

以即時 PCR 快速檢驗曲狀桿菌方法之建立與分析

前言

曲狀桿菌是引起歐美等已開發國家急性腹瀉案例的第一元兇。根據美國 CDC 近年來的調查，每年約有 2 百萬人以上受到感染，感染率約 38%，而有 2 千人以上死亡 [1,2]，其中以小於五歲幼兒及 15 至 44 歲的成年人之發生率為最高，感染率也較其它腸胃道致病菌如沙門氏菌 (35%)、志賀桿菌 (19%)、大腸桿菌 (5.5%) 等為高。至於開發中國家包括台灣等，患者以小於二歲幼兒及嬰兒為主，且通常會與沙門氏菌和志賀菌共同感染同一患者，但通報率與它們相比卻大幅落後。

目前臨床針對此重要的病原菌進行檢驗時，往往會因為以下幾個原因而倍感困難：(1) 曲狀桿菌的生長需要特殊之微需氧環境 (5% 氧氣、10% 二氧化碳、85% 氮氣) 與溫度 (37 或 42°C，在室溫僅能存活數日)，處理不當的檢體在運送過程中，可能導致所含的菌體死亡。再者由於曲狀桿菌的生長速度較為緩慢，為了避免被其他生長速度較快的正常腸內菌叢覆蓋，常規檢驗所使用的培養基都含有高劑量的抗生素，但這些抗生素往往會抑制某些較為敏感之曲狀桿菌的生長，而嘗試降低培養基中抗生素濃度的結果又往往無法抑制雜菌的生長而降低其檢出率，此外雖曲狀桿菌具有嗜熱特性，42°C 的培養溫度也有導致敏感菌株死亡的可能。(2) 它在低感染量時就可造成患者的腹瀉症狀 [3]。如此一來低菌量的曲狀桿菌更加喪失了與生長速度較快之其它腸內菌在培養基上的生長優勢。(3) 曲狀桿菌的生長週期當中，目前已提出可能會進入一個無法培養的情況 (viable but not culturable state) [4]，雖然此說法的爭議性仍大。因此至今，雖已慢慢研發出多種含不同抗生素的曲狀桿菌選擇性培養基供常規檢驗使用，試圖提高檢出率，但效果依舊不彰。為了解決此一窘境，開始有文獻提出可先將患者檢體利用特殊的增菌培養液 [5] 培養 48 小時之後，再以常規的選擇性培養基作第二次培

養，雖其結果顯示檢出率稍有提高，但卻大大提高檢驗所需要的時間（大約 5~6 天）與人力成本。

爲了不斷提昇對於各臨床致病菌的檢驗效果，近年來以 DNA 爲基礎的分子技術已慢慢成爲一項重要依據，其中 PCR 可說是目前最被廣爲應用的方法之一，許多不容易培養的微生物檢驗都開始以此方法作爲輔助診斷或鑑定的重要工具。以曲狀桿菌爲例，目前已開始將其應用於食品製造業，以檢測肉類食品中的空腸曲狀產菌 (*C. jejuni*)，利用其一特定的基因序列當作標地，以適當的引子將該基因片段增值後再以洋菜膠電泳分析其大小的 DNA 片段。它的優點是敏感度比傳統培養的方法高出許多，且不需要活菌也可以藉由偵測特定基因的存在而判定結果，因此近年來以這種分析終產物的定性 (Qualitative) PCR 偵測 *C. jejuni* 的報導愈來愈多[6, 7, 8]，但檢體種類仍以環境水或是食品居多，較少爲病人的臨床檢體例如糞便或是肛門拭子等，這是由於糞便中帶有大量的 PCR 抑制物而容易影響結果。即時定量 PCR (real-time quantitative PCR) 是一種改良自傳統 PCR 的新技術，它利用帶有螢光的探針 (probe) 或是可與 DNA 結合的螢光染劑 (例如 SYBR green I) 在 PCR 的增值過程中不斷地嵌入產物當中，並以電腦即時地偵測螢光訊號的強度來反映 PCR 產物累積的程度，繼而分析螢光強度與 PCR 循環數的關係再與已知量的標準 DNA 相比較，將模板中所含的 DNA 進行定性與定量分析。此方法優於傳統 PCR 是在於它可以電腦即時地分析而省去傳統 PCR 需要再進行洋菜膠電泳的步驟，既省時也可以避免跑電泳時 DNA 的污染，而且利用電腦來分析螢光強度的敏感度也較以肉眼判讀洋菜膠上的 DNA 高出許多。因此即時 PCR 已慢慢成爲未來開發檢驗技術的新趨勢。

