

計畫編號：MOHW106-CDC-C-114-113704

衛生福利部疾病管制署 106 年委託科技研究計畫

計畫名稱：多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台開發與應用

106 年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：國防醫學院

計畫主持人：許蕙玲

研究人員：謝博軒、郭明德、崔佩怡、蔡善格、梁忠誌、
黃信憲、徐育麟、陳國卿、林豐平、吳玉屏

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應
事先徵求本署同意*

目 錄

中文摘要.....	3
英文摘要.....	5
本文.....	7
一、 前言.....	7
二、 材料與方法.....	12
1. 參考菌株.....	12
2. 細菌培養.....	12
3. 核酸萃取.....	13
4. 核酸定量.....	14
5. 探針微球製備.....	14
6. 多重聚合酶連鎖反應.....	17
7. T7 核酸外切酶(T7 exonuclease)反應.....	19
8. 微球雜合反應與流式細胞儀分析直接雜交反應.....	20
9. 偵測極限之分析.....	22
10. 資料統計與分析.....	22
三、 結果.....	23
1. 原理介紹.....	24
2. 建立多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台.....	27
3. 多重腹瀉性病原核酸偵測平台之臨床檢體初步檢測.....	50
四、 討論.....	60
五、 重要研究成果及具體建議.....	66
六、 參考文獻.....	68
七、 期末報告審查意見回復表.....	71

表 目 錄

表 1、2011-2015 年台灣腹瀉性法定傳染病統計	9
表 2、2011-2015 年台灣感染性病原引起食物中毒案件統計	9
表 3、7 種腹瀉性致病原引子組合(組合一).....	29
表 4、8 種探針微球混合物內容 (組合一).....	32
表 5、以陽性對照組進行多重懸浮微球陣列反應之原始數值 (組合一)....	33
表 6、以陽性對照組進行多重懸浮微球陣列反應之分析結果 (組合一)....	34
表 7、多重腹瀉性病原核酸偵測平台之偵測極限分析(組合一).....	37
表 8、多重腹瀉性致病原引子組合(組合二).....	39
表 9、10 種探針微球混合物內容(組合二).....	43
表 10、多重懸浮微球陣列反應之原始數值(組合二).....	45
表 11、多重懸浮微球陣列反應之分析結果(組合二).....	46
表 12、多重腹瀉性病原核酸偵測平台之偵測極限分析(組合二).....	48
表 13、以多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台對臨床檢體之檢測與平行比 對之結果.....	52
表 14、多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台對臨床檢體檢測之靈敏度與專 一性分析.....	59

摘要

中文摘要

(字數以不超過六百字為原則)

研究目的: 腹瀉性疾病是全球重要的公共衛生議題，每年估計 20 億腹瀉病例，並導致 200 萬人口死亡。造成腹瀉症狀的致病原種類多且各種方法對不同致病原的偵測靈敏度差異很大、耗時、費力且判斷較為主觀，致使早期且準確鑑定腹瀉感染性病原對診斷實驗室是一種挑戰。多重分子檢測是前景看好的新興技術之一，然而目前市售之試劑缺乏台灣好發致病原之項目，因此本計畫旨於開發一項符合國內需求之多重腹瀉病原核酸偵檢平台，並評估它在臨床診斷及鑑定食物中毒病原之應用價值。

研究方法:本計畫納入國內腹瀉性法定傳染、食物中毒相關與臨床常見的腸胃道病原為偵檢標的，採用多重聚合酶連鎖反應將各致病原之基因擴增後，以懸浮微球陣列與擴增產物進行雜合反應後，搭配流式細胞儀的微流體系統進行分析，一個試驗最快當天即可得到多項結果。

結果: 今年度已初步建構一套針對 9 種腹瀉性細菌病原之同步檢測平台，內容包括沙門氏菌屬、志賀氏菌屬、霍亂弧菌、志賀毒性大腸桿菌、產氣莢膜桿菌、困難梭狀桿菌、李斯特菌與金黃色葡萄球菌，該平台對於致病原之偵測極限可達 5-1000 GE，經過 71 項臨床檢體的實際測試，分析的專一性可達 100%，靈敏度為 76.9~100%，後續將持續納入多項細菌與病毒偵檢項目，並持續改善反應條件，以提升各偵檢項目之靈敏度。相信此偵測平台之建置有助於整合檢測方法，達到節省人力、物力，以及短時間內快速檢測多重病原之目的。

關鍵詞：腹瀉性病原、多重分子檢測、多重聚合酶連鎖反應、懸浮微球陣列

英文摘要

(字數以不超過六百字為原則)

Significance and Purpose: Infectious diarrhea is one of the most important global public health issues with an estimated number of 2 billion cases and 1.9 million deaths per year. Diverse infectious agents may cause diarrhea, however, most of the detection methods are laborious, time consuming, and subjective. Therefore, early and accurate diagnosis of the causal agent is still a challenge for diagnostic laboratory. Multiplex molecular assays are the most promising emerging technologies for rapid and accurate identification of multiple infectious agents, however, the commercial kits cannot fully meet the demands in Taiwan. The aim of this study is to develop a multiplex molecular detection panel for comprehensive syndromic pathogen detection and evaluate its application in clinical diagnosis and identification of the causative agent of food poisoning.

Methods: The multiplex molecular detection panel targets infectious agents of notifiable diarrheal diseases, food-poisoning diseases and common causes of gastrointestinal infections in Taiwan. Pathogen-specific amplicons can be obtained by multiplex PCR and followed sequentially by hybridization with different sets of Luminex microspheres, detection and quantification by flow cytometry with microcapillary system. It may provide an approach for one test with multiple answers within one day.

Results: We has constructed a multiple diarrheal pathogen detection panel against 9 bacteria, including *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, STEC, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* with the limit of detection equivalent to 5-1,000 genome copies. This assay is validated via assessment of 71 clinical specimen and achieves a specificity of 100% and sensitivity of 76.9-100%. We will continue

to include a number of bacteria and virus detection and try to optimize the performance of this panel. It is believed that the establishment of this panel will help to integrate the detection methods and largely decrease the processing time, labor, costs, sample and reagent consumption.

Keywords: diarrheal pathogen · multiple molecular assays · multiplex PCR · suspension bead array

本文

一、 前言

「傳染病防治法」於 1999 年 6 月 23 日公布實施，依致死率、發生率及傳播速度等危害風險程度高低將疾病分類，其中多項腹瀉性疾病，包括傷寒、副傷寒、腸道出血性大腸桿菌感染症、桿菌性痢疾、阿米巴性痢疾與霍亂納入第二類傳染病。

衛生署疾病管制局(現今衛生福利部 疾病管制署)自 2004 年 2 月起開始對腹瀉個案進行監視，2005 年 1 月起新增「主動監視通報系統」，開始收集腹瀉群聚事件通報，更於 2006 年 9 月加強「症狀監視通報系統」功能，為監測腹瀉個案與群聚事件提供更即時與便利的資訊[1]，加上現有的「法定傳染病監視通報系統」以及食品藥物管理署之「食品中毒資訊系統」，足見我國對腹瀉性病原引發傳染病的重視。

世界衛生組織在 2007 年倡議由各國共同合作估計食媒性病原的全球疾病負擔[2]，亦建置全球監測網絡，結合全球力量進行食媒性與腹瀉病原的監測與控制，以了解各區域腸道疾病流行狀況與疾病負擔，成為全球共同的目標與任務。

腹瀉性疾病是全球公衛問題，根據世界衛生組織(WHO)與聯合國兒童基金會的統計，每年估計有 20 億腹瀉病例，導致 200 萬人口死亡，是全球 5 歲以下兒童第二死因[3]，僅次於肺炎，估計每年 190 萬兒童死於此因[4, 5] (這些兒童主要處於開發中國家，其中非洲與東南亞佔 78%)，佔死亡總人數的 18%，相當於每天有超過 5,000 名兒童死於腹瀉疾病。

在工業化的國家中，儘管因腹瀉導致死亡的人數相當低，腹瀉性疾病仍是主要罹病的原因，也造成醫療照護方面相當龐大的支出。過去 20 年來，

腹瀉疾病的罹病率依然相當穩定[5]。依據美國 2011 年統計資料，每年平均有 940 例食媒性疾病，造成 55,961 例住院與 1,351 例死亡，其中 58% 的疾病由諾羅病毒引起，其次是非傷寒之沙門氏菌(11%)、產氣莢膜桿菌(10%)、曲狀桿菌(9%)。因引發腸胃道症狀導致住院的致病原中以非傷寒之沙門氏菌最多(占 35%)，其次依序是諾羅病毒(26%)、曲狀桿菌 (15%)與弓漿蟲(*Toxoplasma gondii*，8%)。因腸胃道感染導致死亡的致病原中以非傷寒之沙門氏菌最多(占 28%)，其次是弓漿蟲(24%)、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*，19%)與諾羅病毒(11%)[6]。依據疾病管制署 2012 年的流行病學分析，因諾羅病毒造成之腹瀉群聚事件占所有通報腹瀉群聚事件約 1/2，細菌病原造成的腹瀉群聚事件接近 10%，引起的病原包括金黃色葡萄球菌、弧菌、傷寒桿菌與志賀氏桿菌。此外，星狀病毒占 5.9%、輪狀病毒占 3.3%、沙波病毒占 2.9%、腺病毒占 2.6%，混合感染占 8.6%，未知病原占 17.2%[7]。2011 年至 2015 疾病管制署傳染性統計資料如表 1，除了腸道出血性大腸桿菌感染症無病例以外，桿菌性痢疾病例數最多，占 57.9%，桿菌性痢疾占 1/3。食品藥物管理署近 5 年食品中毒事件的統計數據如表 2，在已判定病因的案件中，細菌性病原所佔比例最高，包括腸炎弧菌、金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌、沙門氏桿菌、霍亂弧菌、肉毒桿菌與志賀氏桿菌。病毒性病原引發的案件占感染性病原中的 20.6%，但患者數最多，為 31.6%，輪狀病毒僅 2015 年出現 3 案。病因物質不明的案件高達 1538 案，出現兩種以上感染原的案件累計 62 件。

比對台灣與美國的流行情形，諾羅病毒均是腹瀉事件的主要原因，但部分病原包括弓漿蟲、李斯特菌與曲狀桿菌，在台灣未顯示相關資料，推測可能無病例或相關單位(包括醫院、疾病管制署、食品藥物管理署)尚未針

對該些項目列入常規檢驗或統計。此外，在疾病管制署與食品藥物管理署的分析結果中，未知病原與病因物質不明的案件也有相當的比例，同一案件中有兩種以上病原的案例亦為數不少，推測若能將常規檢驗項目納入更多腹瀉性病原，可能發現更多的致病原因，降低未知病原的案件，也較可能診斷多重致病原存在的情形，使腹瀉性病原或食物中毒的調查更完整。

表 1、2011-2015 年台灣腹瀉性法定傳染病統計

2011-2015年腹瀉性法定傳染病確定病例數											
	2011		2012		2013		2014		2015		總計
	本土	境外									
霍亂	2	1	5	0	7	0	4	0	9	1	29
傷寒	42	7	15	11	6	13	6	19	15	14	148
副傷寒	1	5	1	7	7	2	0	8	2	1	34
桿菌性痢疾	64	139	49	106	24	131	15	117	81	105	831
阿米巴性痢疾	120	135	86	172	88	183	103	197	155	196	1435
腸道出血性大腸桿菌感染症	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
總計	229	287	156	296	132	329	128	341	262	317	2477

表 2、2011-2015 年台灣感染性病原引起食物中毒案件統計

2011-2015年台灣地區感染性病原引起食物中毒案件之病因分類統計												
	2011		2012		2013		2014		2015		總計	
	案件數	患者數										
腸炎弧菌	52	596	32	210	37	173	66	565	16	177	203	1721
沙門氏桿菌	11	67	16	145	21	229	32	649	16	294	96	1384
病原性大腸桿菌	16	199	5	51	9	210	7	183	4	49	41	692
金黃色葡萄球菌	27	1048	33	580	31	424	36	356	27	369	154	2777
仙人掌桿菌	36	165	23	722	14	1032	20	615	9	834	102	3368
肉毒桿菌	3	3	0	0	1	1	0	0	2	2	6	6
霍亂弧菌	1	61	2	73	3	48	4	60	2	4	12	246
志賀氏桿菌	0	0	0	0	1	5	0	0	1	12	2	17
諾羅病毒	26	1656	37	1043	17	152	17	218	64	1653	161	4722
輪狀病毒	0	0	0	0	0	0	0	0	3	31	3	31
總計	172	3795	148	2824	134	2274	182	2646	144	3425	780	14964
病因物質不明(未檢出)合計	255	2164	364	2848	247	1567	269	1664	403	2729	1538	10972
2種(含)以上病原引起案件的案件	24	1196	8	289	6	213	11	124	13	294	62	2116

急性腹瀉的高危險群是 5 歲以下兒童，依據 2009-2011 年疾病管制署統

計 2000~2009 年間急性腸胃炎就醫人數與醫療成本，發現平均每年就醫人次介於 87 萬至 123 萬人次，病程醫療成本每年平均 8-11 億，且有逐年上升情形。無論在未開發或已開發國家中，提供快速的診斷方法，對於降低疾病負擔、減少社會經濟衝擊與提升健康照護的品質是相當必要的。

