

結合重組酶聚合酶擴增法與側向層析試紙之恙蟲病快速核酸檢測技術開發

Development of a Rapid Nucleic Acid Detection Technique for Scrub Typhus by Integrating Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Assay

實習單位：疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

學生：葉佳翰 指導老師：蔡坤憲 教授 單位指導：顏采瑩 副研究員

一、研究背景

恙蟲病為立克次體屬的 *Orientia tsutsugamushi* 引起之蟲媒傳染病，透過帶菌之恙蟲幼蟲叮咬傳播，常見於亞太地區，具高度地方流行特性。由於臨床上恙蟲病初期症狀與登革熱、斑疹傷寒等感染症相似，顯示出恙蟲病診斷難度高。為促進公共防疫衛生，發展一套能快速、準確辨識恙蟲病感染者的診斷工具，有助於提升臨床治療效率。

現行常用之診斷方式包含血清學檢測（IFA、ELISA）及核酸擴增技術（PCR），雖具高靈敏度與特異性，但需仰賴專業儀器與實驗室環境，難以應用於資源不足地區或現場快速診斷。為了克服這些限制，將重組酶聚合酶擴增法操作簡便、反應快速、且易達到反應條件的特性，進一步搭配側向層析（lateral flow）快篩試紙作為可視化讀出方式，整合為一套操作簡便、可視化且適用於現場的核酸快篩檢測技術。

二、研究目的

重組酶聚合酶擴增法（Recombinase Polymerase Amplification, RPA）應用於恙蟲病快篩的關鍵，在於應用引子的特異性，透過常溫即具有活性的重組酶、單鏈 DNA 結合蛋白、鏈置換 DNA 聚合酶，在 37-42℃ 的恆定溫度下進行僅需反應15至20分鐘，大幅降低設備門檻。因此，本研究針對恙蟲病病原體序列進行核酸標靶篩選，設計並驗證具特異性的 RPA 引子，結合側向層析快篩試紙，建立一套快速核酸檢測技術。

三、材料與方法

一、RPA引子

本研究選擇 *Orientia tsutsugamushi* 的 47-kDa high-temperature requirement A (HtrA) 蛋白基因作為擴增靶標，此基因在此屬中有高度保守性，具有作為特異性標靶的潛力。設計 RPA 反應所需之引子並從參考文獻中選一組，共四組 RPA primer。配合側向層析試紙於 Forward primer 5’端加上 FAM，Reverse primer 5’端加上 biotin 標記（表一）。設計時上傳複數序列優先選取 47-kDa HtrA 基因之保守區域，後續以實驗篩選決定最佳引子組合，再進行濃度與反應條件優化，建立可搭配側向流試紙之RPA-LF偵測方法。

二、RPA 反應與側向流試紙檢測

RPA 反應於 37 °C 進行 15 分鐘並以 70 °C加熱5分鐘終止反應，產物混和試紙緩衝液後以側向流試紙檢測。結果依試紙上檢測點（T point）與對照點（C point）判讀，同時出現 T 點與 C 點為陽性，僅出現 C 點為陰性。

