

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-122301

衛生福利部疾病管制署 110 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

110 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、邱憲君

執行期間：110 年 1 月 1 日至 110 年 12 月 31 日

目 錄

一、中文摘要	3
二、英文摘要	4
三、計劃內容	5
四、材料與方法.....	8
五、實驗結果	12
六、討論.....	19
七、結論與建議.....	22
八、計畫重要研究成果及具體建議.....	24
九、參考文獻	25
十、實驗結果	29

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。立克次體疾病如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人類單核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。由於臨床診斷極不易判定，且許多病原體的感染都會引發類似的徵兆及症狀，難以區別，因此臨床上立克次體的診斷常因誤判而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，篩選立克次體特異性基因區域並設計探針使其具有特異性，建置新興立克次體 real-time PCR、Multiplex real time-PCR 檢測系統，能在最短時間內同步檢測新興立克次體疾病如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人類單核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。未來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、人類單核球艾利希氏體

二、英文摘要

Due to frequently international traffic, global warming and climate change, rickettsia infectious disease has 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, and multiplex real-time PCR 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

三、計劃內容

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、人類單核球艾利希氏體症皆會引起急性高燒、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，以致於難於區別，因此臨床上經常發生立克次體的誤診而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過度使用，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，在各縣市均有相關病例報告。

地方性斑疹傷寒為 *Rickettsia typhi* 引起的疾病，其病徵和人蝨型(流行性)斑疹傷寒類似，如頭痛、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。實驗室通常用 IFA 分析鑑定是否感染。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，因此鼠為傳染窩。地方性斑疹傷寒立克次體在老鼠為無症狀的不顯性感染，傳染方式為具有傳染性的鼠蚤在

吸血時，間接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。另外，也有因吸入了乾的蚤糞而感染的少數病例。因此在人口聚集、衛生條件不良，且人、鼠和蚤密集共存時，極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，細菌嗜吞噬細胞無形體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。細菌嗜吞噬細胞無形體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感染疾病相似，亦容易發生誤診。HGA 若沒有即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。目前在台灣對細菌嗜吞噬細胞無形體感染所引起的 HGA 研究與臨床診斷極為有限，因此 HGA 現今所面臨最大的挑戰是如何在感染的初期能快速被有效診斷出，以便及早治療，因此對細菌嗜吞噬細胞無形體建置一個簡單又有效的快篩檢測系統極為重要。

艾利希氏體最早在 1986 年發現，是一種絕對細胞內寄生，會感染人畜的艾利希體立克次體，對人畜皆具有致病性。人類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*) 感染所致。Human monocytic ehrlichiosis 主要是由被感染艾利希氏體的蜱叮咬所引起新興傳染病，因此 *Ehrlichia* 不僅會感染人也會感染家畜。*Ehrlichia* 主要感染單核球，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、中樞神經感染等症狀。由於此類立克次體感染在台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時間與試驗配置步驟錯誤導致檢驗判斷的困難增加等，而 IFA 方法耗時費力且不同立克次體間容易發生抗體交叉反應。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特異性基因，藉由篩選出的新興立克次體特異性基因區域設計出特異性探針，並以此建置新興立克次體 multiplex RT-PCR 檢測系統，並確認其用於臨床分析的準確性。預計建立高通量分析平台，能在最短時間內同步檢測不同類型的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、人類單核球艾利希氏體症傳染病，並提高試驗的靈敏度及專一性，未來可應用於疾病的早期診斷及流行病學研究等，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疾病的監測與防治具有極大的效益，可作為未來研究及防疫政策的重要參考指標。

四、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 5 μ l 血清連續稀釋不同倍數及 PC 與 NC 血清點在 slide 上 (保濕盒)，放置於 37°C incubator，30min 後以 PBS wash，並泡在 PBS RT，5 min 後以 ddH₂O 沖洗 slide，之後將 slide 放置於乾燥器上晾乾，待 slide 乾燥後，每個 well 加入 20 μ l FITC-goat anti-human IgM (保濕盒)，放置 37°C incubator，30 min 後以 PBS wash，並泡在 PBS RT 5 min，以 ddH₂O 沖洗 slide 並晾乾，加入封存劑 cover 風乾，以 400x 螢光顯微鏡判定。
 1. IgM 配對力價測定：transfer serum 5 μ l into 96 wells plate, add 35 μ l IgG remover, RT 5 min (血清檢體做 8 倍稀釋), prepare PBS 倒入塑膠凹槽，取 10 μ l 檢體 for serial dilution: 10 μ l + 90 μ l PBS (IgM: 80 倍稀釋, PBS 倒入凹槽，以 8 爪取較為便利), 取檢體 20 μ l 及 PC 與 NC 血清點在 slide 上 (保濕盒，內裝無菌 ddH₂O)，放置 37 °C for 30 min incubator. 以 PBS wash，泡在 PBS RT 5 min，以 ddH₂O 沖洗 slide. 電風扇吹乾, add 20 μ l 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 ddH₂O 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 µl into 96 wells plate, add 35 µl IgG remover, RT 5 min (血清檢體做 8 倍稀釋), prepare PBS 倒入塑膠凹槽, 取 10 µl 檢體 for serial dilution: 10 µl + 90 µl PBS (IgG: 40 倍稀釋至 640 倍, 以等倍稀釋 90 µl PBS + 90 µl serial serum 做 serial diution to 40x-80x-160x-320x-640x), 取檢體 20 µl 及 PC 與 NC 血清點在 slide 上 (保濕盒, 內裝無菌 ddH₂O), 放置 37°C for 30 min incubator. 以 PBS wash, 泡在 PBS RT 5 min, 以 ddH₂O 沖洗 slide. 電風扇吹乾, add 20 µl 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 ddH₂O 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 μ l 預熱 70 $^{\circ}$ 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 5 μ l 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 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 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 $^{\circ}$ 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。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 μ l 的 2x Ready mix，RNase-free Water，核酸引子與 probe，最後加入 5 μ l 檢體 DNA，反應最終體積為 25 μ l。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。 針對兩種新興病毒或三種新興病毒設計 multiplex real-time PCR Probe: 所選用的螢光分別為人類顆粒細胞無形體症(Atto425)、恙蟲病(FAM)、地方性斑疹傷寒(Cy5)及人類單核球艾利希氏體症(VIC)並比較其與目前臨床檢驗 real-time PCR 間的差異。

五、實驗結果

1. 恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症及人類單核球艾利希氏體症的 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、地方性斑疹傷寒及人類顆粒細胞無形體症所設計之特異性引子、探針與臨床檢驗所使用之引子序列。

- a. 設計一組新穎的 *Orientia tsutsugamushi* (OT) Taqman real-time PCR 引子及探針，target gene 為 *gyrB*，螢光波長為 FAM，用來偵測恙蟲病。
 - b. 設計一組新穎的 *Rickettsia typhi* (RT) Taqman real-time PCR 引子及探針，target gene 為 *ompB*，螢光波長為 Cy5，用來偵測地方性斑疹傷寒。
 - c. 設計一組新穎的 *Anaplasma phagocytophilum* (AP) Taqman real-time PCR 引子、探針組，target gene 為 *Atto425*，螢光波長為 Atto425，用來偵測人類顆粒細胞無形體症。
 - d. 設計一組新穎的 *Ehrlichia chaffeensis* (EC) Taqman real-time PCR 引子、探針組，target gene 為 *ECHWP650*，螢光波長為 VIC，用來偵測人類單核球艾利希氏體症。
2. 所設計之 *gyrB* (FAM)與 *ompB* (Cy5)探針於不同樣品間測試，專一性區別出恙蟲病與地方性斑疹傷寒，且不會產生偽陽性的螢光訊號

將不同型別的恙蟲病與地方性斑疹傷寒樣品，單獨或等比例

混合後進行 Duplex Taqman real-time PCR 反應，結果顯示所設計之 *gyrB* 探針能專一性的區分出不同型別的恙蟲病 Cp 值，而偵測波長切換為 Cy5 後則能區分出地方性斑疹傷寒的 Cp 值 (Fig. 1A)。恙蟲病與地方性斑疹傷寒樣品以單獨或等比例混合後，兩種螢光波長數值所散佈之位置 (Fig. 1B)，結果顯示所設計之探針能專一性的區分出兩種疾病。

3. 所設計之 *ankA* (Atto425)與 *gyrB* (FAM)探針於等比例混和之樣品測試，專一性的區別出人類顆粒細胞無形體檢體與恙蟲病，且不會產生偽陽性。

將先前已測出之人類顆粒細胞無形體檢體與恙蟲病 (TW10 strain) 等比例混和，Duplex real-time PCR 結果顯示藉由切換螢光波長能分別偵測出混有該疾病樣品之 Cp 值，正常血清之樣品 (L100505 及 L101506) 混入人類顆粒細胞無形體檢體或恙蟲病亦能測出各自 Cp 值 (Fig. 2)，顯示所設計之探針能專一性的區分出兩種疾病，且亦不會相互影響。

4. 所設計之 *gyrB* (FAM)與 *ompB* (Cy5)探針於 Duplex Taqman real-time PCR 平台之敏感性測試

將分別帶有 *gyrB* 與 *ompB* 基因片段之質體以 10 倍序列稀釋至不同濃度後，再以等比例混合進行 Multiplex Taqman real-time PCR 反應，結果顯示恙蟲病 *gyrB* (FAM)與 *ompB*(Cy5)之偵測領敏度為 22.3 copies/reaction, 1.4 copy (取最低濃度且三重複皆有反應)。將各濃度之數值統計後 (Fig. 3.1C, 3.2C)，換算 R^2 值 *gyrB* (FAM)為 0.9922 而 *ompB* (C5)為 0.9855，而 PCR 放大效率分別為 93.52% (*gyrB*)及 97.75%(*ompB*)，結果顯示所設計之兩種探針於 Multiplex Taqman real-time PCR 平台，其靈敏

度仍能偵測到 100ag 的樣品。

5. 人類顆粒細胞無形體症 Taqman probe real-time PCR 對 pCR2.1-ank A plasmid 之敏感性測試

- a. 將設計之 ank A 基因片段植入 pCR2.1 plasmid 上，並建立帶有該片段(132 bp)之 pCR2.1-ank A 載體，並以此 plasmid DNA 用於後續偵測極限測試 (Fig. 4)，pCR2.1-ank A plasmid 進行十倍稀釋至不同濃度後，再進行 Taqman probe real-time PCR 反應，將各濃度之三重複數值統計後，換算出 R² 值為 0.9998，而 PCR 放大效率為 94.03% (Fig. 5A)。
- b. Taqman probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-ankA plasmid 的 limit of detection (LOD)最低可偵測到 2.32 copies 的核酸 (Fig. 5B)，而反應後不同濃度的核酸產物也可清楚見於 2% 洋菜膠上 (Fig. 5D)。

6. 人類顆粒細胞無形體症 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.felis*、*R.conorii*)及不同恙蟲病型別的核酸(TW-1、TW-10、TW-13、TW-22 及 TW-24)進行 Taqman probe real-time PCR 測試，從反應結果可知 *A.phagocytophilum* 樣品被專一性的放大，顯示所設計之 ank A 引子及探針具高度專一性(Fig. 6A and 6B)。
- b. *A.phagocytophilum* 所放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體則不會，經由膠電泳可再次確認所設計之 ank A 引子及探針具高度專一性 (Fig. 6C)。

