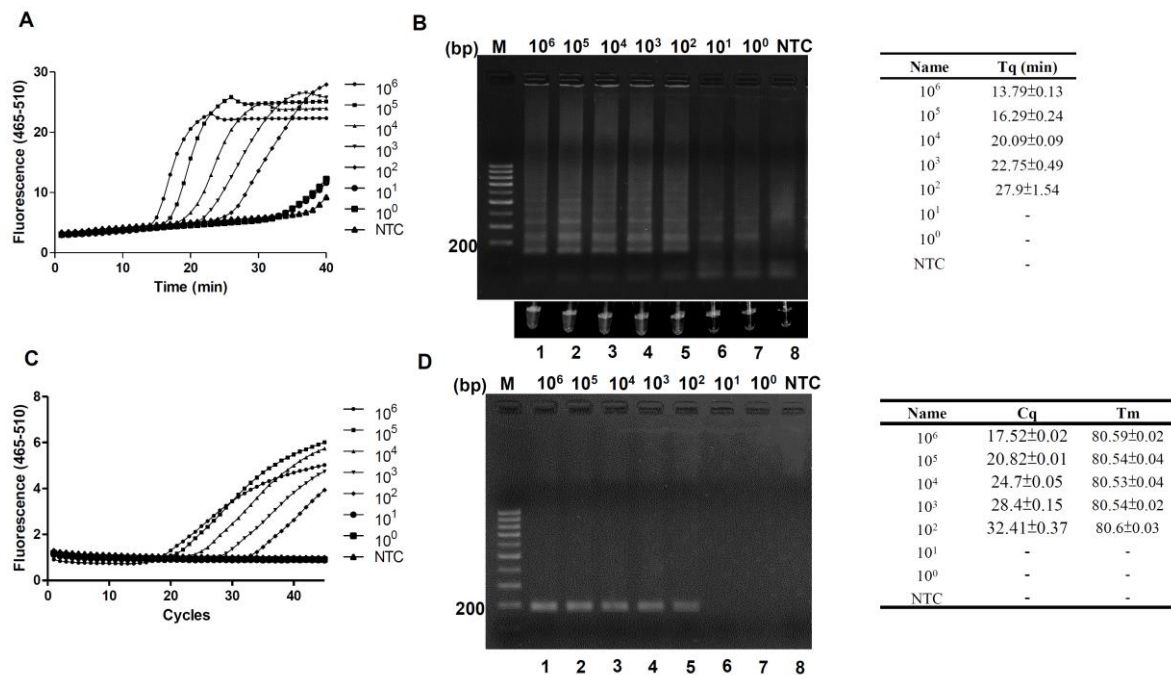


Figure 8. Limit of the detection of hsp70 LAMP and real-time qPCR for recombinant plasmid containing target sequence of *Anaplasma phagocytophilum* hsp70 gene.

(A) Serially diluted plasmid (10⁶ to 10⁰ copies/reaction) were used to evaluate the limit of detection of LAMP assay. Sensitivity of the LAMP assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (C) Serially diluted plasmid (10⁶ to 10⁰ copies/reaction) were used to evaluate the limit of detection of real-time qPCR assay. Sensitivity of the real-time qPCR assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (D) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