曲狀桿菌雖較少有大規模的流行案件爆發，但偶發性感染的案例並不少見，但卻一直被臨床醫師忽略。目前許多腹瀉病患往往於服用其它腸胃道致病菌的抗生素仍腹瀉不止之後，才針對曲狀桿菌作檢驗，不但延誤治療時間同時也造成素的濫用。本研究的目的便是藉由即時定量 PCR 的系統，

以腹瀉病患的臨床檢體當作 PCR 的模板 DNA，藉此瞭解是否經短期增菌後以即時 PCR 檢測可以縮短對此菌的檢驗時間，希望達到快速診斷以提供醫師早期用藥的功效，並憑著此法的高敏感性對此菌的檢出率有所提昇。此外將這方法所得結果與傳統培養相互對照，希望可作為改善傳統培養方法的一項參考依據。

材料與方法

一、腹瀉患者的檢體來源與培養條件

腹瀉檢體以各定點醫師、小兒急性腹痛或腹瀉者、各醫療院所之可疑患者及基層衛生局所送驗之檢體為主。檢體的選擇為肛門拭子 (rectal swab；通常採一枝)，採取時應盡量採到少許糞便或是黏液，並將採集後的棉棒保存在輸送培養基 Cary-Blair 中，試管要確保密封，並在 4°C 的環境下盡速運送至實驗室。檢體以兩種選擇性培養基 mCCDA (modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar) 與 CSM (charcoal-containing selective medium) 進行接種，以四區畫線劃開後，置於 42°C 微氧的環境 (5% 氧氣、10% 二氧化碳、85% 氮氣；使用 BBL 公司之 CampyPak 產氣包) 培養 48 小時後觀察結果。若檢體為患者的糞便，則需先懸浮在少許曲狀桿菌的液體培養基再進行接種。若培養基於 48 小時後有灰色呈濕潤擴散狀的菌落出現，則挑單一菌落於 mCCDA 再培養 24 小時後進行 oxidase、catalase、indole、hippurate 等生化試驗鑑定是否為曲狀桿菌 [9]。

二、檢體中細菌 DNA 萃取

將接種過選擇性培養基之肛門拭子或糞便懸浮液置於含有抗生素 (CAT supplement; oxoid SR174) 與 5% 冷凍馬血之曲狀桿菌增菌培養液 (*Campylobacter* enrichment broth)，在 37°C 的微氧環境中培養 16~18 小時後，取 1 ml 增菌培養液至 1.5 ml 微量離心管中，13,200 rpm 離心 10 分鐘後移去上清液，再以 200 μ l 無菌水清洗管底之 pellete，於沸水中煮沸 15 分鐘，13,200