由於造成腹瀉症狀的病原種類繁多，包括多種細菌、病毒與寄生蟲等，因此早期鑑定腹瀉性病原對臨床實驗室仍是一種挑戰。糞便培養對疑似細菌感染是主要的診斷方法，引發腸胃道腹瀉症狀的病原種類繁多，因此選擇性培養基的使用、後續細菌染色、細菌型態鑑定、生化特性鑑定與血清學試驗常需納入，以進一步鑑定與確認這些疑似的分離菌，一般而言，以糞便培養為基礎的鑑定方法耗時、人力、耗費成本高但靈敏度低[8]。大部分造成感染性腸胃炎的病毒(如諾羅病毒、輪狀病毒等)不易或甚至無法培養，常用的方法包括電子顯微鏡檢查、免疫分析，這些方法需要特別的專業技術，耗人力、仰賴專業而主觀的判讀。寄生蟲與蟲卵檢驗大多仰賴顯微鏡檢查，需要訓練良好的技術人員製備檢體與執行鏡檢工作，型態的鑑別與判讀也相當主觀，不同的種別的寄生蟲經常不易從型態上區別[9]。分子診斷技術的靈敏度高、可提供較一致的篩檢方法、縮短操作時間，是近年來被臨床實驗室廣為使用的檢驗方法。對於同一位病人，不同醫師提出的檢驗項目經常有差異，試驗結果是影響治療方式(如抗生素的選用)的主要原因，因此試驗不一致亦導致採取的治療內容不一致[10]。如能使用一項以症狀為主的多重致病原偵測平台，即可提供快速與準確的鑑定結果，有助臨床醫師選擇適當的藥物與避免藥物的不當濫用的問題。

依據 Liu 等學者發表的文獻[11]，利用 1500 個臨床檢體評估 3 種多重致病原核酸偵檢平台(包括 PCR-Luminex assay, multiplex real-time PCR,

TaqMan array)，並與實驗室傳統方法(包括細菌培養、ELISA 與 PCR)分析比較，發現以多重致病原核酸偵檢平台進行分析，平均每檢體耗費美金 25~60 元，若使用 7 種 ELISA、3 種培養基與不同生化試劑以檢測不同腸胃道病原，總試劑成本要 200 元美金。除了省下總試劑成本，若以症狀為導向的多重致病原核酸偵檢平台檢測 100 個檢體，操作時間僅需要數小時或數天，相同的檢體量以傳統方法進行檢測將需要數周的時間。**多重偵檢平台的使用，有助於快速診斷病原，大大降低試驗的時間與成本。**

本實驗室在 2013 年以懸浮微球陣列為基礎，搭配多重聚合酶連鎖反應與外切酶反應的獨特設計，與流式細胞儀的高效能微流體系統分析，成功開發針對細菌性生物戰劑的多重高傳染性致病原偵檢平台[12]，其優點：(1) 應用彈性大、成本較微陣列技術(DNA microarray)低；(2) 反應快速，核酸萃取後反應 5-6 小時可得到結果；(3) 可同時分析多種致病原，節省時間、人力與檢體用量；(4) 隨時可修改分析項目內容，避免不必要之試劑浪費；(5) 螢光偵測靈敏度高；(6) 配合軟體計算可提供定量結果；(7) 以 96 孔盤型式進行測定，達到高通量分析目的；(8) 可區別多重感染等。本計畫中，將以該項設計理念為基礎，應用於開發腹瀉性病原之多重偵檢平台，提供一套針對國內重要腹瀉傳染病病原快速且準確之診斷工具，達到即時檢驗之目標，有助於提供疾管署對於疾病流行群聚之監測與即時反應量能之提升，並了解國內腹瀉性疾病的流行狀況與疾病負擔。

二、 材料與方法

1. 參考菌株

Salmonella typhi ATCC167, *Salmonella paratyphi* A (CDC, sal-1), *Shigella boydii* ATCC 9207, *Shigella dysenteriae* ATCC 11835, *Shigella flexneri* ATCC11836, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC29552 (EPEC), *Escherichia coli* ATCC43890 (EHEC), *Escherichia coli* ATCC23515 (ETEC), *Escherichia coli* ATCC35401 (ETEC), *Vibrio cholerae* ATCC9458, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *Clostridium difficile* ATCC 9689, *Clostridium perfringens* ATCC 3626, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Campylobacter jejuni* ATCC 01919.

2. 細菌培養

所有參考菌株除了 *Vibrio cholerae* 與 *Vibrio parahaemolyticus* 以 TCBS 培養基於 35-37°C 培養 20-24 小時；*Clostridium difficile* 與 *Clostridium perfringens* 以 YAM 培養基於 35-37°C 厭氧環境培養 24-48 小時；*Campylobacter jejuni* 以 Campy CVA 或 mCCDA (Modified Campylobacter blood-free agar) 培養基於 37-42°C 微需氧環境(85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) 培養 24-48 小時；其餘菌株皆以 BHIA 培養於 35-37°C 培養 20-24 小時。

3. 核酸萃取

(1) 菌株之核酸萃取

由培養基上挑取數個菌落懸浮於 1.0 ml 無菌 PBS 中，轉移至 Precellys® Lysing Kits CK01 2 ml (Bertin Technologies) 中，以 Bertin precellys 24 lysis and homogenization 震盪 5000rpm，5 分鐘，於室溫靜置 10 分鐘後，離心 14000rpm，2 分鐘，吸取上清液，取 100 µl 以 MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche) 進行核酸萃取。

(2) 糞便檢體核酸萃取

取大約 0.1 g 之糞便檢體至無菌微量離心管中，加入 10 倍於糞便檢體重量之無菌生理食鹽水(相當於 1:10 稀釋)，震盪 1 分鐘，將懸浮液轉移入一管 Precellys® Lysing Kits 2 ml SK38 (Bertin Technologies) 中，以 Bertin precellys 24 lysis and homogenization 震盪 5000rpm，5 分鐘，於室溫靜置 10 分鐘後，離心 14000rpm，2 分鐘，吸取上清液，取出 200 µl 以 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) 進行核酸萃取。

(3) 拭子檢體核酸萃取

將拭子浸入 15ml 無菌離心管內之 1.5 ml 之無菌生理食鹽水中，高速震盪 1 分鐘後，將拭子上多餘液體壓出後取出，取 1.2 ml 懸浮液加入一管 Precellys® Lysing Kits 2 ml SK38 (Bertin Technologies) 中，以 Bertin precellys 24 lysis and homogenization 震盪 5000rpm，5 分鐘，於室溫靜置 10 分鐘後，離心 14000rpm，2 分鐘，吸取上清液，取出 1 ml 以 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit-Large Volume (Roche) 進行核酸萃取。

所有核酸萃取物應立即進行後續多重腹瀉性病原核酸偵檢平台之測試，若不立刻測試，先保存於-20°C。

4. 核酸定量

(1) PicoGreen dsDNA Assay

以 PicoGreen dsDNA Assay 搭配 Qubit® 2.0 Fluorometer 分析 DNA 濃度。首先製備 1:200 之 Dye Working Solution，針對 2 種標準液(Standard 1 & 2) 之配製，取用 190 μ l Dye Working Solution 於 0.5 ml 專用微量離心管(不含螢光劑)，加上 10 μ l 核酸標準液；每一測試檢體取用 199~190 μ l Dye Working Solution 於 0.5 ml 專用微量離心管，加上 1~10 μ l 核酸萃取液，使最終體積為 200 μ l。利用震盪器混合均勻，室溫靜置 2 分鐘後，以 Qubit® 2.0 Fluorometer 測定螢光值，讀取該儀器自動計算之 DNA 濃度。

(2) Nanodrop Spectrophotometer

利用 Nanodrop Spectrophotometer (TECAN Infinite® M200 PRO，Switzerland)測定 A260 與 A280 之 optical density (O.D.)，以計算核酸濃度和評估核酸品質。

5. 探針微球製備

(1) 試劑與材料

- 1.1. Capture Probe: 5' C12- amino modified capture oligonucleotide。
- 1.2. 1.5 ml 微量離心管
- 1.3. EDC 分裝 10~30 mg/tube，利用 parafilm 封口，保存在-20°C，使用前 1 小時先放乾燥箱回溫，每次反應需要兩管。
- 1.4. 血球計數盤
- 1.5. 0.1M MES
- 1.6. Tween-20

- 1.7. 10% SDS
- 1.8. Tris-EDTA buffer (TE), pH 8.0, 100X
- 1.9. Streptavidin-R-phycoerythrin, (SA-PE), 1 mg/ml

(2) 注意事項

- 2.1. amino coupled probe 不能以 TE 進行回溶，必須使用分生等級的純水。
- 2.2. EDC 容易吸收空氣中水氣，故低溫時不可打開瓶子，分裝後管口用 parafilm 封住，回溫時最好放在乾燥箱中。
- 2.3. Coupling 的反應相當快，加入 EDC 時一定要立刻震盪離心管。
- 2.4. 反應過程中，盡量避光，可使用錫箔紙包住反應管。
- 2.5. 盡量使用 fine-tipped transfer pipette 或 gel-loading micropipette tip 吸除上清液，避免吸到微球。

(3) 步驟

- 3.1. 從-20°C 冰箱取兩管 10 mg EDC 至乾燥箱中回溫 30-60 分鐘。
- 3.2. 以 H₂O 將 amino-coupled probe (capture probe) 配製最終濃度為 0.1 mM。
- 3.3. 選出欲使用之 MagPlex COOH beads 微球震盪(speed 6-7) 30 秒，再以超音波震盪 30 秒。(務必使微球呈現單一懸浮顆粒，若仍出現聚集物，再以超音波震盪 30 秒，直到看不到 aggregates 為止)

Bead Volume	Reactions
100 μ L	~200
200 μ L	~400
400 μ L	~800

1 ml	~2000
5 ml	~10000
10 ml	~20000

- 3.4. 取出 2.5×10^6 微球 (200 μ l)到一管 1.5 ml 螺旋蓋離心管中，將離心管放於磁架上，一分鐘後小心吸除液體部分。
- 3.5. 將離心管移出磁鐵反應架，將微球懸浮在 25 μ l 的 0.1 M MES pH 4.5 (coupling buffer)中，以 power 3 的強度震盪均勻 (vortex 及超音波震盪 30 秒)。
- 3.6. 加入 2 μ l 之 0.1 mM capture probe，以 power 3 的強度震盪均勻，以微量吸管將所有液體混合並加到管底。
- 3.7. 新鮮配製 10 mg/ml EDC (以 H₂O 溶解)。
- 3.8. 一次加入 1 μ l 的 10 mg/ml EDC 至一個反應管中，立刻震盪均勻，待所有反應管均加入 EDC 後，再各震盪 20 秒。
- 3.9. 室溫避光靜置 30 分鐘。
- 3.10. 新鮮配製第二管 10 mg/ml EDC (以 H₂O 溶解)。
- 3.11. 一次加入 1 μ l 的 10 mg/ml EDC 至一個反應管中，立刻震盪均勻，待所有反應管均加入 EDC 後，再各震盪 20 秒。
- 3.12. 室溫避光靜置 30 分鐘。
- 3.13. 各離心管加入 500 μ l 的 0.02% Tween-20，短暫震盪。
- 3.14. 將離心管放於磁架上，至少一分鐘(或待液體澄清)後小心吸除液體部分。
- 3.15. 將離心管移出磁鐵反應架，將微球懸浮在 500 μ l 的 0.1% SDS 中，震盪均勻 20 秒。

- 3.16. 將離心管放於磁架上，至少一分鐘(或待液體澄清)後小心吸除液體部分。
- 3.17. 將離心管移出磁鐵反應架，將微球懸浮在 60 μ l 的 TE, pH8.0 中，震盪均勻 30 秒及超音波震盪 30 秒。
- 3.18. 取 1 μ l 微球懸浮液加入 99 μ l H₂O 稀釋 100 倍，取 10 μ l 利用血球計數盤計數微球數目，以算出微球濃度。
- 3.19. 將微球吸到新的離心管中，超音波震盪 30 秒 (避光保存)。

6. 多重聚合酶連鎖反應

(1) 反轉錄反應

取 0.2 ml 微量管或 8 連排或 96 孔盤，各管(或孔)依以下內容配製混合液：

核酸萃取液.....	4 μ l
10 倍專一引子混合液.....	2.5 μ l
10 倍特定引子對.....	2.5 μ l
10 倍內部控制寡核酸.....	1.25 μ l
2 倍聚合酶酵素反應混合液 (SuperScript One-Step reaction mix)	12.5 μ l
無菌去離子水.....	2.25 μ l
總體積.....	25 μ l

混合液配製完成後，依以下條件進行 PCR 反應：

53°C	20 min	1 cycle
95°C	10 min	1 cycle

95°C	30 sec	} 25 cycles (1 st step PCR)
65°C	60 sec	
72°C	30 sec	
95°C	30 sec	} 35 cycles (2 nd step PCR)
50°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	1 cycle
12°C	forever	

(2) 多重聚合酶連鎖反應

取 0.2 ml 微量管或 8 連排或 96 孔盤，各管(或孔)依以下內容配製混合液：

Conc.	Name	Vol. (μl)
	DNA template	4
10X	Multiplexed primers	2.5
10X	Unique forward primer	0.25
10X	Biotin-4S-Unique reverse primer	0.25
10X	Internal control oligo	1.25
10X	AmpliTaq Gold Buffer	2.5
10mM	dNTP	0.5
25 mM	MgCl ₂	2.5
5U/μl	AmpliTaq Gold DNA Polymerase	0.125
	H ₂ O	11.125
Total		25