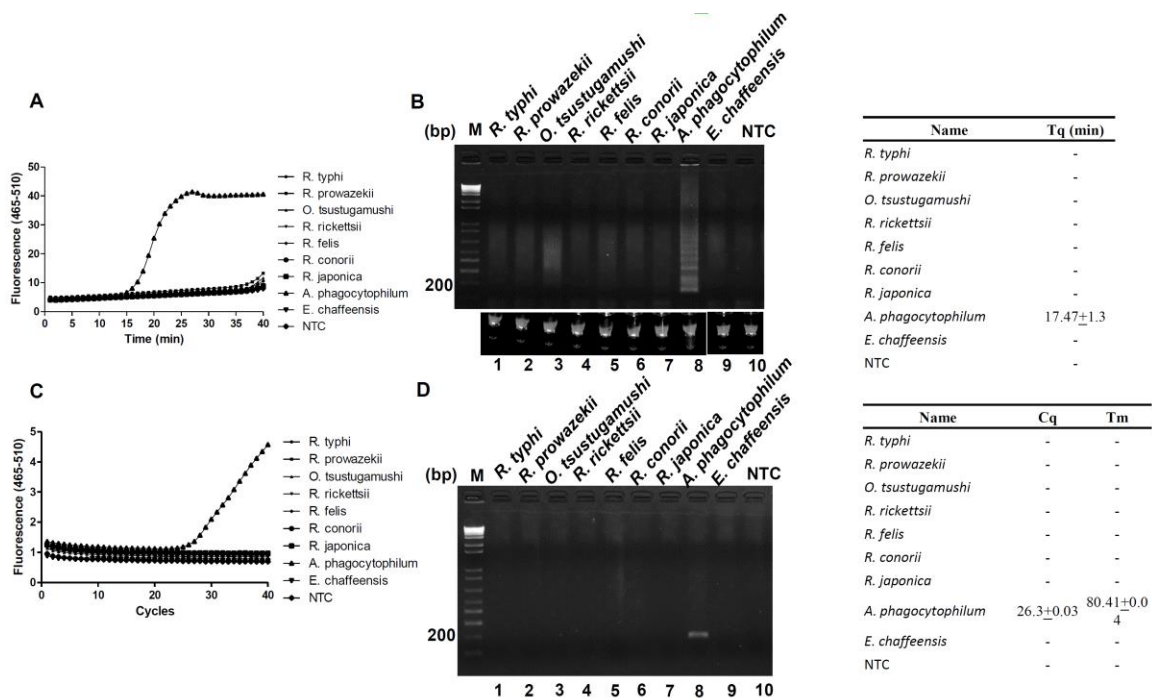


Figure 9. hsp70 LAMP and real-time qPCR specifically detect *Anaplasma phagocytophilum* but not the other members of Rickettsiales.

(A and C) DNA from different members of Rickettsiales including *R. typhi*, *R. prowazekii*, *O. tsutsugamushi*, *R. rickettsia*, *R. felis*, *R. conorii*, *R. japonica*, *A. phagocytophilum* and *E. chaffeensis* were used to evaluate the specificity of the LAMP assay and real-time qPCR. The LAMP assay was monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) Quantitative time of the amplification by LAMP assay. The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (D) The PCR amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

Table. 5 List of *Anaplasma phagocytophilum* infected samples, Taiwan

全血編號	性別	姓名	居住地	年齡	發病日	一採血清	二採血清	症狀	住院	旅遊接觸史	Cq	Tm	Sequencing	LAMP
L081820	F	王O臻	高雄市鳳山區	25	15/24	1083139	1083330	發燒 紅疹 疲勞 肌肉痠痛 不適 肝功能異常 肝炎	V	澎湖旅遊 8.25-8.26	32.67	80.42	V	+
L081822	M	許O龍	高雄市大樹區	81	5	1083147	-	發燒 畏寒 全身痠痛	V	-	36.05	80.5	V	+
L081936	M	洪O陀	台中市大里區	64	29/37	1083317	1083449	發燒 肌肉痛 關節疼痛	V	野外活動	36.2	80.5	V	+
L082008	F	蔡O玲	高雄市鳳山區	59	3/15	1083484	1083723	發燒 嘔吐 頭痛 意識不清	V	澎湖旅遊8.1-9.18 接觸羊	37.89	80.4	V	+

>L081820<

CTGTAGGTGCTGCGATACAGGGTGGTATCTTAACAGGTGATGTTTCGTGATGCTTGTGTTGG
ATGTTGCTCCGCTATCTTTGGGTATAGAACTTTGGGTGGTGATTTACGCCTTTGATTGAGCG
TAATACTACAATTCCTACTAAGAAGTCGCAGGTGTTCTCTACGGCTGAAGATAA<