rpm 離心 5 分鐘取上清液 100 μ l 與等量的無菌水混合作為即時 PCR 的模板 DNA。

三、即時PCR試驗

(1) PCR 引子、試劑與反應條件

參考Andrew與David等人於 2003 年的報導 [10]，以 82F和 197R作為引子 (表一)，增殖出曲狀桿菌染色體的 115 bp DNA片段， T_m 值約 78°C。本研究使用Roche LightCycler 1.0 之儀器並配合Roche LightCycler FastStart DNA Master SYBR GreenI (Cat. No. 3 003 230) 之定量PCR試劑。PCR反應總體積為 20 μ l，內含 8.6 μ l PCR等級無菌水、2.4 μ l MgCl₂ stock solution (最終為 4 mM)、10 μ M之 82F和 197R引子各 1 μ l (最終為 0.5 μ M)、2 μ l Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I reagent以及 5 μ l 模板 DNA。反應條件為 (1) Denature : 95°C 7 分鐘；(2) Cycling : 95°C 5 秒、60°C 5 秒、72°C 10 秒進行 65 個循環；(3) Melting : 95°C 10 秒、65°C 15 秒後以每秒升高 0.1°C的速率慢慢加溫至 95°C；(4) Cooling : 40°C 45 秒。反應結束後可立刻由電腦分析之Cp值與 T_m 曲線 (melting curve)的頂點溫度 (T_m)值判定結果，反應總時間約 55 分鐘。

(2) 以模擬的臨床檢體測試即時 PCR 試驗

本研究的最終目的是直接以腹瀉患者的肛門拭子或糞便檢體進行即時 PCR 分析，因此先利用已分離的曲狀桿菌臨床菌株與確定不含它的患者糞便混合，以模擬曲狀桿菌感染患者的糞便檢體。首先計算模擬檢體中含有的曲狀桿菌數，並以上述萃取 DNA 的方法處理後作為模板 DNA。將該 DNA 以 10 倍的序列稀釋後進行即時 PCR 分析，利用電腦計算出各稀釋倍數所得之 Cp 值與其所代表之粗估細菌數的相關曲線。

(3) 以腹瀉患者臨床檢體 DNA 為模板進行即時 PCR 分析

直接將腹瀉患者的肛門拭子或糞便檢體隔夜培養 (約 16~18 小時；37 °C 微氧環境)於 5 ml Campy-CAT 增菌培養液後萃取 DNA 作為模板，同樣依

上述條件作即時 PCR 分析，由電腦計算後的 Cp 值配合 *Tm* 曲線當作判讀曲狀桿菌陽性與否的依據。

結果

一、PCR引子的特異性

利用 4 株曲狀桿菌標準株、2 株分離自腹瀉小兒的臨床株與 3 株其他腸內菌臨床株以煮沸法得到的 DNA 以 82F / 197R 引子進行即時 PCR 分析 (圖一;以 *C. jejuni* ATCC 49943 的結果為代表),顯示 2 株 *C. jejuni* 與 2 株 *C. coli* 有陽性的螢光訊號產生 (圖一 A、表二),且 *Tm* 曲線的頂點溫度約在 78 ± 0.5 °C 的區間 (圖一 B),將 PCR 陽性的產物以洋菜膠電泳分析 (圖一 C),也有預期之 115 bp 的 DNA band,而該產物進一步定序確認後也無誤。

二、以模擬的臨床檢體決定即時PCR試驗之半定量線性區間

將一系列 10 倍序列稀釋的模擬臨床檢體以 82F / 197R 引子進行即時 PCR 分析。顯示 Cp 值介於 18.6 至 38.7 之間 (圖二A;以 *C. jejuni* 為代表),其線性關係涵蓋 6 個 10 倍稀釋區間 (圖二B)。對照每一稀釋倍數菌落數目計算後的結果,得出本方法半定量的準確區間約在 $2.5\sim 2.5 \times 10^5$ CFU / 每一 PCR 反應。

三、由腹瀉患者的檢體於增菌培養後以即時PCR作定性分析

將 300 件由定點醫師提供的小兒腹瀉病患肛門拭子先接種至選擇性培養基 mCCDA 後,同時將拭子置於增菌培養液作隔夜增菌培養於隔天以煮沸法萃取 DNA 進行即時 PCR 分析,並將結果與傳統培養相對照 (表三)。此外,所有 PCR 陽性檢體的反應終產物,皆再以洋菜膠電泳分析檢查有無 115 bp 之產物作進一步確認。經統計後 29 件檢體為即時 PCR 陽性,其中 21 件為培養陽性,另 8 件的培養結果為陰性,總計 300 件檢體的培養陽性率為 7%,而即時 PCR 則為 9.7% (表三)。PCR 陽性檢體的 Cp 值區間為 20.75~46.11,其中 62.1% (18/29)介於 21~29,27.6% (8/29)介於 31~38,10.3%

