

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-112303

衛生福利部疾病管制署 107 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：107 年 1 月 1 日至 107 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	7
三、結果	11
四、討論	15
五、結論與建議	16
六、重要研究成果及具體建議	17
七、參考文獻	18
八、圖、表	20

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。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。本年度完成恙蟲病及地方性斑疹傷寒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 *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia typhi* 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。

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 400-500 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。亦歸類為第四類傳染病。目前實驗室診斷通常用IFA鑑定。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，而污染了叮咬皮膚傷口，造成感染，偶爾也有因吸入了乾的蚤糞而感染的病例。在人口聚集、衛生條件不良，且人、鼠和蚤密集的地區，常見地方性斑疹傷寒流行。

雖然real time-PCR可用來檢測立克次體，但其缺點是real time-PCR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參考。

## 二、材料與方法

### (一) NASBA 及 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  $\mu$ l，以 QIAmp DNA blood Mini Kit ( Qiagen, Cat. No. 51106 ) 萃取立克次體細胞內核酸。分別加入 20  $\mu$ l Proteinase K 與 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 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) 等重要立克次體病原。針對 *Orientia tsutsugamushi* 特有的外膜蛋白 22kD type-specific antigen (TSA22)、*Rickettsia typhi* 的 OmpB 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 (Net laboratory, Japan, <http://venus.netlaboratory.com>)。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(TSA22、OmpB、16S rRNA)及從實驗室培養的立克次體中萃取的 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 $\mu$ l 立克次體 genomic DNA 加入含有 2X buffer Mix(50mM KCl、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton-X 100、dNTP mixture 1mM)、5 units *Taq* polymerase 共 50 $\mu$ 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 *Orientia tsutsugamushi* 特有的外膜蛋白 22kD type-specific antigen (TSA22)、*Rickettsia typhi* 的 OmpB 基因片段進行引子設計。
- 2. SYBR Green 即時螢光定量反轉錄酶／聚合酶鍊鎖反應 (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 $\mu$ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5  $\mu$ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10  $\mu$ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50  $\mu$ l。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：50 $^{\circ}$ C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95 $^{\circ}$ C 15 分鐘，40 至 50 次循環之 94 $^{\circ}$ C 15 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒、77 $^{\circ}$ C 30 秒 (讀取螢光值)。另外，以 plasmid (TSA22、OmpB、16S rRNA)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 $^{\circ}$ C, 1 分鐘、68 $^{\circ}$ C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5 $^{\circ}$ C/30 秒/循環。

### 三、結果

#### 1. 恙蟲病與地方性斑疹傷寒的 LAMP 系統之引子設計與合成：

**Table 1** 所示為針對恙蟲病與地方性斑疹傷寒所設計之引子組。

- a. 設計一組新穎的 *Orientia tsutsugamushi* (OT) LAMP 引子組，target 為 TSA22，針對恙蟲病之偵測(**Table 2**)。
- b. 設計一組新穎的 *Rickettsia typhi* (RT) LAMP 引子組，target 為 OmpB，針對地方性斑疹傷寒之偵測(**Table 4**)。

#### 2. 恙蟲病 LAMP 對恙蟲病菌株之敏感性測試

- a. 檢測 LAMP 敏感性，以 86.7 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 86.7 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. 恙蟲病 LAMP 對 pCR2.1-TSA22 plasmid 之敏感性測試

建置帶有 TSA22 目標核酸片段的 pCR2.1 plasmid (**Fig. 2**)，用以進行敏感性測試。

- a. pCR2.1-TSA22 plasmid 從  $10^5$  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-TSA22 plasmid 的 limit of detection (LOD)可偵測到約 1 個 copy 的核酸

(Fig.3A)。

- b. 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 20 分鐘內增殖 (Fig. 3B)。
- 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 1000 個 copy 的核酸(Fig. 3C)。
- d. 產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 40 個 cycle 內增殖(Fig. 3D)。

目前實驗室偵測恙蟲病基因片段所使用 16S rRNA 的 qPCR primer，其靈敏度約為 100 個 copies/reaction (Fig. 4)。結果顯示我們所開發的恙蟲病 LAMP 具有更高的敏感性。

#### 4. 恙蟲病 LAMP 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 *O. tsutsugamushi*，結果顯示 LAMP 具高專一性(Fig. 5A)。
- b. *O. tsustugamushi* 核酸產物會在 13.5 分鐘開始增幅 (Fig. 5B)。
- c. *O. tsustugamushi* 核酸產物可清楚見於 2% 洋菜膠上(Fig. 5C)。

#### 5. 所開發之恙蟲病 LAMP 可檢測出臺灣本土菌株型別

- a 確認所開發之 LAMP 可廣泛偵測不同型別的恙蟲病菌株，將 LAMP 所辨認的 TSA22 基因目標核酸序列進行比對，比對菌株包含: Karp, Gilliam, Kato, TW1, TW10, TW19, TW22, TW24,

TW4, TW2, TW20, TW21 and TW12，其中臺灣較為常見的 TW1、TW10、TW19 及 TW22。發現這些菌株的 TSA22 基因序列的相似度高(Fig. 6A)。

- 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 90-100%(Fig. 6B)。
- c. LAMP 反應之核酸產物可清楚見於 2% 洋菜膠上(Fig. 6C)。所測試的恙蟲病菌株皆可被辨認增幅。

## 6. 所開發之恙蟲病 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 年恙蟲病送驗檢體共 34 個，其中 14 個經 qPCR 確認為恙蟲病陽性，10 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 10 個陰性檢體進行專一性測試。
- b. 結果顯示 14/14 個 qPCR 陽性檢體可被 LAMP 驗出，4/10 個 IFA 陽性(qPCR 陰性)檢體可被 LAMP 驗出，0/10 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 75% (18/24) 較\_qPCR(14/24, 58%)更為敏感，且可測得部分 qPCR 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 LAMP 對地方性斑疹傷寒菌液之敏感性測試

- a. 檢測 LAMP，以 1.3 ng *Rickettsia typhi* 核酸進行十倍序列稀釋，進行 LAMP 測試，檢測之靈敏度為 1.3 fg。產物可清楚見於 2% 洋菜膠上。產物可於 20 分鐘內增殖(Fig. 7A)。
- 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 13 fg 的核酸。產物可清楚見於 2% 洋

菜膠上。產物可於 50 個 cycle 內增殖(Fig. 7B)。

c. routine primer(17kDa)進行 Qiagen Quanti Nova SYBR Green 於 Roche Light Cycler 480 亦進行即時螢光偵測 PCR，1.3 ng *Rickettsia typhi* 核酸進行十倍序列稀釋，結果每一反應可偵測到 13 fg 的核酸(Fig. 7C)。