>L081822<

CTGTAGGTGCTGCGATACAGGGTGGTATCTTAACAGGTGATGTTTCGTGATGCTTGTGTTGG
ATGTTGCTCCGCTATCTTTGGGTATAGAACTTTGGGTGGTGATTTACGCCTTTGATTGAGCG
TAATACTACAATTCCTACTAAGAAGTCGCAGGTGTTCTCTACGGCTGAAGATAA<

>L081936<

CTGTAGGTGCTGCGATACAGGGTGGTATCTTAACAGGTGATGTTTCGTGATGCTTGTGTTGG
ATGTTGCTCCGCTATCTTTGGGTATAGAACTTTGGGTGGTGATTTACGCCCTTATTGATTGAGCG
TAATACTACAATTCCTACTAAGAAGTCGCAGGTGTTCTCTACGGCTGAAGATAA<

>L082008<

CTGTAGGTGCTGCGATACAGGGTGGTATCTTAACAGGTGATGTTTCGTGATGCTTGTGTTGG
ATGTTGCTCCGCTATCTTTGGGTATAGAACTTTGGGTGGTGATTTACGCCTTTGATTGAGCG
TAATACTACAATTCCTACTAAGAAGTCGCAGGTGTTCTCTACGGCTGAAGATAA<

**VGAAIQGGILTDVDRDVLVLLDVAPLSLGIETLG
GVFTPLIERNTTIPTKKSQVFSTAE**

**VGAAIQGGILTDVDRDVLVLLDVAPLSLGIETLG
GVFTPLIERNTTIPTKKSQVFSTAE**

**VGAAIQGGILTDVDRDVLVLLDVAPLSLGIETLG
GVFTPLIERNTTIPTKKSQVFSTAE**

**VGAAIQGGILTDVDRDVLVLLDVAPLSLGIETLG
GVFTPLTERNTTIPTKKSQVFSTAE**

I406T

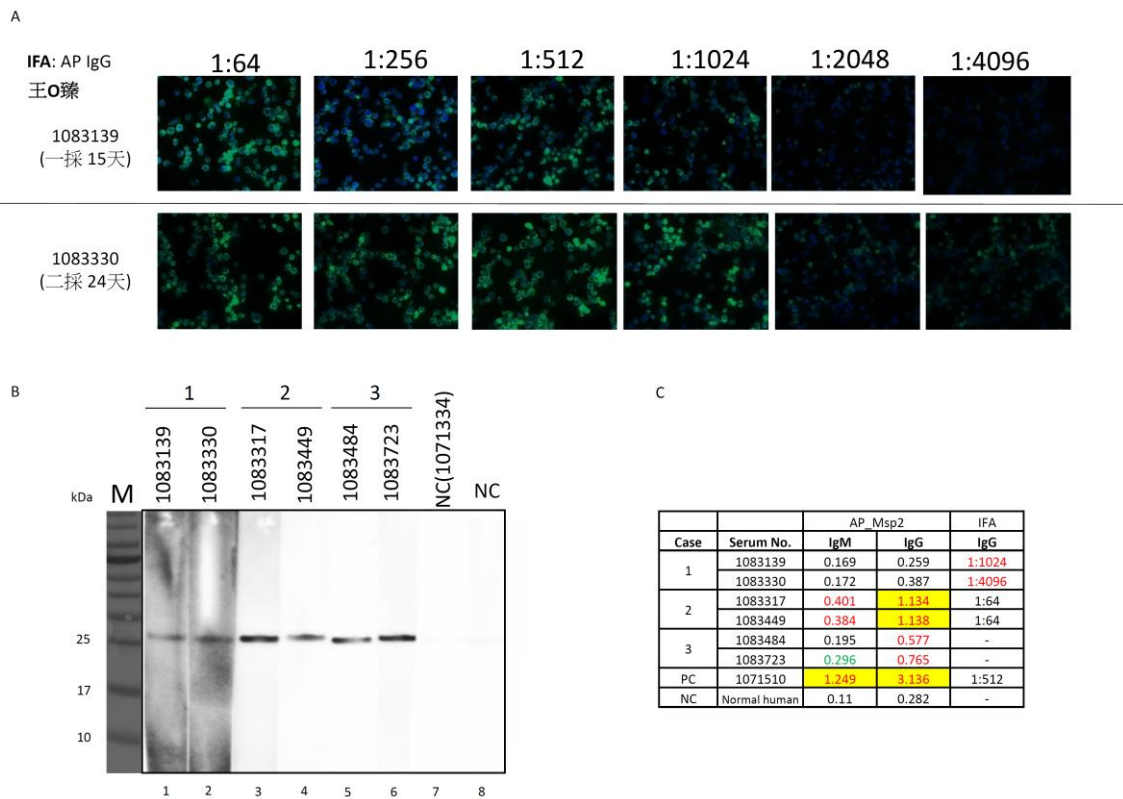


Figure 10. The *Anaplasma phagocytophilum* infected patients were confirmed by IFA, Western blot and ELISA.

(A) The paired sera (acute- and convalescent- phase) from PCR positive samples were used for IFA assay. IgG against *Anaplasma phagocytophilum* showed seroconversion in a patient (1:1024 to >1:4096). (B) The antibodies (IgA, IgM and IgG) against *Anaplasma phagocytophilum* msp2 protein were detectable in paired sera from three patients. (C) The msp2 ELISA demonstrated that IgM and IgG were exist in the two patients.

衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122304

計畫名稱：開發新興立克次體快速等溫核酸增殖方法

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	計畫主持人：完成人類艾利希氏體、人類顆粒細胞無形體症的 LAMP 檢測技術，符合計畫目標。	謝謝委員審查意見。	無
2	完成技術開發具實用值。	謝謝委員審查意見。	無
3	本計畫利用 LAMP 技術開發第一個人類艾利希氏體檢測方法，其靈敏度可到 10 copies/reaction，有利臨床應用與商業開發價值。	謝謝委員審查意見，未來將應用此技術並持續開發。	無
4	針對人類顆粒細胞無形體症的 LAMP 檢測方法，可檢測到 100 copy/reaction，對臨床檢體具有實用性，以及具商業開發價值。	感謝評審委員肯定，未來將應用此技術並持續開發。	無
5	在交通便捷、森林遊樂、林地開發等趨勢下，各種新興及再浮現蜱媒傳染病對人類健康所造成的威脅益嚴重。因此本計畫能建立靈敏度、準確度高的立克次體傳染病快速檢驗系統，對監測已知存在及可能會入侵的立克次體傳染病有其重要意義。將來若開發成商品檢測試劑，將有助於臨床快速診斷，以及相關傳染病監測；對於疫情掌握與流行病學資料庫建立，有其具體價值。	感謝評審委員肯定，未來將用本計畫開發之方法持續監測新興立克次體，已利防疫及流行病學資料庫建立。	無

6	LAMP 的 SWOT 分析優缺點要 balance。	<p>I. 優點 (S): 檢驗時間短、具即時性、可應用 POC(肉眼可辨)</p> <p>II. 缺點 (W): 價格昂貴 (LAMP 本身具專利)、無法定序確認</p> <p>III. 機會 (O): 可應用於商品開發、可用於醫療缺乏偏遠地區、若商品化市場效益高</p> <p>IV. 威脅 (T): 其他核酸檢驗技術日新月異，如 RPA 或 CRISPR 等。</p> <p>未來進行相關商品化及檢驗試劑開發時會考量上述分析。</p>	無
7	否真有離島、偏僻地區需求？	<p>歷年監測立克次體感染病例在台灣以東部的台東縣、花蓮縣最多，再來則是離島的澎湖縣，因此開發快速核酸檢驗方法有其價值，可做為初篩方法提供醫生臨床診斷。由於金門與台灣本島已有人類艾利希氏體、人類顆粒細胞無形體症確診病例，本研究除可提供 LAMP 方法外也再精進 real-time qPCR 方法有助檢驗與防疫效能。</p>	無