

計畫編號： MOHW109-CDC-C-315-114303

衛生福利部疾病管制署 109 年署內科技研究計畫

新興立克次體多重核酸快速檢驗試劑開發

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：109 年 1 月 1 日至 109 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 35 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。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等是由一群絕對細胞內寄生、會感染人畜的立克次體細菌，皆引起急性高燒、淋巴結腫大等臨床症狀，有時會併發器官衰竭異常。臨床診斷極不易判定，然而許多病原體的感染都會引發類似的徵兆及症狀，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。

因此本計畫將分析近年台灣立克次體流行菌株，以分子生物學分析主要抗原蛋白質及基因特異性，設計篩選立克次體特異性基因區域與探針使具有特異性，建置新興立克次體real-time PCR、multiplex real time-PCR及微陣列檢測系統，能在最短時間內同步檢測新興立克次體細菌如恙蟲病、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等傳染病，並提高試驗的靈敏度及專一性，並將此多重核酸系統進行分析方法確效。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，對新興病毒及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參考。

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, the purpose of this study is to analyze the recently Taiwan's emerging rickettsial epidemic strains, molecular biology and genetic analysis of the mainly antigenic protein. To establish the emerging rickettsial real-time PCR, multiplex real-time PCR and panel of chip detection system could detect emerging rickettsial bacteria 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.

Key words: *Orientia tsutsugamushi*, murine typhus, human granulocytic anaplasmosis,
human monocytic ehrlichiosis

貳、計劃內容

一、前言

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。立克次體的臨床診斷不易判定，然而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。

恙蟲病為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬，所引起的急性傳染性疾病。感染恙蟲病的特徵為在螫口處形成特有的無痛性洞穿式潰瘍性焦痂 (eschar)，主要臨床症狀包括發熱、頭痛、肌肉酸痛、紅疹與淋巴結病變等症狀。恙蟲病之地理分佈，北由日本北部與俄羅斯東部，南至澳洲北部與西太平洋群島，西至阿富汗均有病例發生。雖然恙蟲病可藉由抗生素治療而痊癒，但由於錯誤的診斷與抗生素的選用不當，世界上每年仍有零星致死的案例發生。台灣在1955年將此病列為通報傳染病，現歸類為第四類傳染病。台灣地區的恙蟲病近年來每年約有250-400個確定病例，在各縣市均有病例報告。

地方性斑疹傷寒為 *Rickettsia typhi* 引起的疾病，其病程和人蝨型（流行性）斑疹傷寒類似，有頭痛、惡寒、疲勞、發燒、全身性疼痛和出疹等現象，但病情較流行性斑疹傷寒溫和。現歸類為第四類傳染病。實驗室診斷通常用IFA鑑定。台灣地區有散發性病例。在自然界以鼠—蚤—鼠的循環方式維持傳播，此時鼠為傳染窩。地方性斑疹傷寒在老鼠為不顯性感染，傳染方式為具有傳染性的鼠蚤在吸血時排出立克次體而污染了叮咬部位或其他新鮮的皮膚傷口，進而

造成感染，偶爾也有因吸入了乾的蚤糞而感染的病例。在災難發生而導致人口聚集、衛生條件不良，且人、鼠和蚤密集共存時，有可能發生地方性斑疹傷寒流行。

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) 的病原，*Anaplasma phagocytophilum* 不只會感染人也會感染家畜(馬、狗、牛、羊等)，然而在2006年大陸安徽省也發現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。目前在台灣對*Anaplasma phagocytophilum* 感染所引起的HGA研究與臨床診斷極為有限，HGA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 (HGA) 建置一個簡單又有效的快篩檢測系統亟為重要。

艾利希氏體是一種絕對細胞內寄生，會感染人畜的艾利希體立克次體，對人畜皆具有病原性。最早是在1986年發現造成人單核球艾利希氏體症 (human monocytic ehrlichiosis; 簡稱 HME)，其病因為查非艾利希氏體 (*Ehrlichia chaffeensis*)。Human monocytic ehrlichiosis 主要是由被感染蜱叮咬所感染引起新興傳染病 human monocytic ehrlichiosis (HME) 的病原，*Ehrlichia* 不只會感染人也會感染家畜。*Ehrlichia* 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。此類立克次體感染在臺灣的研究與臨床診斷甚少，因此若能在臨床檢驗中加入篩檢有助於臨床診斷與治療及相關防疫之工作。

目前恙蟲病與地方性斑疹傷寒為我國第四類法定傳染病，臨床檢驗方法依據real-time PCR與間接免疫螢光染色法判定(IFA)。過去臨床檢驗中已知台灣恙蟲病至少有超過30種以上的亞型存在，其突變率高、檢驗用PCR引子專一性不夠加上需耗費大量的檢驗試劑且繁複的準備與試驗配置步驟導致錯誤可能造成檢驗上困難，而IFA方法耗時費力且不同立克次體間經常發生抗體交叉反應。因此本計畫將分析近年台灣新興立克次體流行菌株，以分子生物學分析主要抗原蛋白質及基因特異性，設計篩選新興立克次體特異性基因區域與探針使具有特異性，建置新興立克次體multiplex RT-PCR及微陣列檢測系統，並進行分析方法確效。能在最短時間內同步檢測新興立克次體細菌如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人類顆粒球艾利希氏體症傳染病，並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，對新興病毒及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參考。

二、材料與方法

I. 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。

II. 免疫螢光染色法:取 5ul serum for serial dilution 及 PC 與 NC 血清點在 slide 上(保濕盒),放置 37°C for 30 min incubator.以 PBS wash,泡在 PBS RT 5 min 以 dH2O 沖洗 slide.電風扇吹乾,add 20 ul FITC-goat anti-human IgM into slide(保濕盒),放置 37°C for 30 min incubator.以 PBS wash,泡在 PBS RT 5 min,以 dH2O 沖洗 slide.電風扇吹乾,add 封存劑 cover 風乾,以 400x 螢光顯微鏡判定。

1. IgM 配對力價測定:transfer serum 5 uL into 96 wells plate, add 35 uL IgG remover, RT 5 min(血清檢體做 8 倍稀釋),prepare PBS 倒入塑膠凹槽,取 10ul 檢體 for serial dilution:10 ul +90 ul PBS(IgM : 80 倍稀釋,PBS 倒入凹槽,以 8 爪取較為便利),取檢體 20ul 及 PC 與 NC 血清點在 slide 上(保濕盒,內裝無菌 dH2O),放置 37°C for 30 min incubator.以 PBS wash,泡在 PBS RT 5 min,以 dH2O 沖洗 slide.電風扇吹乾,add 20 ul FITC-goat anti-human IgM into slide(保濕盒),放置 37°C for 30 min incubator.以 PBS wash,泡在 PBS RT 5 min 以 dH2O 沖洗 slide.電風扇吹乾 add 封存劑 cover 風乾,以 400x 螢光顯微鏡觀察判定 IgM 力價

2. IgG 配對力價測定: transfer serum 5 uL into 96 wells plate, add uL IgG remover, RT 5 min (血清檢體做 8 倍稀釋), prepare PBS 倒入塑膠凹槽, 取 10ul 檢體 for serial dilution: 10 ul +90 ul PBS (IgG:40 倍稀釋至 640 倍, 以等倍稀釋 90 ul PBS + 90 ul serial serum 做 serial diution to 40x-80x-160x-320x-640x),取檢體 20ul 及 PC 與 NC 血清點在 slide 上 (保濕盒, 內裝無菌 dH₂O), 放置 37°C for 30 min incubator.以 PBS wash , 泡在 PBS RT 5 min, 以 dH₂O 沖洗 slide.電風扇吹乾, add 20 ul FITC-goat anti-human IgM into slide (保濕盒), 放置 37°C for 30 min incubator. 以 PBS wash , 泡在 PBS RT 5 min 以 dH₂O 沖洗 slide.電風扇吹乾 add 封存劑 cover 風乾,以 400x 螢光顯微鏡觀察判定 IgG 力價