#### 8. 地方性斑疹傷寒 LAMP 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 LAMP 測試，結果顯示 LAMP 系統對 PET47b-ompB plasmid 的 LOD 可偵測到 10 copy 的核酸(Fig. 8A)。

b. 以 LAMP L3, B3 2 條 primer Qiagen Quanti Nova SYBR Green 進行即時螢光偵測 PET47b-ompB plasmid 從  $10^8$  copy 進行十倍序列稀釋至 1 copy，結果 qPCR 的 LOD 亦可偵測到 10 copy 的核酸(Fig. 8B)。

#### 9. 地方性斑疹傷寒 LAMP 之專一性測試

a. 進一步確認 LAMP 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 0.7 ng 核酸進行 LAMP 測試，LAMP 系統只專一性的放大 *R. typhi*，結果顯示 LAMP 具高專一性(Fig. 9A)。

b. 由於 *R. typhi* 與 *R. prowazekii* 皆屬於 Typhus group，LAMP 所放大的核酸區域在兩物種的序列相似度為 92%，因此在高濃度的

核酸反應中會偵測到 *R. prowazekii*，但偵測到產物的時間較 *R. typhi* 慢 3 倍(Fig. 9B)。

- 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，再次證實開發 LAMP 對地方性斑疹傷寒具高度專一性(Fig. 9C)。

#### 11. 地方性斑疹傷寒 LAMP 進行臨床檢體測試

**Table 5** 檢體來源為臺灣民國 105 及 106 年地方性斑疹傷寒陽性確診檢體共 38 個，其中 10 個為 qPCR 確認 (26.3%)，34 個為間接免疫螢光法(IFA)確認 (89.5%)。本研究中共有 26 個檢體可被 LAMP 所偵測(68.4%)(Fig. 11)。比較 LAMP 與 qPCR 兩種核酸檢驗方法結果，LAMP 較 qPCR 具更高的敏感性(高 2.6 倍)。另外，能被 qPCR 所檢出的陽性檢體其地方性斑疹傷寒的核酸量也較高，因此被 LAMP 所偵測到的平均時間也越快。

#### 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 1~3 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。本研究開發出恙蟲病之 LAMP 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在 1 copy/reaction 之間並能快速在 30 分鐘內進行增幅反應。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%)，且 LAMP 相較於 qPCR 可能具有更高的敏感度。本研究也開發出第一個專門針對地方性斑疹傷寒的 LAMP 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在 10 copy/reaction 之間並能在 60 分鐘內進行增幅反應，對於臨床檢體，LAMP 相較於 qPCR 具有更高的敏感度。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 *Anaplasma phagocytophilum* 及 *Ehrlichia chaffeensis* 等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。本計畫以成功開發出可偵測恙蟲病與地方性斑疹傷寒的等溫核酸檢測 LAMP 方法，具有高度專一性與敏感性，較現行之 qPCR 方法有更高敏感性。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

我們開發出恙蟲病與地方性斑疹傷寒等溫核酸檢測方法(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。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. Schukink, 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 HT<sup>1</sup>, Sun LS<sup>1</sup>, Chen ZM<sup>1</sup>, Hu JS<sup>1</sup>, Ye CD<sup>1</sup>, Jia K<sup>1</sup>, Wang H<sup>1</sup>, Yuan LG<sup>1</sup>, Zhang GH<sup>1</sup>, 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* and *Rickettsia typhi*.**

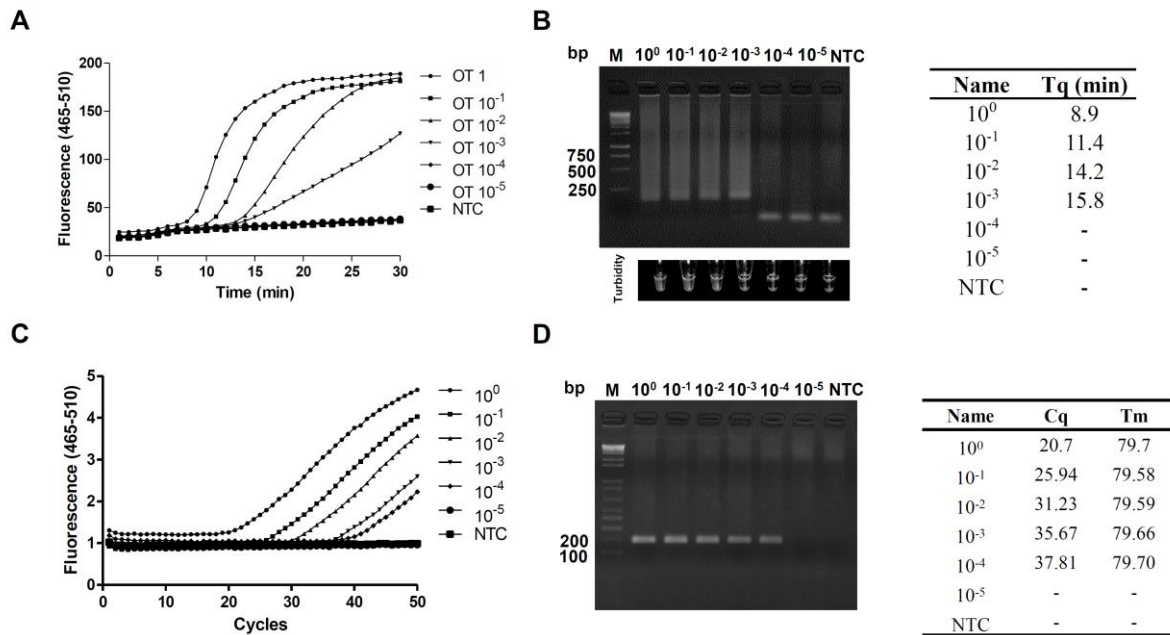
<b>Primer Name</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
OT - F3	TCAAAGCTAGTAGATAGCGC
OT - B3	CTGCTTCTCCAGCTTCAA
OT - FIP	CTCTTTCATGCCTGTAAAGGCC-TTGTACAAACTGCAGTTAAGGT
OT - BIP	AGGAATAATGGGTGTAGCTGCA-TCATATTGCTCACCCCTTG
OT - LF	GCATCATTTCTGTGGAA
OT - LB	GGCATACAAACCTGTTACTAG
RT - F3	GCAAAATGAATATTAGAAAGTGGAC
RT - B3	GCTATTAACGAGTTAGTTATGGAA
RT - FIP	GCCGCTGATCCTATTAATACTGAT-TTTCTGCACTACCTAAATTCG
RT - BIP	ATGATTTTACCTTGATTTGCAGCAT-TGATGGTTCAGTACACCTTAC
RT - LF	CTCTTGCTGATGGTA
RT - LB	GTTATTAAGTAAGTATTGTG