7. 人類顆粒細胞無形體症 Taqman probe real-time PCR 進

行臨床檢體測試

表二為臺灣人類顆粒細胞無形體症陽性確診檢體，與所開發之 TaqMan probe real-time PCR 比較。目前臨床檢驗為 qPCR(HSP70 及 msp2)，8 個檢體已由 qPCR(HSP70)所偵測出並經由膠電泳及定序重覆確認為陽性。本研究中而所設計之 ank A 探針及引子亦能偵測出 8 個陽性檢體，且亦經由膠電泳及定序反覆確認結果為陽性，顯示所設計之 ank A 引子及探針具有高度的專一性與敏感性(Fig. 7)。

8. 目前經由 ank A 引子及探針驗出之人類顆粒細胞無形體症陽性檢體

所設計之 ank A 引子及探針目前偵測樣本數為 358 位，而驗出人類顆粒細胞無形體症陽性檢體數為 25 位，偵測率為 6.9%。上述之陽性檢體均經由膠電泳及定序重覆確認為陽性，其序列至 NCBI BLAST 比對後與人類顆粒細胞無形體症序列相似度為 96%~100%，顯示所設計之 ank A 引子及探針具高度專一性與敏感性 (Fig. 8)。

9. 所設計之 gyrB (FAM)、ompB (Cy5)與 ank A (Atto425)探針於 Triplex Taqman real-time PCR 平台之專一性測試

為了確認所設計之三種疾病之引子及探針是否會產生交錯反應，將分別帶有 gyrB、ompB 與 ank A 基因片段之質體以 10 倍序列稀釋至不同濃度後，再以等比例混合進行 Multiplex Taqman real-time PCR 反應，結果顯示所設計之三種探針專一性的區分出各自標定的立克次體疾病，而樣品濃度至 100 fg 亦能偵測出該疾病之 Cp 值且不會有交錯反應 (Fig. 9)。

10. 臨床恙蟲病、人類顆粒細胞無形體與地方性斑疹傷寒

之陽性檢體於所設計之 Triplex real-time PCR (gyrB, ompB, ankA)平台測試

分析臨床檢驗為陽性的恙蟲病、人類顆粒細胞無形體與地方性斑疹傷寒檢體。測試平台於臨床陽性檢體是否亦能同時偵測不同立克次體疾病，結果顯示所設計之專一性探針皆能測出立克次體疾病標定基因，同時並發現某些陽性檢體亦帶有其他立克次體疾病基因之片段，顯示這些陽性檢體可能同時感染不同的立克次體疾病 (Fig. 10A)。人類顆粒細胞無形體陽性檢體(L071407)於 Triplex real-time PCR 平台並未偵測到，推估應為檢體放置太久。將 Triplex real-time PCR 反應產物定序並於 NCBI 比對後，其立克次體疾病序列相似度皆達到 80% 以上，顯示所設計之立克次體疾病探針及引子能應用於臨床檢體上，藉由切換波長能同時偵測不同疾病，亦具有專一性 (Fig. 10B)。

11. 人類單核球艾利希氏體症 Taqman probe real-time PCR 對 pCR2.1-ECHWP650 plasmid 之敏感性測試

- a. 將設計之 ECHWP650 基因片段植入 pCR2.1 plasmid 上，並建立帶有該片段(248 bp)之 pCR2.1-ECHWP 650 載體，並以此 plasmid DNA 用於後續偵測極限測試 (Fig. 11)，pCR2.1-ank A plasmid 進行十倍稀釋至不同濃度後，再進行 Taqman probe real-time PCR 反應，將各濃度之三重複數值統計後，換算出 R² 值為 0.9908，而 PCR 放大效率為 104.31% (Fig. 12A)。
- b. Taqman probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-ECHWP650 plasmid 的 limit of detection (LOD)最低可偵測到 0.2

copies 的核酸 (Fig. 12B)，而反應後不同濃度的核酸產物也可清楚見於 2% 洋菜膠上 (Fig. 12D)。

12. 人類單核球艾利希氏體症 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. felis*、*R.conorii*)及不同恙蟲病型別的核酸(TW-10、TW-23、Kato)進行 Taqman probe real-time PCR 測試，從反應結果可知僅 *E. chaffeensis* 樣品被專一性的放大，顯示所設計之 ECHWP650 引子及探針具高度專一性 (Fig. 13A and 13B)。
- b. *E. chaffeensis* 專一性引子及探針所放大之核酸產物 (248 bp)可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體則不會，經由膠電泳可再次確認所設計之 ECHWP650 引子及探針具高度專一性 (Fig. 13C)。

13. 人類單核球艾利希氏體症 Taqman probe real-time PCR 進行臨床檢體測試

本研究中共 25 臨床檢體，而所設計之 ECHWP650 探針及引子偵測出 24 陽性檢體 (Fig. 14A)，反應產物亦經由膠電泳 (Fig. 14B)及定序反覆確認結果為陽性，僅一例(L101988)定序後發現為偽陽性，顯示所設計之 ECHW650 引子及探針具有高度的專一性與敏感性。

14. 測試 Triplex real-time PCR (ECHWP650, ompB, ankA) 平台之偵測 LOD 值

將所設計之人類單核球艾利希氏體 (ECHWP650)、人類顆粒細胞無形體症 (ank A)及地方性斑疹傷寒 (ompB)的探針及引子，整合成 Triplex real-time PCR 平台，並偵測不同立克次體疾病之 LOD 值。將帶有 ECHWP650, ank A 及 ompB 基因片段之不同濃度的質體樣品分別以單獨或等比例加入，結果顯示藉由切換偵測螢光波長，能明確分辨出帶有基因片段之質體樣品，且 Triplex real-time PCR 平台皆能測到 30 copies 之樣品，顯示所設計之探針皆具有高度專一性，即使是混合後的樣品(模擬共同感染)也能藉由切換波長而偵測出各疾病的 Cp 值 (Fig. 15A)。此外，所設計之立克次體探針及引子(ECHWP650、ank A、ompB) 其複製片段依序為 248 bp、132 bp 及 197 bp，將 Triplex real-time PCR 反應產物跑膠後，亦能見到不同標定基因之核酸產物清楚見於 2%洋菜膠上 (Fig. 15B)。顯示所設計之立克次體標定基因引子及探針具有高度的專一性與敏感性，即便是混合後的樣品亦能區別。

15. 臨床檢體於 Triplex real-time PCR (ECHWP650, ompB, ankA)平台測試

將臨床檢體樣品 (L101921-L101943)及(L101977-L102003) DNA 於 Triplex real-time PCR 平台測試，兩次試驗結果皆顯示藉由切換螢光波長能偵測出各立克次體疾病控制組之 Cp 值。

- a. 臨床檢體編號(L101921-L101943)共 23 個於 Triplex real-time PCR 平台檢驗出 8 例人類單核球艾利希氏體、8 例人類顆粒細胞無形體、2 例地方性斑疹傷寒 (Fig.16 A)，後續將呈現陽性之檢體產物定序後於 NCBI BLAST 比對，其各自的序列相似度皆與標定之疾病基因達到 80%以上的相

似。

- b. 臨床檢體編號(L101977-L102003)共 27 個於 Triplex real-time PCR 平檢驗出 25 例人類單核球艾利希氏體、2 例人類顆粒細胞無形體、1 例地方性斑疹傷寒 (Fig.25 1C)，後續將呈現陽性之檢體產物定序後於 NCBI BLAST 比對，其各自的序列相似度皆與標定之疾病基因達到 90%以上的相似，僅一例偽陽性(L101988)。雖反應產物清楚見於膠電泳 (Fig.16 E)，但經 DNA 定序確認為雜訊，故本研究所建置核酸診斷平台仍具專一性。
- c. 總檢體數共 50 支，兩次實驗測出人類單核球艾利希氏體症為 33 支，序列相似度為 80%以上，一例(L101988)偽陽性；測出人類顆粒細胞無形體症 10 支、序列相似度為 90%以上；地方性斑疹傷寒為 3 支，序列相似度為 99%，顯示所設計之探針及引子搭配可同時偵測不同立克次體疾病，並具有高度專一性與敏感性 (Fig.16)。

六、討論

1. 傳統的 qPCR 檢測主要可分為 SYBR 及 Taqman probe 兩種，前

者螢光會嵌入複製的 DNA 雙股中，雖快速但容易有偽陽性，而後者雖專一性高，但每次實驗僅能檢測一種疾病。故本計畫的目標在於建立新興立克次體傳染病之多重核酸檢驗試劑，Multiplex 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，配合多重螢光探針與切換不同螢光波長則可以即時偵測多種立克次體疾病之核酸。未來搭配核酸純化方法的開發，可發展出具有高靈敏度、高專一性之多重核酸分子快速檢測試劑。

2. Taqman real-time PCR 相較於傳統的 qPCR 具有更高的敏感度，故本研究中，首先建置出了多種恙蟲病基因體序列資料庫，並根據其核酸高度保守序列區域，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%)。
3. 本研究亦開發出針對地方性斑疹傷寒 (RT)、人類顆粒細胞無形體症 (AP)及人類單核球艾利希氏體症(EC)的 Taqman real-time PCR 檢測方法，皆具高度專一性，靈敏度依序分別為 100 copy/reaction, 2.32 copies/reaction 及 0.2 copies/reaction,且對於臨床檢體測試的結果也都具有高度專一性(100%)與敏感性(100%)。
4. 本研究所設計之恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症及人類單核球艾利希氏體症之專一性探針及引子，將不同波長的螢光探針搭配整合成 Multiplex Taqman real-time PCR 平台，能藉由切換螢光波長同時並專一性的偵測二或三種的立克次體疾病標定基因且不具有交錯反應，反應後之產

物亦經由定序及跑膠反覆驗證結果。另外，Triplex Taqman real-time PCR 平台對於臨床檢體測試結果，顯示亦具有高度專一性與敏感性，藉由搭配不同標定的立克次體專一性螢光探針及引子，其有助於提升實驗室檢驗能量及減少試驗時間。

5. 未來若建立出其他立克次體疾病之專一性探針及引子，亦能藉由設計不同螢光波長來做搭配，建立 Triplex Taqman real-time PCR 平台同時偵測欲檢驗之立克次體疾病項目，減少實驗流程所需花費的時間。整體而言，Triplex Taqman real-time PCR 平台在短時間內同步篩檢出不同病原體，其有助於立克次體傳染病之快速檢驗，並有效降低立克次體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，使國人專注於全民防疫大作戰外亦能免於受傳染病之威脅。

七、結論與建議

1. 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。
2. 本計畫已成功建立出四種立克次體傳染病之專一性探針及引子，即恙蟲病(*gyrB*)、地方性斑疹傷寒(*ompB*)、人類顆粒細胞無形體症(*ankA*)及人類單核球艾利希氏體症(*ECHWP650*)。藉由設計不同波長之螢光，將其整合成 Multiplex Taqman real-time PCR 平台，可同步即時偵測三種立克次體傳染之，且經由實驗證實所設計之引子及探針皆具有高度專一性與敏感性且不會交錯反應。
3. Multiplex Taqman real-time PCR 較現行之 real-time qPCR 方法具有相似的敏感性與專一性，且不需要反覆抽取檢體增加樣品污染的可能性，即可進行多種立克次體疾病之偵測並減少檢驗花費的時間。未來若開發出其他新興立克次體之專一性探針及引子，可搭配整合進 Multiplex Taqman real-time PCR 平台，增加檢驗項目減少試驗花費時間，或搭配專一性基因不同片段之探針及引子，建立新興立克次體疾病之基因體序列資料庫。
4. 另外，某些 Triplex real-time PCR 檢體產物之定序結果不能達到 100%相似度，建議將呈現陽性之檢體，挑出並做單一 Taqman probe real-time PCR 後，再將產物定序。若更進一步將

此平台應用開發出多重核酸分子快速檢測試劑組，一旦患者出現傳染病症狀，可快速檢驗出感染何種立克次體傳染病，除了幫助醫療及監測上的評估外，亦可立即實施防治工作，有效降低傳染病的流行，解決公共衛生上的危機。