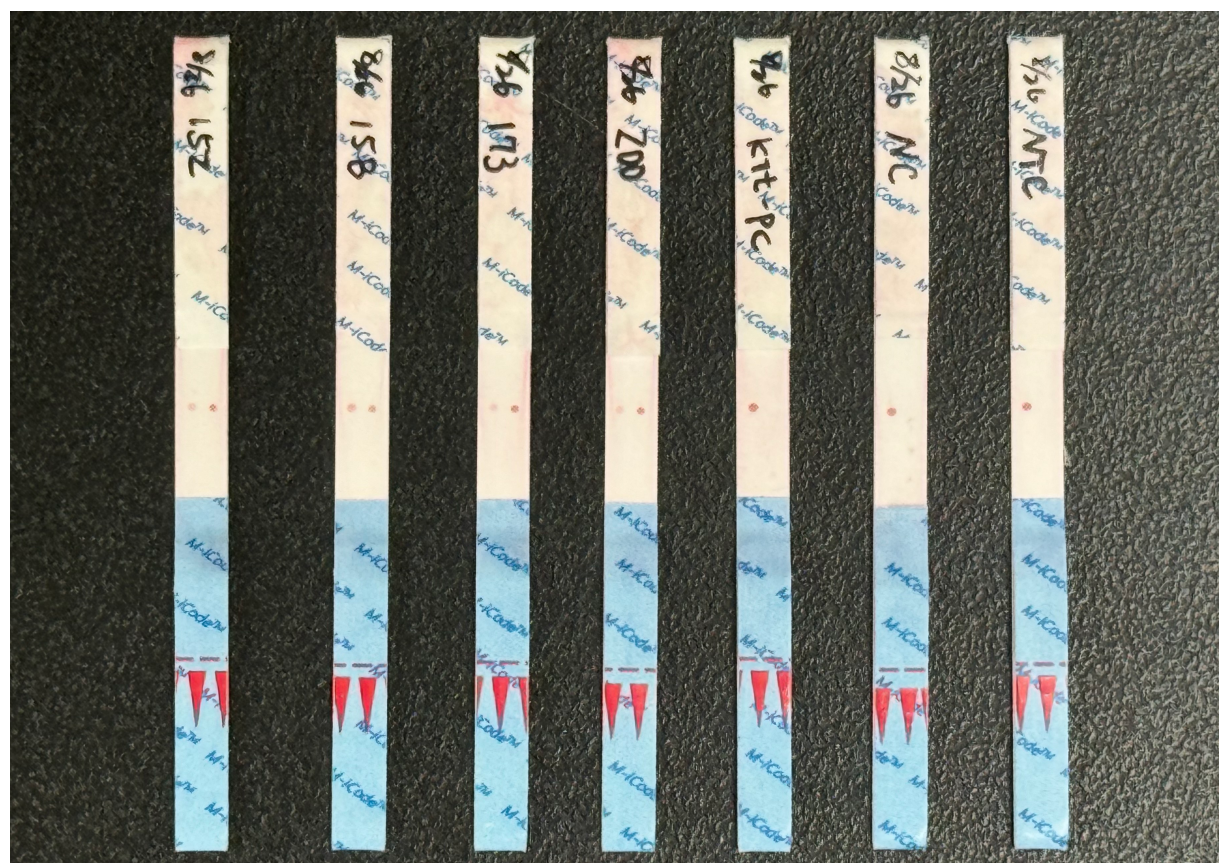
表一、RPA Primers

	Primers	Sequences(5' to 3')	
Forward	Ot_47HA(152)F5fam	FAM-GGACCAGATATGGGTAACGGCATAGTAACTG	
Reverse	Ot_47HA(152)R5bt	biotin-GCAAACTTATGCCTGAGTAAGATACGTGAATGG	
Forward	Ot_47HA(158)F5fam	FAM-TAAAGTTGCATGATGGTTCAGAACTCATAGCA	*文獻參考序列
Reverse	Ot_47HA(158)R5bt	biotin-TATTGCAATAACCTGATCTCCTACTCTAGA	
Forward	Ot_47HA(173)F5fam	FAM- TTGCCAACAAAGGTGAGGATAGTGAGCAAC	
Reverse	Ot_47HA(173)R5bt	biotin-TCTCCCCAAGAGAGTTAGGCGAAACCTTC	
Forward	Ot_47HA(200)F5fam	FAM-CAGCACAATGTGGAATTGCTCCTGGAGATG	
Reverse	Ot_47HA(200)R5bt	biotin-TTGTGCTCACTATCCTCACCTTTGTTGGC	