使用 ABI 9700 (9600 升溫模式)進行 PCR 反應。

PCR 反應程式:

95°C	10 min		1 cycle
95°C	30 sec	}	25 cycles (1 st step PCR)
65°C	60 sec		
72°C	30 sec		
95°C	30 sec	}	35 cycles (2 nd step PCR)
50°C	30 sec		
72°C	30 sec		
72°C	7 min		1 cycle
12 °C	forever		

7. T7 核酸外切酶(T7 exonuclease)反應

取 0.2 ml 微量管或 8 連排或 96 孔盤，各管(或孔)依以下內容配製混合液:

Concentration	Name	Vol. (μl)
	PCR product	18
10X	NEBuffer 4	3.6
10U/μl	T7 Exonuclease (NEB 0020906)	2.1
	H ₂ O	12.3
Total		36

外切酶反應程式:

使用 ABI 9700 (9600 升溫模式)進行外切酶反應。

25°C	40 min	1 cycle
4°C	forever	

8. 微球雜合反應與流式細胞儀分析直接雜交反應

(1) 試劑與材料

1.1. 1.5x TMAC hybridization solution (bead diluent)

5 M TMAC (Sigma T3411), 0.15% sarkosyl (Sigma L9150), 75 mM Tris-HCL, pH 8.0 (Sigma T3038), 6 mM EDTA, pH 8.0 (Gibco 15575-038)

1.2. 1x TMAC

將 1.5x TMAC 已無菌水稀釋至 1x。

1.3. 1.5 ml 微量離心管

1.4. 96 孔 PCR 反應盤或八連排反應管。

1.5. PE Streptavidin (BD Pharmingen 554061)

1.6. 96 孔濾膜反應盤 (Millipore MSBVN1210)

1.7. 真空幫浦與抽氣裝置

(2) 步驟

2.1. 使用 ABI PCR 8 連排管反應管或 96 孔 PCR 反應盤。

2.2. 各 well 加入 33 μ l 的 working bead mix 及 17 μ l T7 exo 反應液，混合均勻(微量吸管反覆吸排 5 次)，封蓋。

- 2.3. 於 ABI 9700 PCR thermal cycler 中進行核酸雜合反應 (hybridization program)
- | | |
|-------|---------|
| 95°C | 10 min |
| 50°C | 30 min |
| 50 °C | forever |
- 2.4. 將反應液轉移至 96 well flat-bottom plate 中。
- 2.5. 將 96 孔盤置於磁盤架上(Luminex Magnetic Plate Separator)，靜置至少 1 分鐘。握緊磁盤架與其上之 96 孔盤，以倒轉方式，快速將內部反應液倒乾，以擦手紙將盤孔周圍吸乾(避免回流造成汙染)。
- 2.6. 各孔加入 200 μ l 1xTMAC buffer。
- 2.7. 重複步驟 2.5-2.6，2 次，最後一次將反應液倒乾。
- 2.8. 製備 reporter mix：10 μ g/ml SA-PE in 1 x TMAC，100 μ l/well。
(stock: 0.5 mg/ μ l, BD Pharmingen 554061 PE Streptavidin) (註: 稀釋 200 倍)
- 2.9. 各 well 加 100 μ l 的 reporter mix，用錫箔紙包覆，於震盪器上低速搖盪 5 分鐘。
- 2.10. 重複步驟 2.5-2.6，3 次，最後一次將反應液倒乾。
- 2.11. 各孔加入 75 μ l 1xTMAC buffer，於震盪器上低速搖盪 1 分鐘，再以 Bio-Plex system 進行分析。(high RP1)
- 2.12. 以 Bio-Plex 200 system (Bio-Rad)配合 Bio-Plex Manager 5.0 進行分析，得到每檢體中各組微球螢光值之中位數 (Median Fluorescence Intensity, MFI)結果。

9. 偵測極限之分析

將各標準菌株 DNA 或病毒核酸標準品濃度換算為基因拷貝數(genome equivalents)，經序列稀釋後加入各反應，反應二重複或三重複，以反應後產生的平均螢光訊號值(MFI-bkgd)對照邊界值(cut-off)後可判為陽性之最低基因拷貝數，即為系統可偵測到的偵測極限 (detection of limit)。

10. 資料統計與分析

以多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台對臨床檢體測試之靈敏性(sensitivity)與專一性(specificity)分析，是以先前的細菌培養、免疫凝集反應或毒力基因檢測結果作為依據。

$$\text{sensitivity \%} = \text{TP}/(\text{TP}+\text{FN})$$

$$\text{specificity \%} = \text{TN}/(\text{TN}+\text{FP})$$

TP: True positive ; TN: True negative ; FN: false negative ; FP: false positive 。

三、 結果

106 年規劃完成之工作項目包括：

- (1) 以微流體核酸檢測技術建立可同時偵檢多項腹瀉相關之細菌性病原平台，偵測項目包括 4 項法定傳染病原：沙門氏菌屬(*Salmonella* spp.，含傷寒桿菌與副傷寒桿菌)、志賀氏菌屬(*Shigella* spp.)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、腸道出血性大腸桿菌(EHEC，如 *E. coli* O157:H7)；以及臨床常見腹瀉病原或常見食媒傳播病原，包括：李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、病原性大腸桿菌 (pathogenic *E. coli*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*)、產毒性大腸桿菌(enterotoxigenic *E. coli*)、困難梭狀桿菌(*Clostridium difficile*)、產氣莢膜桿菌 (*Clostridium perfringens*)、曲狀桿菌(*Campylobacter*)中至少 4 項，共計至少 8-10 項。
- (2) 文獻收集，引子、探針序列之設計，探針微球之製備與確效。
- (3) 以標準細菌株或核酸標準品評估多重致病原偵檢平台中各項目之偵測靈敏度與專一性。
- (4) 提供疾管署腹瀉細菌性病原感染之臨床檢體初步檢測評估，並與疾管署偵測結果進行平行比較，預估分析檢體數量 50-100 件。
- (5) 提供 1 份學術研討會報告或論文。

建立多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台，採用本實驗室所建立之方法 SSMP-SBA，全名為 **the assay of single-stranded multiplex polymerase chain reaction amplicons by suspension bead array**[12]。

1. 原理介紹

為建置多重聚合酶連鎖反應，我們針對各致病原所挑選出來之標的基因設計專一引子對 (**specific primer pairs**)，專一引子對分別包含一段正向/反向共同序列(forward/reverse unique tail sequence) 及一段特異序列(specific sequences)，共同序列係本實驗室自行設計之一段隨機序列 (random sequences)，特異序列分別為各致病原標的基因的互補序列(complementary sequences)。另設計一對**特定引子對(unique primer pair)**，其中正向特異引子(forward unique primer)含有正向共同序列(forward unique tail)，反向特異引子(reverse unique primer)則含有反向共同序列(reverse unique tail)、硫代磷酸鍵結(phosphorothioate linkage)及 5 端生物素(biotin)標定。反應中另包含一外加之內部控制寡核酸(internal control oligonucleotide)，此為一段隨機序列，長度為 80 個鹼基，含有正向共同序列與反向共同序列之互補序列，其餘序列與現有之任何基因無相關性，作為反應之內部陽性對照用(如圖 1A)。

進行多重聚合酶連鎖反應時，所有選定之專一引子對加上特定引子對，混合成多重引子對(multiplex primers)，針對待測核酸進行兩階段 PCR 反應，第一階段之 PCR 目的是利用各專一引子對將標的基因片段初次擴增，並於末端加入正向/反向共同序列；第二階段以特定引子對將初次擴增之產物進行再次擴增，並將反向股(reverse strand) DNA 之 5 端改為硫代磷酸鍵結(phosphorothioate linkage)及生物素(biotin)標定。各反應當中均加入內部控制寡核酸，該內部控制寡核酸經第二階段之 PCR 擴增後，產生一

段 65 bp 之產物，該產物反向股 DNA 之 5' 端亦被改為硫代磷酸鍵結 (phosphorothioate linkage) 及生物素 (biotin) 標定。

將多重聚合酶連鎖反應之產物，取部分進行 T7 核酸外切酶 (exonuclease) 反應，T7 核酸外切酶作用於雙股 DNA，可由 5' 至 3' 方向逐步切除 5' 單核苷酸，由於所有擴增產物之反向股 5' 端均為硫代磷酸鍵結，可保護該股不被外切酶作用而被保留下來，形成多重聚合酶連鎖反應單股產物 (single stranded multiplex PCR amplicons，簡稱 SSMP)，如圖 1B。

為偵測多重聚合酶連鎖反應單股產物，針對每一標的基因片段內選定一小片段序列 (23-24 個寡核酸) 設計為核酸探針 (probe)，該核酸探針與反向股之序列互為反向互補 (reverse complementary)，並於 5' 端標定胺基 (amine)，胺基與寡核酸之間以 12 個 C 作為間隔 (spacer)，各標的基因之探針核酸與特定編號之微球先製成探針微球，製作好的探針微球於冷藏避光可保存 1 年。

T7 外切酶反應產生單股核酸產物 SSMP 與探針微球混合物進行懸浮微球陣列 (suspension bead array) 之雜合反應，單股核酸產物 SSMP 藉由互補序列結合到特定的探針微球上方，微球經由清洗後，加入的螢光報導分子 (Streptavidin-PE) 將與微球上單股核酸產物的生物素結合，反應物經由流式細胞儀分析，即可辨別特定編號微球上的 PE 螢光訊號 (如圖 1B)。

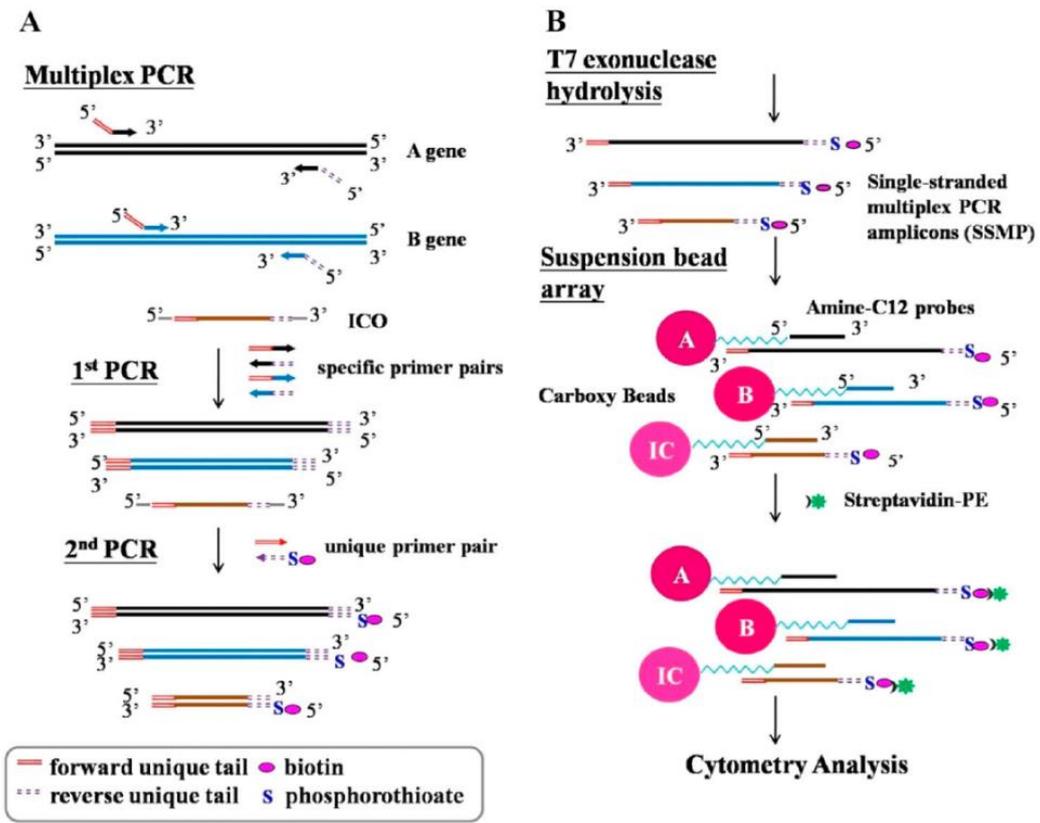


圖 1、SSMP-SBA 設計原理

2. 建立多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台

目前針對委託單位之需求建置多重腹瀉病原偵檢平台之引子共有兩種組合：組合一是以文獻[12]為基礎選定標的基因，組合二是以文獻[12]以及疾病管制署委託單位目前參考之文獻[13][14]為基礎，選定標的基因。

[組合一之平台測試]

(1) 多重聚合酶連鎖反應之建立(組合一)

組合一平台內針對 7 種致病原(包括沙門氏菌屬(*Salmonella* spp.，含傷寒桿菌與副傷寒桿菌)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、志賀氏菌屬(*Shigella*)、志賀毒性大腸桿菌(Shiga-like Toxin producing *E.coli* (STEC))、產毒性大腸桿菌(enterotoxigenic *E.coli*, ETEC)、困難梭狀桿菌(*Clostridium difficile*)、單核細胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)與金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))設計專用引子對，各專一引子對需先搭配特定引子對進行二重聚合酶連鎖反應(duplex PCR)，確認各致病原參考菌株核酸經擴增後產生與預期相符之產物，該專一引子對才會納入多重聚合酶連鎖反應中，加入共同引子成為**混合引子組合一**(表 3)。