III. 血液標本及細胞培養製備新興立克次體 DNA : 以 ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. No. 11 796 828 001) 萃取病人檢體全血或細胞培養之細菌 DNA 核酸。首先取加抗凝血劑之全血 200 μl , 與 200 μl 之 Binding Buffer 均勻混合後, 再加入 40 μl Proteinase K , 以震盪器混合均勻, 置於 70°C 水浴槽加熱 10 分鐘。再加入 isopropanol 100 μl 均勻混合後, 加到 High Pure Filter Tube 以 8,000 x g 離心 1 分鐘。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後, 加入 500 μl 之 Inhibitor Removal Buffer , 以 8,000 x g 離心 1 分鐘。再置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後, 加入 500 μl 之 Wash Buffer , 以 8,000 x g 離心 1 分鐘, 重複此步驟再 wash 一次。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後, 以 13,000 x g 離心 1 分鐘, 將 High Pure Filter Tube 上殘留的廢液甩乾淨。最後將 High Pure Filter Tube 放至新的 eppendorf , 加入 50 μl 預熱 70°C 的 Elution Buffer , 靜置 10 分鐘, 以 8,000 x g 離心 1 分鐘, eppendorf 中的液體即為欲萃取之 DNA 。

IV. 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，利用過往所建立的本土恙蟲病基因型資料庫設計出可廣泛偵測立克次體的引子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 5ul gDNA 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 50uL，於 94°C 變性 (denature)10 分鐘後，以 94°C：30 秒、60°C：30 秒、72°C：1 分鐘，進行 40 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°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。測試新開發引子的敏感度與專一性，利用帶有目標序列的質體進行序列稀釋進行敏感度測試，此外亦用不同立克次體的 genomic DNA 進行專一性測試。

V. 建置新興立克次體 multiplex real-time PCR 利用 TaqMan PCR 篩檢立克次體病原，詳細的檢驗方法如前所述：(1)使用 QIAGEN QuantiTect Probe PCR kit 反應試劑。依序加入以下試劑：12.5 μl 的 2x Ready mix，RNase-free Water，核酸引子與 probe，最後加入 5 μl 檢體 DNA，反應最終體積為 25 μl。再進行 QIAGEN QuantiTect Probe real-time PCR 反應：95°C 15 分鐘，45 次循環之 95°C 15 秒、60°C 60 秒。針對兩種新興病毒設計 multiplex real-time PCR Probe: 所選用的螢光為恙蟲病 probe: FAM，地方性斑疹傷寒 probe: Cy5，並比較其與 real-time PCR。

三、結果

1. 恙蟲病、地方性斑疹傷寒的 Taqman probe real-time PCR 系統之引子、探針設計與合成：

Table 1 所示為針對恙蟲病、地方性斑疹傷寒所設計之引子與探針組與臨床檢驗使用之引子序列。

- a. 設計一組新穎的 *Orientia tsutsugamushi* (OT) Taqman real-time PCR 引子、探針組，target 為 *gyrB*，針對恙蟲病之偵測(**Table 2**)。
- b. 設計一組新穎的 *Rickettsia typhi* (RT) Taqman real-time PCR 引子、探針組，target 為 *OmpB*，針對地方性斑疹傷寒之偵測(**Table 5**)。

2. 恙蟲病 Taqman probe real-time PCR 對恙蟲病菌株之敏感性測試

- a. 檢測 Taqman probe real-time PCR 敏感性，以 1 ng *Orientia tsutsugamushi* 核酸進行十倍序列稀釋，進行 LAMP 測試，檢測之靈敏度為 1 pg。(Fig. 1A)。
- b. 核酸放大產物可清楚見於 2% 洋菜膠上 (Fig. 1B)。
- c. 恙蟲病 Taqman probe real-time PCR 對於恙蟲病菌株之測試，偵測極限 LOD 可偵測到 1 pg 的核酸(Fig. 1B)。

3. 恙蟲病 Taqman probe real-time PCR 對 pCR2.1-*gyrB* plasmid 之敏感性測試

建置帶有 *gyrB* 目標核酸片段的 pCR2.1 plasmid (Fig. 2)，用以進行敏感性測試。

- a. pCR2.1-*gyrB* plasmid 從 10^5 copy 進行十倍稀釋至 1 copy，再進行 Taqman probe real-time PCR 測試，結果顯示 Taqman probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-*gyrB* plasmid 的 limit of

detection (LOD)可偵測到約 100 個 copy 的核酸(Fig. 3A)。

b. 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上(Fig. 3B)。目前實驗室偵測恙蟲病基因片段所使用 16S rRNA 的 qPCR primer，其靈敏度也約為 100 個 copies/reaction。結果顯示我們所開發的恙蟲病 Taqman probe real-time PCR 與臨床使用的 qPCR 具有相似的敏感性。

4. 所開發之恙蟲病 Taqman probe real-time PCR 可檢測出臺灣本土菌株型別

- a. 確認所開發之 Taqman probe real-time PCR 可廣泛偵測不同型別的恙蟲病菌株，將 Taqman probe real-time PCR 所辨認的 *gyrB* 基因目標核酸序列進行比對，比對菌株包含: Karp, Gilliam, Kato, TW1-TW30，其中包含臺灣較為常見的 TW1、TW10、TW19 及 TW22。發現這些菌株的 *gyrB* 基因序列的相似度高(Fig. 4A)。
- b. 進行序列分析比對，以 TW1 作為模板，其他菌株之序列相似度高達 98.11-100%(Fig. 4A)。
- c. Taqman probe real-time PCR 反應之核酸產物可清楚見於 2% 洋菜膠上(Fig. 4B)。所測試的恙蟲病常見菌株皆可被辨認增幅。

5. 恙蟲病 Taqman probe real-time PCR 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 9)進行測試，每個反應加入 1 ng 核酸進行 Taqman probe real-time PCR 測試，Taqman probe real-time PCR 系統只專一性的放大 *O. tsutsugamushi*，結果顯示

Taqman probe real-time PCR 具高專一性(Fig. 5A and 5B)。

- b. *O. tsustugamushi gyrB* 核酸產物可清楚見於 2% 洋菜膠上 (Fig. 5C)。

6. 所開發之恙蟲病 Taqman probe real-time PCR 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 109 年恙蟲病送驗檢體共 51 個，其中 20 個經 qPCR 確認為恙蟲病陽性，9 個經間接免疫螢光法(IFA)確認(qPCR 為陰性)為恙蟲病陽性。另外也針對 22 個陰性檢體進行專一性測試。
- b. 結果顯示 19/20 個 qPCR 陽性檢體可被 Taqman probe real-time PCR 驗出，9/9 個 IFA 陽性(qPCR 陰性)檢體可被 Taqman probe real-time PCR 驗出，22/22 陰性檢體皆未驗出。結果顯示 Taqman probe real-time PCR 對於臨床檢體之敏感性約為 96.55% (28/29) 較_qPCR(20/29, 68.97%)更為敏感，且可測得部分 qPCR(TSA56)無法驗出之恙蟲病感染檢體，具有高度試劑發展潛力。

7. 地方性斑疹傷寒 Taqman probe real-time PCR 對地方性斑疹傷寒菌液之敏感性測試

- a. 檢測 Taqman probe real-time PCR，以 100 ng *Rickettsia typhi* 核酸進行十倍序列稀釋，進行 Taqman probe real-time PCR 測試，檢測之靈敏度為 10 pg。產物可清楚見於 2% 洋菜膠上(Fig. 6A and 6B)。
- b. Taqman probe real-time PCR 對地方性斑疹傷寒 ompB LOD 可偵測到 10 pg 的核酸。其反應產物可於 45 個 cycle 內增殖並為線

性(Fig. 6C)。

8. 地方性斑疹傷寒 Taqman probe real-time PCR 對 PET47b-ompB plasmid 之敏感性測試

建置帶有 ompB 目標核酸片段的 PET47b plasmid，用以進行敏感性測試

- a. pET47b-ompB plasmid (pET-47b 帶有 *Rickettsia typhi* ompB 的核酸序列) 測試樣品從 10^8 copy 進行十倍序列稀釋至 1 copy，再進行即時 Taqman probe real-time PCR 測試，結果顯示 Taqman probe real-time PCR 系統對 pET47b-ompB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸(Fig. 7A)。
 - b. 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上，且其反應產物可於 45 個 cycle 內增殖並為線性 (Fig. 7B and 7C)。
- #### 9. 地方性斑疹傷寒 Taqman probe real-time PCR 之專一性測試
- a. 進一步確認 Taqman probe real-time PCR 專一性，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 1 ng 核酸進行 Taqman probe real-time PCR 測試，Taqman probe real-time PCR 系統只專一性的放大 *R. typhi*，結果顯示 Taqman probe real-time PCR 具高專一性(Fig. 8A and 8C)。
 - b. *R. typhi* 放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體則不會，再次證實開發 LAMP 對地方性斑疹傷寒具高度專一性(Fig. 8C)。
- #### 10. 地方性斑疹傷寒 Taqman probe real-time PCR 進行臨床檢體測試