四、研究結果與討論

一、引子篩選

以 TW-1 (Karp) 株 DNA純化樣本進行測試。四組引子皆在陽性中產生顯色條帶，而陰性對照（NC）均無反應（圖一）。進一步以地方性斑疹傷寒 DNA純化樣本測試特異性，結果顯示OT152、OT158引子未產生陽性點，而OT173、OT200引子出現非特異性陽性反應（圖二）。因此後續實驗選用前兩組引子進行檢測極限濃度。



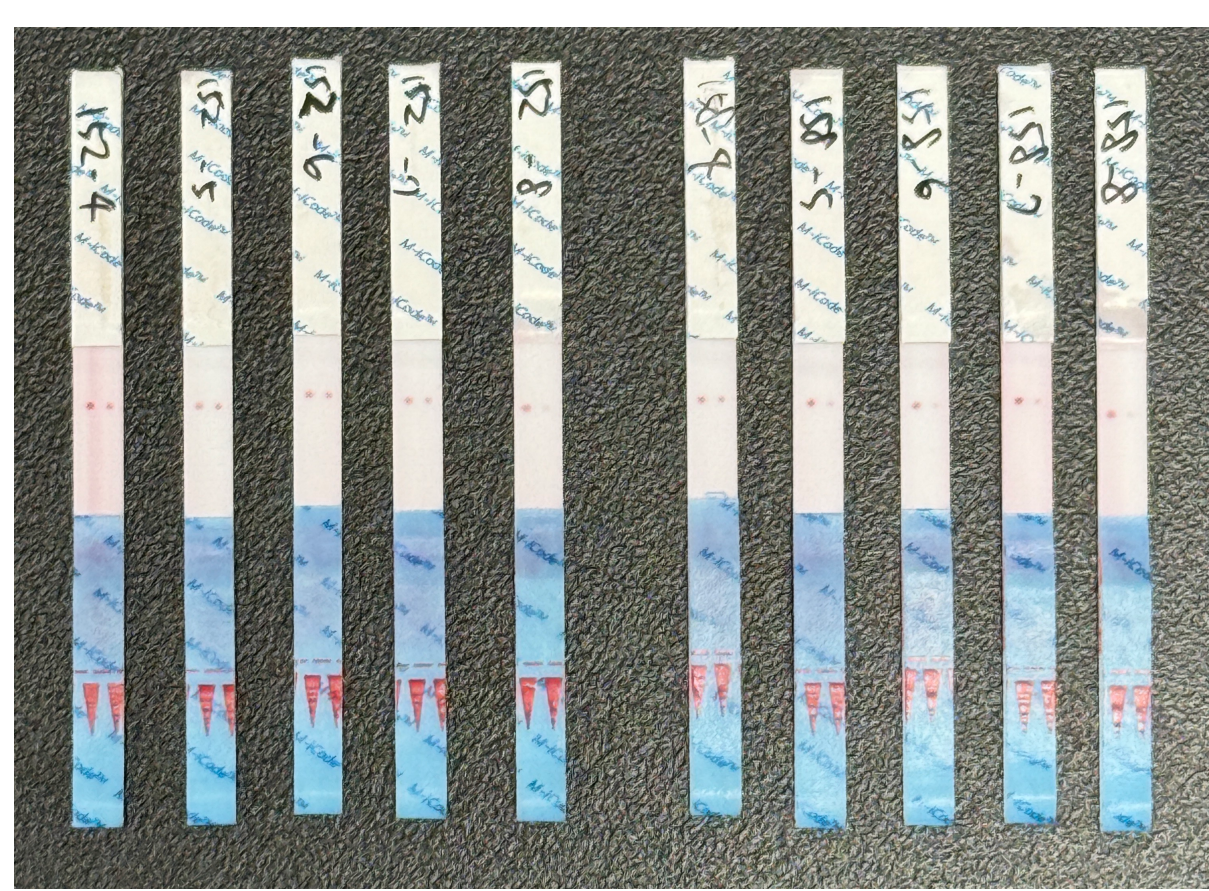
圖一、以 TW-1 株 DNA 測試四組 RPA 引子 圖二、以地方性斑疹傷寒DNA測試特異性