(3/29)大於 41。它們的 T_m 曲線之頂點溫度均在 78 ± 0.5 °C 的區間，每批試驗之 NTC (no template control；將檢體 DNA 以水取代作為模板)的 C_p 值均大於 45。

討論

曲狀桿菌的檢驗至今仍存在著許多有待克服的重要關鍵。造成此現象的主要原因是由於它對外環境極為敏感，往往會因為檢體運送過程或是接種培養基時的不小心而死亡，雖然生長緩慢的它比其他腸內菌有抗某些抗生素 (例如 cefoperazone)、耐高溫 (42°C)與可在微需氧環境中生長等優勢，但是仍有許多較為敏感的菌株在培養過程中因無法忍受上述 3 項因素而死亡，導致目前曲狀桿菌的檢出率嚴重被低估，通報率也著跟降低，尤其以開發中國家更為明顯。因此以 PCR 偵測核酸的方式慢慢地被接受與應用試圖彌補傳統培養的不足。因為無論是死菌或是不易培養之菌體只要其 DNA 仍存在，皆可以被偵測出來。

即時定量 PCR 近兩年來在曲狀桿菌上的應用愈來愈廣[11, 12, 13]，它省去了傳統 PCR 之後所必須的洋菜膠電泳分析，不但可以節省等待結果的時間，也可降低因跑膠時 DNA 污染而導致誤判的可能性，但現在主要仍應用於已分離好菌株的鑑定工作上。雖有文獻陸陸續續報導利用它直接由受污染的食品或是環境水中檢測此菌，但多半還是以人工模擬受污染檢體的方式作測試，這不一定能代表最檢體最真實的情況。而某些從天然受污染之食品或水甚至是動物或人的糞便以它來檢測曲狀桿菌的報導，都需要利用自動化的儀器或是 commercial DNA extraction kit 來完成檢體 DNA 的前處理作業。本研究與之相比較，直接以煮沸法取得檢體中的 DNA，不需要作純化的動作，確實縮短檢測所需的時間與金錢成本。此外以未純化之 DNA 當作即時 PCR 的模板也顯示本研究已成功克服糞便中的膽鹽或雜質等對 PCR 反應的影響。利用 Roche LightCycler SYBR Green I 的系統，65 個 PCR 循環加上 T_m 曲線的鑑定過程在 1 小時內就可以得到結果，總計檢體收件的隔天

就可以得到檢測報告，足足比傳統培養節省了 2 天以上的時間，不僅於檢體量大或是有大流行爆發時作為快速篩檢之用以省去劃大量培養基的時間，也可以提早將檢驗結果提供給臨床醫師參考給予患者適當地用藥。

這 29 件即時 PCR 陽性的檢體中，傳統培養的結果為 20 件 *C. jejuni* 和 1 件 *C. coli*，其 C_p 值最小為 21.59 最大為 46.11。有 8 件檢體為 PCR 陽性但培養結果為陰性，其中 2 件的 C_p 值大於 40，另 6 件與培養陽性檢體的 C_p 區間 25~39.9 相近。推測造成兩方法結果不同的可能原因有二：一是檢體中所含的曲狀桿菌在運送的過程中因環境不穩定而死亡，導致活菌數目過少而不易培養；二是運送沒有問題，但由於病患檢體中原本所含的曲狀桿菌量太少同樣不易培養，而其中以原因一較為可能。這是因為送自各定點醫師的肛門拭子或是糞便檢體皆是採檢後 1~2 天才送達實驗室，且運送並非以低溫 (4°C) 冷藏而僅在室溫 (夏季約 30°C)。根據本實驗室之前的試驗發現，保存於 Cary-Blair 輸送培養基中的曲狀桿菌若置於室溫，24 小時之後活菌的量會衰減一半以上，故推測送到實驗室的檢體中的活菌量可能很低。將檢體於即時 PCR 分析前先置於增菌培養液培養的作用便是先將檢體中仍存活的少量的曲狀桿菌作些許的增殖，短時間的隔夜增菌雖不一定足以改善因菌量少而不易培養的情況，但對於敏感度較高的即時 PCR 來說，偵測微量增加的菌體 DNA 卻也綽綽有餘。這也印證了目前我國包括其它開發中國家對於曲狀桿菌的通報率普遍偏低的現象，對於氧氣、溫度與抗生素等外在環境極為敏感的它，若只採用傳統劃培養基的方式檢測，的確是有大幅低估其感染率的可能性。