Table 6 檢體來源為臺灣民國 109 年地方性斑疹傷寒陽性確診與陰性檢體，共 6 個 qPCR 確認陽性檢體，10 個為 qPCR 陰性檢體。本研究中，共有 6 個檢體可被 Taqman probe real-time PCR 所偵測(敏感性為 100%)(**Fig. 9**)。而 10 個陰性檢體在 Taqman probe real-time PCR 系統中也未偵測，顯示其專一性也為 100%。

11. 所建置之恙蟲病與地方性斑疹傷寒 Multiplex Taqman real-time PCR 與臨床檢體之測試

合併恙蟲病與地方性斑疹傷寒 Taqman real-time PCR 建置 multiplexPCR，並以 121 個臨床檢體進行反應測試，其中包含 50 個恙蟲病 PCR 陽性檢體、7 個地方性斑疹傷寒 PCR 陽性檢體與 64 個 PCR 陰性檢體。結果顯示其對於恙蟲病之敏感性為 100%(50/50)、專一性為 92.95%(66/71)(但若合併 IFA 結果其專一性應為 97.18(69/71)-100%(71/71))；對於地方性斑疹傷寒之敏感性為 100%(7/7)、專一性為 100%(114/114)(**Table 7**)。

四、討論

本計畫的目標在建立多重核酸檢驗試劑，應用於新興立克次體傳染病之偵測。Taqman real-time PCR 核酸檢測方法，約可在 1.5 小時內完成多重核酸增殖反應，配合螢光檢測儀器，與多重螢光探針則可以即時偵測多種立克次體核酸。未來配合核酸純化方法的開發，將可以發展出高靈敏度、高專一性之多重核酸分子快速檢測試劑。本研究，首先建置出了多種恙蟲病基因體序列資料庫，並根據其高度保守核酸序列區域，開發出恙蟲病之 Taqman real-time PCR 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在 100 copy/reaction 之間。對於臨床檢體測試的結果也具有高度專一性(100%)與敏感性(96.55%)，且 Taqman real-time PCR 相較於 qPCR 具有更高的敏感度。本研究也開發出針對地方性斑疹傷寒的 Taqman real-time PCR 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在 100 copy/reaction 之間，對於臨床檢體測試的結果也具有高度專一性(100%)與敏感性(100%)，Taqman real-time PCR 與 qPCR 具有相同的敏感度。本研究也開發出可同步檢測上述兩種疾病之 Multiplex Taqman real-time PCR，對於臨床檢體測試結果顯示具有高度專一性與敏感性，有助於提升實驗室檢驗能量。

未來將繼續改良引子、探針、試劑、反應濃度、溫度及檢體製備等，發展多重核酸增殖反應之最適化條件並應用於臨床檢驗。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，希望及時篩檢出不同立克次體病原體，有效降低傳染病在臺灣的流行與散布。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。本計畫已成功開發出可同步即時偵測恙蟲病、地方性斑疹傷寒的 Multiplex Taqman real-time PCR 方法，具有高度專一性與敏感性，Multiplex Taqman real-time PCR 較現行之 real-time qPCR 方法有更高或相同的敏感性。未來可進一步發展為偵測新興立克次體(包含：人類顆粒球艾利希氏體、人類顆粒細胞無形體症，等)的多重核酸分子快速檢測劑組，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

我們開發出可同步檢測第四類法定傳染病的恙蟲病、地方性斑疹傷寒之 Multiplex Taqman real-time PCR。未來可發展為相關核酸分子快速檢測試劑，再搭配後續未來研發之新興立克次體引子探針，可應用於我國醫院與實驗室之醫療及監測。我們所開發之方法，除可快速同步檢驗出多種立克次體感染源，且其針對恙蟲病檢驗較現行使用之方法更為敏感。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、實施病人自主管理、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、參考文獻

1. 陳慧玲、謝國珍、陳豪勇等。由病人血液中分離台灣地區 *Rickettsia tsutsugamushi* 之探討台灣醫誌。94 (suppl2) :S112-119, 1995
2. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y, Zhai J, Renwick N, Hui J, Hegyi H, Grolla A, Strong JE, Towner JS, Geisbert TW, Jahrling PB, Buchen-Osmond C, Ellerbrok H, Sanchez-Seco MP, Lussier Y, Formenty P, Nichol MS, Feldmann H, Briese T, and Lipkin WI: Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:73-81.
3. Enatsu T, Urakami H, Tamura A. Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *FEMS Microbiol Lett* 180:160-169, 1999.
4. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 35:2715-2727, 1997.
5. Oaks EV, Rice RNM, Kelly DJ, Stover CK. Antigenic and genetic relatedness of eight *Rickettsia tsutsugamushi* antigens. *Infect Immun* 57:3116-3122, 1989.
6. Ohashi N, Fukuhara M, Shimada M, Tamura A. Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 125: 299-304, 1995.
7. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10:694-719, 1997
8. Tamura A, Ohashi N, Koyama Y, Fukuhara M, Kawamori F, Otsuru M, Wu PF, Lin SY. Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. *FEMS Microbiol Lett* 150: 225-31, 1997.

9. Sea-Liang N, Sereemasapun A, Patarakul K, Gaywee J, Rodkvamtook W, Srisawat N, Wacharapulusadee S, Hemachudha T. Development of multiplex PCR for neglected infectious diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Jul 8;13(7):e0007440.
10. Kawamori F, Shimazu Y, Sato H, Monma N, Ikegaya A, Yamamoto S, Fujita H, Morita H, Tamaki Y, Takamoto N, Su H, Shimada M, Shimamura Y, Masuda S, Ando S, Ohashi N. Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2018 Jul 24;71(4):267-273
11. Tadin A, Tokarz R, Markotić A, Margaletić J, Turk N, Habuš J, Svoboda P, Vucelja M, Desai A, Jain K, Lipkin WI. Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Feb;94(2):466-73
12. Killmaster LF, Loftis AD, Zemtsova GE, Levin ML. Detection of bacterial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from Georgia, USA, and the use of a multiplex assay to differentiate *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii*. *J Med Entomol*. 2014 Jul;51(4):868-72.
13. Denison AM, Amin BD, Nicholson WL, Paddock CD. Detection of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, and *Rickettsia akari* in skin biopsy specimens using a multiplex real-time polymerase chain reaction assay. *Clin Infect Dis*. 2014 Sep 1;59(5):635-42
14. Gaines DN, Operario DJ, Stroup S, Stromdahl E, Wright C, Gaff H, Broyhill J, Smith J, Norris DE, Henning T, Lucas A, Houpt E. Ehrlichia and spotted fever group Rickettsiae surveillance in *Amblyomma americanum* in Virginia through use of a novel six-plex real-time PCR assay. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014 May;14(5):307-16
15. Giulieri S, Jatou K, Cometta A, Trelu LT, Greub G. Development of a duplex real-time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. and typhus group

- rickettsia in clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Feb;64(1):92-7
16. Prakash JA, Reller ME, Barat N, Dumler JS. Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Dec;15 Suppl 2:292-3.
 17. Paris DH, Blacksell SD, Stenos J, Graves SR, Unsworth NB, Phetsouvanh R, Newton PN, Day NP. Real-time multiplex PCR assay for detection and differentiation of rickettsiae and orientiae. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Feb;102(2):186-93.
 18. Abanda B, Paguem A, Achukwi MD, Renz A, Eisenbarth A. Development of a Low-Density DNA Microarray for Detecting Tick-Borne Bacterial and Piroplasmid Pathogens in African Cattle. *Trop Med Infect Dis*. 2019 Apr 12;4(2).
 19. Raja B, Pascente C, Knoop J, Shakarisaz D, Sherlock T, Kemper S, Kourentzi K, Renzi RF, Hatch AV, Olano J, Peng BH, Ruchhoeft P, Willson R. An embedded microretroreflector-based microfluidic immunoassay platform. *Lab Chip*. 2016 Apr 26;16(9):1625-35
 20. Melničáková J, Derdáková M, Barák I. A system to simultaneously detect tick-borne pathogens based on the variability of the 16S ribosomal genes. *Parasit Vectors*. 2013 Sep 18;6:269.
 21. Blaskovic D, Barák I. Oligo-chip based detection of tick-borne bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Feb 15;243(2):473-8.