為確認混合引子於多重聚合酶連鎖反應之可行性，先以至少一種參考菌株之核酸標準品(相當於 10^5 genome equivalence)作為陽性對照組，反應中另行加入內部控制寡核酸(internal control oligonucleotide)作為各反應之內部對照組。**混合引子組合一**之多重聚合酶連鎖反應的產物經由洋菜膠電泳分析結果顯示如圖 2，7 種呼吸道致病原(共 10 種參考菌株，其中志賀氏菌屬有 4 株)之陽性對照組均出現與預期大小接近之條帶，並出現

內部控制寡核酸擴增的產物大小約 65 bp。以無菌蒸餾水、非相關菌株 *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405 與健康人血液 DNA 反應僅得到內部控制寡核酸所產生的產物，且無非專一性產物。

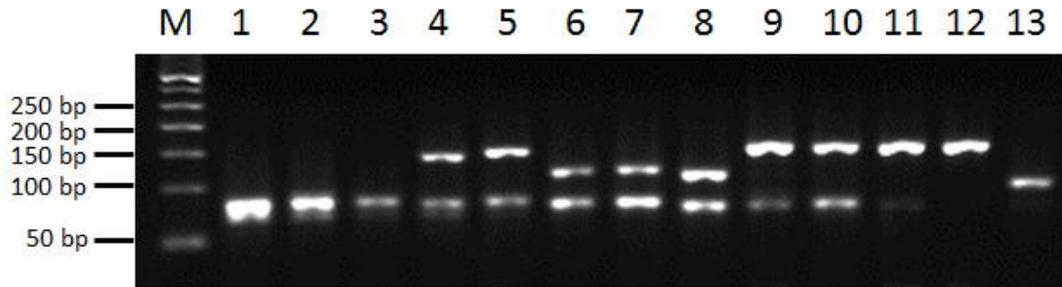


圖 2、多重聚合酶連鎖反應電泳結果(混合引子組合一)

圖 2 說明：以陰性對照組與 7 種腹瀉性致病原之陽性對照組各別進行多重聚合酶連鎖反應後，取 5 μ l 之產物進行洋菜膠電泳反應。(M: DNA ladder；1: 無菌蒸餾水；2: Cam (*Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405)；3: 健康人血液 DNA；4: Lmo；5: Cdi；6: Sau；7: Eco；8: Vch；9: Shi 1；10: Shi 2；11: Shi 3；12: Shi 4；13: Sal。(lane 4~13 為陽性對照組，參考菌株之全名參考表 3)

表 3、7 種腹瀉性致病原引子組合(組合一)

編號	病原名稱	標的基因	引子名稱	引子序列(5'-->3')	擴增產物 大小 (bp)	參考序列 accession No.	參考菌株 Reference strains	參考文獻 References							
1	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>ttrC, ttrA</i>	UF-Sal-ttrC,	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCCC	103	AY578070	Sal 1: <i>Salmonella</i> <i>typhi</i> ATCC 167	[12]							
			ttrA-F (1321-1305)	ACCGACGGCGAGACC											
			UR-Sal-ttrC,	<u>CACCTCGACCC</u> ACTCACACC											
			ttrA-R (1252-1277)	AGGAGATTACAACATGGCTA AT											
2	霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	<i>recA</i>	UF-Vch-recA-F 1 (602-627)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCTG AAATTCTACGCTTCTGTTCGT TTG	116	EU085357	Vch: <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> ATCC 9458	[12]							
			UR-Vch-recA-R 1 (684-661)	<u>CACCTCGACCC</u> ACTCAGGTT TCGTTACCCACCACTTCTTC											
			3	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i>)					<i>ipaH1.4</i>	UF-Shi-F1-n1 (1076-1094)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCCTG TTGCTGCTGATGCCAC	160	AY206449	Shi 1: <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> ATCC 11835;	[12]

			UR-Shi-R-n1 (1202-1182)	<u>CACCTCGACCCACTCAGAGA</u> GCAGAGCGCCGGTATCATT			Shi 2: <i>Shigella boydii</i> ATCC 9207 Shi 3: <i>Shigella flexneri</i> ATCC 11836 Shi 4: <i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	
4	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>rfb</i>	UF-Eco-rfb-F-1 (604-627)	<u>CCATCCAGATTCACTCCTTC</u> CATAATCGGTTGGTGTGCTAA	122	CP001368	EHEC: <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC43895	[12]
			UR-Eco-rfb-R-1 (668-692)	<u>CACCTCGACCCACTCAATGC</u> TGCCCACAAAAATAATGTAA A				
5	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	UF-Sau-femB-F (1093-1115)	<u>CCATCCAGATTCACTCCAA</u> GTAAGTGCACAACACCCTGA A	118	CP020020 HF937103	Sau: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 8095	[13] modified
			UR-Sau-femB-R (1177-1153)	<u>CACCTCGACCCACTCAAGAA</u> ACAAAGAAATTAAGTGGATG G				

6	單核细胞增生性李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>iap</i>	UF-Lmo-iap-F (542-562)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCCTA CACCTGCGCCTAAAGTA	140	JF967603	Lmo: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 984	[15] modified
			UR-Lmo-iap-R (648-627)	<u>CACCTCGACCC</u> ACTCATACG GATAAAGCCCAAATAGTG				
7	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	UF-Cdi-tcdB-F-n1 (3153-3176)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCGA GTGACCCATTATTAAGACAA GA	148	KC292190	Cdi: <i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	[16] modified
			UR-Cdi-tcdB-R-n1 (3267-3246)	<u>CACCTCGACCC</u> ACTCAAAT CCACTAGCTATCCCCAAA				
8	Unique primer pair		UF (forward unique primer)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCC				[12]
			UR (reverse unique primer)	Biotin- <u>C*A*C*C</u> *TCGACCCAC <u>TCA</u> (*: phosphorothioate linkage)				
			ICO (Internal control oligonucleotide)	ATTTCTAA <u>CCATCCAGATTC</u> <u>ACTCCT</u> GCCATGGCATCGCA TCTAGCGTCCATACGTGT <u>GAG</u> <u>TGGGT</u> CGAGGTGGTCATAT				

(2) 多重懸浮微球陣列反應與分析(組合一)

為偵測多重聚合酶連鎖反應產物，設計 7 組探針微球(7 種標的基因之探針微球)，第 8 組為偵測內部對照寡核酸擴增產物之內部控制組微球，內容如表 4。

表 4、8 種探針微球混合物內容 (組合一)

No.	Bacteria	Target gene	Bead name	Probe sequences (5'→3')	參考文獻 References
1	單核細胞增生性 李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>iap</i>	Lmo-iap-probe 588-611	GATCAAAATGCT ACTACACACGC	[17] modified
2	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	Cdi-tcdB- n1 (3229-3251)	GCAATCATTACT TCATCTTTGGG	[18] modified
3	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	Sau-femB (1116-1137)	CTTCACCGTCAC GACCTACAGC	[19] modified
4	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>rfb</i>	Eco-rfb (636-656)	TAAATACACGAC GAACCGAGGA	[12]
5	霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	<i>recA</i>	Vch-recA (642-660)	TGGCGCAATCA AAGAAGGC	[12]
6	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	<i>ipaH1.4</i>	Shi-ipaH1.4-n1 1095-1116	TGAGAGCTGTG AGGACCGTGTC	[12] modified
7	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>ttrC, ttrA</i>	Sal-ttrC, ttrA (1300-1282)	TTTAGCCACTGA CGACGGG	[12]
8	ICO (Internal control oligonucleotide)		IC-probe (internal control probe)	TCGCATCTAGCG TCCATACG	

擴增產物經 T7 核酸外切酶作用後，單股核酸產物再與組合一之 8 種探針微球進行雜合反應，反應物與 Streptavidin-PE 作用，經由流式細胞儀分析，結果如表 5 與表 6。

表 5、以陽性對照組進行多重懸浮微球陣列反應之原始數值 (組合一)

Template \ Bead	Lmo-iap (588-611)	Cdi-tcdB-n1 (3229-3251)	Sau-femB (1116-1137)	Eco-rfb (636-656)	Vch-recA (642-660)	Shi-ipaH1.4-n 1 (1096-1116)	Sal-ttrC, ttrA (1300-1282)	IC-probe
Blank	3145.3	39.3	169.8	61	36	25	124.8	140.5
NTC	3261.5	164.5	512.3	236	134.5	159	271	27379
健康人血液核酸	3247.8	183.3	653	209.3	134	229	251.8	28702
Lmn	23223.5	152	548.8	204.5	125.3	157	282.3	29254.5
Cdi	3330.5	19465.8	312.5	211.3	132.3	185.5	253	29327
Sau	3430.8	159	26010.5	474	123.8	151	228.5	29432
EHEC	3301	152	305.5	18096.5	348.3	287.5	1157.5	30254.3
Vch	3231.5	133	299.5	237	18224.5	137.5	457.5	29869.3
Shi 1	3238	146.3	290.5	150	112	11882.3	285	30822.8
Shi 2	3344	126	342.5	163	98	7953	277.5	31720.5
Shi 3	3299.5	142.5	417	164.8	120.8	12120.3	273.8	30955.3
Shi 4	3250.3	132	291	156	94.8	12397.5	292	17581.3
Sal	3206.8	110.3	321	737.8	102	129	24751.3	30643.3

單位: MFI

(20170623)

表 6、以陽性對照組進行多重懸浮微球陣列反應之分析結果 (組合一)

Bead \ Template	Lmo-iap (588-611)	Cdi-tcdB-n1 (3229-3251)	Sau-femB (1116-1137)	Eco-rfb (636-656)	Vch-recA (642-660)	Shi-ipaH1.4-n1 (1096-1116)	Sal-ttrC, ttrA (1300-1282)
健康人血液核酸	0	18.8	140.8	0	0	70	0
Lmn	19962	0	36.5	0	0	0	11.3
Cdi	69	19282.5	0	0	0	26.5	0
Sau	169.3	0	25498.3	238	0	0	0
EHEC	39.5	0	0	17860.5	213.8	128.5	886.5
Vch	0	0	0	1	18090	0	186.5
Shi 1	0	0	0	0	0	11723.3	14
Shi boydii	82.5	0	0	0	0	7794	6.5
Shi flexneri	38	0	0	0	0	11961.3	2.8
Shi sonnei	0	0	0	0	0	12238.5	21
Sal	0	0	0	501.8	0	0	24480.3
Cut-off	260.4	25.7	196.7	745.5	291.8	231.4	1223.7

單位: MFI-bkgd

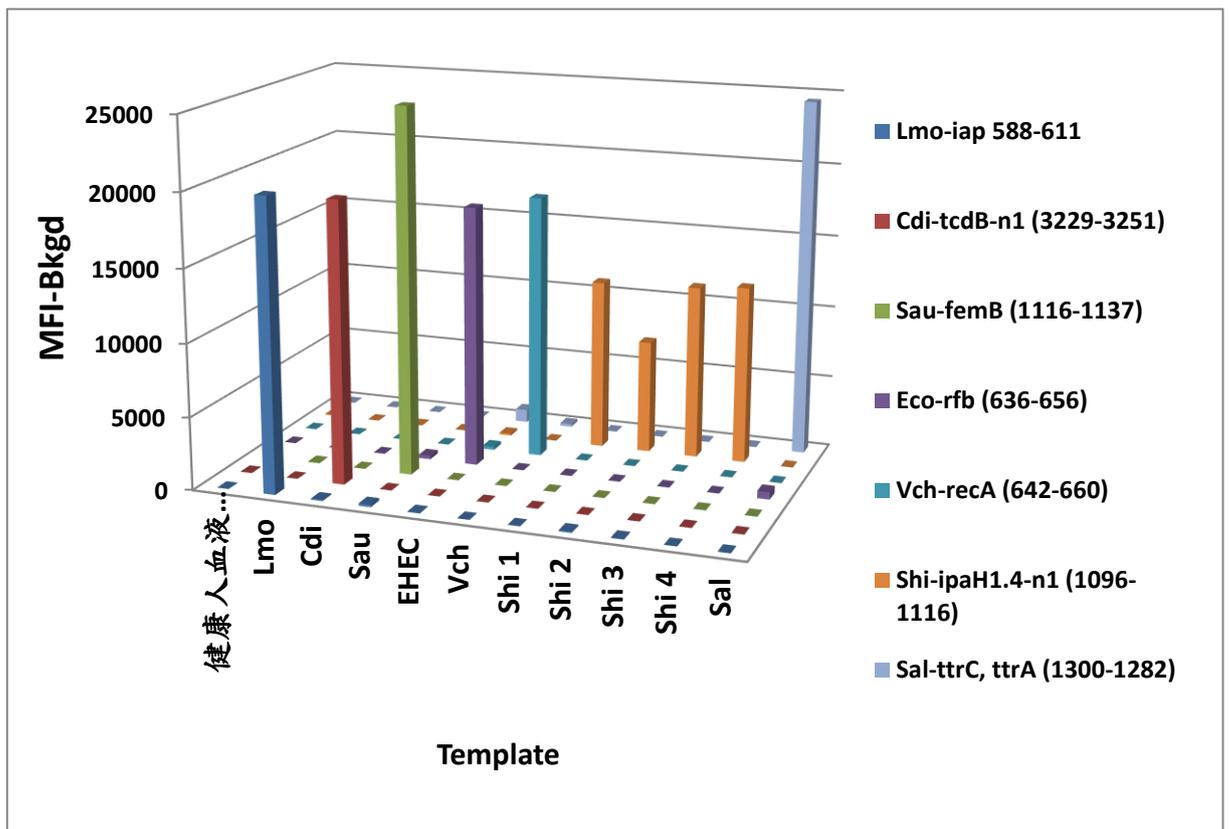


圖 3、多重懸浮微球陣列分析結果 (測試一)