二、靈敏度分析極限濃度

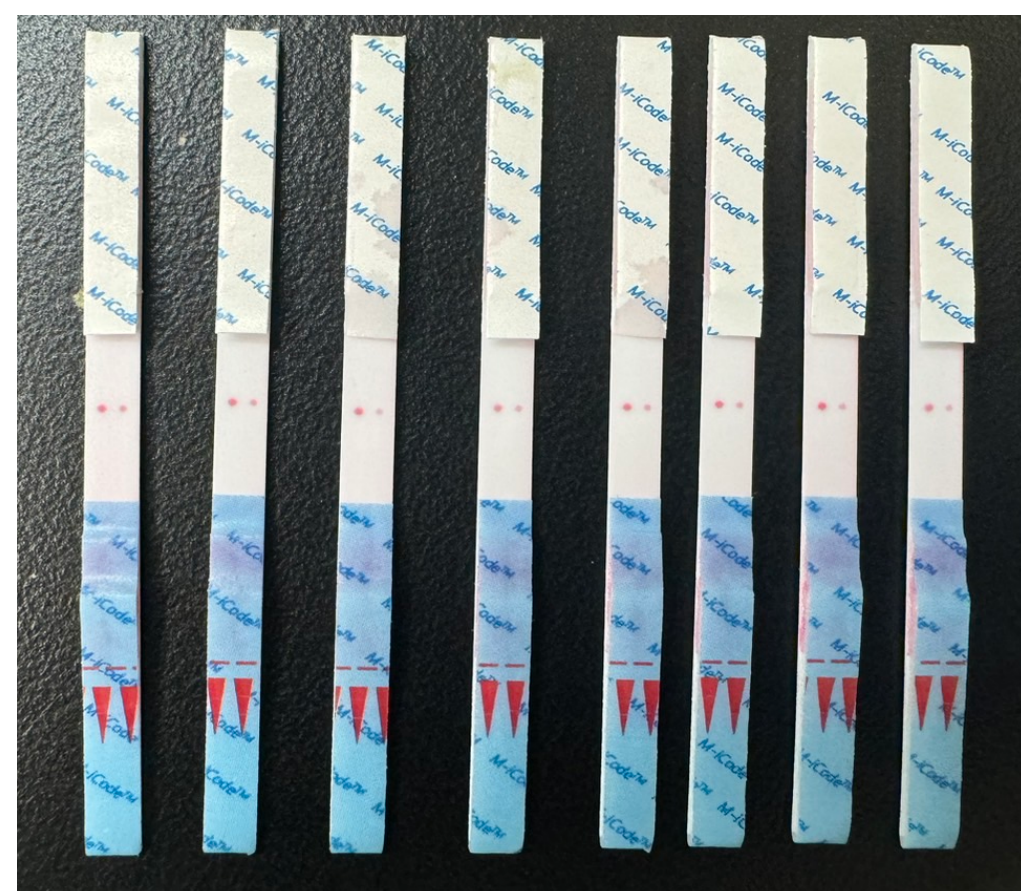
將篩選後的兩組引子（OT152 與 OT158）用於二倍梯度稀釋 DNA 樣本之檢測（圖三）。結果顯示，兩組引子皆能檢測至最低濃度 36.33 μg/mL，在此濃度下仍可產生明確的陽性點狀訊號，顯示此方法具備良好的檢測極限。