八、圖表

一、本研究所用以偵測恙蟲病與地方性斑疹傷寒之引子與探針。

表一、對恙蟲病及地方性斑疹傷寒 TaqMan probe real-time PCR 系統引子、探針序列。

Primer Name	Sequence (5'-3')
OT-gyrB-Forward primer	ACAAAGAGATGGTGGAAAGCCA
OT-gyrB-Reverse primer	AGCTCCGGACTAACCAACT
OT-gyrB-probe	FAM-TCGAGAAGGGCTATCTTGTGTGTTATCA-BHQ1
RT-ompB-Forward primer	GCAAAATGAATATTAGAAAGTGGAC
RT-ompB-Reverse primer	GCTATTAACGAGTTAGTTATGGAA
RT-ompB-probe	Cy5-TCGTACCATCAGCAAGAGCTGTATCA-BHQ2
OT-16S-Forward primer	CCAGYGGGTRATGCCGGGA ACTAT
OT-16S-Reverse primer	GGCAGTGTGTACAAGGCCCGAGAA
OT-TSA56-Forward primer	CCATTTGGTGGTACATTAGCTGCAGGT
OT-TSA56-Reverse primer	TCACGATCAGCTATACTTATAGGCA
RT-17kDa-Forward primer	GGGTGGTATGAACAAACAAGGGACTG
RT-17kDa-Reverse primer	CGCCATTCTATGTTACTACCGCTAGG

二、TaqMan probe real-time PCR 偵測恙蟲病 *gyrB* 基因片段，恙蟲病 *gyrase* subunit B (*gyrB*) 是 *Orientia tsutsugamushi* 重要的拓撲異構酶蛋白，對於 DNA 複製扮演重要角色，以其 coding sequence 作目標，藉 Primer BLAST 軟體進行探針、primer 的設計與測試，可複製增殖的 *gyrB* 目標核苷酸片段為 208 bp (表二)。

表二、以 TaqMan probe real-time PCR 放大恙蟲病 *gyrB* 基因核苷酸片段為 208 bp

1 ACAAAGAGATGGTGGGAAGCCATTTACAGGGATATAGATCAGCAGTAACTAGAGCTAT
CACTAAATACACTAAAGATCATTTTCTAAAATAATATCAATTATAATGGTGATGATAT
TCGAGAAGGGCTATCTTGTGTGTTATCATTAAAATTGCCTGATCCTAAATTTGCTTCAC
AAACTAAGGATAAGTTGGTTAGTCCGGAAGCT **208**

OT *gyrB* probe and primers

Primer	Sequence (5'-3')
Forward	ACAAAGAGATGGTGGGAAGCCA
Reverse	AGCTTCCGACTAACCAACT
Probe	FAM-TCGAGAAGGGCTATCTTGTGTGTTATCA-BHQ1

三、完成建置 *Orientia tsutsugamushi gyrB* TaqMan probe real-time PCR 系統並測試其敏感性。以 1 ng *Orientia tsutsugamushi* 核酸進行十倍序列稀釋，進行即時 TaqMan probe real-time PCR 測試(Fig.1A)。產物可由 FAM 探針螢光訊號偵測，亦可於 2% 洋菜膠上進行分析(Fig.1B)，結果顯示 *Orientia tsutsugamushi gyrB* TaqMan probe real-time PCR 系統的 LOD 可偵測到 1 pg 的核酸。

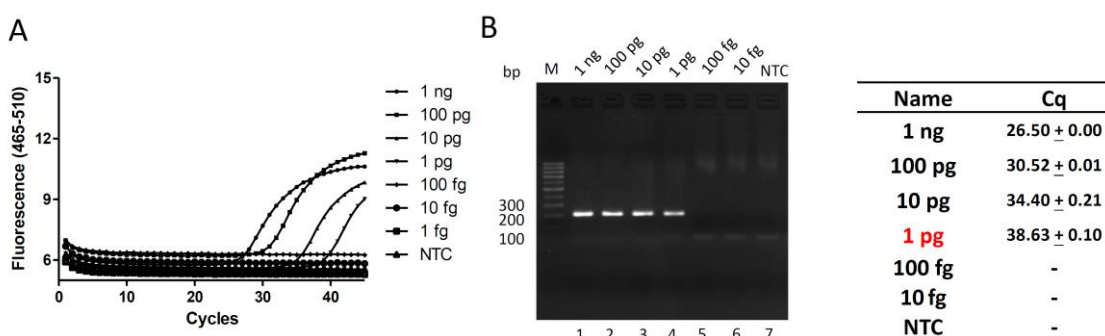


Fig. 1 TaqMan probe real-time PCR 系統對 *Orientia tsutsugamushi* 反應靈敏度為 1 pg。(A) 即時螢光反應結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 系統對 *Orientia tsutsugamushi gyrB* 的 LOD 可偵測到 1 pg 的核酸。(B) 核酸產物為 208 bp，可見於 2% 洋菜膠上進行分析。

四、完成帶有 *Orientia tsutsugamushi* gyrB 之 PCR2.1 載體，用於後續偵測極限測試。

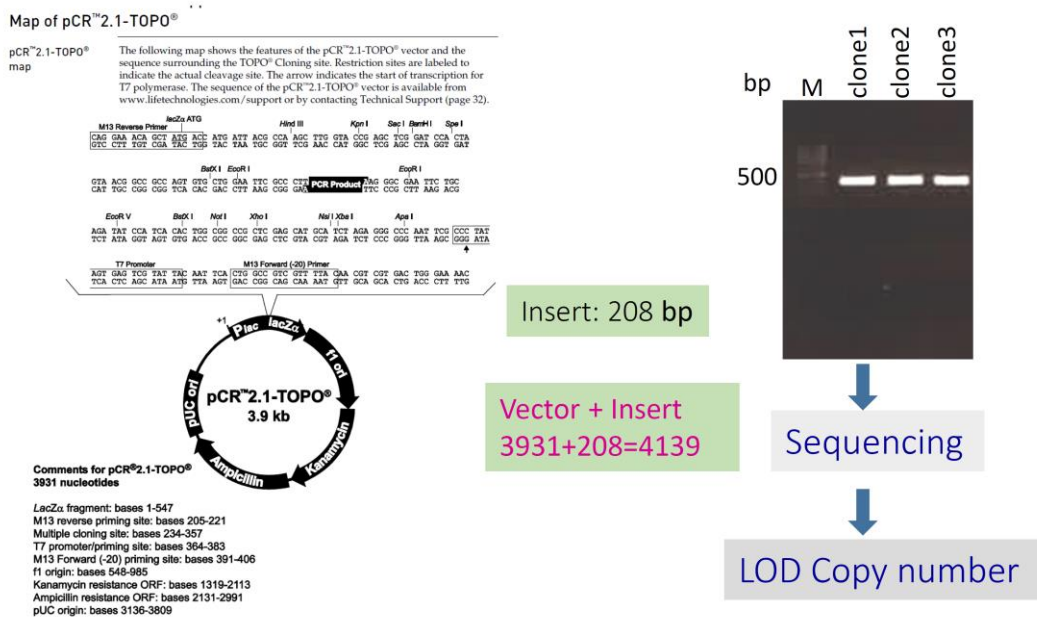


Fig. 2 建置帶有 *Orientia tsutsugamushi* gyrB 之 pCR2.1 載體。成功將目標基因(strain TW-1 gyrB)片段接入載體，以 M13 primer set 進行核酸增幅(約 400 bp)，產物定序確認。

五、TaqMan probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-gyrB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。以 pCR2.1-gyrB plasmid (pCR2.1 帶有 *Orientia tsutsugamushi* strain TW-1 gyrB 的 208 bp 核酸序列) 測試樣品從 10^5 copy 進行十倍序列稀釋至 10^0 copy，再進行即時螢光 TaqMan probe real-time PCR 測試，結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-gyrB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。

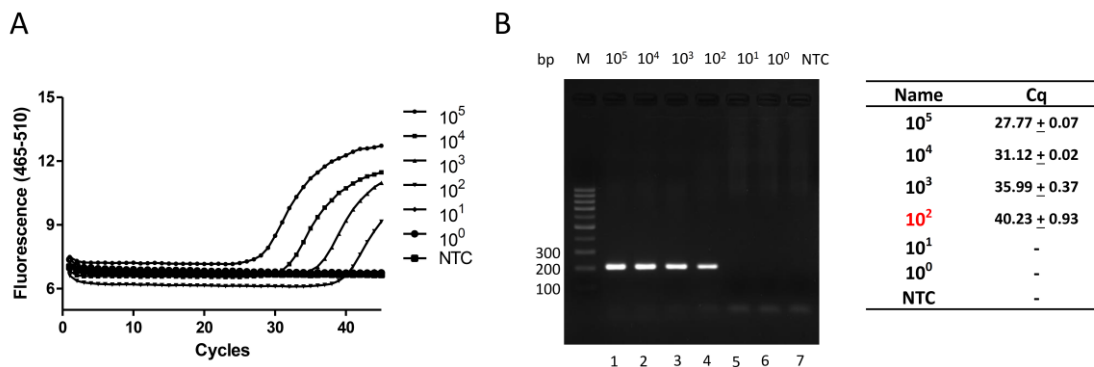


Fig. 3 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-gyrB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。(A) 即時螢光反應結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-gyrB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。(B) 核酸產物可見於 2% 洋菜膠上進行分析