表 5 與表 6 中各縱列代表檢體名稱，各橫欄代表各探針微球之項目。以無菌水反應(non-template control，簡稱 NTC)建立該次分析之背景值(background，簡稱 bkgd)，未與任何核酸產物作用之探針微球作為空白對照組(blank)，此實驗中以健康人血核酸反應作為陰性對照組(當時尚無陰性糞便檢體，故以全血核酸取代)，灰色格子表示陽性對照組預期可與相對應微球探針產生反應之結果，各數值為二重複反應之平均值。表 5 中的數值為 Bio-Plex 200 系統分析所得之原始螢光值 (Median Fluorescence Intensity, MFI; 為 100 顆微球螢光訊號之中位數值)，首先確認 NTC 與所有檢體的內部對照探針微球(IC-probe)反應之螢光值均大於空白對照組之訊號，顯示各反應均為有效結果。其次，將各檢體所有原始螢光值扣除 NTC 的螢光值，

即為 MFI-bkgd 值 (所有負值以 0 表示)，產生表 6 之結果，該表中各探針微球之邊界值(cut-off value)，是將所有 NTC、陰性對照組與非陽性反應 MFI-bkgd 值平均後加 4 倍標準差(SD)，凡**檢體之 MFI-bkgd 值大於邊界值者，該檢測項目判為陽性(標紅字)**，否則判為未測得(undetectable)。此為初步測試，邊界值乃利用該表之結果計算，用於實際檢體檢測前，應收集較多陰性對照組與非陽性反應之結果後計算，且搭配實際臨床檢體測試後修正，方可獲得較客觀之邊界值。表 6 與圖 3 結果顯示所有陽性對照組僅與相對應之探針微球作用，產生較強的螢光訊號，其餘探針微球的螢光訊號相對較低，凸顯平台絕佳的專一性。

(3) 多重腹瀉性病原核酸偵測平台(組合一)之偵測極限分析

為分析 SSMP-SBA 針對各致病原之偵測極限，我們將各陽性對照組之基因體核酸(genomic DNA)進行序列稀釋，使最終各反應加入之 DNA 量相當於 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、50、25、10、5、2、1 基因組套數(genome equivalents，簡稱 GE)，將可呈現陽性反應之最低基因組套數，判為該分析項目的偵測極限值(limit of detection，簡稱 LOD)，

顯示利用組合一的平台偵測 7 種病原的偵測極限值為 5~1000 GE。

表 7、多重腹瀉性病原核酸偵測平台之偵測極限分析(組合一)

No.	Bacteria	Target gene	SSMP-SBA	LOD (GE)
1	單核細胞增生性李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>iap</i>	UF-Lmo-iap-F (542-562) UR-Lmo-iap-R (648-627) Lmo-iap-probe 588-611	100
2	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	UF-Cdi-tcdB-F-n1 (3153-3176) UR-Cdi-tcdB-R-n1 (3267-3246) Cdi-tcdB- n1 (3229-3251)	100
3	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	UF-Sau-femB-F (1093-1115) UR-Sau-femB-R (1177-1153) Sau-femB (1116-1137)	10
4	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>rfb</i>	UF-Eco-rfb-F-1 (604-627) UR-Eco-rfb-R-1 (668-692) Eco-rfb (636-656)	100
5	霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	<i>recA</i>	UF-Vch-recA-F1 (602-627) UR-Vch-recA-R1 (684-661) Vch-recA (642-660)	100
6	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	<i>ipaH1.4</i>	UF-Shi-F1-n1 (1076-1094) UR-Shi-R-n1 (1202-1182) Shi-ipaH1.4-n1 1095-1116	1000
7	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>ttrC, ttrA</i>	UF-Sal-ttrC, ttrA-F (1321-1305) UR-Sal-ttrC, ttrA-R (1252-1277) Sal-ttrC, ttrA (1300-1282)	5

[組合二之平台測試]

(4) 多重聚合酶連鎖反應之建立(組合二)

針對 9 種腸胃道腹瀉細菌病原(包括沙門氏菌屬(*Salmonella* spp.，含傷寒桿菌與副傷寒桿菌)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、志賀氏菌屬(*Shigella*)、志賀毒性大腸桿菌(Shiga-like Toxin producing *E.coli*, STEC)、曲狀桿菌(*Campylobacter*)、產氣莢膜桿菌 (*Clostridium perfringens*) 困難梭狀桿菌(*Clostridium difficile*)、單核細胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)與金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)各設計 1 對專一引子對(表 8)，加入共同引子成為混合引子組合二。

混合引子組合二之多重聚合酶連鎖反應產物經由洋菜膠電泳分析結果顯示如圖 4，以無菌蒸餾水與陰性糞便檢體核酸反應僅得到內部控制寡核酸的產物，9 種呼吸道致病原之陽性對照組均出現與預期大小接近之條帶，並出現內部控制寡核酸擴增的產物大小約 65 bp，顯示在該反應條件下，所有的致病原核酸均被擴增放大。圖 5 顯示所有多重聚合酶連鎖反應之產物經 T7 核酸外切酶處理後，大部分的雙股 DNA 均已消失，顯示外切酶作用完全。

表 8、多重腹瀉性致病原引子組合(組合二)

編號	病原名稱	標的基因	引子名稱	擴增產物 大小 (bp)	參考序列 Accession No.	參考菌株 Reference strains	參考文獻 References	
1	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>invA</i>	UF-Sal invA-F (305-323) UR-Sal invA-R (381-360)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCTCG GGCAATTCGTTATTGG <u>CACCTCGACCCACTCAGATA</u> AACTGGACCACGGTGACA	110	CP014659	Sal 2: <i>Salmonella</i> <i>paratyphi</i> A (CDC, sal-1, IPM 00962)	[14] modified
2	霍亂弧菌 (<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>)	<i>ompW</i>	UF-Vch ompW-R (675-695) UR-Vch ompW-F (763-741)	CCATCCAGATTCACTCCGCTG GTTCTCAACGCTTC(A)TG CACCTCGACCCACTCAAACA TCCGTGGATTTGGCATCTG	122	X51948	Vch: <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> ATCC 9458	[13] modified
3	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	<i>ipaH1.4</i>	UF-Shi ipaH1.4-F1-n1 (1076-1094) UR-Shi ipaH1.4-R-n1 (1202-1182)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCCTG TTGCTGCTGATGCCAC CACCTCGACCCACTCAGAGA GCAGAGCGCCGGTATCATTA	160	AY206449	Shi: <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> ATCC11835	[12]
4	志賀毒性大腸桿菌 Shiga-like Toxin producing <i>E.coli</i> (STEC)	<i>stx1</i>	UF-STEC Stx1-F (414-437) UR-STEC Stx1-R (545-521)	<u>CCATCCAGATTC</u> ACTCCACT TCTCGACTGCAAAGACGTAT G <u>CACCTCGACCCACTCAACAA</u> ATTATCCCCTGWGCCACTATC	165	AP010953	STEC: <i>Escherichia coli</i> ATCC43890	[14] modified

5	曲狀桿菌 (<i>Campylobacter</i>)	<i>cadF</i>	UF-Cam cadF-F (642-671)	<u>CCATCCAGATTCACTCCCTG</u> CTAAACCATAGAAAATAAAATT TCTCAC	254	CP020045	Cam: <i>Campylobacter</i> WHOC16.1	[14] modified
			UR-Cam cadF-R (862-833)	<u>CACCTCGACCCACTCACTTT</u> GAAGGTAATTTAGATATGGAT AATCG				
6	產氣莢膜桿菌 (<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>)	<i>cpe</i>	UF-Cpe cpe-F (583~604)	<u>CCATCCAGATTCACTCCGG</u> TTCATTAATTGAAACTGGTG	187	X81849	Cpe: <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> cp3-2	[13] modified
			UR-Cpe cpe-R (736-712)	<u>CACCTCGACCCACTCAAACG</u> CCAATCATATAAATTACCAGC				
7	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium</i> <i>difficile</i>)	<i>tcdB</i>	UF-Cdi-tcdB-F-n 1 (3153-3176)	<u>CCATCCAGATTCACTCCGA</u> GTGACCCATTATTAAGACAA GA	148	KC292190	Cdi: <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> ATCC9689	[20]
			UR-Cdi-tcdB-R-n 1 (3267-3246)	<u>CACCTCGACCCACTCAAAAT</u> CCTAGCTATCCCCAAA				
8	單核細胞增生性李 斯特菌 (<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>)	<i>iap</i>	UF-Lmo-iap-F (542-562)	<u>CCATCCAGATTCACTCCCTA</u> CACCTGCGCCTAAAGTA	140	JF967603	Lmo: <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC984	[15] modified

			UR-Lmo-iap-R (648-627)	<u>CACCTCGACCCACTC</u> ATACG GATAAAGCCCAAATAGTG				
9	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	UF-Sau-femB-F (1093-1115)	<u>CCATCCAGATTCACTCCAA</u> GTAAGTGCACAACACCCTGA A	118	CP020020 HF937103	Sau: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC8095	[16] modified
			UR-Sau-femB-R (1177-1153)	<u>CACCTCGACCCACTCAAGAA</u> ACAAAGAAATTAAGTGGATG G				
10	共同引子 Unique primer pair		UF (forward unique primer)	<u>CCATCCAGATTCACTCC</u>				[12]
			UR (reverse unique primer)	Biotin- <u>C*A*C*C*TCGACCCAC</u> <u>TCA</u> (*: phosphorothioate linkage)				
	内部对照寡核酸		ICO (Internal control oligonucleotide)	ATTTCTAA <u>CCATCCAGATTC</u> <u>ACTCCTGCCATGGCATCGCA</u> TCTAGCGTCCATACGT <u>GTGAG</u> <u>TGGGTCGAGGTGGTCATAT</u>				

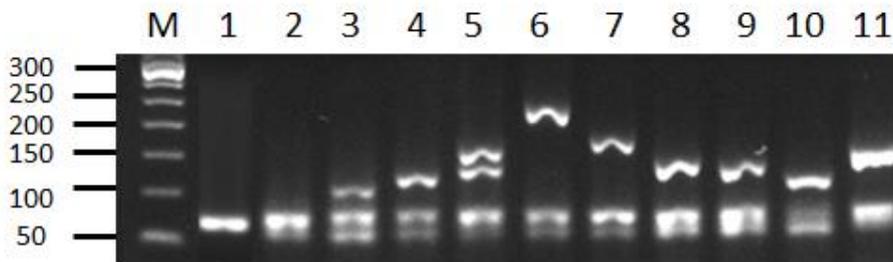


圖 4、多重聚合酶連鎖反應電泳結果(混合引子組合二)

圖 4 說明：

以陰性對照組與 9 種腹瀉性致病原之陽性對照組各別進行多重聚合酶連鎖反應後，取 5 μ l 之產物進行洋菜膠電泳反應。(M: DNA ladder; 1: 無菌蒸餾水; 2: 陰性糞便檢體核酸; 3: Sal 2; 4: Vch; 5: STEC; 6: Cam; 7: Cpe; 8: Cdi; 9: Lmo; 10: Sau; 11: Shi 1。(lane 3~11 為陽性對照組，參考菌株之全名參考表 8)



圖 5、多重聚合酶連鎖反應產物經 T7 核酸外切酶處理後之電泳結果 (混合引子組合二)

圖 5 說明：以陰性對照組與 9 種腹瀉性致病原之陽性對照組各別進行多重聚合酶連鎖反應後，產物經 T7 核酸外切酶處理，再進行洋菜膠電泳反應。(M: DNA ladder; 1: 無菌蒸餾水; 2: 陰性糞便檢體核酸; 3: Sal 2; 4: Vch; 5: STEC; 6: Cam; 7: Cpe; 8: Cdi; 9: Lmo; 10: Sau; 11: Shi 1。)

(5) 多重懸浮微球陣列反應與分析(組合二)

針對混合引子組合二之內容，設計 9 組探針微球，第 10 組為偵測內部對照寡核酸擴增產物之探針，內容如表 9。

表 9、10 種探針微球混合物內容(組合二)

No.	Bacteria	Target gene	Bead name	Probe sequences (5'→3')
1	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>invA</i>	Sal <i>invA</i> -P (336-358)	GGTGGGTTTTGTTGTC TTCTCTA
2	霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	<i>ompW</i>	Vch <i>ompW</i> -P (713-734)	GAAACAACGGCAACC TACAAAG
3	志賀氏菌屬(<i>Shigella</i>)	<i>ipaH1.4</i>	Shi <i>ipaH1.4</i> -P (1095-1116)	TGAGAGCTGTGAGGA CCGTGTC
4	志賀毒性大腸桿菌 Shiga-like Toxin producing <i>E.coli</i> (STEC)	<i>stx1</i>	STEC <i>stx1</i> -P (448-470)	GAATGTCATTCGCTCT GCAATAG
5	曲狀桿菌 (<i>Campylobacter</i>)	<i>cadF</i>	Cam <i>cadF</i> -P (785-807)	AGCCAAAAATCGTCA AAATGATA
6	產氣莢膜桿菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)	<i>cpe</i>	Cpe <i>cpe</i> -P (690-712)	TGATGCATTAAACTCA AATCCAG
7	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	Cdi- <i>tcdB</i> -n (3199-3221)	ATGGCAGTAAATTTAA CAACAGC
8	單核細胞增生性李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>iap</i>	Lmo- <i>iap</i> -P (612-634)	TGTCAAAAGCGGTGA CACTATTT
9	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	Sau- <i>femB</i> (1116-1137)	CTTCACCGTCACGACC TACAGC
10	ICO (Internal control oligonucleotide)		IC-probe (internal control probe)	TCGCATCTAGCGTCCA TACG