在建立序列稀釋的標準曲線時，除了 $10^0 \sim 10^{-5}$ 倍的 6 個 C_p 值具有線性關係之外 (圖二)，再往下稀釋至 10^{-7} 倍的 C_p 值為 44.5，或許因為受到取樣時的誤差影響，並不落在線性區域之內，但經由洋菜膠電泳分析其產物，卻有 105 bp 的 DNA 存在，表示當 C_p 值大至約 45 時仍可判定為陽性，雖然此 C_p 值 45 的 PCR 反應中所含的曲狀桿菌數無法藉由標準線粗略估計，但保守

估計本方法的偵測極限至少仍達到 2.5 CFU / 每一PCR反應。統計 29 件 PCR陽性檢體的Cp值，得出範圍在 21.59~46.11 之間。由於以洋菜膠電泳分析每一個判定為PCR陽性的產物後均發現含有 105 bp的DNA，且每批試驗 NTC的Cp值均大於 45，顯示目前當(1) 檢體的Cp值小於 45；(2)*Tm*曲線的頂點值約在 78 ± 0.5 °C 區間時可直接判定為曲狀桿菌感染陽性。對於Cp值大於 45 但*Tm*曲線的仍符合的檢體由於目前只有二件個案，因此短期內仍需以洋菜膠電泳分析產物後方可確定為陽性。此外由於*C. jejuni*與*C. coli*共佔臨床上所有感染人類之曲狀桿菌的 99%以上，也顯示以本方法作為曲狀桿菌的快速檢驗可以涵蓋近所有的案例，相信對於此菌的檢驗提供了一項可參考的新工具，未來更可將此方法應用於其他腸胃道致病菌的快速檢驗，必定事半功倍。

結論

本即時 PCR 方法的建立可作為臨床實驗室檢驗曲狀桿菌的一個新工具。它的敏感度至少與傳統培養的方式相當甚至更高約 2.7%，偵測極限保守估計為 2.5 CFU / 每一 PCR 反應。而此法的實用之處，便是將曲狀桿菌檢驗結果獲得的時間由原本的 3~5 天縮短至檢體收件後的隔天，節省了許多人力成本，更可方便各臨床醫師在第一時間對病患診斷與用藥，至於偵測敏感度是否有近一步提昇仍待檢體樣本繼續增加後再下定論。曲狀桿菌於開發中國家的感染案例一直不斷地被低估，這也是近年來新型診斷技術不斷推陳出新的原因，將即時 PCR 與培養結果相互配合，相信可以突破目前許多對於曲狀桿菌的檢驗仍無法完全克服的瓶頸，對於日後此菌檢驗方式的再改良，必有相當程度的幫助。