八、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蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症及人類單核球艾利希氏體症之 Multiplex Taqman real-time PCR 平台。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。

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，能即早進行篩檢診斷，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、人類單核球艾利希氏體症、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。

九、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, Sereemasun A, Patarakul K, Gaywee J, Rodkvamtook W, Srisawat N, Wacharapulsadee 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, Jaton 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, Pagueu A, Achukwi MD, Renz A, Eisenbarth A. Development of a Low-Density DNA Microarray for Detecting Tick-Borne Bacterial and Piropasmid Pathogens in African Cattle. *Trop Med Infect Dis*. 2019 Apr 12;4(2).
- 19.** Raja B, Pascente C, Knoop J, Shakarizaz 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.
- 22.** Tuo Dong, Zhangyi Qu, Lijuan Zhang. Detection of *A. phagocytophilum* and *E. chaffeensis* in Patient and Mouse Blood and Ticks by a Duplex Real-Time PCR Assay. *PLoS One*. 2013 Sep 4; 8(9): e74796.
- 23.** Karolina A Rygiel, John P Grady, Robert W Taylor, Helen A L Tuppen, Doug M Turnbull. Triplex real-time PCR-an improved method to detect a wide spectrum of mitochondrial DNA deletions in single cells. *Sci Rep*. 2015 May 19; 5:9906.
- 24.** Anizah Rahumatullah, Boon Yin Khoo, Rahmah Noordin. Triplex PCR using new primers for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol*. 2012 Jun; 131(2):231-8.
- 25.** Hur D, Kim MS, Song M, Jung J, Park H. Detection of genetic variation using dual-labeled peptide nucleic acid (PNA) probe-based melting point analysis. *Biol Proced Online*. 2015 Nov 4; 17:14.

十、實驗結果

表一、目前所建立之恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症及人類單核球艾利希氏體症之新興立克次體傳染病專一性引子及探針。

Tickborne diseases	Fluorophore Dye	Primer	Sequence (5'-3')	Product (bp)
<i>A. phagocytophilum</i>	Atto425	ank A-F	CAGTCGTGAATGTAGAGGGGAAAAC	132
		ank A-R	CAAGTTCCTGAAGGGGGATTCC	
		ank A-porbe	CGTTCAGCCATCATTGT	
<i>O. tsutsugamushi</i>	FAM	gyrB-F	ACAAAGAGATGGTGGGAAGCCA	208
		gyrB-R	AGCTTCGGACTAACCAACT	
		gyrB-probe	TCGAGAAGGGCTATCTTGTGTGTATCA	
<i>R. typhi</i>	Cy5	ompB-F	GCAAAATGAATATTAGAAAGTGGAC	197
		ompB-R	GCTATTAACGAGTTAGTTATGGAA	
		ompB-probe	TCGTACCATCAGCAAGAGCTGTATCA	
<i>E. chaffeensis</i>	VIC	ECHWP650-F	CTGCTTCCAGGTACAACCTCG	248
		ECHWP650-R	TTGCCTGTTGGAGTTGGTGT	
		ECHWP650-prone	TGTAGTCCACCACACACGCCT	

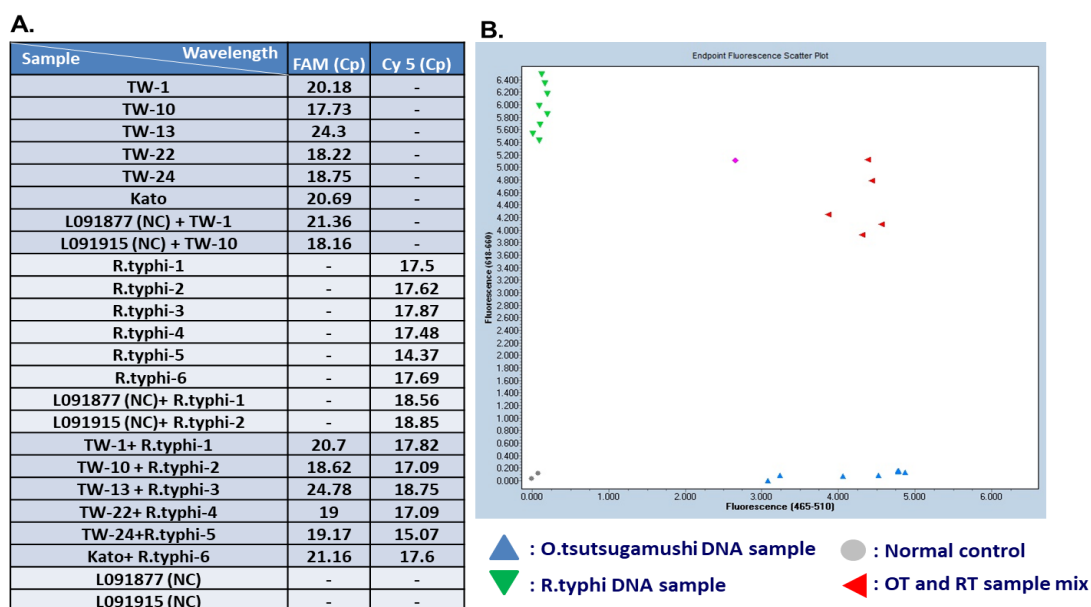


Fig. 1 (A) Multiplex Taqman real-time PCR 藉由轉換不同螢光波長可明確偵測出恙蟲病或地方性斑疹傷寒的 Cp 值，等比例混和的樣品也能藉由切換不同的螢光波長偵測出該疾病的 Cp 值。(B) 恙蟲病與地方性斑疹傷寒或混合樣品的螢光值分布圖，X 軸為 FAM，Y 軸為 Cy5。

A.

Well	Samples	ankA -Atto425	gyrB -FAM
A1	L100063 (AP+) +TW10-1	36.27	19.96
B1	L100140 (AP+) +TW10-1	36.79	20.12
C1	L100264 (AP+) +TW10-1	38.23	20.71
D1	L100333 (AP+) +TW10-1	39.52	20.85
E1	L100033 (AP+) +TW10-1	36.88	20.3
F1	L070900 (AP+) +TW10-1	36.11	20.27
G1	L071402 (AP+) +TW10-1	36.9	20.54
H1	L071407 (AP+) +TW10-1	36.68	20.17
A2	L071411 (AP+) +TW10-1	36.21	20.07
D2	L100505+TW10	-	20.38
E2	L100506+TW10	-	19.9
F2	L100505+PCR2.1 ankA-1ng	12.82	-
G2	L100506+PCR2.1 ankA-1ng	13.73	-
H2	L100505+PCR2.1 gyrB-1ng	-	11.33
A11	L100506+PCR2.1 gyrB-1ng	-	11.79
B11	AP DNA+TW10-1	23.88	20
C11	AP DNA-2+TW10-2	23.91	19.9
D11	AP DNA+TW-13	22.68	25.44
H11	NTC	-	-

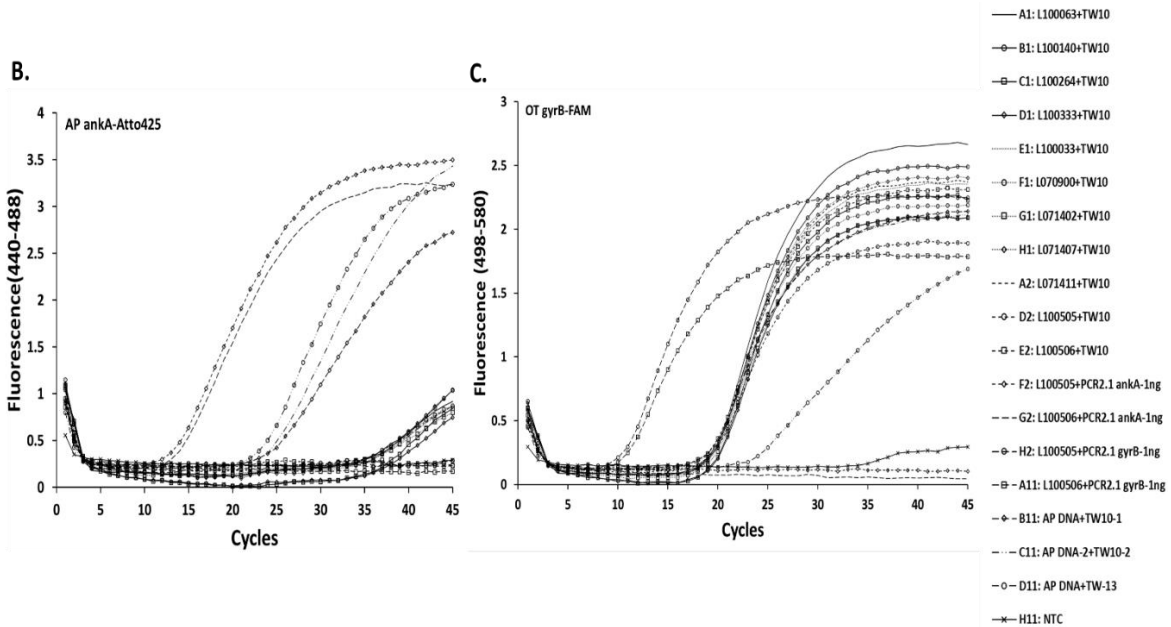


Fig. 2 (A) Multiplex Taqman real-time PCR 藉由轉換不同螢光波長可明確偵測出恙蟲病及人類顆粒細胞無形體症之 Cp 值，藉由切換不同的螢光波長偵測出該疾病的 Cp 值。(B) 切換波長為 Atto425 (ank A) 之螢光放大曲線圖。(C) 切換波長為 FAM (gyrB) 之螢光放大曲線。

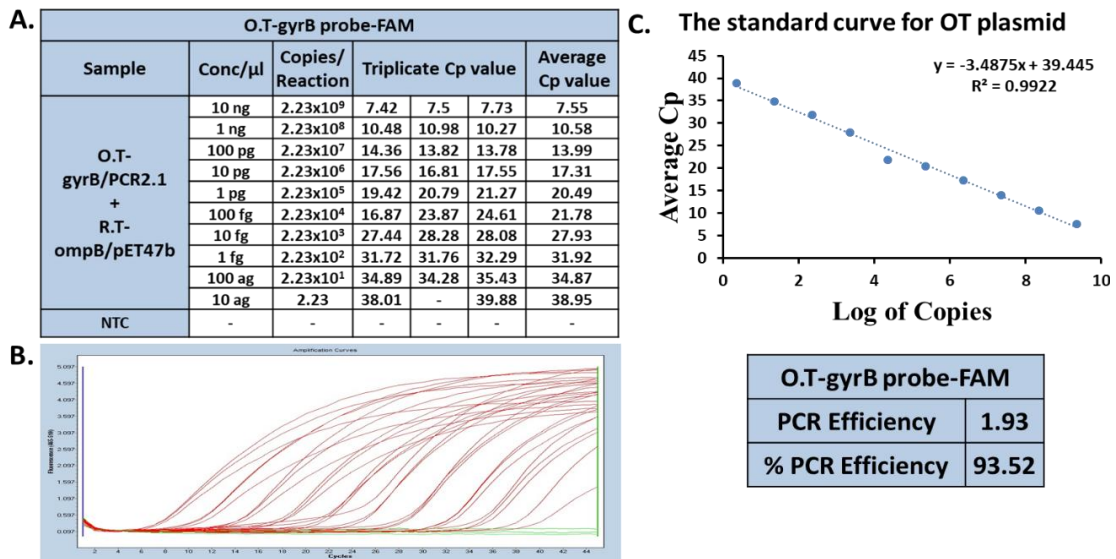


Fig. 3.1 TaqMan probe real-time PCR 系統對等比例混合 pCR2.1-gyrB 與 pET47b-ompB plasmid 的樣品偵測極限值 (LOD)。(A)恙蟲病 FAM 螢光波長所測出之三重複 Cp 值、Copies 值及樣品濃度等。(B) 三重複實驗之螢光放大曲線圖。(C) 三重複實驗之標準曲線圖，放大效率 93.52%。