**Table 2. The *Orientia tsutsugamushi* TW1 TSA22 gene indicating names and binding sites of primer for LAMP.**

		<b>F3</b>			
<b>1</b>	<u>TCAAAG</u>	CTAGTAGATA	GCGCAGTAAA	ATTTGTACAA	<b>36</b>
	<b>F2</b>		<b>LF</b>		
<b>37</b>	<u>ACTGCAGTTA</u>	AGGTTTCCAC	AGAAATGATG	CAGGCCTTTA	<b>76</b>
	<b>F1C</b>		<b>B1C</b>		
<b>77</b>	<u>CAGGCATGAA</u>	AGAGAAAGGA	ATAATGGGTG	TAGCTGCAGG	<b>116</b>
	<b>LB</b>				
<b>117</b>	<u>CATACAAACT</u>	GTTACTAGTG	GATTTCAAAA	TATAACACAA	<b>156</b>
	<b>B2</b>		<b>B3</b>		
<b>157</b>	<u>GGGGTGAGCA</u>	ATATGATTGA	AGCTGGAGAA	GCAG	<b>190</b>

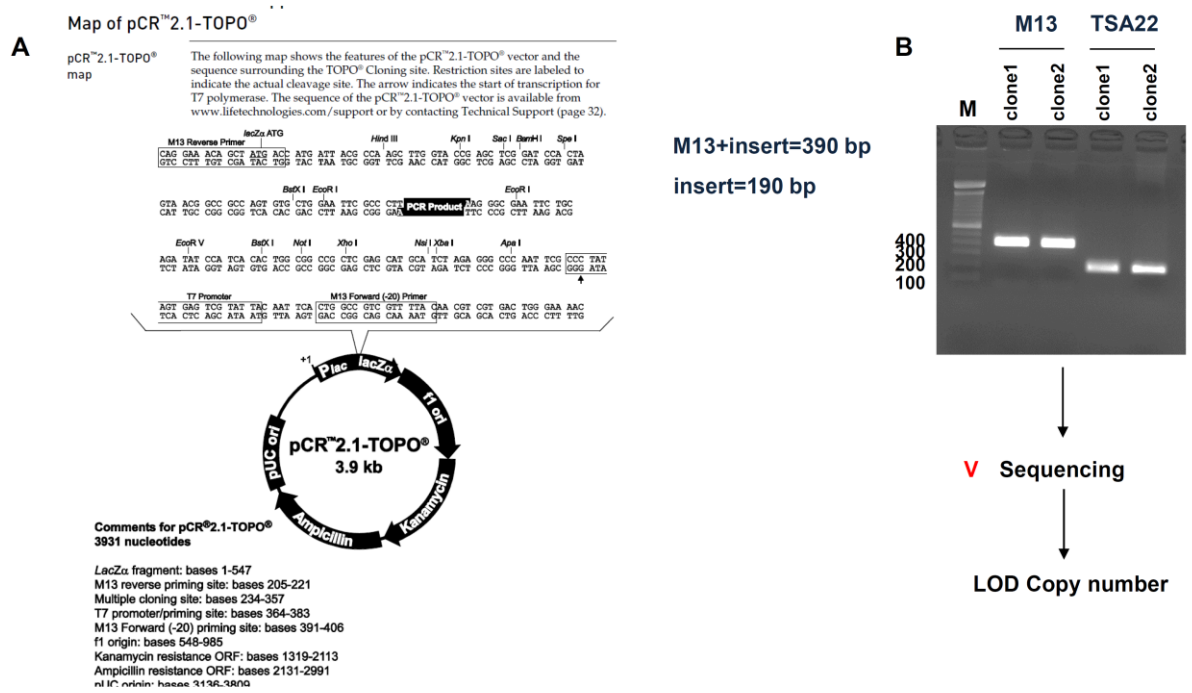
**恙虫病 *Orientia tsutsugamushi*-Type specific antigen 22(TSA22)**

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
F3	TCAAAGCTAGTAGATAGCGC
B3	CTGCTTCTCCAGCTTCAA
FIP (F1c-F2)	CTCTTTCATGCCTGTAAAGGCC-TTGTACAAACTGCAGTTAAGGT
BIP (B1c-B2)	AGGAATAATGGGTGTAGCTGCA-TCATATTGCTCACCCCTTG
LF	GCATCATTCTGTGGAA
LB	GGCATACAAACTGTTACTAG



**Figure 1. Comparison of the detection limit of TSA22 LAMP and qPCR for cultured *Orientia tsutsugamushi* TW1 strain.**

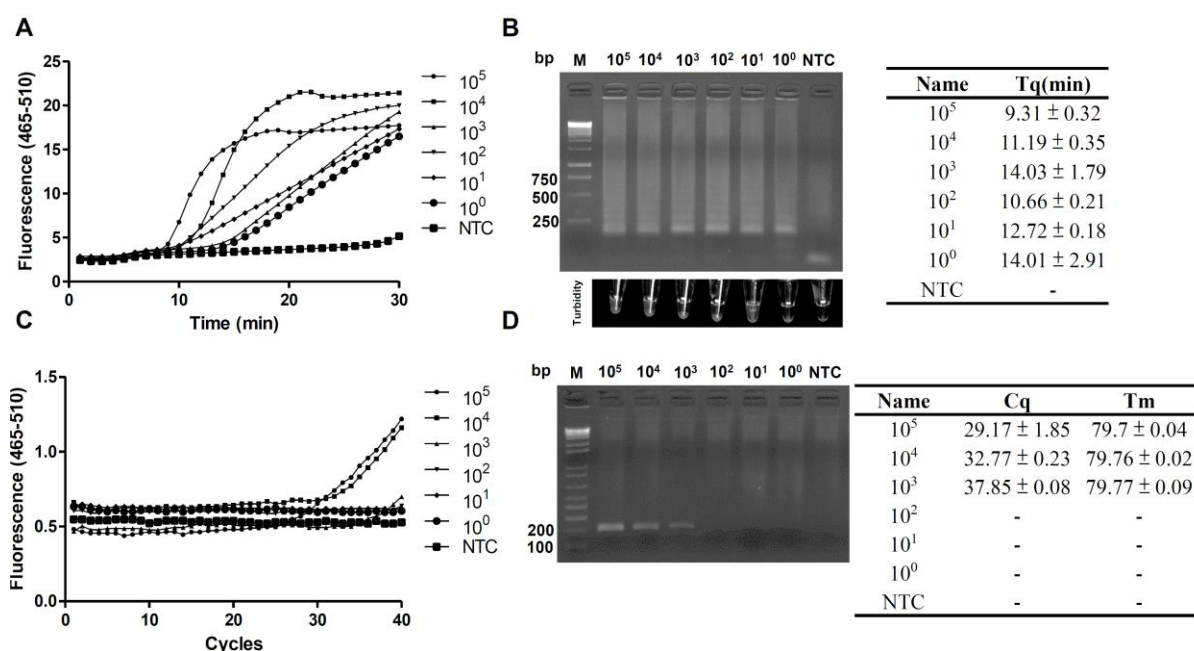
(A) Sensitivity of the LAMP assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (C) The L3 and B3 primers from LAMP were used for real-time qPCR. (D) The PCR product was observed after 2% agarose gel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