撰稿者：楊季融、邱秀櫻、蔡金來、陳光燼、曾士展、王昱嵐、周振英、蘇勳璧、陳豪勇

行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

參考文獻

1. Padungton P and Kaneene J.B. *Campylobacter* spp. in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *J. Vet. Med. Sci*, 2003, 65: 161-170.
2. Mead P. S., Slutsker L., Tauxe R. V. *et al.* Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5:607-625.
3. On S.L. Identification methods for *Campylobacter*, *Helicobacter*, and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 9:405-422.
4. Bovill, R. A., and Mackey B. M. Resuscitation of “non-culturable” cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 1997, 143:1575-1581.
5. Corry, J. E. L., Post D. E., Laisnev M. J. *et al.* Culture media for the isolation of Campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, 26:43-76.
6. Chuma T., Yano K., Yugi H. *et al.* Direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents by PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 1997, 59:85-87.
7. Oyofe B. A., Abd el Salam S. M., Wasfy M. O. *et al.* Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. from chicken using the polymerase chain reaction. *Zentbl. Bakteriol.* 1997, 285:480-485.
8. Wang G., Clark C.G., Rodgers F.G. *et al.* Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40: 4744-4747.
9. 楊季融、邱秀櫻、蔡金來、李智隆等：台灣地區新感染症候群-曲狀桿菌之初步報導。行政院衛生署疫情報導，民國九十三年第 20 卷第 6 期：307-320 頁。
10. Sails A. D., Fox A. J., Greenway D.L. *et al.* A real-time PCR assay for the

- detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69:1383-1390.
11. Nogva H. K., Bergh A., Rudi K. *et al.* Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66:4029-4036.
 12. Yang C., Jiang Y., Yin Y. *et al.* Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 2003, 38:265-271.
 13. Best E. L., Powell E. J., Frost J. A. *et al.* Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters.* 2003, 229:237-241.

表一、real-time PCR primer sequences

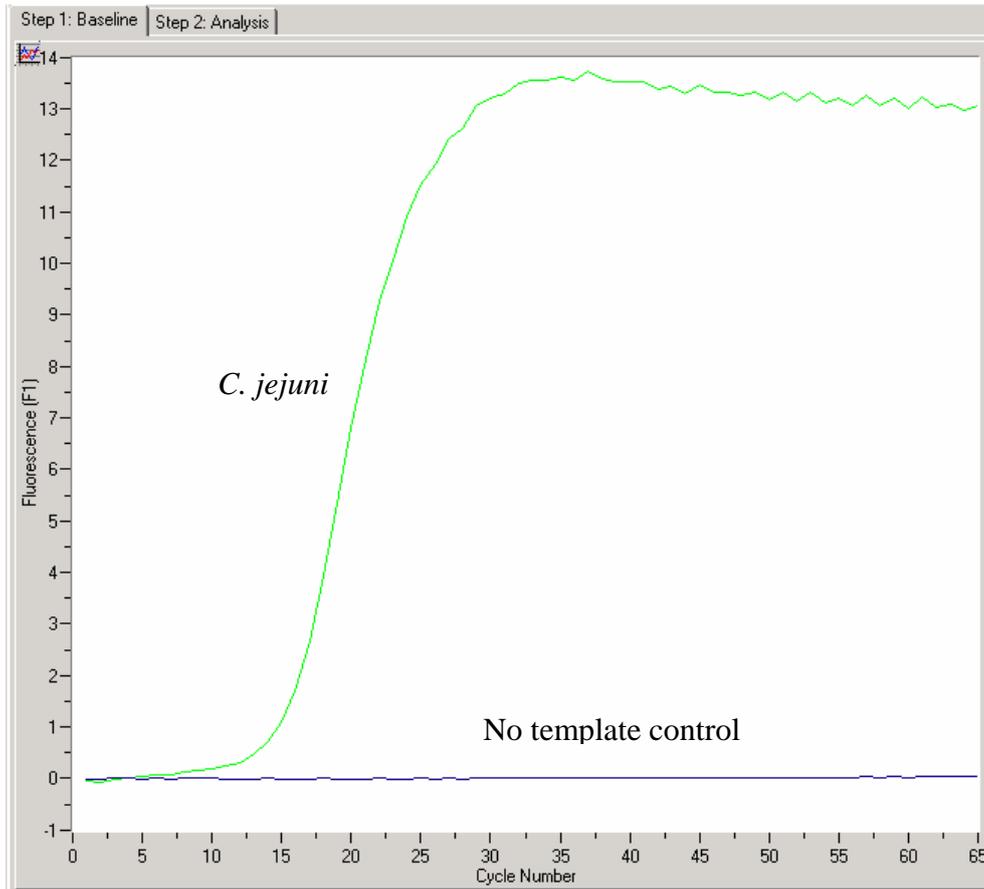
Primer	sequence (5'-3')
82F	TTGGTATGGCTATAGGAACTCTTATAGCT
197R	CACACCTGAAGTATGAAGTGGTCTAAGT