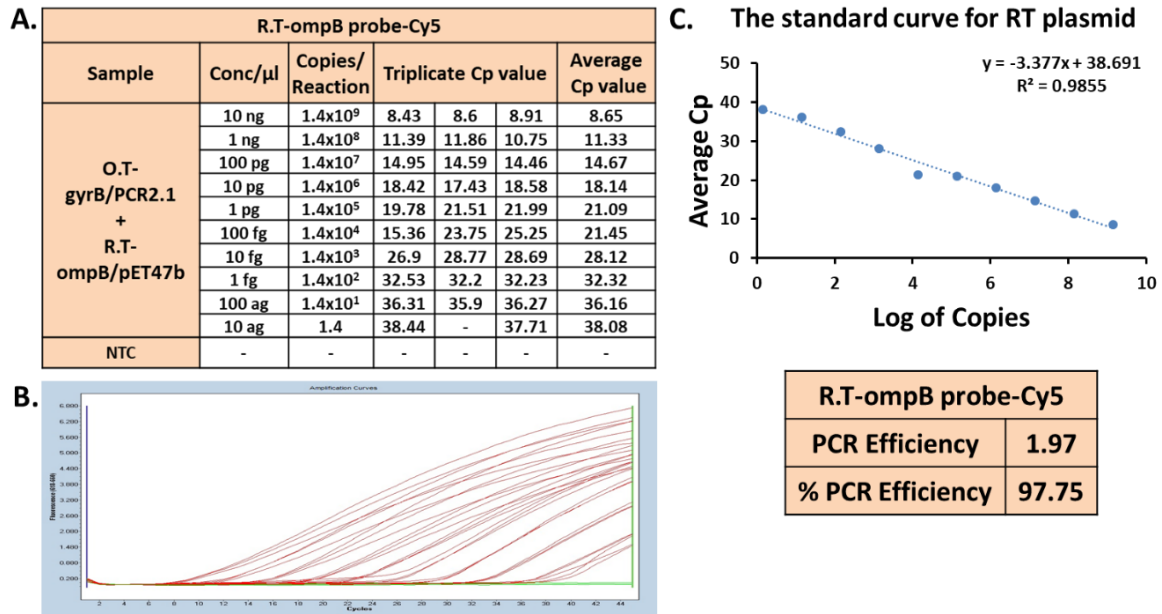


Fig. 3.2 TaqMan probe real-time PCR 系統對等比例混合 pCR2.1-gyrB 與 pET47b-ompB plasmid 的樣品偵測極限值。(A)地方性斑疹傷寒 Cy5 螢光波長所測出之三重複 Cp 值、Copies 值及樣品濃度等。(B)三重複實驗之螢光放大曲線圖。(C)三重複實驗之標準曲線圖，放大效率 97.75%。

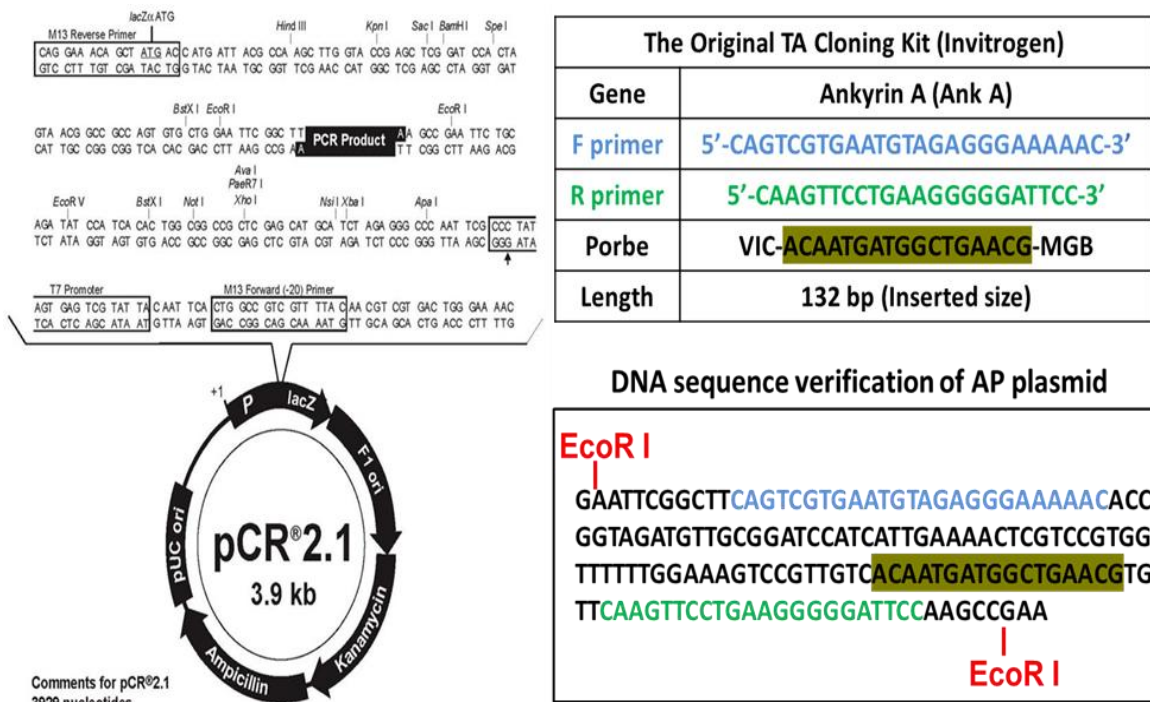


Fig. 4 建置帶有 *A. phagocytophilum* ankA 基因片段之 pCR2.1 載體。成功將目標基因 (ankA 片段) 接入載體，並以引子進行核酸增幅(132 bp)，產物經膠電泳及定序反覆確認，並用於後續偵測探針及引子之極限(LOD)。

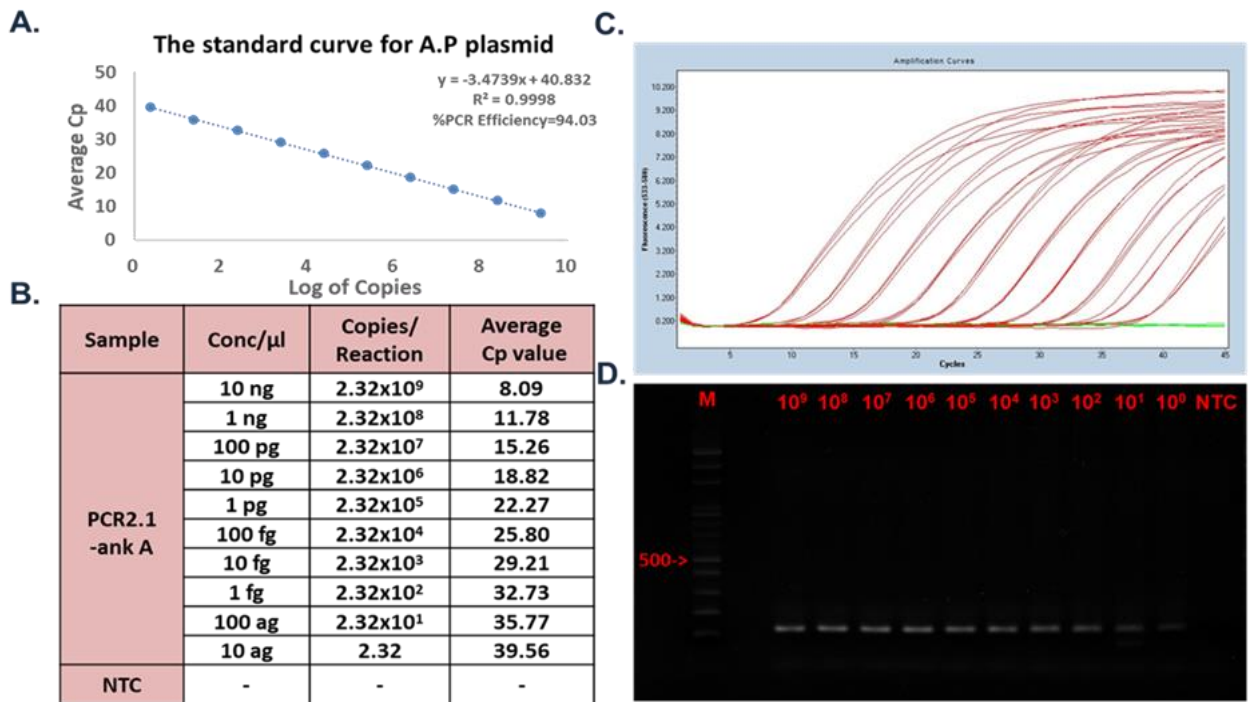


Fig.5 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-ank A plasmid 之 LOD 值。
 (A)三重複實驗之標準曲線圖。(B)人類顆粒細胞無形體症 Atto425 螢光波長所測出之三重複 Cp 值、Copies 值及樣品濃度等。(C) 三重複實驗之螢光放大曲線圖。(D)不同濃度之核酸反應產物於 2%洋菜膠電泳圖。

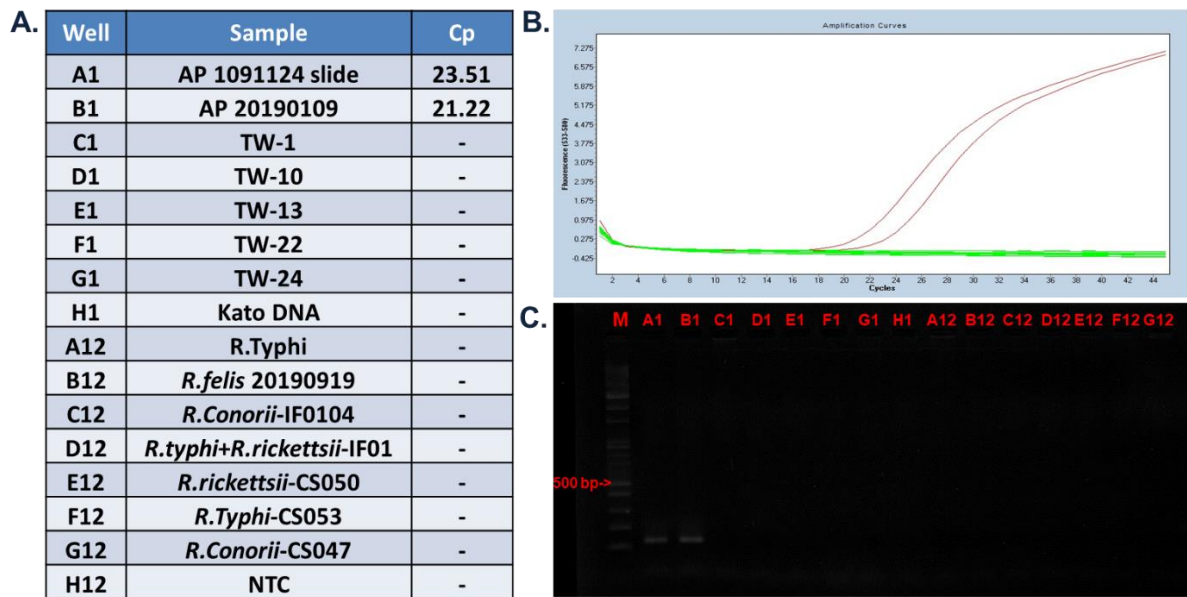


Fig. 6 TaqMan probe real-time PCR 對 *A. phagocytophilum* 專一性。(A) TaqMan probe real-time PCR 核酸增幅之 Cq，僅 *A. phagocytophilum* 樣品可被放大。(B) QPCR 專一性實驗之螢光放大曲線圖，螢光波長為 Atto425。(C) *A. phagocytophilum* 放大之核酸產物可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體樣品則不會。