六、TaqMan probe real-time PCR 系統對不同基因型別 *Orientia tsutsugamushi* gyrB 具有高敏感性。將所設計的 gyrB 引子與探針進行序列比對，可發現其序列在不同的 *Orientia tsutsugamushi* 基因型別中高度保守。

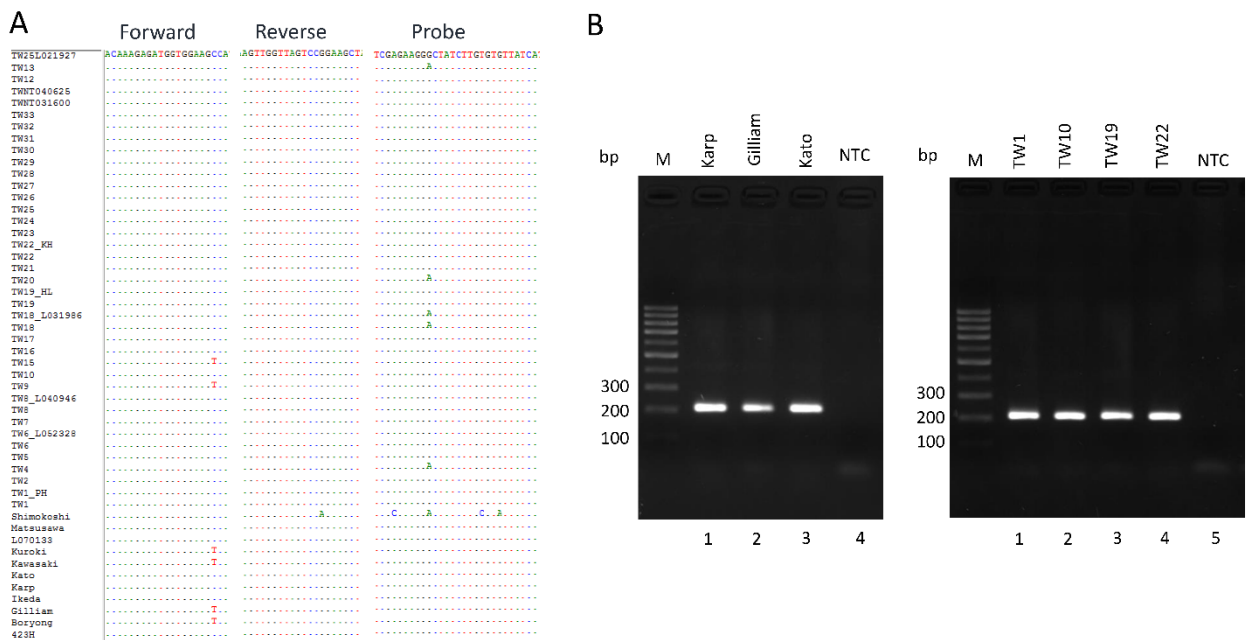


Fig. 4 TaqMan probe real-time PCR 系統對不同基因型別 *Orientia tsutsugamushi* gyrB 具有高敏感性。(A)所設計之 *Orientia tsutsugamushi* gyrB 引子與探針序列比對結果顯示，在不同的基因型別中序列高度保守。(B) TaqMan probe real-time PCR 系統對不同基因型別 *Orientia tsutsugamushi* gyrB 仍具有高敏感性。208 bp 核酸產物可於 2% 洋菜膠上進行分析。PCR 產物經過定序比對確認為 *Orientia tsutsugamushi* 基因片段。

七、開發 TaqMan probe real-time PCR 系統可專一性辨認 *Orientia tsutsugamushi*。為確認 TaqMan probe real-time PCR 專一性，萃取多種立克次體(*O. tsutsugamushi*、*R. typhi*、*R. prowazekii*、*R. rickettsii*、*R. felis*、*R. conorii*、*R. japonica*、*A. phagocytophilum* 與 *E. chaffeensis*) 的核酸(Lanes 1 to 9)進行測試，每個反應加入 1 ng 核酸進行 TaqMan probe real-time PCR 測試，TaqMan probe real-time PCR 系統只專一性的放大 *Orientia tsutsugamushi gyrB* 基因片段，結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 具高專一性 **Fig.(5A)**。TaqMan probe real-time PCR 放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體則無，再次驗證所開發 TaqMan probe real-time PCR 對恙蟲病具高度專一性 **Fig.(5C)**。

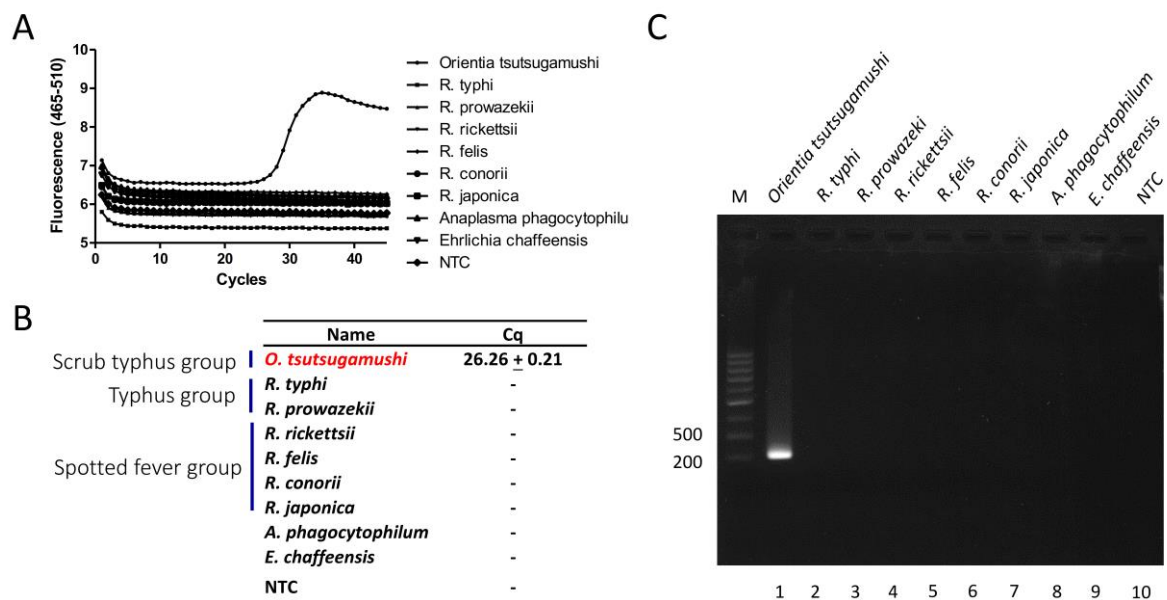


Fig.5 TaqMan probe real-time PCR 系統對 *Orientia tsutsugamushi* 檢測具高度專一性 **(A)** TaqMan probe real-time PCR 即時偵測結果。萃取多種立克次體(*O. tsutsugamushi*、*R. typhi*、*R. prowazekii*、*R. rickettsii*、*R. felis*、*R. conorii*、*R. japonica*、*A. phagocytophilum* 與 *E. chaffeensis*) 的核酸進行測試，TaqMan probe real-time PCR 系統只專一性的放大 *O. tsutsugamushi gyrB* 基因片段，結果顯示所開發之恙蟲病 TaqMan probe real-time PCR 具高專一性。**(B)**為 TaqMan probe real-time PCR 核酸增幅之 Cq，*O. tsutsugamushi gyrB* 基因片段在 26.26 cycles 時可被放大。**(C)** *O. tsutsugamushi* 放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體則不會，再次驗證開發 TaqMan probe real-time PCR 對恙蟲病具高度專一性。

八、TaqMan probe real-time PCR 系統檢測臨床恙蟲病陽性檢體核酸

表三、由所開發之 TaqMan probe real-time PCR 系統偵測送驗臨床檢體中，*Orientia tsutsugamushi gyrB* 基因核酸片段。29 個陽性檢體中可驗得 28 個，敏感性為 96.55%。