**Figure 2. The pCR2.1-TSA22 containing the *Orientia tsutsugamushi* TSA22 gene is generated as reference plasmid.**

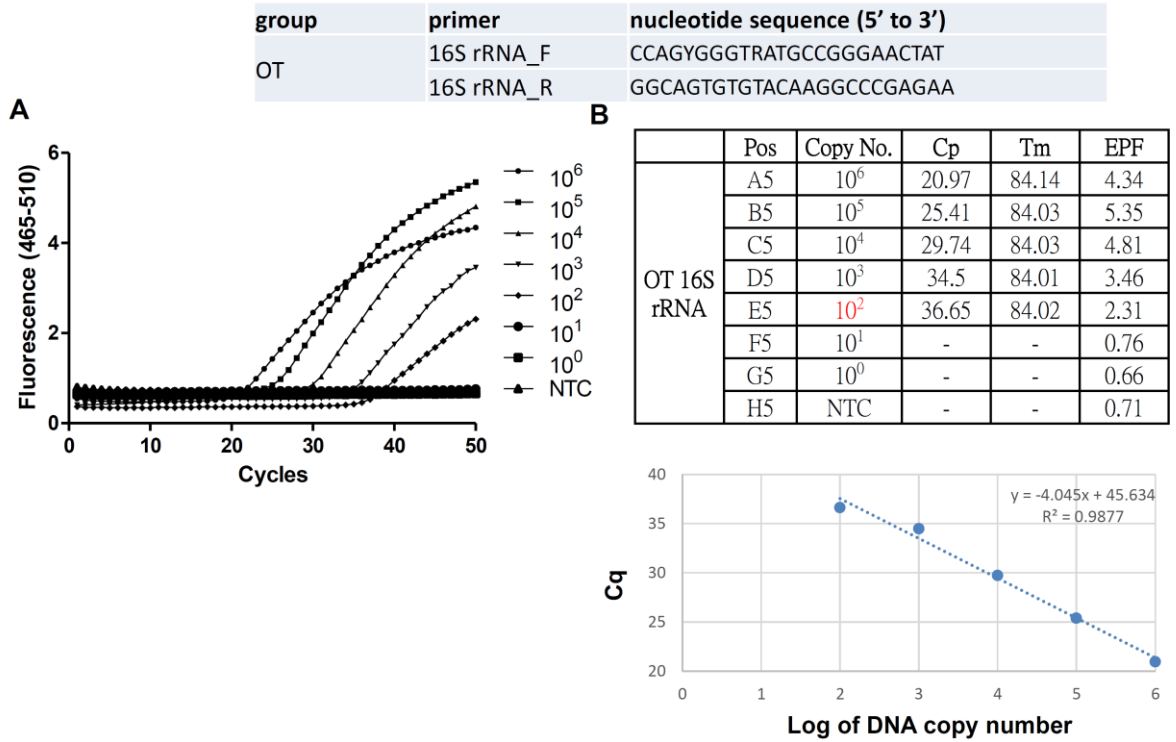
(A) The map of pCR2.1 (~3.9 kb). (B) The PCR products (190 bp) were cloned into the pCR2.1 vector using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen). The plasmid was verified by DNA sequencing, quantified by BioDrop and diluted for evaluating the limit of detection of the assays.





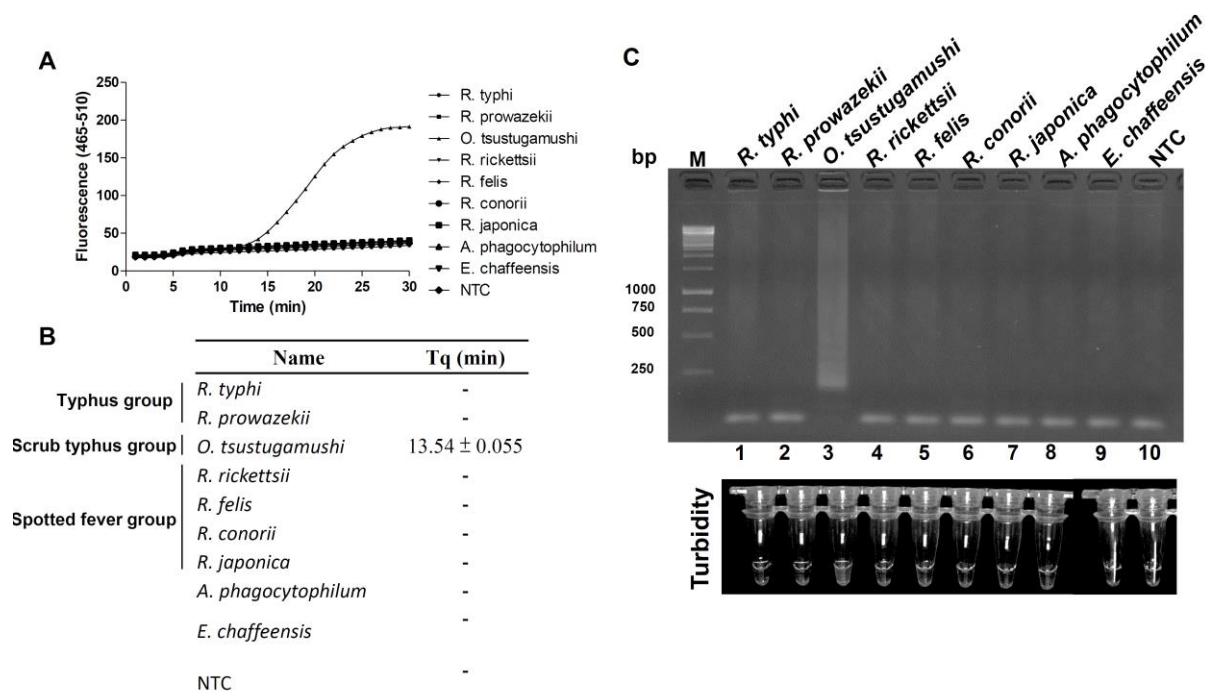
**Figure 3. Comparison of the detection limit of TSA22 LAMP and qPCR for recombinant plasmid containing target sequence of TSA22 gene.**

(A) Serially diluted plasmid (10<sup>5</sup> to 10<sup>0</sup> copies/reaction) were used to evaluate the limit of detection of 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) The L3 and B3 primers from LAMP were used for real-time qPCR. (D) The PCR product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.