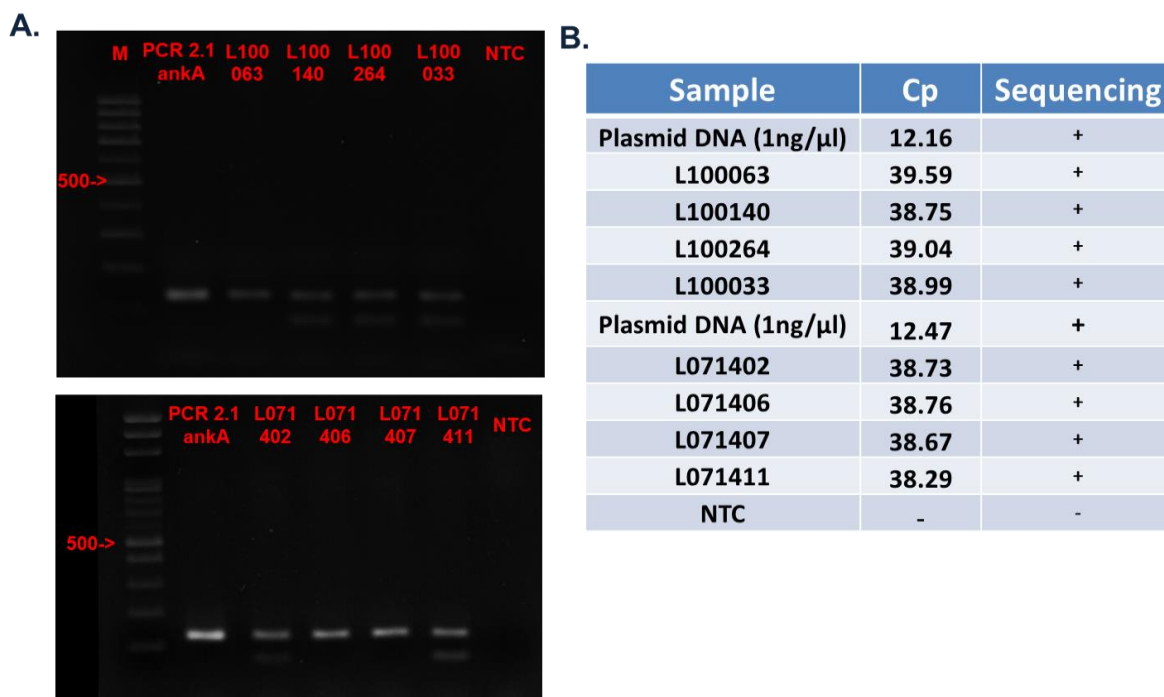
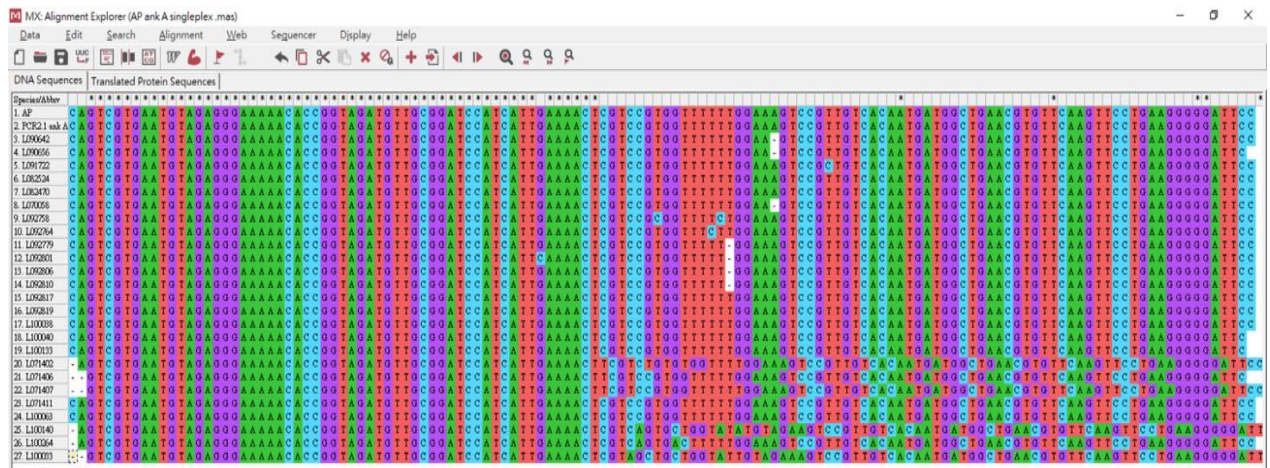


Fig. 7 TaqMan probe real-time PCR 系統對臨床檢體檢測 *A. phagocytophilum* 之結果。(A) QPCR 反應產物大之 2% 膠電泳圖。(B) *A. phagocytophilum* 陽性檢體之 Cp 值及定序結果。加號為定序成功並比對確認為 ank A 之片段，具有高度專一性。

表二、所開發之 TaqMan probe real-time PCR 系統與目前臨床檢驗人類類顆粒細胞無形體陽性檢體之比較，檢體之核酸反應產物，皆經過膠電泳及定序重覆確認為陽性之檢體。

Sample	qPCR		Taqman
	Msp2	HSP70	ank A
Plasmid DNA (1ng/μl)	14.3	15.72	12.16
L100063	-	35.07	39.59
L100140	-	35.78	38.75
L100264	-	33.85	39.04
L100033	-	-	38.99
L071402	-	32.92	38.73
L071406	-	33.68	38.76
L071407	-	34.94	38.67
L071411	-	35.02	38.29



Plasmid DNA (Cp)	11.78
Positive (Mean Cp)	39.76
Sequencing	25
Total number	358
Detection rate	6.9%
Sequence similarity	96~100%

Fig. 8 目前檢驗出為 *A. phagocytophilum* 陽性之檢體，檢體總數為 358 支，檢驗出陽性並定序成功之檢體數為 25 個，陽性率為 6.9%，於 NCBI BLAST 比對後與 *A. phagocytophilum* 序列相似度為 96-100%。

A.

Tickborne diseases	Sample (plasmid DNA)	ankA -Atto425	gyrB -FAM	ompB -Cy5
<i>A. Phagocytophilum</i>	ank A-1 ng	15.77	-	-
	ank A-100 pg	18.28	-	-
	ank A-10 pg	24.1	-	-
	ankA-1 pg	25.87	-	-
	ank A-100 fg	31.65	-	-
<i>O.tsetsumushi</i>	gyrB-1 ng	-	11.03	-
	gyrB-100pg	-	15.02	-
	gyrB-10 pg	-	17.95	-
	gyrB-1 pg	-	21.77	-
	gyrB-100 fg	-	25.18	-
<i>R.typhi</i>	ompB-1 ng	-	-	13.47
	ompB-100 pg	-	-	16.28
	ompB-10 pg	-	-	19.69
	ompB-1 pg	-	-	23.05
	ompB-100 fg	-	-	26.35
Mixture (AP,OT,RT)	mix-1 ng	16.42	12.88	14.41
	mix-100 pg	20.06	16.71	17.9
	mix-10 pg	22.89	19.69	20.46
	mix-1 pg	27.95	23.7	24.76
	mix-100 fg	29.72	27.67	28.48
	NTC	-	-	-

B.

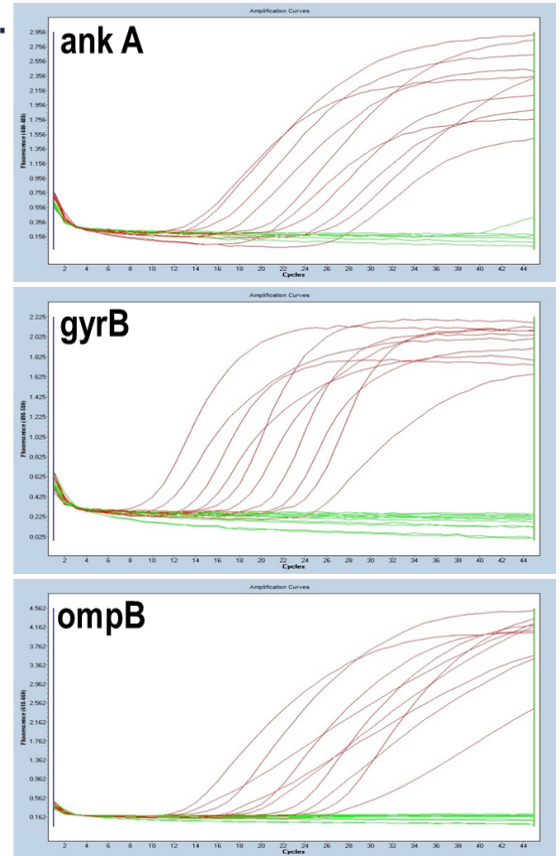


Fig. 9 整合 Triplex Taqman real-time PCR(OT&RT&AP)平台 (A)藉由切換不同螢光波長可明確偵測出人類顆粒細胞無形體症(Atto425)、恙蟲病(FAM)或地方性斑疹傷寒(Cy5)的 Cp 值，等比例混和後的質體樣品亦能藉由切換螢光波長偵測出該疾病的 Cp 值。(B)不同波長之螢光放大曲線圖。

A.

Well	Sample	gyrB -FAM Cp	ankA -VIC Cp	ompB -Cy5 Cp	Sequencing NCBI Blast (%)		
					gyrB	ank A	ompB
A1	pCR2.1 ankA-1ng	-	13.05	-	-	100	-
B1	pCR2.1 gyrB-1ng	11.56	-	-	100	-	-
C1	pET47b ompB-1ng	-	-	15.69	-	-	100
D1	L101146 (OT+)	34.86	-	-	99.04	-	-
E1	L101143 (OT+)	33.81	-	-	100	-	-
F1	L101135 (OT+)	34.92	39.32	-	100	87.69	-
G1	L101118 (OT+)	39.83	-	-	95	-	-
H1	L101117 (OT+)	34.61	-	-	99.03	-	-
A2	L101107 (OT+)	31.69	39.67	-	100	89.8	-
B2	L101104 (OT+)	34.56	39.5	-	99.52	96.21	-
C2	L101095 (OT+)	31.16	-	-	100	-	-
D2	L101080 (OT+)	35.97	-	-	99.52	-	-
E2	L101060 (OT+)	28.61	-	-	99.03	-	-
F2	L100961 (RT+)	-	39.38	36.27	-	95.24	100
G2	L100938 (RT+)	-	-	38.43	-	-	100
H2	L100920 (RT+)	-	-	36	-	-	100
A11	L100488 (RT+)	-	41.37	35.81	-	89.68	100
B11	L092877 (RT+)	-	-	35.96	-	-	100
C11	L092872 (RT+)	-	41.57	38.91	-	87.3	100
D11	L092719 (RT+)	-	-	35.61	-	-	100
E11	L092650 (RT+)	-	-	36.16	-	-	100
F11	L071411 (AP+)	-	38.92	-	-	100	-
G11	L071406 (AP+)	-	36.89	42.19	-	100	98.98
H11	L071402 (AP+)	-	40.17	40.25	-	100	99.49
A12	L071407 (AP+)	-	-	-	-	-	-
B12	L101430	38.39	-	-	98.85	-	-
C12	NTC	-	-	-	-	-	-

B.