三、特異性分析

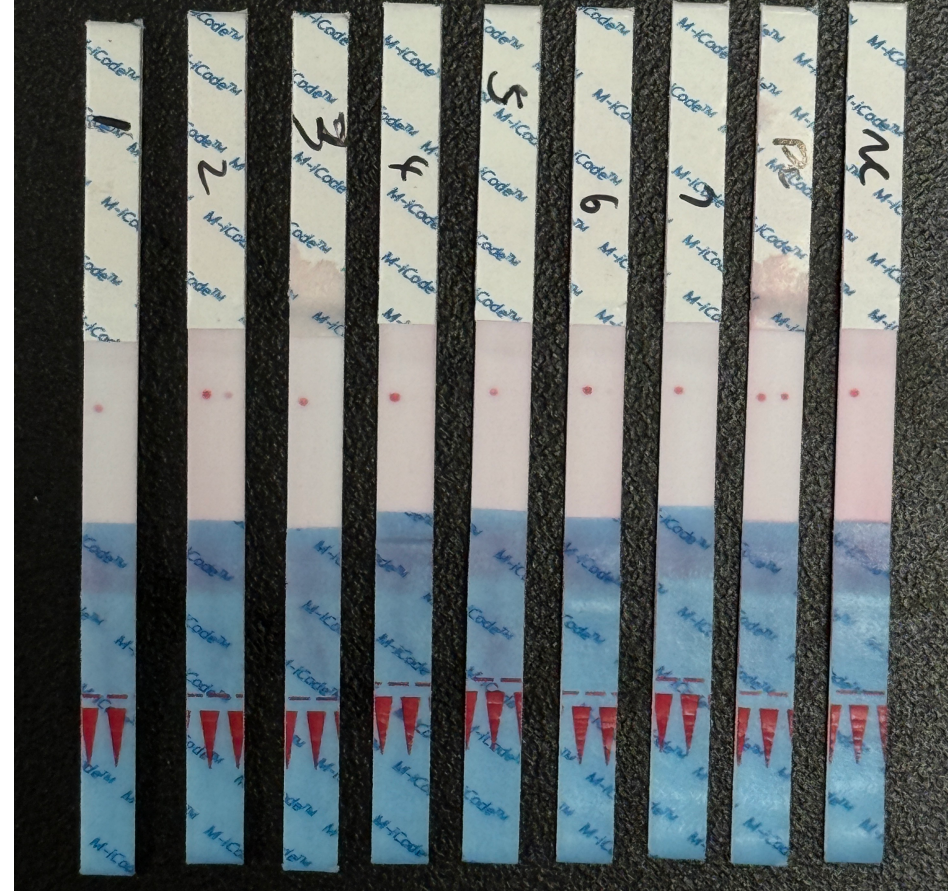
以反應較為清晰的OT152進一步以恙蟲病以及地方性斑疹傷寒之陽性DNA檢體進行特異性分析（圖四、圖五）。結果顯示，結果顯示 OT152在恙蟲病陽性檢體測試中皆呈現陽性反應，而在地方性斑疹傷寒陽性檢體測試中僅出現一例偽陽性反應，此方法下敏感度 100%、靈敏度86%，顯示出良好的特異性。



圖三、檢測引子極限濃度



圖四、恙蟲病陽性檢體測試



圖五、地方性斑疹傷寒測試

四、討論

本研究開發一套結合RPA與側向流試紙的恙蟲病快速核酸檢測技術。實驗結果顯示，OT152與OT158兩組引子均具備良好的檢測極限。其中反應較清晰的 OT152 引子能檢測出恙蟲病陽性檢體，且僅出現一例偽陽性反應，展現了優異的特異性。未來可進一步納入更多臨床上症狀相似或可能引起交叉反應的病原體檢體，擴大特異性測試規模，以強化技術的準確性與可靠性。

五、結論

此適用於現場快速篩檢的恙蟲病核酸檢測平台，整合了RPA技術反應快速（37°C下僅需15分鐘）、操作簡便的優點，並搭配側向層析試紙，使檢測結果可視化，無需依賴高階實驗室儀器。經驗證篩選出的 OT152引子能有效辨識恙蟲病病原體。此技術有助於克服現行診斷方法在時效性與設備上的限制，可望協助公共衛生防疫，提升臨床的早期診斷與治療效率。