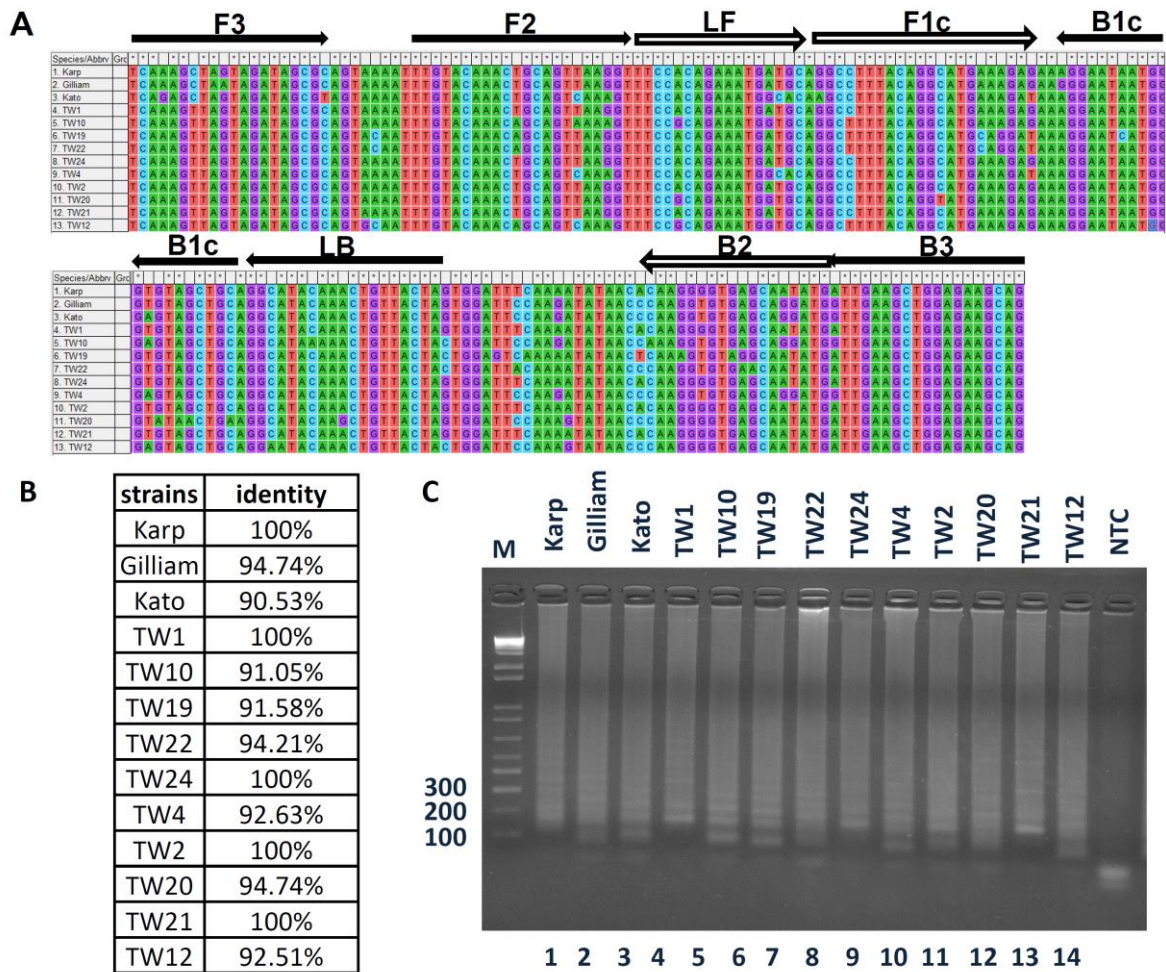
**Figure 4. The detection limit of *Orientia tsutsugamushi* routine 16S rRNA primers is 100 copies.**

(A) Serially diluted 16S rRNA reference plasmid (10<sup>5</sup> to 10<sup>0</sup> copies/reaction) were used to evaluate the limit of detection of qPCR. Sensitivity of the assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) The result of qPCR crossing point (Cp), melting emperature(Tm) and end point fluorescence (EPF) were shown.



**Figure 5. TSA22 LAMP specifically detect *Orientia tsutsugamushi* but not the 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 as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. (B) The quantitative time (Tq) represents the starting time point of the DNA product amplified. (C) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.



**Figure 6. TSA22 LAMP can detect *Orientia tsutsugamushi* strains.**

(A) Sequence alignment of LAMP targeted sequences of TSA22 gene from different strains including Karp, Gilliam, Kato, TW1, TW10, TW19, TW22, TW24, TW4, TW2, TW20, TW21 and TW12. (B) LAMP targeted TSA22 gene sequence identity between TW1 and other strains were shown in the table. (C) The LAMP amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.

**Table 3. Comparison of the LAMP assay with qPCR for the detection of the *Orientia tsutsugamushi* in clinical samples.**

	全血編號	年齡	性別	發病日	居住地	Routine qPCR	Routine IFA	LAMP (TSA22)	qPCR (TSA22)
1	L071705	25	M	6	高雄市	+	+	+	+
2	L071651	49	F	8	高雄市	+	+	+	-
3	L071605	63	F	8	台東縣	+	+	+	-
4	L071496	46	M	6	台東縣	+	+	+	-
5	L071428	61	M	5	台東縣	+	+	+	+
6	L071389	17	F	9	南投縣	+	+	+	+
7	L071373	56	M	9	高雄市	+	+	+	-
8	L071695	76	M	2	台東縣	+	ND	+	+
9	L071708	24	F	7	台北市	+	+	+	+
10	L071726	70	M	6	台東縣	+	+	+	-
11	L071747	50	F	5	屏東縣	+	ND	+	+
12	L071749	53	F	3	雲林縣	+	+	+	+
13	L071760	50	M	6	花蓮縣	+	+	+	+
14	L071809	80	M	10	花蓮縣	+	+	+	-
15	L071868	54	F	12	澎湖縣	-	+	-	+
16	L071619	37	M	6	花蓮縣	-	+	-	-
17	L071492	78	M	8	花蓮縣	-	+	+	-
18	L071665	39	M	7	屏東縣	-	+	-	-
19	L071591	52	F	4	高雄市	-	+	-	-
20	L071515	41	M	4	金門縣	-	+	-	-
21	L071564	64	M	10	台東縣	-	+	-	+
22	L071645	65	M	17	彰化縣	-	+	+	-
23	L071537	43	F	3	台東縣	-	+	+	-
24	L071601	52	M	10	新竹縣	-	+	+	-
25	L071890	52	F	12	彰化縣	-	-	-	-
26	L071774	78	F	1	台北市	-	-	-	-
27	L071792	57	F	3	花蓮縣	-	-	-	-
28	L071866	29	M	4	台中市	-	-	-	-
29	L071833	14	F	3	金門縣	-	-	-	-
30	L071895	34	M	5	高雄市	-	-	-	-
31	L071983	41	F	8	花蓮縣	-	-	-	-
32	L071891	72	F	1	台東縣	-	-	-	-
33	L071923	24	M	8	高雄市	-	-	-	-
34	L071919	71	F	1	高雄市	-	-	-	-