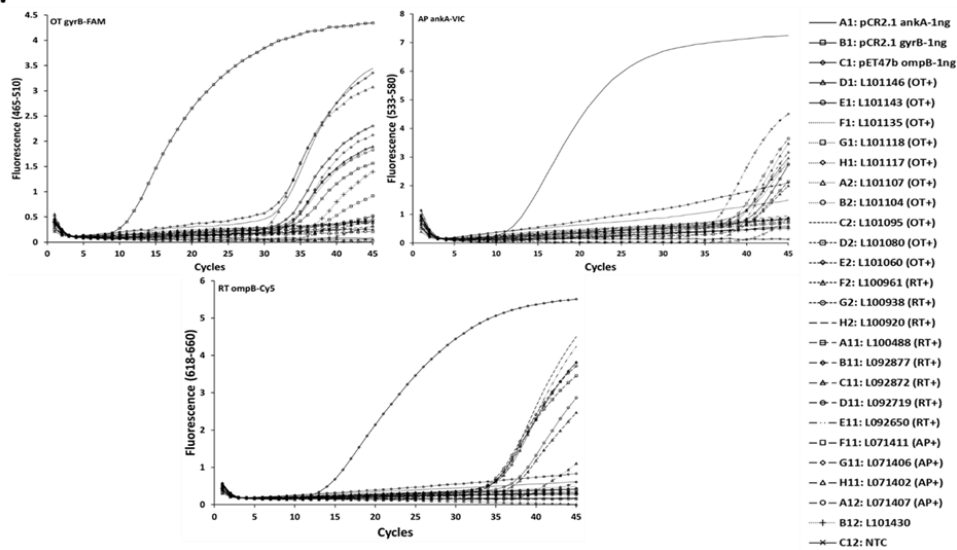


Fig. 10 臨床陽性檢體於 Triplex Taqman real-time PCR 平台(OT&RT&AP)之測試結果 (A) 藉由轉換不同螢光波長可明確偵測出人類顆粒細胞無形體症(ankA)、恙蟲病(FAM)或地方性斑疹傷寒(ompB)的 Cp 值，並將反應產物定序於 NCBI BLAST 比對之結果。(B)切換不同波長之人類顆粒細胞無形體症(VIC)、恙蟲病(FAM)及地方性斑疹傷寒(Cy5)之螢光放大曲線圖。

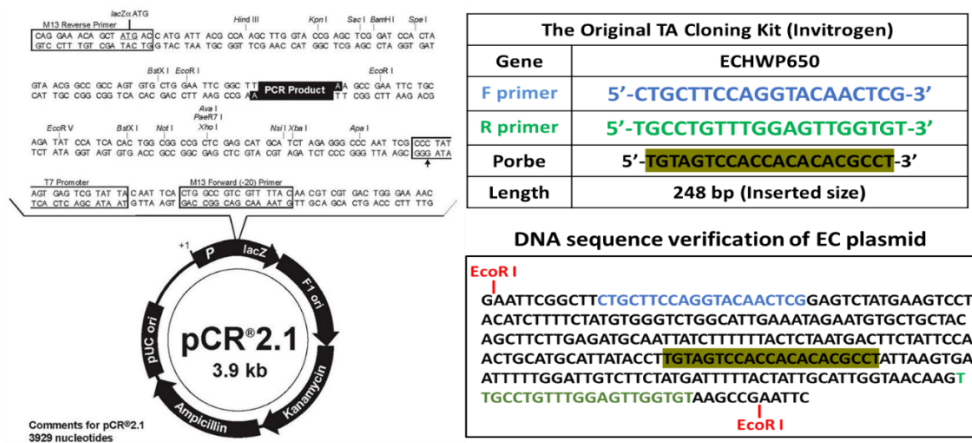


Fig. 11 pCR2.1 載體帶有 *E. chaffeensis* ECHWP650 基因片段。成功將目標基因(ECHWP650) 片段接入載體，以 ECHWP650 primer 進行核酸增幅，PCR 反應後之產物經定序及膠電泳重覆確認，所植入之基因片段經 NCBI BLAST 比對與 *E. chaffeensis* 具有高度專一性，用於後續偵測探針之 LOD 值。

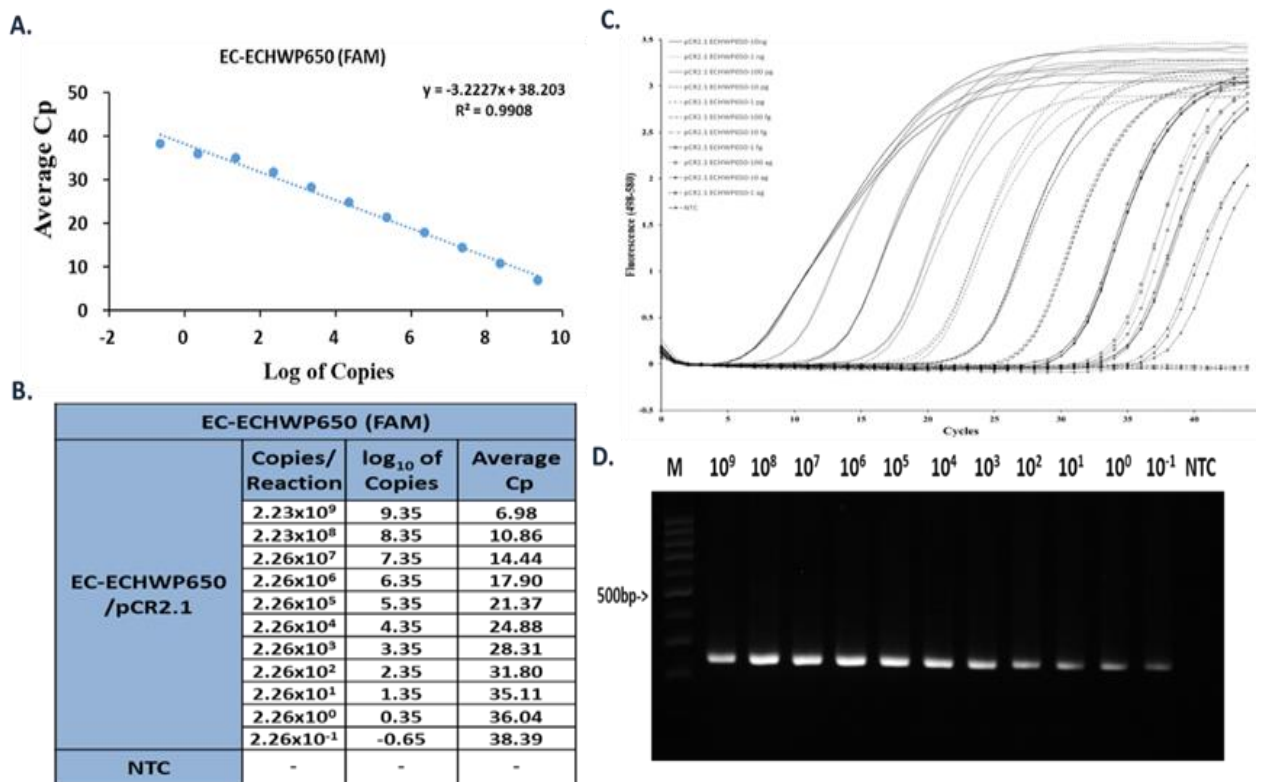


Fig.12 TaqMan probe real-time PCR 系統對 pCR2.1-ECHWP650 plasmid 之 LOD 值。(A)三重複實驗之標準曲線圖，由斜率推算 PCR 放大效率為 104.31%。(B) 人類單核球艾利希氏體症(FAM)螢光波長所測出之三重複 Cp 值、Copies 值及樣品濃度等。(C) 三重複實驗之螢光放大曲線圖。(D)不同濃度之核酸反應產物清楚見於 2%洋菜膠電泳圖。

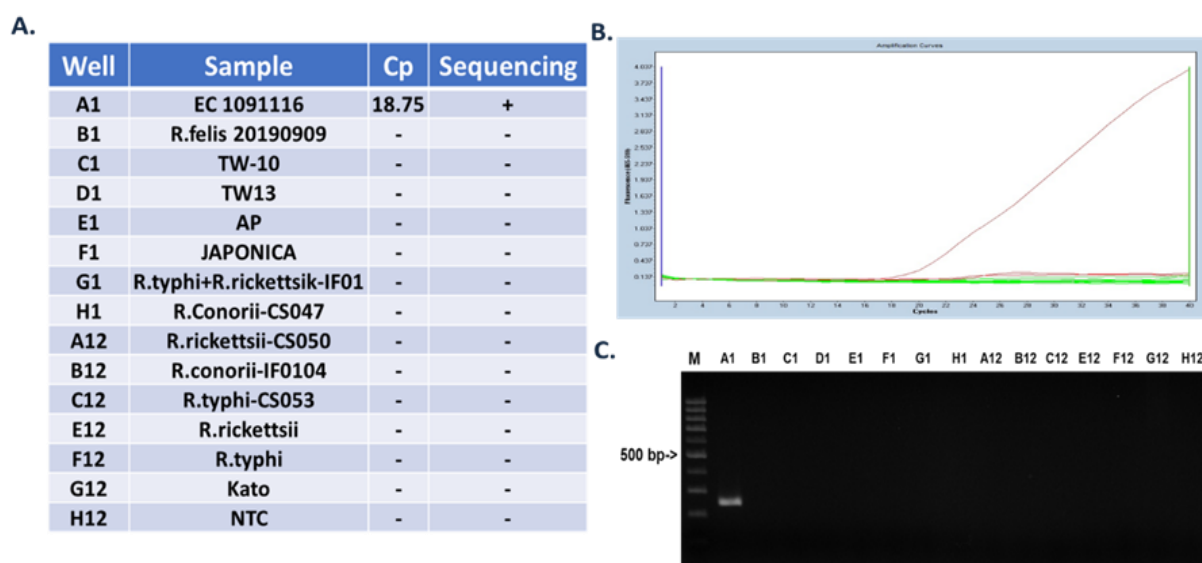


Fig. 13 TaqMan probe real-time PCR 對 *E. chaffeensis* 專一性結果。(A) TaqMan probe real-time PCR 核酸增幅之 Cq 值，僅 *E. chaffeensis* 樣品可被放大。(B) QPCR 專一性實驗之螢光放大曲線圖。(C) *E. chaffeensis* 放大之專一性核酸產物 (248 bp)可清楚見於 2% agarose gel，其他立克次體樣品則不會。