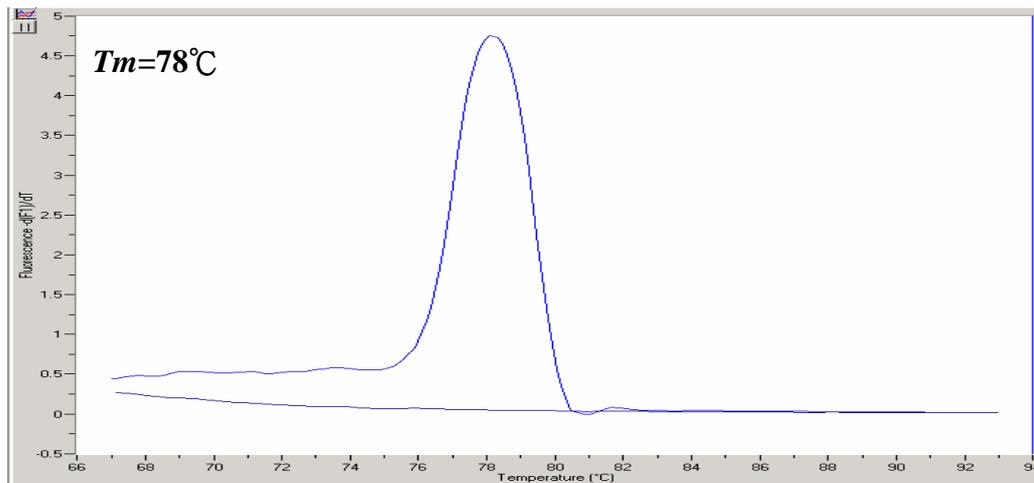
82F 引子在曲狀桿菌染色體序列的位置為：Nt 203349~203377.

197R 引子在曲狀桿菌染色體序列的位置為：Nt 203289~203262.

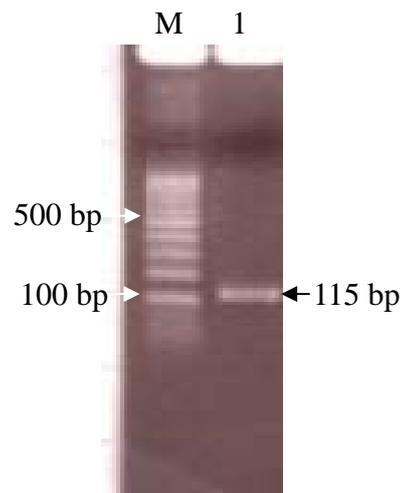
圖一、以 Roche Lightcycler 進行 *C. jejuni* 之 real-time PCR 結果

(A) 以 82F/197R 引子分析 *C. jejuni* 所得之螢光讀值與 PCR 循環數結果



(B) *C. jejuni* 即時 PCR 之 T_m 分析曲線

(C) 以洋菜膠分析即時 PCR 產物



M: marker;