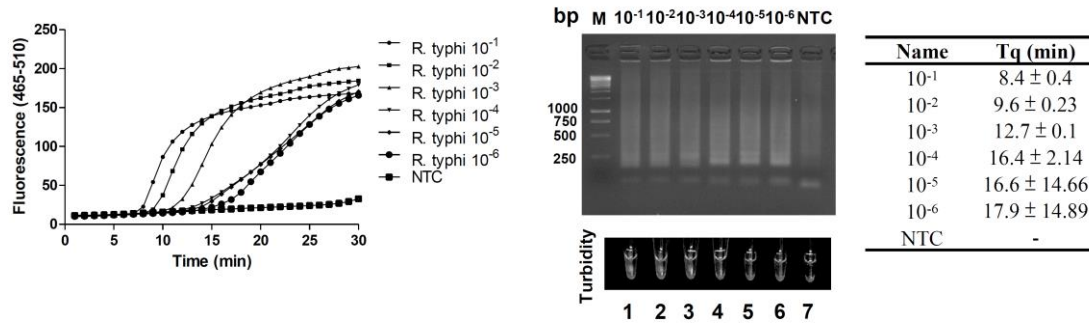
**Table 4. The *Rickettsia typhi* ompB gene indicating names and binding sites of primer for LAMP.**

	F3		F2			
1	GCAAAATGAA	TATTAGAAAG	TGGACTTTCT	GCACTACCTA	AATTCGTACC	50
	LF		F1C			
51	ATCAGCAAGA	GCTGTATCAG	TATTAATAGG	ATCAGCGGCA	ACTATGATTT	100
	B1C			LB		
101	TACCTTGATT	TGCAGCATTG	ATAGTTTTTG	TTATTAAGTA	AGTATTGTGA	150
	B2			B3		
151	GTAAGGTGTA	CTGAACCATC	ATTTCCATA	ACTAACTCGT	TAATAGC	197

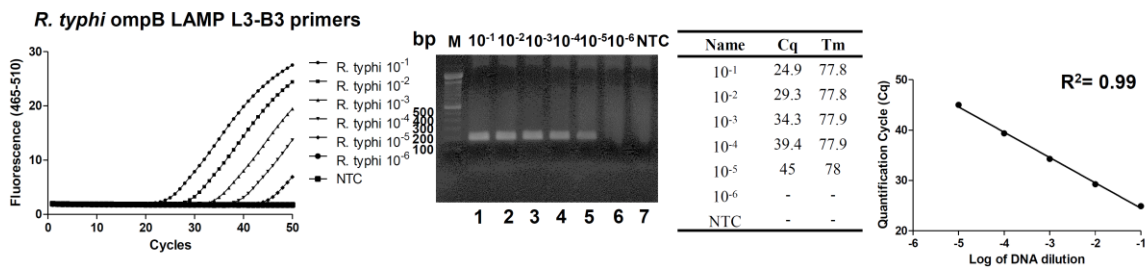
**地方性斑疹傷寒 *Rickettsia typhi*-outer membrane protein B(ompB)**

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
F3	GCAAAATGAATATTAGAAAGTGGAC
B3	GCTATTAACGAGTTAGTTATGGAA
FIP (F1c-F2)	GCCGCTGATCCTATTAATACTGAT-TTTCTGCACTACCTAAATTCG
BIP (B1c-B2)	ATGATTTTACCTTGATTTGCAGCAT-TGATGGTTCAGTACACCTTAC
LF	CTCTTGCTGATGGTA
LB	GTTATTAAGTAAGTATTGTG