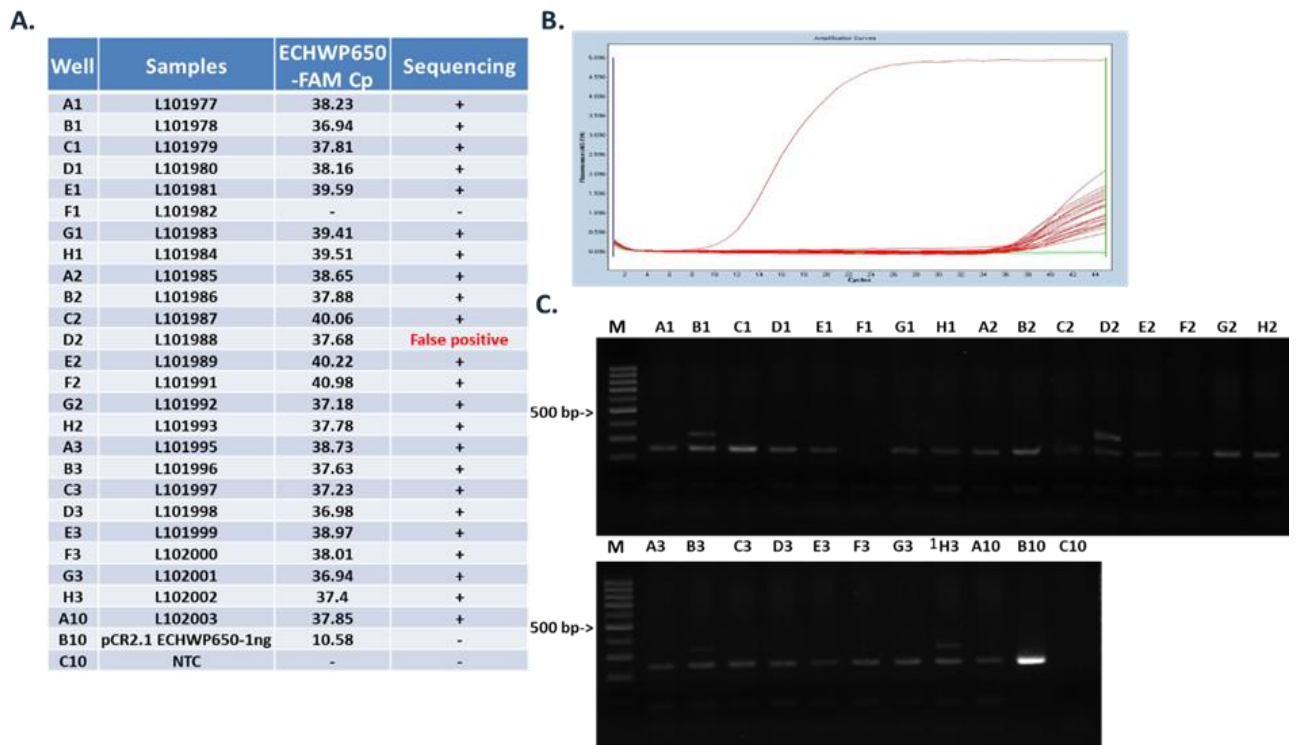
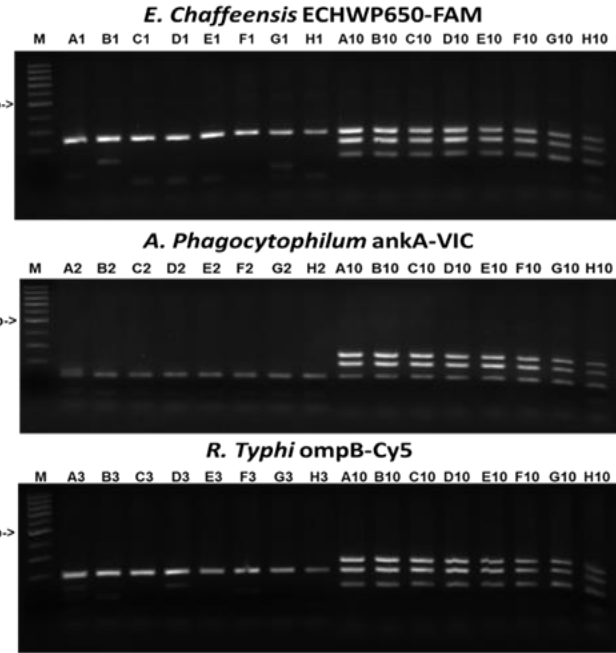


Fig. 14 TaqMan probe real-time PCR 系統對臨床檢體檢測 *E. chaffeensis* 之結果。(A) *E. chaffeensis* 陽性檢體之 Cp 值及定序結果。加號為定序成功並比對確認為 ECHWP650 之專一性片段。(B)陽性檢體之螢光放大曲線圖(FAM)。(C)放大之核酸反應產物(248bp)清楚見於 2%膠電泳圖。

A.

Well	Sample	ECHWP650 -FAM	ankA -VIC	ompB -Cy5
A1	pCR2.1 ECHWP650-1ng	8.93	-	-
B1	pCR2.1 ECHWP650-100pg	13.62	-	-
C1	pCR2.1 ECHWP650-10pg	17.36	-	-
D1	pCR2.1 ECHWP650-1pg	20.54	-	-
E1	pCR2.1 ECHWP650-100 fg	23.65	-	-
F1	pCR2.1 ECHWP650-10 fg	27.21	-	-
G1	pCR2.1 ECHWP650-1 fg	31.3	-	-
H1	pCR2.1 ECHWP650-100ag	33.76	-	-
A2	pCR2.1 ankA-1 ng	-	11	-
B2	pCR2.1 ankA-100 pg	-	14.46	-
C2	pCR2.1 ankA-10 pg	-	17.55	-
D2	pCR2.1 ankA-1 pg	-	20.71	-
E2	pCR2.1 ankA-100 fg	-	23.82	-
F2	pCR2.1 ankA-10 fg	-	27.59	-
G2	pCR2.1 ankA-1 fg	-	30.99	-
H2	pCR2.1 ankA-100 ag	-	34.19	-
A3	pET47b ompB-1 ng	-	-	11.06
B3	pET47b ompB-100 pg	-	-	14.74
C3	pET47b ompB-10 pg	-	-	17.98
D3	pET47b ompB-1 pg	-	-	20.86
E3	pET47b ompB-100 fg	-	-	24.5
F3	pET47b ompB-10 fg	-	-	28.44
G3	pET47b ompB-1 fg	-	-	31.52
H3	pET47b ompB-100 ag	-	-	34.73
A10	Mix-1 ng	11.04	12.71	12.98
B10	Mix-100 pg	14.9	16.17	16.34
C10	Mix-10 pg	18.88	19.42	20.19
D10	Mix-1 pg	21.95	22.22	22.49
E10	Mix-100 fg	25.57	25.73	25.94
F10	Mix-10 fg	29.06	29.26	29.78
G10	Mix-1 fg	32.8	32.78	33.49
H10	Mix-100 ag	34.88	36.03	35.93
A11	NTC	-	-	-
B11	NTC	-	-	-

B.



C.

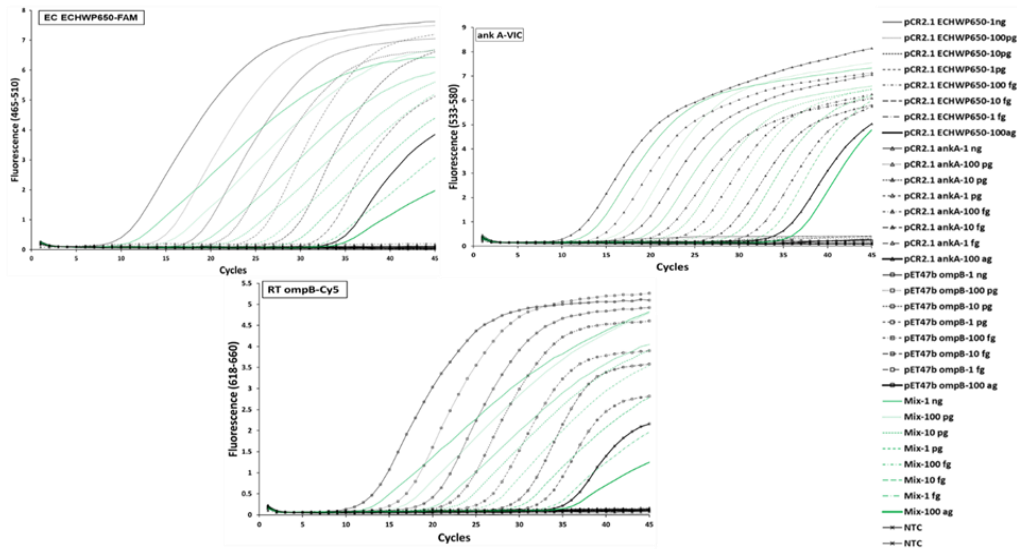


Fig. 15 整合 Triplex Taqman real-time PCR (EC&AP&RT)平台(A)藉由切換不同螢光波長可明確偵測出三種立克次體傳染病各 Cp 值。(B) *E. chaffeensis* (248 bp)、*A. phagocytophilum* (132 bp)及 *R.typhi* (197 bp)之核酸反應產物可清楚見於 2%膠電泳圖。(C)各波長之人類單核球艾利希氏體症(FAM)、人類顆粒細胞無形體症(VIC)及地方性斑疹傷寒(Cy5)及混合樣品的螢光放大曲線圖，綠色為混合之質體樣品。

A.

Well	Sample	ECHWP650 -FAM Cp	ankA -VIC Cp	ompB -Cy5 Cp	Sequencing NCBI Blast (%)		
					ECHWP650	ank A	ompB
A1	pCR2.1 ECHWP650-1ng	10.36	-	-	100	-	-
B1	pCR2.1 ankA-1ng	-	12.49	-	-	100	-
C1	pET47b ompB-1ng	-	-	13.23	-	-	100
D1	EC vincent 1091030	33.02	-	-	100	-	-
E1	AP 1100914	-	26.75	-	-	100	-
F1	R.typhi-slide	-	-	22.77	-	-	100
G1	Mix plasmid-1ng	12.32	14.24	14.74	100	100	100
H1	D1+E1+F1	35.45	28.48	24.69	100	100	100
A2	L101921	-	36.23	-	-	100	-
B2	L101922	42.99	-	-	-	-	-
C2	L101923	-	-	-	-	-	-
D2	L101924	36.35	-	-	96.05	-	-
E2	L101925	39.69	39.7	-	86.59	100	-
F2	L101926	41.77	-	-	97	-	-
G2	L101927	38.22	-	-	92.86	-	-
H2	L101928	38.8	-	-	90.87	-	-
A11	L101929	40.83	-	-	94.23	-	-
B11	L101930	39.74	-	-	85.71	-	-
C11	L101931	-	-	-	-	-	-
D11	L101932	-	-	-	-	-	-
E11	L101933	-	-	40.27	-	-	99.49
F11	L101934	-	-	-	-	-	-
G11	L101935	41.1	41.91	-	90.87	97	-
H11	L101936	-	40.7	-	-	99.24	-
A12	L101937	-	40.27	-	-	98.5	-
B12	L101938	-	-	-	-	-	-
C12	L101939	-	41.3	-	-	98.5	-
D12	L101940	-	-	-	-	-	-
E12	L101941	-	40.71	-	-	100	-
F12	L101942	-	-	-	-	-	-
G12	L101943	-	39.99	40.6	-	98.48	99.49
H12	NTC	-	-	-	-	-	-

B.