	檢體編號	居住地	性別	發病日	16S qPCR	TSA56 qPCR	gyrB Taqman	IFA
1	L090102	彰化縣鹿港鎮	F	9	29.67	38.35	38.56	+
2	L090089	臺東縣成功鎮	M	5	35.35	36.66	38.2	+
3	L090090	南投縣竹山鎮	M	9	35.15	39.28	38.59	+
4	L090056	臺北市士林區	M	10	34.75	35.3	39.26	+
5	L090066	宜蘭縣礁溪鄉	M	3	29.46	27.9	36.44	+
6	L090049	新北市汐止區	M	13	35.11	34.34	36.66	NA
7	L090016	桃園市平鎮區	M	10	36.94	36.82	41.11	+
8	L090027	花蓮縣卓溪鄉	M	2	36.1	36.32	39.54	NA
9	L090028	臺北市北投區	M	8	39	37.58	-	+
10	L090037	花蓮縣壽豐鄉	F	8	35.38	33.46	31.42	NA
11	L090616	澎湖縣馬公市	F	6	36.5	38.8	33.08	+
12	L090619	澎湖縣馬公市	M	6	30.86	32.47	31.32	NA
13	L090623	臺東縣臺東市	F	4	35.4	34.24	34.96	+
14	L090593	臺北市文山區	M	11	35.4	37.44	36.31	+
15	L090583	花蓮縣豐濱鄉	M	3	34.91	37.9	31.85	+
16	L090545	花蓮縣瑞穗鄉	M	4	32.92	35.4	32.64	+
17	L090552	臺東縣卑南鄉	M	8	37.27	38.9	34.91	+
18	L090517	臺東縣卑南鄉	M	6	32.6	36.66	31.03	+
19	L090529	臺東縣臺東市	F	10	36.98	38.6	34.32	+
20	L090498	臺東縣臺東市	F	8	31.59	34.06	30.92	+
21	L090594	新北市樹林區	M	7	36.07	-	36.55	NA
22	L090558	嘉義縣太保市	M	7	38.125	-	37.27	+
23	L090570	臺東縣臺東市	M	8	36.93	-	35.46	+
24	L090574	澎湖縣七美鄉	M	3	37.39	-	37.74	+
25	L090575	澎湖縣西嶼鄉	F	2	38.74	-	36.13	+
26	L090576	澎湖縣馬公市	M	7	37.37	-	36.45	+
27	L090525	澎湖縣西嶼鄉	F	4	35.92	-	36.01	IgG
28	L090455	臺東縣卑南鄉	M	9	38.78	-	36.24	IgG
29	L090457	臺東縣臺東市	M	8	36.22	-	36.46	IgG

NA:無二採血清; IgG:血清抗體無四倍上升，判定為曾經感染過。

九、TaqMan probe real-time PCR 系統檢測臨床恙蟲病陰性檢體核酸

表四、送驗臨床檢體中，由所開發之 TaqMan probe real-time PCR 系統偵測陰性檢體中 *Orientia tsutsugamushi gyrB* 基因核酸片段。22 個陰性檢體中皆無驗出，專一性為 100%。

	檢體編號	居住地	性別	發病日	16S qPCR	TSA56 qPCR	gyrB Taqman	IFA
1	L090159	高雄市鼓山區	M	11	-	-	-	-
2	L090160	臺中市西屯區	F	4	-	-	-	NA
3	L090162	新北市深坑區	F	4	-	-	-	NA
4	L090163	花蓮縣花蓮市	M	2	-	-	-	-
5	L090164	臺北市士林區	M	3	-	-	-	NA
6	L090165	新北市林口區	M	6	-	-	-	IgG
7	L090166	新北市三重區	M	2	-	-	-	NA
8	L090167	花蓮縣瑞穗鄉	M	6	-	-	-	-
9	L090168	花蓮縣吉安鄉	M	2	-	-	-	NA
10	L090169	花蓮縣花蓮市	M	2	-	-	-	IgG
11	L090600	基隆市中山區	M	6	-	-	-	IgG
12	L090601	新北市板橋區	F	2	-	-	-	NA
13	L090602	臺北市士林區	F	15	-	-	-	-
14	L090603	高雄市鳥松區	M	4	-	-	-	NA
15	L090604	桃園市中壢區	M	6	-	-	-	NA
16	L090605	桃園市桃園區	M	14	-	-	-	NA
17	L090606	新竹市東區	F	5	-	-	-	-
18	L090608	臺東縣臺東市	M	3	-	-	-	-
19	L090609	花蓮縣光復鄉	M	7	-	-	-	NA
20	L090610	新北市板橋區	F	16	-	-	-	NA
21	L090611	新北市永和區	M	1	-	-	-	-
22	L090364	彰化縣大城鄉	F	9	-	-	-	NA

NA:無二採血清; IgG:血清抗體無四倍上升，判定為曾經感染過。

十、以 TaqMan probe real-time PCR 偵測地方性斑疹傷寒 ompB 基因片段，地方性斑疹傷寒 Outer membrane protein B (ompB) 是 *Rickettsia typhi* 重要表面抗原蛋白，以其 coding sequence 作目標，藉 Primer BLAST 軟體進行探針、 primer 的設計與測試，可複製增殖的 ompB 目標核苷酸片段為 197 bp (表五)。

表五、以 TaqMan probe real-time PCR 放大地方性斑疹傷寒 ompB 基因核苷酸片段為

197 bp

1 GCAAAATGAATATTAGAAAGTGGACTTTCTGCACTACCTAAATTCGTACCATCA
GCAAGAGCTGTATCAGTATTAATAGGATCAGCGCAACTATGATTTTACCTTG
 ATTTGCAGCATTGATAGTTTTTGTATTATAAGTAAGTATTGTGAGTAAGGTGTAC
 TGAACCATCATTTTCCATAACTACTCGTTAATAGC **197**

Primer	Sequence (5' - 3')
Forward	GCAAAATGAATATTAGAAAGTGGAC
Reverse	GCTATTAACGAGTTAGTTATGGAA
Probe	Cy5-TCGTACCATCAGCAAGAGCTGTATCA-BHQ2

十一、完成建置 *Rickettsia typhi* ompB TaqMan probe real-time PCR 系統並測試其敏感性(Sensitivity)。以 100 ng *Rickettsia typhi* 核酸進行十倍序列稀釋，進行即時 TaqMan probe real-time PCR 測試(Fig.6A)。產物可由 Cy5 探針螢光訊號偵測，亦可於 2% 洋菜膠上進行分析(Fig.6B)，結果顯示 *Rickettsia typhi* ompB TaqMan probe real-time PCR 系統的 LOD 可偵測到 10 pg 的核酸。