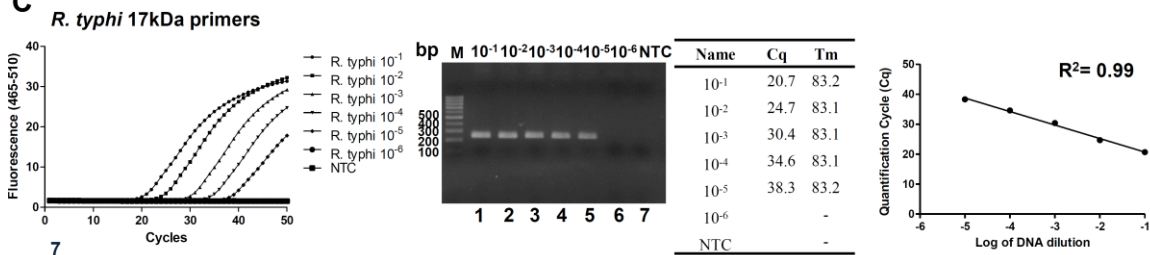
**A**



**B**

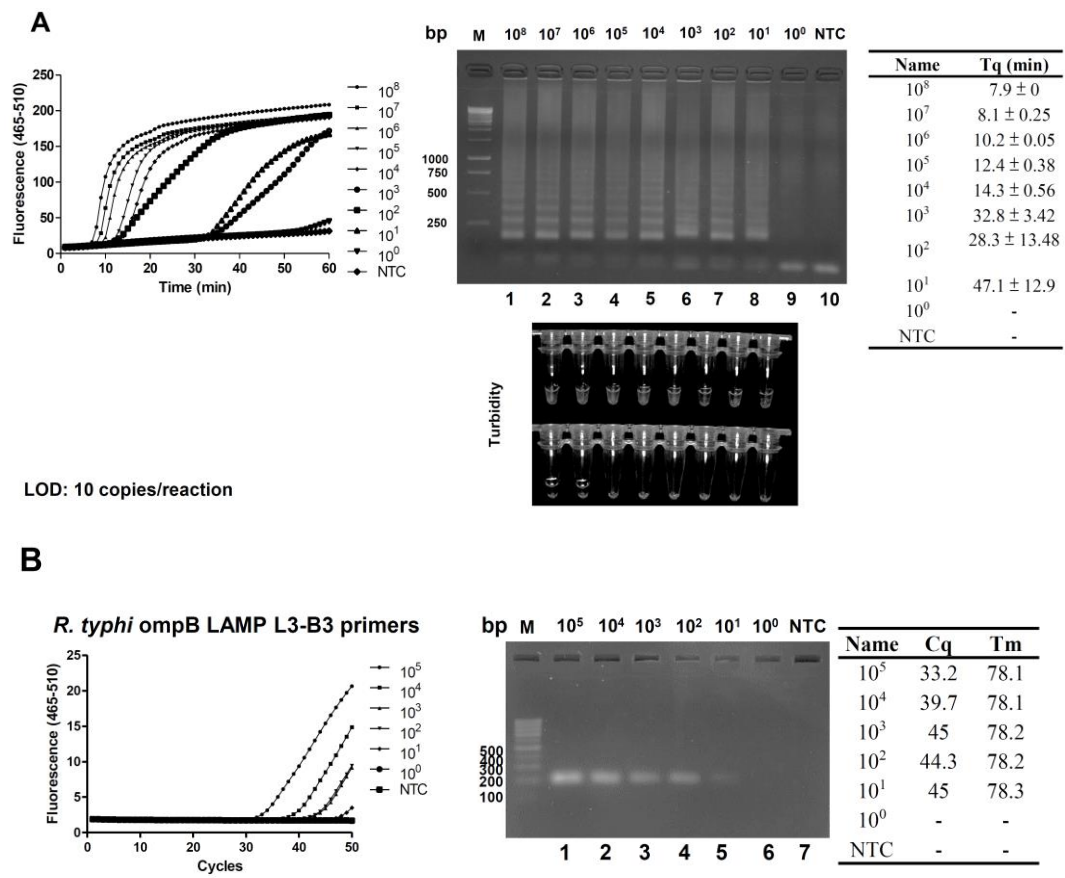


**C**



**Figure 7. Comparison of the detection limit of ompB LAMP and qPCR for cultured *Rickettsia typhi*.**

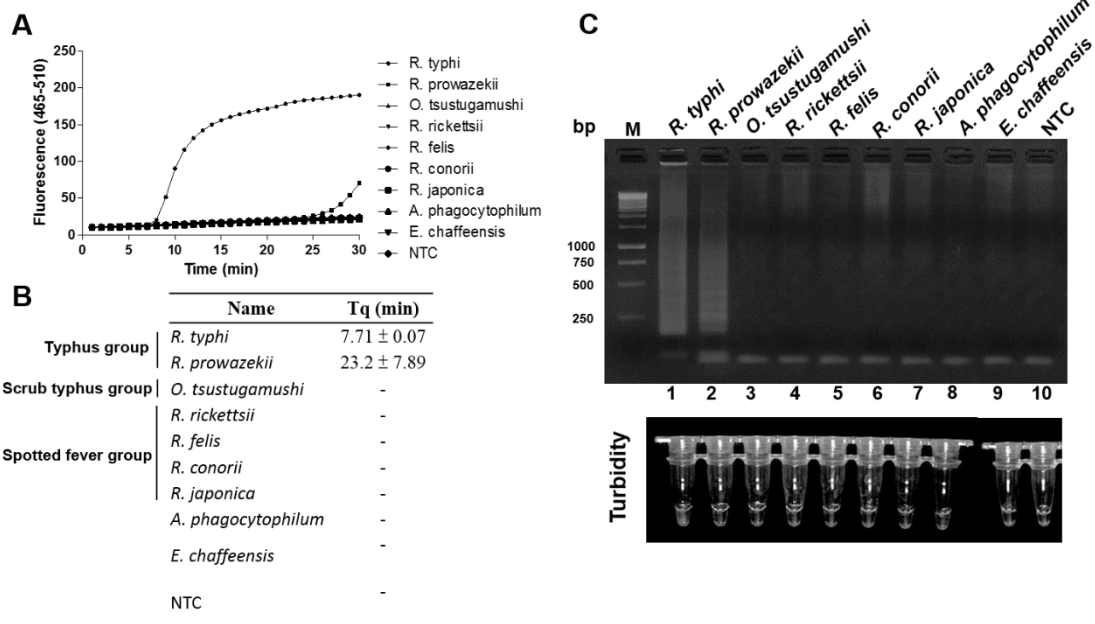
(A) Sensitivity of the LAMP assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (B) The L3 and B3 primers from LAMP were used for real-time qPCR. The PCR product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (C) Routine *Rickettsia typhi* 17 kDa primers were used for real-time qPCR. The PCR product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.



**Figure 8. Comparison of the detection limit of ompB LAMP and qPCR for recombinant plasmid containing target sequence of ompB gene.**

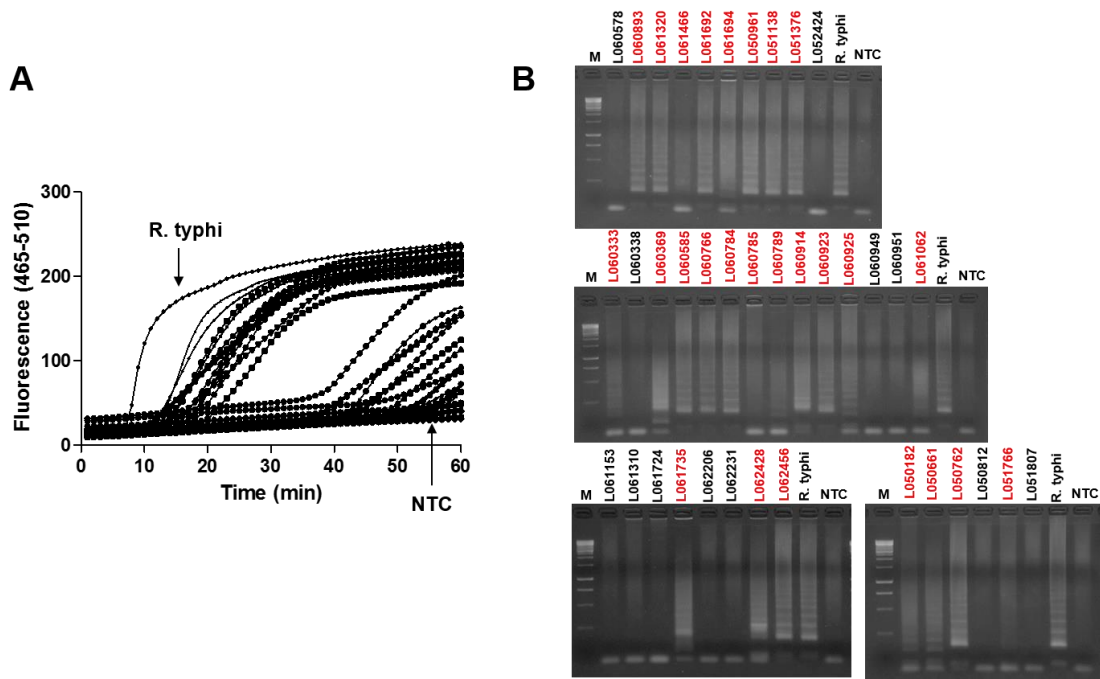
(A) Serially diluted plasmid ( $10^5$  to  $10^0$  copies/reaction) were used to evaluate the limit of detection of assay. Sensitivity of the LAMP assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. (B) The L3 and B3 primers from LAMP were used for real-time qPCR. The PCR product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.





**Figure 9. ompB LAMP specifically detect *Rickettsia typhi* but not the 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) The quantitative time (Tq) represents the starting time point of the DNA product amplified. (C) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis.



**Figure 10. ompB LAMP can sensitive detect the *Rickettsia typhi* infected clinical sample.**

(A) 38 *Rickettsia typhi* infected DNA clinical samples between 2016 and 2017 in Taiwan CDC were collected to evaluate the sensitivity of LAMP assay. The LAMP assay as monitored by the real-time measurement of fluorescence intensity. *Rickettsia typhi* DNA and ddH<sub>2</sub>O (NTC) are used as positive and negative control, respectively and indicate with arrows. (C) The amplified DNA product was observed after 2% agarose gel electrophoresis. LAMP positive clinical samples are color in red.