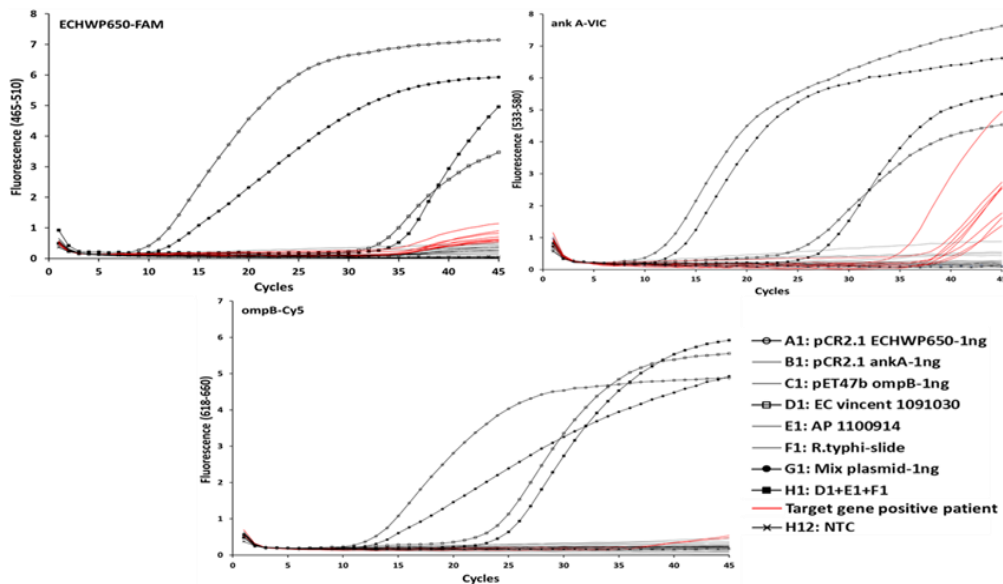
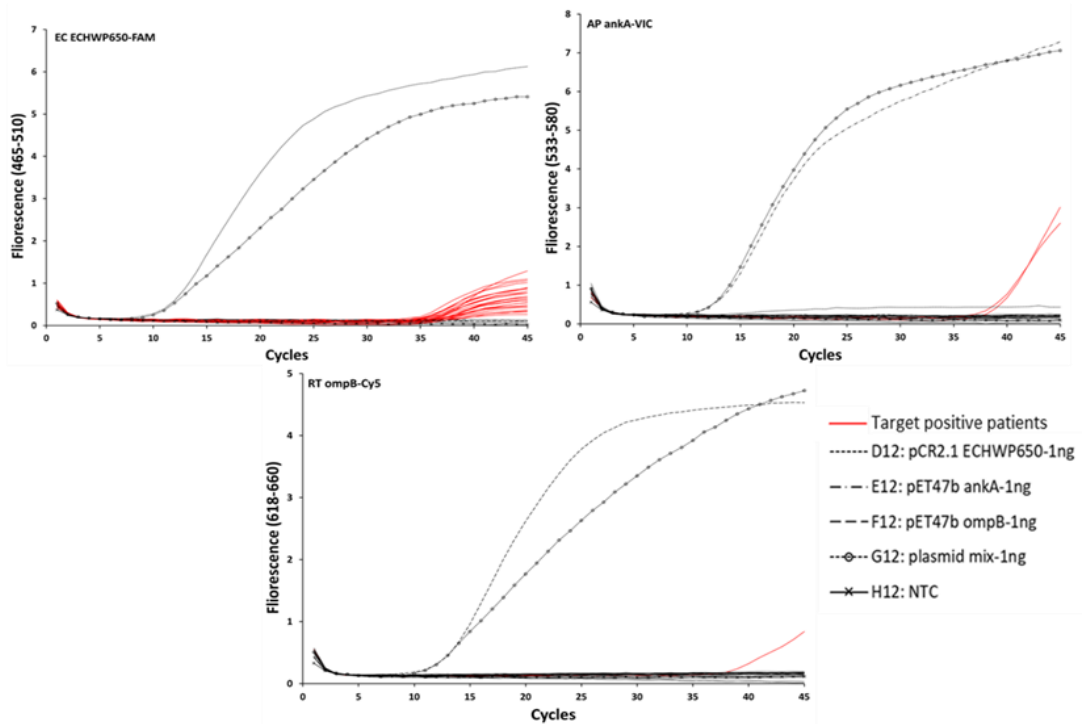


Fig. 16 整合 Triplex Taqman real-time PCR (EC&AP&RT) 平台應用於臨床檢體。(A)切換不同螢光波長可偵測出檢體編號 L101921-L101943 帶有專一性標定疾病基因(ECHWP650、ank A 及 ompB)之 Cp 值及專一性反應產物之定序結果，序列相似度為 80%以上。(B) 人類單核球艾利希氏體症(FAM)、人類顆粒細胞無形體症(VIC)及地方性斑疹傷寒(Cy5)之各波長螢光放大曲線圖，紅色表示各螢光波長呈現陽性之檢體。

C.

Well	Sample	ECHWP650 -FAM Cp	ankA -VIC Cp	ompB -Cy5 Cp	Sequencing NCBI Blast (%)		
					ECHWP650	ank A	ompB
A1	L101977	36.64	-	-	100	-	-
B1	L101978	35.04	-	-	100	-	-
C1	L101979	37.88	39.33	-	100	100	-
D1	L101980	37.72	-	-	100	-	-
E1	L101981	37.42	-	-	99	-	-
F1	L101982	36.09	-	-	99	-	-
G1	L101983	39.57	-	-	99	-	-
H1	L101984	37.01	-	-	99	-	-
A2	L101985	37.27	-	-	99	-	-
B2	L101986	37.58	-	38.77	100	-	99
C2	L101987	35.69	-	-	99	-	-
D2	L101988	37.89	-	-	False positive	-	-
E2	L101989	37.23	-	-	99	-	-
F2	L101990	-	-	-	-	-	-
G2	L101991	36.92	-	-	100	-	-
H2	L101992	35.47	-	-	100	-	-
A11	L101993	37.83	-	-	100	-	-
B11	L101994	-	-	-	-	-	-
C11	L101995	35.71	-	-	99	-	-
D11	L101996	36.31	38.88	-	100	99	-
E11	L101997	37.58	-	-	100	-	-
F11	L101998	39.05	-	-	99	-	-
G11	L102003	34.68	-	-	100	-	-
H11	L101999	36.63	-	-	100	-	-
A12	L102000	36.64	-	-	100	-	-
B12	L102001	35.64	-	-	100	-	-
C12	L102002	35.5	-	-	99	-	-
D12	pCR2.1 ECHWP650-1ng	8.27	-	-	100	-	-
E12	pET47b ankA-1ng	-	12.47	-	-	100	-
F12	pET47b ompB-1ng	-	-	10.98	-	-	100
G12	plasmid mix-1ng	9.22	12.41	11.15	100	100	100
H12	NTC	-	-	-	-	-	-

D.



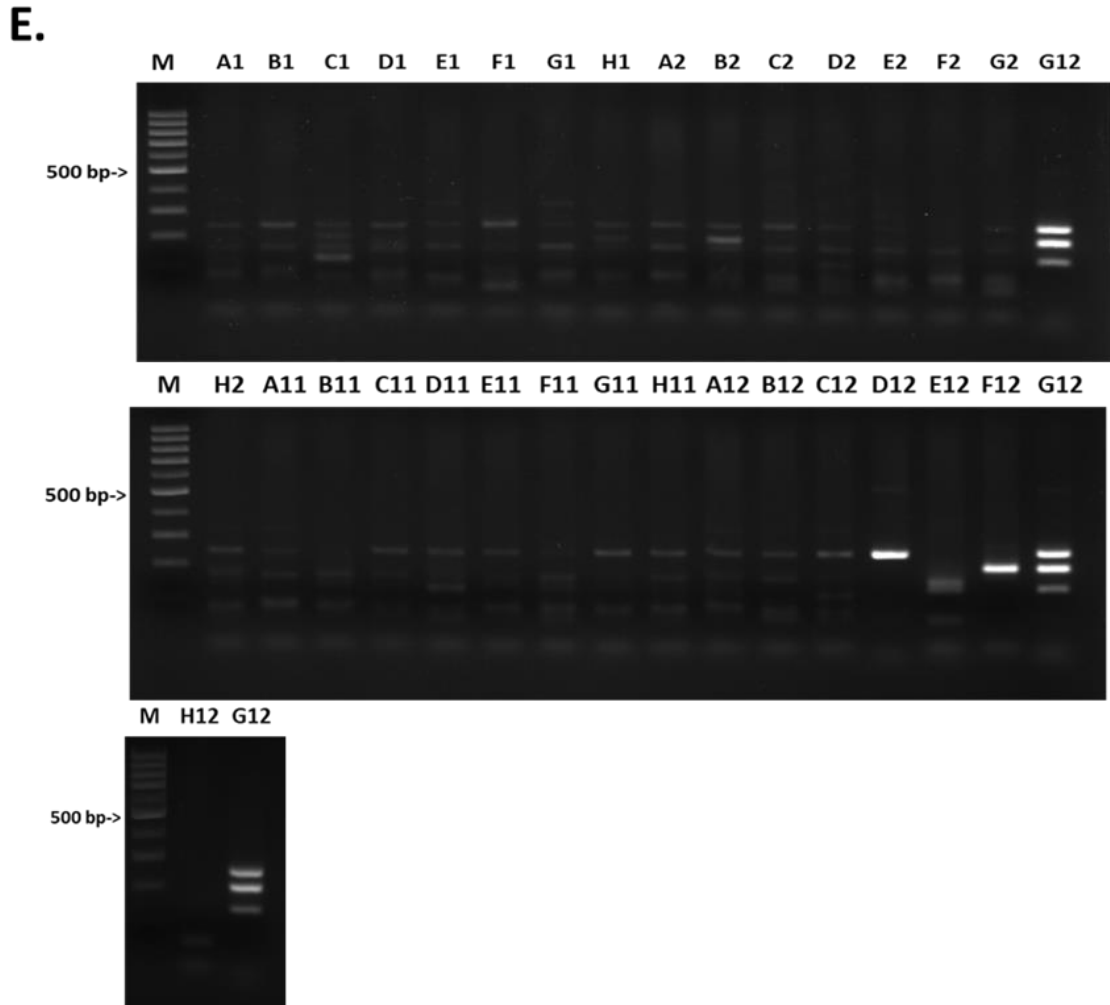


Fig.16 整合 Triplex Taqman real-time PCR (EC&AP&RT) 平台應用於臨床檢體。(C)藉由切換不同螢光波長可明確偵測出檢體編號 L101977-L102003 帶有專一性標定疾病基因(ECHWP650、ank A 及 ompB)之 Cp 值及專一性反應產物之定序結果。(D) 人類單核球艾利希氏體症(FAM)、人類顆粒細胞無形體症(VIC)及地方性斑疹傷寒(Cy5)之各波長螢光放大曲線圖，紅色表示各螢光波長呈現陽性之檢體。(E) *E. chaffeensis*(248 bp)、*A. phagocytophilum*(132 bp)及 *R. typhi*(197 bp)之核酸反應產物清楚見於 2%膠電泳圖。

110 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: 110.11.30

*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	Realtime multiple PCRs for detecting <i>rhickettsia</i> agents in Taiwan. The sensitivity and specificity appeared to be good.	謝謝委員建議與肯定。	無
2	This assay needs to be applied for real world detection to learn its actual performance, and any effect on the diseases control or treatment.	1. 謝謝委員的建議。	無
3	可做為日常檢驗應用於國內檢驗需求。	1. 謝謝委員肯定。 2. Multiplex Taqman Probe RT-PCR 是運用專一性的螢光探針，可以即時同步測得病原體特定基因鑑別感染種類，具有高度的專一性可大幅縮短檢驗操作過程流程與及早確認感染源，提供疫情防疫措施參考。	無

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
4	應發展定點照護檢驗 (point of care testing , POCT)	謝謝委員的建議，後續會尋求廠商技轉，並製成三合一核酸快速檢驗試劑。	無
5	靈敏度不應該小於 1 copy。	靈敏度以 construct plasmid, 經十倍連續稀釋測得，且皆有重複 3 次，確認在此低濃度下皆能測得。LOD 小於 1copy 代表 DNA template 的正態分布雖不是預期的，代表試驗有時可偵測或測不到(Thermofisher)。另於國際期刊報導(Anal. Chem. 2007, 79, 8471-8475)發現有效益的 PCR 偵測系統，其靈敏度能小於 1 copy。在此實驗我們將 DNA 模板進行重複試驗皆具一致性，當測 Cp(Ct)值 35 以上的檢體，會將該檢體多次檢驗，以確認偵測具效能。	無
6	相關檢驗開發結果具創新性且可供臨床實驗室使用，對新興立克次體之監測與防治具有助益。	謝謝委員肯定。	無