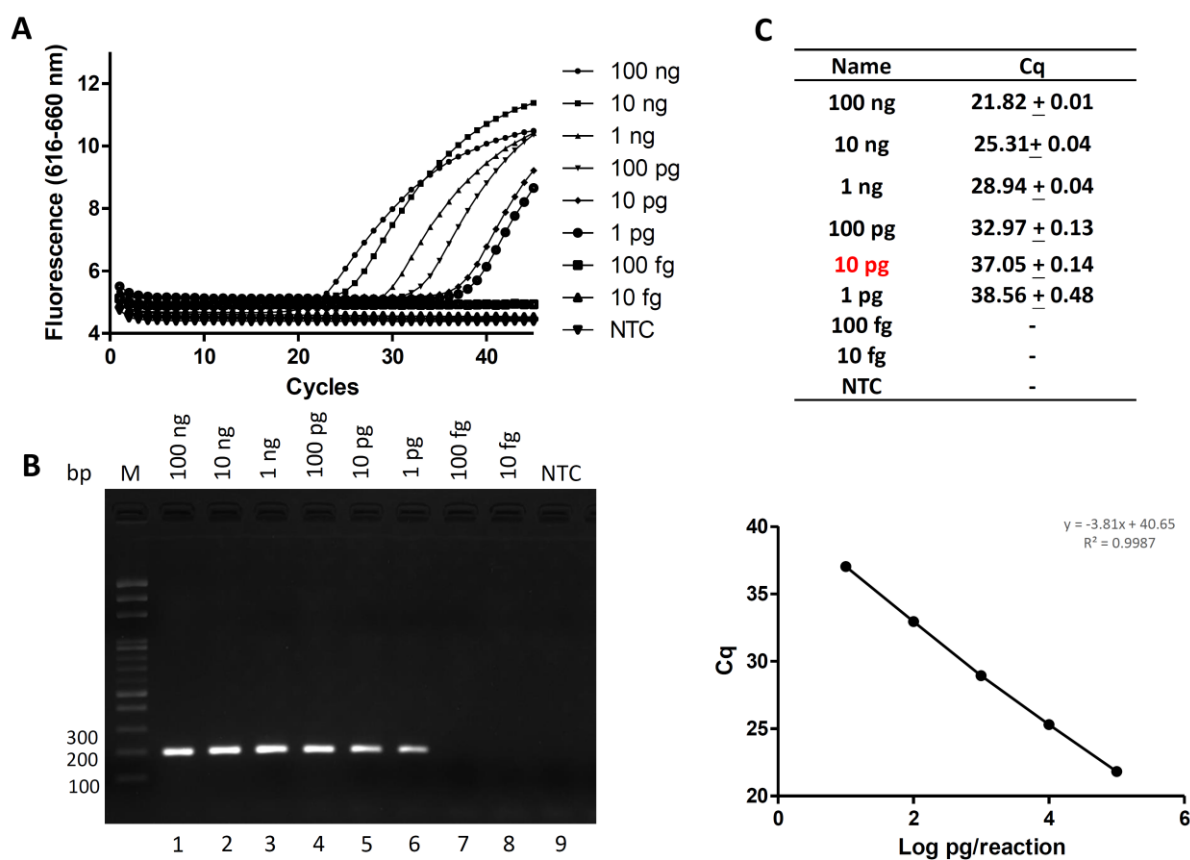


Fig. 6 TaqMan probe real-time PCR 系統對 *Rickettsia typhi* 反應靈敏度為 10 pg。(A) 即時螢光反應結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 系統對 *Rickettsia typhi* ompB 的 LOD 可偵測到 10 pg 的核酸。(B) 核酸產物為 197 bp，可見於 2% 洋菜膠上進行分析。

十二、TaqMan probe real-time PCR 系統對 pET47b-ompB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。以 pET47b-ompB plasmid 測試樣品從 10^8 copy 進行十倍序列稀釋至 10^0 copy，再進行即時螢光 TaqMan probe real-time PCR 測試，結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pET47b-ompB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。

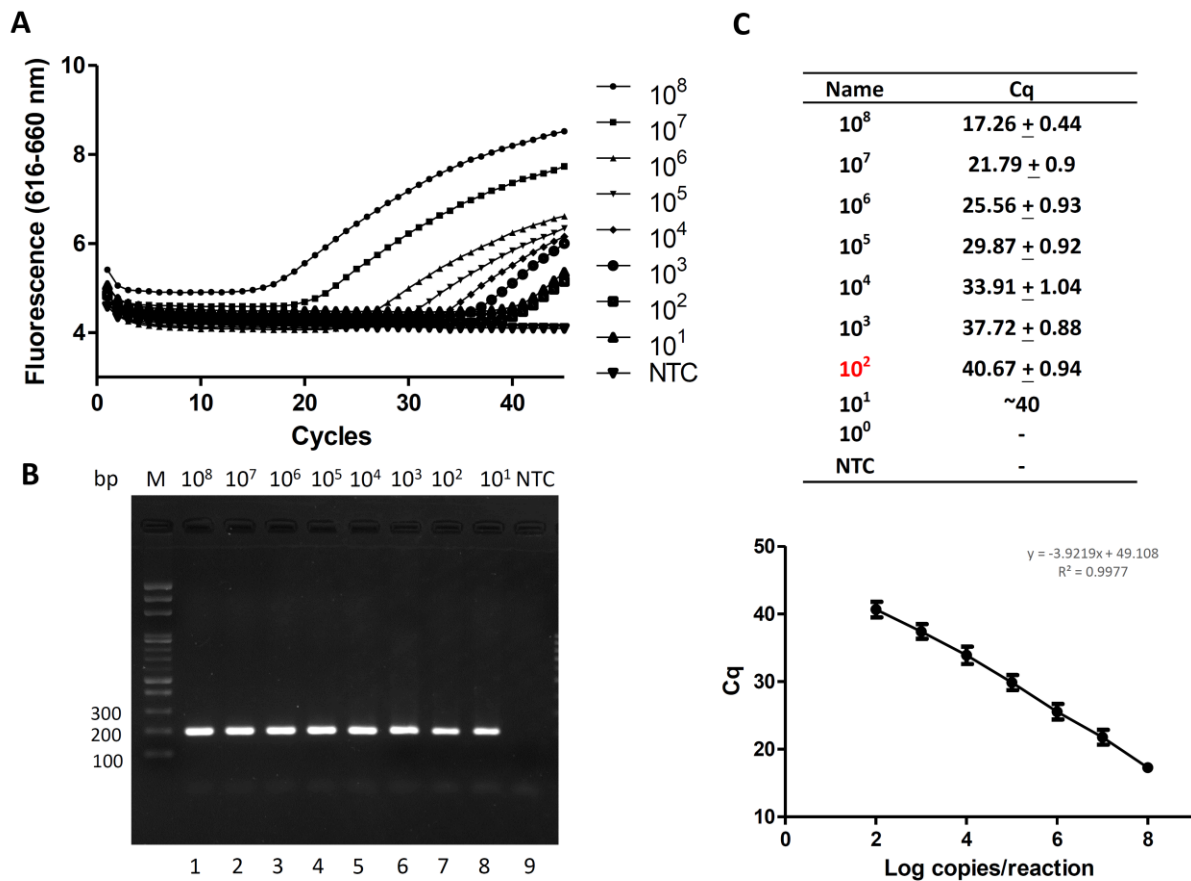


Fig. 7 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pET47b-ompB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。(A) 即時螢光反應結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pET47b-ompB plasmid 的 LOD 可偵測到 100 copy 的核酸。(B) 核酸產物可見於 2% 洋菜膠上進行分析。

十三、開發 TaqMan probe real-time PCR 系統可專一性辨認 *Rickettsia typhi*。為確認

TaqMan probe real-time PCR 專一性，萃取多種立克次體(*O. tsutsugamushi*、*R. typhi*、*R. prowazekii*、*R. rickettsii*、*R. felis*、*R. conorii*、*R. japonica*、*A. phagocytophilum* 與 *E. chaffeensis*)的核酸(Lanes 1 to 9)進行測試，每個反應加入 1 ng 核酸進行 TaqMan probe real-time PCR 測試，TaqMan probe real-time PCR 系統只專一性的放大 *Rickettsia typhi ompB* 基因片段，結果顯示 TaqMan probe real-time PCR 具高專一性 **Fig.(8A)**。TaqMan probe real-time PCR 放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體則無，再次驗證所開發 TaqMan probe real-time PCR 對地方性斑疹傷寒具高度專一性 **Fig.(8C)**。