將混合引子組合二應用於多重聚合酶連鎖反應，產生的基因擴增產物與組合二之 10 種探針微球 (9 種標的基因之探針微球與 1 組內部控制組微球)進行雜合反應，經由流式細胞儀分析結果如表 10、表 11 與圖 6，顯示所有陽性對照組僅與相對應之探針微球作用，產生較強的螢光訊號，其中參考菌株 **Shi 1** (*Shigella dysenteriae* ATCC 11835) 除了相對應的 ipaH1.4 基因呈現陽性反應外，STEC stx1 亦呈現陽性反應，經查證部分 *Shigella dysenteriae* 菌株確實帶有 stx1 基因[21]，故其陽性反應之出現符合預期，其餘探針微球的螢光訊號相對較低，顯示平台專一性佳。。

表 10、多重懸浮微球陣列反應之原始數值(組合二)

Bead Template	Sal invA-P (336-358)	Vch opmW-P (713-734)	STEC stx1-P (448-470)	Cam cadF-P (785-807)	Cpe cpe -P (690-712)	Cdi-tcdB-n (3199-3221)	Lmo iap-P (612-634)	Sau-FemB-P (1116-1137)	Shi-ipaH1.4-P (1095-1116)	IC-probe
Blank	28	69	121	104	446	52	77	288.5	31	236
NTC	370.3	188.5	151.0	116.0	629.0	192.3	144.3	463	96.0	73912.5
Negative stool	573.0	580.5	429.0	301.0	836.0	366.0	346.0	427	169.0	63946.3
Sal 2	15699.8	194.8	144.5	116.5	558.8	195.8	141.5	373.5	157.0	74726.8
Vch	780.5	30899.3	136.5	106.5	457.5	179.0	153.8	460	128.5	67678.5
STEC	575.0	231.5	13770.5	197.8	423.3	178.0	168.3	442.5	146.5	71769.0
Cam	300.8	145.3	77.3	11888.5	592.8	124.3	1252.8	385.3	99.0	72918.3
Cpe	291.5	444.8	64.0	57.0	19201.0	108.0	90.3	356.8	117.3	68868.3
Cdi	376.8	289.3	98.8	68.0	291.0	12808.8	105.8	402.5	120.0	72745.0
Lmo	235.3	149.3	95.8	430.0	226.0	128.5	33149.5	515.8	125.3	70318.8
Sau	1410.3	533.3	93.8	84.5	254.8	118.8	113.3	33738.8	151.0	72265.5
Shi 1	370.5	127.5	8304.0	72.8	146.3	123.8	74.0	403.0	14787.3	60508.5

單位: MFI

表 11、多重懸浮微球陣列反應之分析結果(組合二)

Bead Template	Sal invA-P (336-358)	Vch opmW-P (713-734)	STEC stx1-P (448-470)	Cam cadF-P (785-807)	Cpe cpe -P (690-712)	Cdi-tcdB-n (3199-3221)	Lmo iap-P (612-634)	Sau-FemB-P (1116-1137)	Shi-ipaH1.4-p (1095-1116)
Negative stool	202.7	392	278	185	207	173.7	201.7	0	73
Sal 2	15329.5	6.25	0	0.5	0	3.5	0	0	61
Vch	410.25	30710.75	0	0	0	0	9.5	0	32.5
STEC	204.75	43	13619.5	81.75	0	0	24	0	50.5
Cam	0	0	0	11772.5	0	0	1108.5	0	3
Cpe	0	256.25	0	0	18572	0	0	0	21.3
Cdi	6.5	100.75	0	0	0	12616.5	0	0	24
Lmo	0	0	0	314	0	0	33005.3	52.8	29.3
Sau	1040	344.75	0	0	0	0	0	33275.8	55
Shi 1	0.25	0	8153	0	0	0	0	0.0	14691.3
Cut-off	1459.3	707.7	379.3	896.4	326.6	226.7	1450.9	75.1	131.2

單位: MFI-bkgd

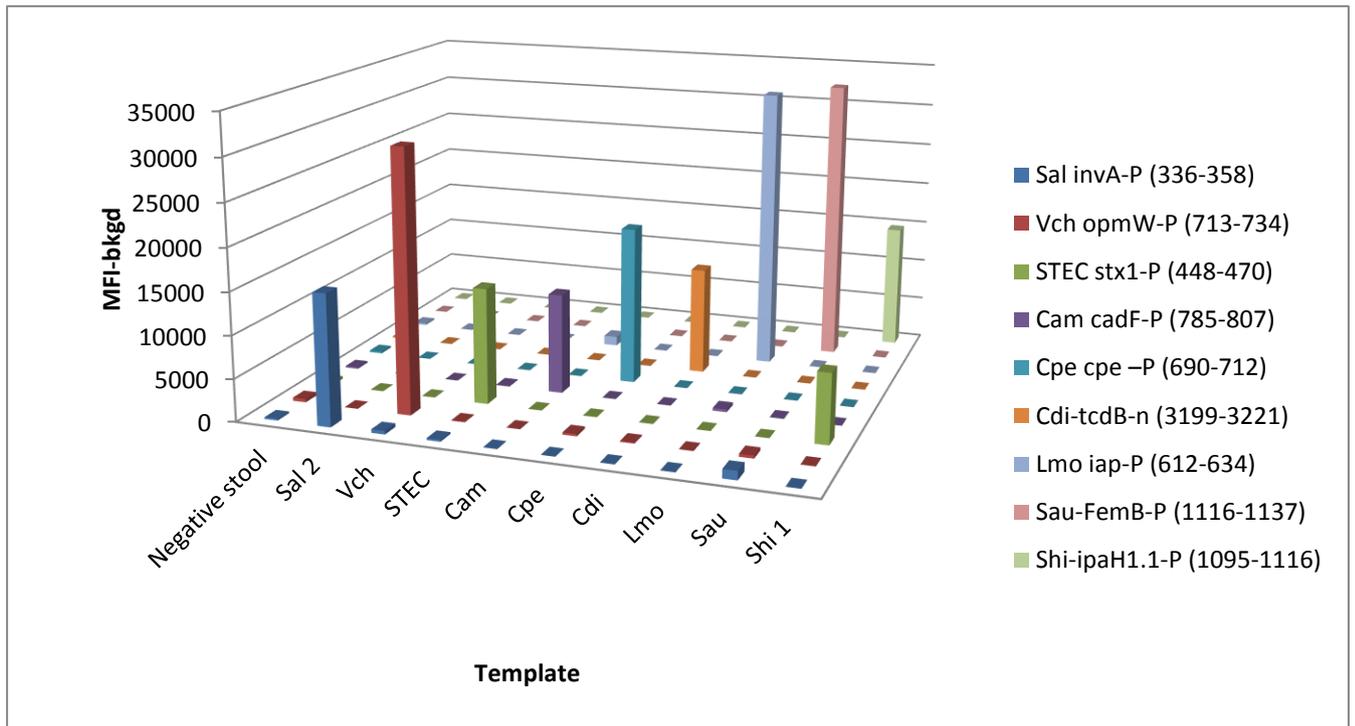


圖 6、多重懸浮微球陣列分析結果 (組合二)

(6) 多重腹瀉性病原核酸偵測平台(組合二)偵測極限之初步分析

為分析組合二之多重腹瀉性病原核酸偵測平台對各致病原之偵測極限，我們先以 Tris buffer 進行序列稀釋，使最終反應加入之各參考菌株核酸量相當於 10^3 、 10^2 、50 與 10 基因組套數(GE)，表 12 顯示利用組合二的平台偵測極限初步分析結果，各病原的偵測極限值為 50~1000 GE，其中霍亂弧菌 Vch opmW 與志賀氏菌屬 Shi ipaH1.4 之偵測極限值均為 50 GE。為了解平台應用於檢體測試之偵測極限，將霍亂弧菌與志賀氏菌屬此兩種參考菌株之核酸加入陰性糞便檢體之核酸萃取物中，作為模擬檢體(Spiked specimen)，則偵測極限值均為 100 GE，結果發現與純致病原核酸之偵測極限值差異不大，未來待平台內容更確定時，將再進一步分析各病原之偵測極限值。

表 12、多重腹瀉性病原核酸偵測平台之偵測極限分析(組合二)

No.	Bacteria	Target gene	SSMP-SBA	LOD of Pure N.A (GE)	LOD of Spiked specimen (GE)
1	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>invA</i>	UF-Sal <i>invA</i> -F(305-323) UR-Sal <i>invA</i> -R(381-360) Sal <i>invA</i> -P (336-358)	1000	
2	霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	<i>ompW</i>	UF-Vch <i>ompW</i> -R (675-695) UR-Vch <i>ompW</i> -F (763-741) Vch <i>ompW</i> -P (713-734)	50	100
3	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	<i>ipaH1.4</i>	UF-Shi <i>ipaH1.4</i> -F1-n1 (1076-1094) UR-Shi <i>ipaH1.4</i> -R-n1 (1202-1182) Shi <i>ipaH1.4</i> -P (1095-1116)	50	100
4	志賀毒性大腸桿 菌 (STEC)	<i>stx1</i>	UF-STEC <i>Stx1</i> -F (414-437) UR-STEC <i>Stx1</i> -R (545-521) STEC <i>stx1</i> -P (448-470)	1000	
5	曲狀桿菌 (<i>Campylobacter</i>)	<i>cadF</i>	UF-Cam <i>cadF</i> -F (642-671) UR-Cam <i>cadF</i> -R (862-833) Cam <i>cadF</i> -P (785-807)	1000	
6	產氣莢膜桿菌 (<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>)	<i>cpe</i>	UF-Cpe <i>cpe</i> -F (583~604) UR-Cpe <i>cpe</i> -R (736-712) Cpe <i>cpe</i> -P (690-712)	1000	

7	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	UF-Cdi-tcdB-F-n1 (3153-3176) UR-Cdi-tcdB-R-n1 (3267-3246) Cdi-tcdB-n (3199-3221)	1000
8	單核細胞增生性 李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>iap</i>	UF-Lmo-iap-F (542-562) UR-Lmo-iap-R (648-627) Lmo-iap (612-634)	100
9	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	UF-Sau-femB-F (1093-1115) UR-Sau-femB-R (1177-1153) Sau-femB (1116-1137)	50

3. 多重腹瀉性病原核酸偵測平台之臨床檢體初步檢測

(1) 平行比對結果

為了解多重腹瀉性病原核酸偵測平台(SSMP-SBA)應用於臨床檢體檢測之可行性，本所向疾病管制署腹瀉病原實驗室申請臨床分離菌株、臨床陽性糞便檢體與陰性糞便檢體，包括本所收存之陰性腹瀉檢體共計 71 項檢體。以多重腹瀉性病原微流體偵測平台檢測時，各檢體均依實驗方法所述萃取核酸，臨床分離菌株以 1 ng 之核酸量進行反應，陰性腹瀉檢體與陽性腹瀉檢體的核酸萃取物經 1:10 稀釋後進行反應，反應所得之 MFI-bkgd 值與各項目之邊界值比較，大於邊界值者判陽性(+)，所有項目均小於邊界值者，判為未檢出(undetectable)。表 13 呈現以組合一或二之多重腹瀉性病原核酸偵測平台檢測結果，以及各臨床檢體其他分析方法之結果，所有臨床檢體先進行組合二之平台檢測，當發現結果與其他檢測方法不符合時，進一步以組合一重新檢測，比對所有結果後判為符合或不符合。

(2) 靈敏度與專一性分析

本次測試 71 個檢體，檢體種類以分離菌株為主，佔 73.2% (52/71)；糞便檢體佔 26.8% (19/71)。陽性檢體共有 57 個，包括 52 個分離菌株與 5 支糞便檢體；陰性檢體為 14 個，均為糞便檢體。依照疾病管制署腹瀉實驗室先前檢測的結果，陽性檢體中 *Salmonella* spp.有 14 個檢體 (12 個分離菌株與 2 支糞便檢體)、*Staphylococcus aureus* 有 13 個檢體(包括 10 個分離菌株與 3 支糞便檢體)，*Clostridium difficile* 與 *Shigella* spp.各為 12 個檢體、*Vibrio cholerae* 有 5 個檢體，均為分離菌株。

以組合二偵測 *Shigella* spp.與 *Vibrio cholerae* 的 sensitivity 均為 100%，偵測 *Staphylococcus aureus*、*Clostridium difficile* (tcdB)與 *Salmonella* spp. 的

sensitivity 分別為 76.9%、63.6%與 26.7%，如以組合一偵測 *Clostridium difficile* (tcdB)與 *Salmonella* spp.，sensitivity 分別為 91.7%與 100%。對偵測 *Clostridium difficile* 而言，組合一與組合二內容的差別在於所使用的探針微粒位置不同；對偵測 *Salmonella* spp.而言，組合一與組合二內容的差別在於所使用的標的基因不同，平台一是 *Salmonella ttrC, ttrA*，平台二採用的是 *Salmonella invA*。不論組合一或組合二，偵測所有致病原的 specificity 均為 100%，顯示利用 SSMP-SBA 方法偵測的專一性相當好。