Lane 1: *C. jejuni* PCR product

表二、以 82F / 197R 引子進行曲狀桿菌即時 PCR 之特異性分析

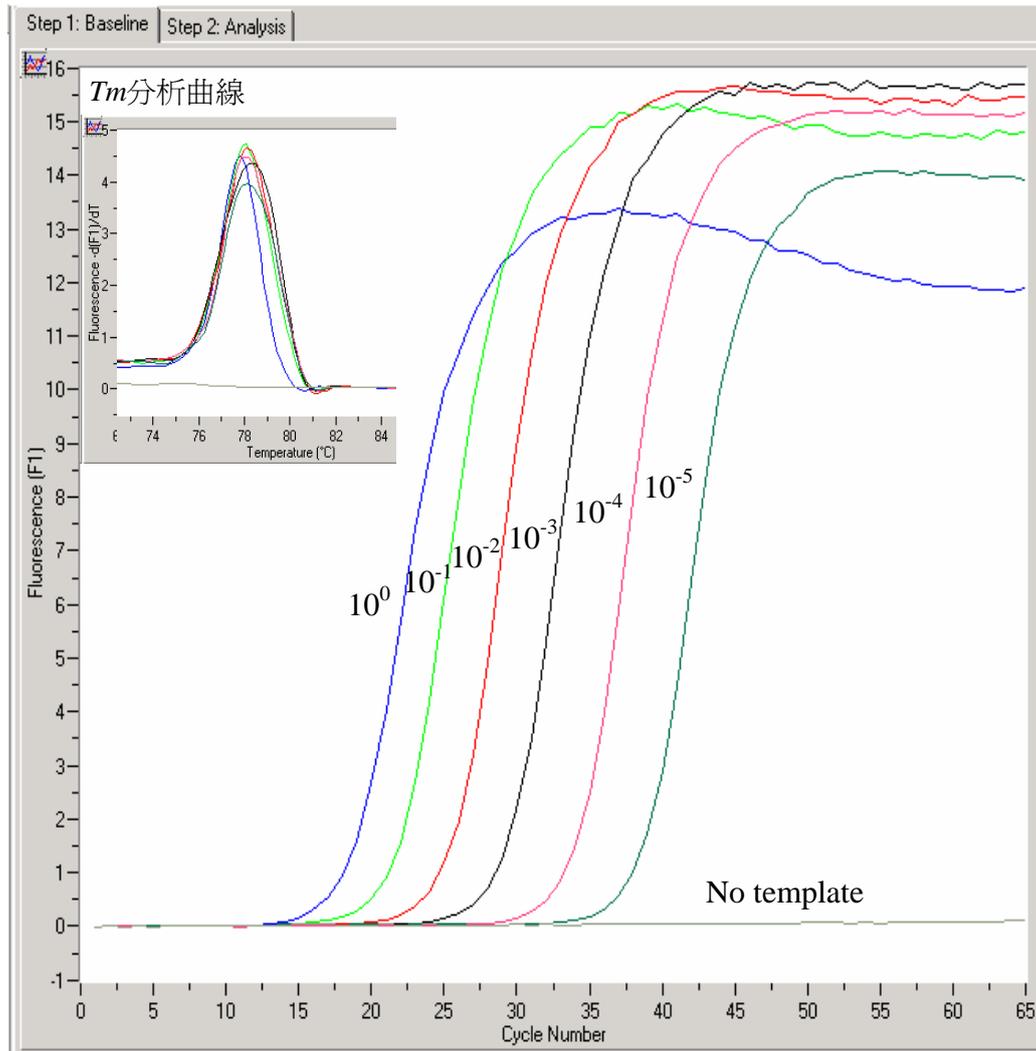
Organism	source	Cp value	result
<i>C. jejuni</i>	ATCC	12.18	+
<i>C. coli</i>	ATCC	17.87	+
<i>C. lari</i>	ATCC	>65	-
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	ATCC	>65	-
<i>C. jejuni</i>	human	13.54	+
<i>C. coli</i>	human	14.71	+
<i>E. coli</i>	human	>65	-
<i>Salmonella</i>	human	>65	-
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	human	>65	-

表三、300 件腹瀉檢體之即時 PCR 與傳統培養結果比較

Real-time PCR \ Culture on mCCDA	No. of positive	No. of negative
	*No. of positive	21
No. of negative	0	271

*All PCR positive products had been analyzed by electrophoresis, and the 115 bp DNA fragment can be seen on 1.5% agarose gel.

圖二、以模擬的臨床檢體決定即時 PCR 試驗之半定量線性區間

(A) *C. jejuni* 10 倍序列稀釋 DNA 之即時 PCR 螢光讀值與 PCR 循環數結果

(B) *C. jejuni* 序列稀釋 DNA 之即時 PCR 標準曲線