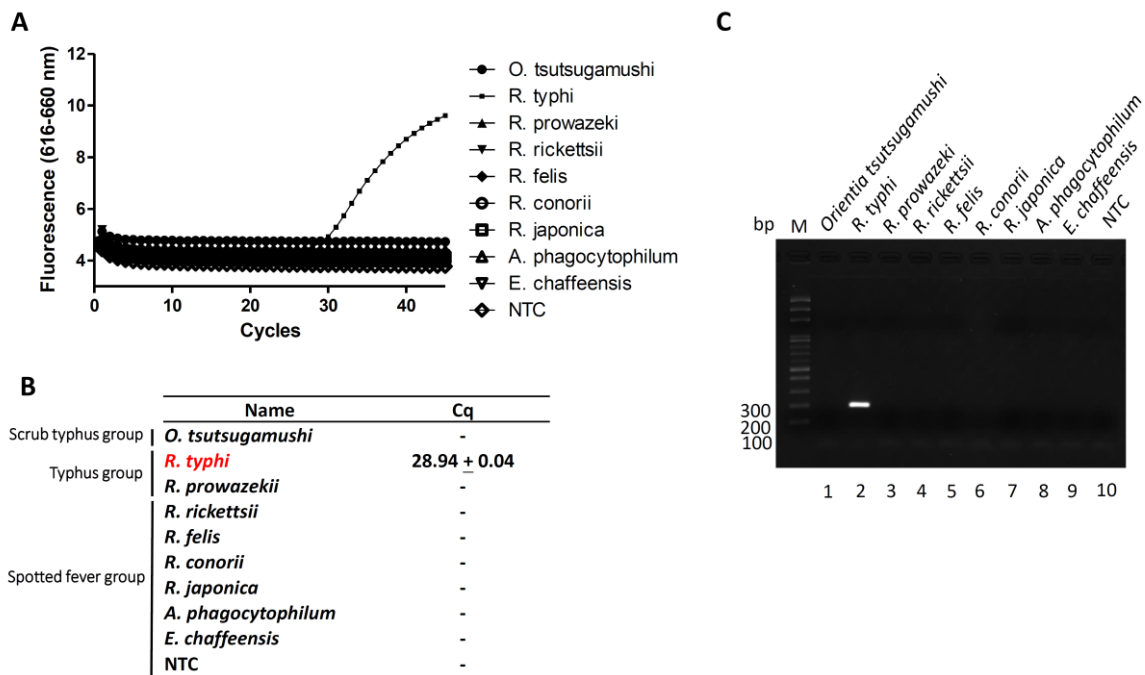


Fig.8 TaqMan probe real-time PCR 系統對 *Rickettsia typhi* 檢測具高度專一性 **(A)** TaqMan probe real-time PCR 即時偵測結果。萃取多種立克次體(*O. tsutsugamushi*、*R. typhi*、*R. prowazekii*、*R. rickettsii*、*R. felis*、*R. conorii*、*R. japonica*、*A. phagocytophilum* 與 *E. chaffeensis*)的核酸進行測試，TaqMan probe real-time PCR 系統只專一性的放大 *R. typhi ompB* 基因片段，結果顯示所開發之地方性斑疹傷寒 TaqMan probe real-time PCR 具高專一性。**(B)** 為 TaqMan probe real-time PCR 核酸增幅之 Cq，*R. typhi ompB* 基因片段在 28.94 cycles 時可被放大。**(C)** *R. typhi* 放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體則不會，再次驗證開發 TaqMan probe real-time PCR 對地方性斑疹傷寒具高度專一性。

十四、TaqMan probe real-time PCR 系統檢測臨床地方性斑疹傷寒 PCR 陽性與陰性 檢體核酸從臨床檢體中選取 6 個陽性與 10 個陰性 PCR 核酸檢體，利用所開發之 Taqman probe real-time PCR 進行檢測，結果與現行臨床檢驗方法一致，敏感性與專一性為 100% (Fig. 9 與表六)。

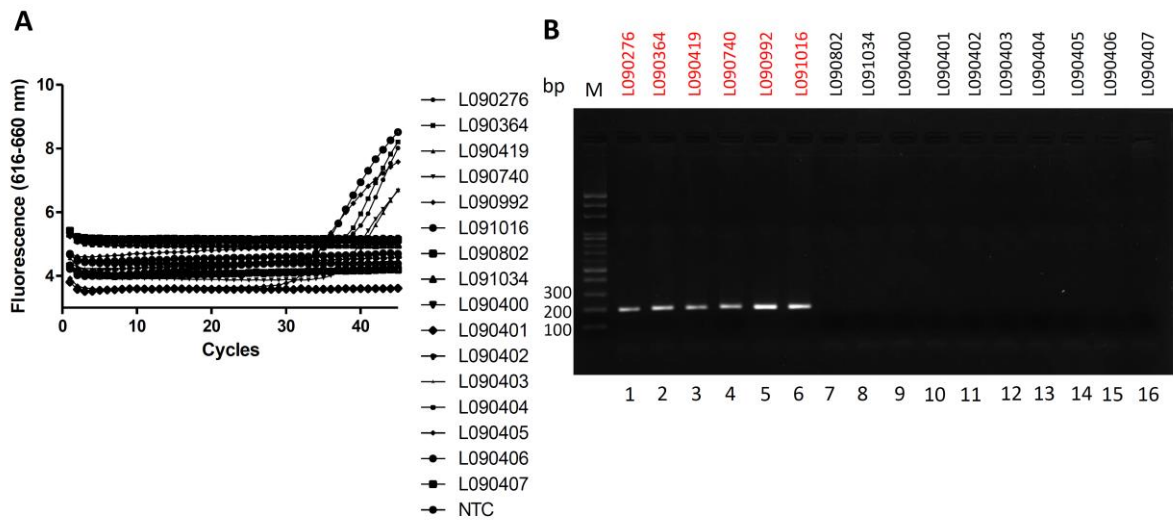


Fig. 9 TaqMan probe real-time PCR 系統對 *Rickettsia typhi* 臨床檢測具高度敏感性與專一性。(A) TaqMan probe real-time PCR 即時偵測結果。(B) *R. typhii* 放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel。

表六、由所開發之 TaqMan probe real-time PCR 系統偵測送驗臨床檢體中，*Rickettsia typhi* *ompB* 基因核酸片段。6 個陽性檢體中可驗得 6 個，而 10 個陰性檢體皆呈陰性，敏感性與專一性皆為 100%。

	檢體編號	16S qPCR	17kDa qPCR	<i>ompB</i> Taqman
1	L090276	39.559	36.03	40
2	L090364	38.490	34.9	37.82
3	L090419	36.266	36.44	38.2
4	L090740	36.902	36.97	36.84
5	L090992	29.608	32.73	31.53
6	L091016	32.325	33.02	34.5
1	L090802	-	-	-
2	L091034	-	-	-
3	L090400	-	-	-
4	L090401	-	-	-
5	L090402	-	-	-
6	L090403	-	-	-
7	L090404	-	-	-
8	L090405	-	-	-
9	L090406	-	-	-
10	L090407	-	-	-

十五、建置 Multiplex Taqman real-time PCR 系統，在單一反應下可同時檢驗恙蟲病與地方性斑疹傷寒。用 121 個臨床檢體進行測試，其中包含 50 個恙蟲病 PCR 陽性檢體、7 個地方性斑疹傷寒 PCR 陽性檢體與 64 個 PCR 陰性檢體。結果顯示其對於恙蟲病之敏感性為 100%(50/50)、專一性為 92.95%(66/71)(但若合併 IFA 結果其專一性應為 97.18(69/71)-100%(71/71))；對於地方性斑疹傷寒之敏感性為 100%(7/7)、專一性為 100%(114/114)(表七)。

表七、Multiplex Taqman real-time PCR 對恙蟲病與地方性斑疹傷寒臨床檢體測試結果

			Routine (16S+TSA56)		Routine (16S+17kDa)	
			OT		RT	
			+	-	+	-
Multiplex	OT (GyrB)	+	50	5*	0	50
		-	0	66	7	64
	RT (OmpB)	+	0	7	7	0
		-	50	64	0	114

*5 個檢體分別為: L091586(IFA 陽性)、L091589(IFA 陽性)、L091595(IFA 陽性)、L091597(無二採血清檢體)、L091441(無二採血清檢體)

109 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱: 新興立克次體多重核酸快速檢驗試劑開發

計畫主持人: 楊素鈴技正

填報日期: 109.12.15

*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	無特殊建議。	謝謝委員建議與肯定	無
2	平台已建立，但與 PCR 有無差別？	<ol style="list-style-type: none"> 1. 謝謝委員的建議。 2. PCR 原理是利用 DNA 雙鏈複製的功能，在生物體外複製並放大特定 DNA 片段的核酸合成技術。 3. Multiplex Tagman Probe RT-PCR 是運用專一性的螢光探針，藉由光學偵測系統在核酸複製的過程中可以即時測得病原體特定基因鑑別感染種類，相較於傳統 PCR，具有高度的專一性、不需電泳膠實驗費時費力，可大幅縮短檢驗操作過程流程與及早確認感染源的種類。 	無
3	非必要性，是否需繼續發展？	<ol style="list-style-type: none"> 1. 謝謝委員的建議。 2. 許多病原體感染後會產生相同的症狀及表徵，使其難以區別並延誤治療，藉由專一性的探針能在感染早期即時檢驗是否含有病原體。 3. 目前血清學診斷方式主要以病人的急性期與恢復期血清，且需藉由有經驗的技術 	無

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
		<p>人員來判讀 IFA，較為主觀並費時費力，而傳統例行性的分生檢驗方法則無法進行多重 tagman probe 標誌，如果是陽性的結果會需再進行第二次特異性 RT-PCR 鑑別感染種類，無法在第一時間同步確認感染病源。</p> <p>4. 在樣本量有限的情況下，本研究擬建多蟲 Multiplex Tagman Probe RT-PCR 檢驗系統，藉由不同病原體的專一性探針，能夠在同一個試管內進行多達 4 種以上病原體檢測外，同時還可鑑定不同感染源的種類，並大幅縮減檢驗過程所花費的時間，俾利進行立克次體的疫情防治。</p>	