**Table. 5 List of *Rickettsia typhi* infected samples between 2016 to 2017 in Taiwan.**

	年度	判定方法	全血編號	年齡	性別	發病日	居住地	LAMP Tq (min)
1	106	qPCR +	L060578	63	M	4	彰化縣	-
2	106	qPCR +	L060893	20	F	9	台南市	14.97
3	106	qPCR +	L061320	62	M	7	彰化縣	13.48
4	106	qPCR +	L061466	77	M	6	屏東縣	57.48
5	106	qPCR +	L061692	57	M	8	高雄市	12.7
6	106	qPCR +	L061694	50	M	1	台南市	38.26
7	105	qPCR +	L050961	81	M	10	彰化縣	15.66
8	105	qPCR +	L051138	36	M	4	高雄市	18.4
9	105	qPCR +	L051376	47	M	5	雲林縣	16.24
10	105	qPCR +	L052424	60	F	12	雲林縣	-
11	106	IFA+	L060333	65	F	6	桃園市	55.82
12	106	IFA+	L060338	41	M	2	高雄市	-
13	106	IFA+	L060369	52	F	8	彰化縣	44.48
14	106	IFA+	L060585	33	M	3	高雄市	14.57
15	106	IFA+	L060766	32	M	1	高雄市	19.04
16	106	IFA+	L060784	45	M	8	屏東縣	21.22
17	106	IFA+	L060785	78	F	8	高雄市	50.37
18	106	IFA+	L060789	80	M	3	雲林縣	54.53
19	106	IFA+	L060914	64	M	10	屏東縣	38.23
20	106	IFA+	L060923	25	M	18	屏東縣	16.92
21	106	IFA+	L060925	41	M	3	高雄市	39.42
22	106	IFA+	L060949	52	M	5	屏東縣	-
23	106	IFA+	L060951	38	M	12	彰化縣	-
24	106	IFA+	L061062	20	M	7	高雄市	53.89
25	106	IFA+	L061153	67	F	8	彰化縣	-
26	106	IFA+	L061310	49	M	8	高雄市	-
27	106	IFA+	L061724	75	M	7	屏東縣	-
28	106	IFA+	L061735	30	M	7	台南市	42.26
29	106	IFA+	L062206	66	F	6	台南市	-
30	106	IFA+	L062231	40	F	5	屏東縣	-
31	106	IFA+	L062428	41	F	8	彰化縣	43.21
32	106	IFA+	L062456	36	F	22	高雄市	13.29
33	105	IFA+	L050182	70	M	17	桃園市	51.36
34	105	IFA+	L050661	29	F	4	台南市	48.34
35	105	IFA+	L050762	47	F	12	台南市	17.92
36	105	IFA+	L050812	34	M	7	彰化縣	-
37	105	IFA+	L051766	29	M	3	高雄市	52.07
38	105	IFA+	L051807	67	F	9	高雄市	-

## 衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫 學術審查意見回復

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-112303

計畫名稱：開發新興立克次體快速等溫核酸增殖方法

計畫主持人：楊素鈴技正

序號	審查意見	主持人回復說明
1	成功開發高敏感性且快速檢驗之方式，十分重要。	謝謝評審委員的肯定。
2	LAMP 的判讀方式?如何可以更客觀?有無符合 LDT 標準?	謝謝評審委員的建議，我們所使用的 LAMP kit(Lucigen)除可添加螢光作為偵測外，亦可進行濁度法測試。在實驗室可使用 Roche LC480 進行即時螢光偵測，若在戶外則可使用 Eiken 公司之濁度法儀器 LA-500 進行即時濁度偵測。因此，本計畫所開發之 LAMP 系統同時具備上述兩種偵測訊號，可應用於不同場域。未來若能進行產品化，或做為實驗室的診斷工具，將進一步進行 LDT 以符合標準。
3	LAMP 測恙蟲病及地方性斑疹傷寒的敏感度及專一性?	本研究所開發之 LAMP 具高敏感性與高專一性，所開發之 <i>Orientia tsutsugamushi</i> (OT) LAMP 可偵測到 1 copy 且只會辨認 OT 而非其他立克次體病原菌，以臨床檢驗測試結果 100%陽性檢體可被驗出，專一性為 100%。所開發之 <i>Rickettsia typhi</i> (RT) LAMP 可偵測到 10 copy 且只會辨認 RT 而非其他立克次體病原菌，以臨床檢驗測試結果 68.4%陽性檢體可被驗出。
4	LAMP 零敏度極高，易有偽陽性，需注意和有 interal control，應拿陰性檢體測試偽陽性為多少?	謝謝評審委員的建議， <i>Orientia tsutsugamushi</i> (OT)及 <i>Rickettsia typhi</i> (RT) LAMP 系統皆有使用陰性檢體結果皆為陰性，代表所開發之 LAMP 具高專一性。
5	PCR 檢測出的比例非常低，請釐清相關原因。	謝謝評審委員的建議，因立克次體在檢體內的數量非常低，將繼續開發高敏感的檢驗方法來增加檢驗之敏感度。並遵循委員建議未來將調整反應之溫度與時間使其最佳化，應用於臨床檢驗。
6	LAMP 的濁度法和螢光法	謝謝評審委員的建議，我們所使用的 LAMP kit(Lucigen)除可添加螢光作為偵測外，亦可

	應用場域可以不一樣，檢測極限也不同，建議必須預先考量使用情境。	進行濁度法測試。在實驗室可使用 Roche LC480 進行即時螢光偵測，若在戶外則可使用 Eiken 公司之濁度法儀器 LA-500 進行即時濁度偵測。因此，本計畫所開發之 LAMP 系統同時具備上述兩種偵測訊號，可應用於不同場域。
7	以 LAMP 方式進行此類病原檢測有其優勢，但也有其成本需要考慮。	謝謝評審委員的建議，LAMP 的成本較 qPCR 高 5 倍。LAMP 的優勢在於快速且可在戶外直接檢測以達到 Point of care 之功能。但若作為試劑產品確實需考量其成本。
8	LAMP 的 enzyme 批次不是很穩定，要記得有好的 QC。	謝謝評審委員的建議，我們所使用的 LAMP Kit 為 Lucigen 公司的 Lava LAMP DNA Master mix，目前所使用的批號為 Lot12900，每次進行測試皆有使用陽性及陰性對照組及不同批次的 LAMP 產品批號作為 QC。
9	LAMP 有可能取代 PCR 嗎，或是仍要和 IFA 方法綜合判讀？	1.LAMP 系統較 qPCR 之優勢在於，所需反應時間短(60 分鐘內)，只需單一溫度反應，且不需複雜之設備儀器，即可作為即時偵測，具專一性 (因同時針對 6 個核酸區域，專一性更佳)，並可利用濁度與染劑直接判斷產物是否生成。 2.血清所使用之 IFA 是目前臨床上判定感染立克次體的標準方法，其缺點在於需二次採血，比較血清中 IgM/IgG 抗體量是否有 4 倍上升，才可檢驗判定為陽性，時間上較長且玻片置備也繁複，且判定較亦較為主觀，因此所開發之 LAMP 檢測具相當優勢。本研究可與 PCR 同步測試病原體的核酸，仍需和 IFA 的結果做綜合判讀。

<請將此表單附在計畫書後方>