表 13、以多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台對臨床檢體之檢測與平行比對之結果

編號	檢體編號	實驗室編號	檢體類型	平行檢測		多重腹瀉性病原核酸偵測平台 (SSMP-SBA)		其他檢測方法與結果	多重腹瀉性病原核酸偵測平台與平行檢測之比對結果
				檢測方法	檢測結果	組合一	組合二		
1	CDC-17	106-006-D122	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	Undetectable	Cdi-tcdB qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
2	CDC-18	106-701-D167	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	Undetectable	Cdi-tcdB qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
3	CDC-19	106-701-D179	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A-B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	Undetectable	Cdi-tcdB qPCR: undetectable	符合(組合一); 不相符(組合二)
4	CDC-20	106-004-C040	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	Undetectable	Cdi-tcdB qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
5	CDC-21	106-701-D184	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile		Clostridium difficile +		符合
6	CDC-22	106-004-D124	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile		Clostridium difficile +		符合
7	CDC-23	106-002-D040	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	Clostridium difficile +	Cdi-tcdB qPCR (+)	符合
8	CDC-24	106-901-D019	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	Clostridium difficile +	Cdi-tcdB qPCR (+)	符合
9	CDC-26	106-004-C067	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株,	Clostridium difficile		Clostridium		符合

				毒素鑑定 A+B+			difficile +		
10	CDC-27	106-002-C072	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile		Clostridium difficile +		符合
11	CDC-95	106-006-C125	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A-B-	Clostridium difficile A-B-		Undetectable		符合
12	CDC-1-11	106002D006	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株	Clostridium difficile		Clostridium difficile +		符合
13	CDC-28	0911d1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella O8	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
14	CDC-29	0918t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
15	CDC-30	0829t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella O9	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
16	CDC-31	1129d9	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella spp.	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
17	CDC-32	0221t3	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella O8	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
18	CDC-33	0501t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)

19	CDC-34	0626t2	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Salmonella spp. (Sal-invA) +		符合
20	CDC-35	0626t3	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
21	CDC-36	0914d21	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
22	CDC-37	SMN-CHOL200 3002	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella choleraesuis	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable	Sal-invA qPCR (+)	符合(組合一); 不相符(組合二)
23	CDC-38	1060831t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella		Salmonella spp. (Sal-invA) +		符合
24	CDC-39	1060904d13	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella		Salmonella spp. (Sal-invA) +		符合
25	CDC-1-07	0914d6	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella serogroup O3, 10		Salmonella spp. (Sal-invA) +		符合
26	CDC-40	26-19	糞便	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella S. group 09	Undetectable	Undetectable		不符合
27	CDC-41	3-6	糞便	culture, 生化試驗, 血清鑑定,	Salmonella	Salmonella spp. (Sal-ttrC, ttrA) +	Undetectable		符合(組合一); 不相符(組合二)
28	CDC-42	0724d7	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	S. staphylococcus C		S. aureus +		符合

29	CDC-43	0724d9	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	S. staphylococcus C		S. aureus +		符合
30	CDC-44	0731d6	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus B		Undetectable	Sau-femB qPCR: undetectable	不符合
31	CDC-45	0814d5	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus C		S. aureus +		符合
32	CDC-46	0814d7	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus C		S. aureus +		符合
33	CDC-47	0814d8	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus C		S. aureus +		符合
34	CDC-48	0821d7	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus enterotoxin B		S. aureus +		符合
35	CDC-49	0821d10	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus enterotoxin C		S. aureus +	Sau-femB qPCR: (+)	符合
36	CDC-50	0821d15	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus enterotoxin C		S. aureus +		符合
37	CDC-1-10	0227d20	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus enterotoxin C		S. aureus +		符合
38	CDC-51	10-24	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 B 型		Undetectable		不符合

39	CDC-52	21-2	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 A 型		S. aureus +		符合
40	CDC-53	29-6	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 A 型		Undetectable		不符合
41	CDC-54	0313S5	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	shigella sonnei phaseII		Shigella spp. +		符合
42	CDC-55	0601s1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	shigella sonnei phaseII		Shigella spp. +		符合
43	CDC-56	0320S3	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 3a		Shigella spp. +		符合
44	CDC-57	0321S1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 3a		Shigella spp. +		符合
45	CDC-58	0328S3	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 3a		Shigella spp. +		符合
46	CDC-59	0407S2	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 3a		Shigella spp. +		符合
47	CDC-60	0414S11	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 3a		Shigella spp. +		符合

48	CDC-61	0614s1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 2a		Shigella spp. +		符合
49	CDC-62	0503s1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	shigella sonnei phaseII		Shigella spp. +		符合
50	CDC-63	0503s2	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 2a		Shigella spp. +		符合
51	CDC-64	0505s13	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	shigella sonnei phaseII		Shigella spp. +		符合
52	CDC-01-0 8	0919s1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Shigella sonnei		Shigella spp. +		符合
53	CDC-65	3-18	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合
54	CDC-66	20-3	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合
55	CDC-67	20-4	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合
56	CDC-68	20-5	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合
57	CDC-69	23-6	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合
58	CDC-70	8-12	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合
59	CDC-71	20-8	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合
60	CDC-72	9-20	糞便	*	陰性糞便檢體		undetectable		符合

61	IPM-01		糞便	Bacterial culture	陰性糞便檢體		undetectable		符合
62	IPM-02		糞便	Bacterial culture	陰性糞便檢體		undetectable		符合
63	IPM-03		糞便	Bacterial culture	陰性糞便檢體		undetectable		符合
64	IPM-04		糞便	Bacterial culture	陰性糞便檢體		undetectable		符合
65	IPM-05		糞便	Bacterial culture	陰性糞便檢體		undetectable		符合
66	IPM-06		糞便	Bacterial culture	陰性糞便檢體		undetectable		符合
67	CDC-89	1060716v1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae		Vibrio cholerae +		符合
68	CDC-90	1060904V1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae		Vibrio cholerae +		符合
69	CDC-91	1060905V1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae		Vibrio cholerae +		符合
70	CDC-92	1060906V1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae		Vibrio cholerae +		符合
71	CDC-1-09	1017vc	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholera O1, ogawa		Vibrio cholerae +		符合

*V. cholerae, V. parahaemolyticus, Shigella spp., Salmonella spp., Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, EHEC, Norovirus, Rotavirus, saprovirus 之 PCR 結果均為未檢出

表 14、多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台對臨床檢體檢測之靈敏度與專一性分析

致病原標的	多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台 ¹								多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台			
	組合一(n=18) ²				組合二(n=71) ²				組合一		組合二	
	TN	TP	FP	FN	TN	TP	FP	FN	Sensitivity %	Specificity %	Sensitivity %	Specificity %
沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	6	11	0	1	56	4	0	11	91.7	100	26.7	100
霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	18	0	0	0	66	5	0	0	ND	100	100	100
志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	18	0	0	0	59	12	0	0	ND	100	100	100
志賀毒性大腸桿菌 (STEC)	18	0	0	0	71	0	0	0	ND	100	ND	100
金黃色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	18	0	0	0	58	10	0	3	ND	100	76.9	100
單核細胞增生性李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	18	0	0	0	71	0	0	0	ND	100	ND	100
產氣莢膜桿菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)					71	0	0	0			ND	100
困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	12	6	0	0	60	7	0	4	100	100	63.6	100
曲狀桿菌 (<i>Campylobacter</i>)					71	0	0	0			ND	100

¹ TN: true negative; TP: true positive; FP: false positive; FN: false negative。

² 臨床檢體經細菌培養、生化鑑定、血清鑑定或基因檢測至少 2 種方法檢測判定致病原(各檢體之檢測結果見表 13)。

四、 討論

以懸浮微球陣列技術之基因檢測法進行致病原之偵檢，雖可適用於未培養前之檢體，直接萃取檢體中的核酸與微球上的探針進行雜合反應，但是為進一步提高偵測靈敏性，通常配合聚合酶連鎖反應 (PCR) 先將致病原之特定基因片段擴增，再與已接合專一性探針之微球進行雜合反應。

欲同時偵測多種致病原，標的基因可選擇：(1)共同基因(common)與(2)物種特異基因(species-specific gene)。部分研究選用共同基因或基因片段，如：16S rRNA、23S rRNA、16S-23S ITS region、cpn-60 對多種細菌進行偵檢，28S rRNA gene 則常應用於黴菌鑑定。這類共同基因存在所有菌種中，具有高保留性區域(highly-conserved region)與變異區域(variable region)，應用時可在高保留性區域中選取一段序列設計通用引子(universal primer)，將所有細菌或黴菌中的標的基因擴增，另外在變異區域中選擇物種專一性的序列作為探針，以鑑別物種用。優點：(1) 利用單一引子對(primer pair)進行 PCR 反應，反應較單純；(2)適用於所有細菌與黴菌鑑定。缺點：(1)部分臨床檢體如糞便、痰液、喉頭拭子等非完全無菌，檢體中正常菌落的 DNA，在 PCR 反應時也被擴增，影響致病菌 DNA 的擴增效率，但血液、體液與腦脊髓液正常應為無菌，則可適用。(2)所有 PCR 反應的試劑與操作 PCR 的過程需保持無菌，否則干擾 DNA (interfering DNA)將影響 PCR 結果。(3) 某些共同基因的序列在同菌屬 (genus)中為高度保留性，無法藉以區分菌種 (species)，如：16S rRNA 的序列在 *Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus oralis* 及 *Streptococcus mitis* 無法區分，在 *Burkholderia pseudomallei* 及 *Burkholderia thailandensis* 中序列也幾乎完全相同。(4)16S rRNA 的序列在同菌種但不同菌株間的序列變異太大，如 *Enterobacter*、*Pantoea* 與 *Leclercia*，

需利用物種特異基因作確認。

若以物種專一基因(species-specific gene)作為多重偵測致病原時的標的，針對每一種致病原各需選取至少一段基因片段序列，各別設計專一性的引子對與探針，其優點為：專一性更高(被分析物的 DNA 必須同時與正向引子、反向引子及探針有反應，才能導致陽性結果)；缺點為：需進行多重聚合酶連鎖反應(multiplex PCR)，由於反應中加入多對引子，使 PCR 反應的複雜度提高。

為提高分析的專一性，本計畫利用物種特異基因(species-specific gene)或毒素基因作為分析標的，所有選定之正向引子、反向引子及探針序列均經過 GenBank BLAST 比對。然而進行多重聚合酶連鎖反應最大的挑戰，在於同時加入多對引子時，引子與引子間容易形成 primer dimer，且引子可能與非專一性之標的產生結合，產生非專一性產物。為了降低 primer dimer 的形成，與減少非專一性產物的形成，我們在每一對專一引子(specific primers)的末端，各加入正向與反向共同序列，使的專一引子的熔點因此提高，並藉由將專一引子的濃度降至傳統聚合酶連鎖反應之 1/5 至 1/10，可減少 primer dimer 形成的機率。此外，為了克服聚合酶連鎖反應之核酸擴增產物因雜合反應的階段，產生自身黏合(self-annealing)現象，導致最終螢光訊號降低，我們在特定引子對(unique primer pair)的反向引子末端加上硫代磷酸修飾，使 T7 外切酶分解擴增產物中的正向股，保留住反向股，如此可增加反向股與探針之間的結合，提高雜合反應效率，使最終之螢光訊號明顯提高，提高的幅度為 1~38 倍[12]。

在多重腹瀉性病原核酸偵測平台中，我們採用自行設計了內部控制寡核酸(ICO)，來驗證所有反應的有效性，ICO 經由 multiplex PCR 作用後產生

的擴增片段可與內部控制探針微球(internal control probe)結合，最終由內部控制探針微球的螢光訊號是否大於空白組的訊號，用以判斷試劑是否失效、PCR 與 hybridization 反應是否成功。每次反應務必以無菌蒸餾水作為 non-template control，以建立該次分析之背景值(background，簡稱 bkgd)。若 NTC 的內部控制探針微球反應正常(螢光訊號大於空白組)，但檢體的內部控制探針微球螢光訊號未大於空白組，極有可能是檢體中存在 SSMP-SBA 反應的抑制物，我們觀察到這種抑制情形最常出現在檢測臨床糞便檢體時，當臨床糞便檢體經核酸萃取後，未經稀釋直接進行 SSMP-SBA，最終內部控制探針微球的螢光訊號常趨近空白組，但若將核酸檢體適度稀釋(如 1:10 稀釋)後再進行反應，內部控制探針微球的螢光訊號即為正常，推測由於糞便檢體中存在大量腸道細胞，因此萃取所得之核酸濃度太高，而影響 multiplex PCR 的反應，此推測須以不同濃度之糞便萃取核酸進行反應來進一步證明。

Clostridium difficile 自從 1970 年代起成為一項受到重視的腸道傳染病，因使用抗生素引發腹瀉病例中的 10-25%，以及因抗生素使用引發偽腹膜結腸炎(pseudomembranous colitis)的絕大部分病例，都是由帶有毒素基因的 *Clostridium difficile* 菌株所引起[22-24]。*Clostridium difficile* 的毒素有 Toxin A (*tcdA*)與 Toxin B(*tcdB*)兩種，大部分的致病菌株都是 Toxin A-positive 與 Toxin B-positive (A+B+)，Toxin A-negative 與 Toxin B-positive(A-B+)占少部分但也會致病[25]，這兩種毒素均有細胞毒性，並且會造成細胞死亡，然而透過組織培養細胞的實驗觀察到 Toxin B 的毒性比 Toxin A 強[26]，因此在選擇多重腹瀉性病原核酸偵測平台時，我們優先選擇 *tcdB* 基因作為標的。從重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台對臨床檢體檢測的結果，觀察到組合

二對 *Clostridium difficile* (*tcdB* gene)偵測的 sensitivity 為 63.6%，若採用組合一，則對 *Clostridium difficile* (*tcdB* gene)偵測的 sensitivity 為 100%，比較組合二與組合一的差異，在於探針微球的序列不同(組合一為 Cdi-tcdB- n1 (3229-3251); Cdi-tcdB-n (3199-3221))，且由表 7 與表 12 的偵測極限分析，顯示組合一對 *Clostridium difficile* (*tcdB*)的偵測極限 100 GE 比組合二對 *Clostridium difficile* (*tcdB*)的偵測極限 1000 GE 低，表示組合一對於 *Clostridium difficile* (*tcdB*)的偵測靈敏度確實較高，因此未來重新整合平台內容時，應優先考慮 Cdi-tcdB- n1 (3229-3251)作為偵測 *Clostridium difficile* (*tcdB*)的探針微球序列。

對於偵測 *Staphylococcus aureus*，我們參考文獻[13]選用 *femB* 基因作為標的，它是鑑定 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)之常用標的[19, 27]，其基因產物與 *Staphylococcus aureus* 的 methicillin 抗藥程度有關[28]，且 *femB* 不會出現在任何 coagulase-negative staphylococci[27]，對於 *Staphylococcus aureus* 而言是專一性的偵檢標的。然而在 Kobayashi 的文獻中[29]，發現 oxacillin-resistant *S. aureus* 分離菌有 4% 沒有 *femB* 的 PCR 產物，顯示 MRSA 以外的 *Staphylococcus aureus* 可能無法以 *femB* 作為鑑定標的。本研究疾病管制署提供的 10 株分離菌株中，我們以組合二偵測結果 9 株為陽性，1 株為陰性，陰性部分再次經由 *Staphylococcus aureus* qPCR 反應檢測亦呈現陰性；3 管陽性糞便檢體中，1 管為陽性，2 管為陰性，偵檢的 sensitivity 為 76.9%。由於先前疾管署提供這些分離菌株的鑑定依據是採用細菌培養、凝集試驗與毒素鑑定，並未提供抗藥性分析結果，我們推測這株 *femB* 陰性菌株可能非 MRSA，如要確認需進一步進行抗藥性試驗。另外 2 管被判為未檢出之陽性糞便，是否為相同原因(非 MRSA)造成，或是糞便

中的病原量低於組合二之偵測極限，需要另外以其他方法如 *Staphylococcus aureus-femB* qPCR 再次檢測確定。若 *femB* 檢測無法涵蓋所有金黃色葡萄球菌，是否選用其他 housekeeping gene (如 *nuclease*)[30]，將進一步與需求單位討論。

目前以組合二對 *Salmonella* spp. 偵檢的 sensitivity 並不理想，只有 26.7%，如以組合一偵測 *Salmonella* spp.，sensitivity 可達到 91.7%。對偵測 *Salmonella* spp. 而言，組合一與組合二內容的差別在於所使用的標的基因不同，組合一是 *Salmonella ttrC, ttrA*，它是 *ttrRSBCA* locus 內的部分序列，與 *Salmonella* 的 tetrathionate respiration 有關，因此被選作 *Salmonella* spp. 偵檢用基因[31]；組合二採用的是 *Salmonella invA*，它是位在染色體上的毒力基因[16, 32]，二者都是 *Salmonella* spp. 的專一性基因。推測組合一與組合二在偵檢靈敏度上的差異，應該來自對 *Salmonella* 偵測的極限差異，由表 7 與表 12 的偵測極限分析，顯示組合一對 *Salmonella (ttrC, ttrA)* 的偵測極限為 5 GE，比組合二對 *Salmonella (invA)* 的偵測極限 1000 GE 明顯較低，表示組合一對於 *Salmonella* spp. 的偵測靈敏度會較高，因此未來平台重新整合時，可考慮採用組合一中 *Salmonella (ttrC, ttrA)* 的引子和探針，若要使用 *Salmonella (invA)* 作為偵檢標的，需要透過修改探針的序列或其他可提升反應靈敏度的方式，來改善對 *Salmonella* 的偵測。

多重致病原核酸偵測平台的建立過程其實相當繁複，從標的基因的選擇、引子與探針序列的設計、二重與多重聚合酶連鎖反應的測試、基因產物與探針之雜合反應、流式細胞儀的最終分析，需要不斷的測試，失敗後必須重新再設計、重新找理想的反應條件，反覆測試到配對出一套組合後，還要考慮到偵測的專一性、靈敏度及各致病原的偵測極限是否受到影響等，

建立一個實際應用的平台，往往需要花費至少二至四年的時間。由表 12 可看出目前組合二的部分項目偵測極限約為 1000 GE，恐造成後續臨床檢體測試時分析靈敏度偏低，為提升檢測的極限，後續研究將持續與需求單位討論，除了從標的基因的選擇達成共識，另外從引子的序列與濃度、內部對照寡核酸的量、multiplex PCR 反應程式的條件、探針序列的選擇進行調整，以提升各檢測項目之偵測極限，提升平台偵測之靈敏度，達到短時間內提供多項腹瀉性病原快速又精確的偵檢結果。

五、 重要研究成果及具體建議。

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫

106 年度計畫重要研究成果及具體建議

計畫名稱：多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台開發與應用

主持人：許蕙玲

計畫編號：MOHW106-CDC-C-114-113704

1.計畫之新發現或新發明

第一年(106年)計畫已完成9項腹瀉性細菌病原同步核算偵檢平台之初步建置，包括完成偵測引子設計與製備、探針微球之製備、多重聚合酶鏈鎖反應條件測試、多重聚合酶鏈鎖反應產物與探針微球之雜合反應測試。並完成疾病管制署細菌病原生物材料之申請與分讓程序，初步完成71項臨床檢體之測試，確認糞便檢體前處理、自動化核酸製備流程。

本研究針對多項國內腹瀉性法定傳染、食物中毒相關與臨床常見的腸胃道病原，開發快速篩檢平台，多重分子檢測是前景看好的新興技術之一，利用微流體之懸浮陣列微球分析具有多項優勢：(1)同時分析多種致病原，故可節省時間、人力與檢體用量；(2)應用彈性大，可依需求逐步納入更多檢測項目；(3)隨時可修改分析項目內容，避免不必要之試劑浪費；(4)螢光偵測靈敏度高；(5)分析專一性極佳；(6)以96孔型式進行測定，可達到高通量分析目的。

將本計畫執行所累積的經驗，未來可提供於多中心操作之標準作業程序，包含最佳檢體處理、核酸萃取與核酸檢測流程，以確保不同實驗室檢

測結果之一致性。此偵測平台之建置將有助於疾病管制署對於腹瀉疾病之監測與流行病學調查研究，了解國內腹瀉性疾病的流行狀況與疾病負擔。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

無

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

無

六、 參考文獻

1. 林秋香、林育如、蔡佳倫、鄭雅芬、曾淑慧. 衛生署疾病管制局第五組. 台灣地區 94-95 年腹瀉群聚事件監測資料分析.
2. Kuchenmüller, T., et al. *Estimating the global burden of foodborne diseases--a collaborative effort*. Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles European communicable disease bulletin, 2009. **14**, pii/19201; author reply pii/19200.
3. Walker, C.L., et al., *Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29151.
4. Liu, L., et al., *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. The Lancet. **379**(9832): p. 2151-2161.
5. Farthing, M., et al., *Acute Diarrhea in Adults and Children: A Global Perspective*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2013. **47**(1): p. 12-20.
6. Scallan, E., et al., *Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(1): p. 7-15.
7. 陳協成、吳靜怡、盧祉彤、吳芳姿、吳和生. 2012 年臺灣星狀病毒腹瀉群聚事件流行病學分析. 疫情報導, 2014. 30(12): p. 238-245.
8. Bennett, W.E.J. and P.I. Tarr, *Enteric infections and diagnostic testing*. Current Opinion in Gastroenterology, 2009. **25**(1): p. 1-7.
9. Kebede, A., et al., *Short communication: Misleading microscopy in amoebiasis*. Tropical Medicine & International Health, 2004. **9**(5): p. 651-652.
10. Guerrant, R.L., et al., *Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **32**(3): p. 331-351.
11. Liu, J., et al., *Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study*. The Lancet Infectious Diseases, 2014. **14**(8): p. 716-724.
12. Hsu, H.L., et al., *Suspension bead array of the single-stranded multiplex polymerase chain reaction amplicons for enhanced identification and quantification of multiple pathogens*. Anal Chem, 2013. **85**(11): p. 5562-8.

13. Fukushima, H., et al., *Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Analysis*. International Journal of Microbiology, 2010. **2010**: p. 864817.
14. Liu, J., et al., *A Laboratory-Developed TaqMan Array Card for Simultaneous Detection of 19 Enteropathogens*. Journal of Clinical Microbiology, 2013. **51**(2): p. 472-480.
15. Opel, K.L., D. Chung, and B.R. McCord, *A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR**, *†*. Journal of Forensic Sciences, 2010. **55**(1): p. 25-33.
16. Rahn, K., et al., *Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella*. Molecular and Cellular Probes, 1992. **6**(4): p. 271-279.
17. Rodríguez-Lázaro, D., et al., *Quantitative Detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by Real-Time PCR: Assessment of hly, iap, and lin02483 Targets and AmpliFluor Technology*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(3): p. 1366-1377.
18. Lemee, L., et al., *Multiplex PCR Targeting tpi (Triose Phosphate Isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) Genes for Toxigenic Culture of Clostridium difficile*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(12): p. 5710-5714.
19. Pérez-Roth, E., et al., *Multiplex PCR for Simultaneous Identification of Staphylococcus aureus and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance*. Journal of Clinical Microbiology, 2001. **39**(11): p. 4037-4041.
20. Oikarinen, S., et al., *PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants*. Journal of Clinical Virology, 2009. **44**(3): p. 211-214.
21. Bélanger, S.D., et al., *Rapid Detection of Shiga Toxin-Producing Bacteria in Feces by Multiplex PCR with Molecular Beacons on the Smart Cycler*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(4): p. 1436-1440.
22. Bartlett, J.G., et al., *Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis Due to Toxin-Producing Clostridia*. New England Journal of Medicine, 1978. **298**(10): p. 531-534.
23. Bartlett, J.G., et al., *Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis*. Gastroenterology. **75**(5): p. 778-782.
24. Brazier, J.S., *The diagnosis of Clostridium difficile-associated disease*.

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998. **41**(suppl_3): p. 29-40.
25. Alfa, M.J., et al., *Characterization of a Toxin A-Negative, Toxin B-Positive Strain of Clostridium difficile Responsible for a Nosocomial Outbreak of Clostridium difficile-Associated Diarrhea*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(7): p. 2706-2714.
 26. Lyerly, D.M., et al., *Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile*. Infection and Immunity, 1992. **60**(11): p. 4633-4639.
 27. TOWNER, K.J., et al., *Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Medical Microbiology, 1998. **47**(7): p. 607-613.
 28. Berger-Bächi, B., *Expression of resistance to methicillin*. Trends in Microbiology, 1994. **2**(10): p. 389-393.
 29. Kobayashi, N., et al., *Detection of mecA, femA, and femB genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction*. Epidemiology and Infection, 2009. **113**(2): p. 259-266.
 30. Fukushima, H., Y. Tsunomori, and R. Seki, *Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(11): p. 5134-5146.
 31. Malorny, B., et al., *Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(12): p. 7046-7052.
 32. Chiu, C.H. and J.T. Ou, *Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes, invA and spvC, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay*. Journal of Clinical Microbiology, 1996. **34**(10): p. 2619-22.

七、 疾病管制署 106 年度科技研究計畫期末報告審查意見回復表

計畫編號：MOHW106-CDC-C-114-113704

計畫名稱：多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台開發與應用

計畫單位：國防醫學院

計畫主持人：許蕙玲

審查意見	意見回復	報告修正內容 (頁數)
1. 期末報告有七種病原，現增加為十個，sensitivity 與 specificity 應加強。	感謝委員的意見，平台尚在建置階段，將逐步藉由反應條件的修正、探針重新設計等增加各病原偵測的 sensitivity 與 specificity。	
2. 是否有與 Luminex 的 sensitivity 的比較?	將於 107 年-108 年計畫執行內容加入與 Luminex 平台的比較。	
3. 請審慎評估本實驗每一例分析之成本。	將於 108 年平台建置與測試完成後，就平台所有涵蓋之項目內容與試劑需求等，評估每一例分析之成本。	
4. CDC 有七台 flow，capacity 上沒問題，可順利轉移。	感謝委員的意見!	

<p>5. Luminex 費用過高問題 建議可找原廠談，購買 小量單價一定很高。</p>	<p>將透過協商(如委託測試) 或與其他單位一起購買的 方式，與廠商洽談試劑價 格，感謝委員的意見!</p>	
<p>6. 本研究之結果應規劃 如何利用，以簡化未來 檢驗流程。</p>	<p>感謝委員的意見!本研究同 時針對多種腹瀉性病原之 核酸進行專一性偵檢，為 腹瀉傳染病檢體快速篩檢 的利器，應可取代目前單 項致病原的核酸檢測，然 而病原的培養、基因定序 分析與病原型別之檢測， 為疾病傳播來源與生物材 料保存之依據，仍建議保 留。</p>	