腹瀉性大腸桿菌 Enterotoxigenic 與 Enterohemorrhagic *E. coli* 快速診斷法之建立

[1]楊季融、[1]蔡金來、[1]江春雪、[2]蘇勳璧、[1]吳和生
[1]疾病管制局研究檢驗中心 [2]疾病管制局第三分局

摘要

臨床上 5 大類腹瀉性大腸菌 (EHEC、ETEC、EPEC、EIEC、EaggEC)的鑑定診斷至今仍相當困難，為了要提昇對此類致病菌的檢驗能力，疾病管制局細菌實驗室首先建立一套以即時PCR (real-time PCR)快速診斷其中兩類ETEC與EHEC的流程。檢測標的物為其毒素基因，即ETEC的熱敏感與熱穩定腸毒素LT、ST與EHEC的verocytotoxin *Stx1*、*Stx2* 等基因。經由引子與探針特殊的設計，兩類大腸菌的各 2 種毒素基因均可在同一個PCR program被偵測出來，耗費時間約 60 分鐘。此檢測法具有專一性，敏感度在ETEC的*lt*與*st*約達 3.3~ 3.3 x 10^6 CFU / 每PCR反應，而EHEC之*stx1* 與*stx2* 則為 1.4~ 1.4 x 10^6 CFU / 每PCR反應。整個檢測流程省去了以往需進行一連串血清鑑定的繁瑣步驟，對於此兩類腹瀉性大腸菌可提供較快速的輔助鑑定之用。

簡介

大部分的大腸桿菌 (*Escherichia coli*)屬皆存在於人類的腸胃道中，為正常菌叢的成員之一，屬於非致病性。但在某些特定的大腸桿菌族群可引起人類之臨床病症，包含尿道炎、菌血症、腦膜炎、腸胃道疾病如腹瀉、腹痛等等，通常將它們廣泛的定義為腹瀉性大腸菌 (Diarrheagenic *E. coli*；DEC) [1,2,3]。這些帶有致病性的大腸菌與特定的血清型有關 (表一)，依照其血清型與致病因子 (virulence factor)目前至少有 5 大類已被定義出來，各類均包含了各種不同特定的 O 與 H 抗原，它們分別為：(1) enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)或稱為 shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) (2) enterotoxigenic *E. coli*

(ETEC) (3) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (4) enteroinvasive *E. coli* (EIEC) (5) enteroaggregative *E. coli* (EaggEC)等五種 [13]。

EHEC 可說是腹瀉性大腸菌中最重要的一種致病菌，其中以血清型 O157:H7 以及 O157:nonmotile (NM) (合稱作 O157 STEC)較常引起人類的腹瀉症。它們會產生一種或是一種以上的 Shiga-like toxin (STX)或稱爲 verocytotoxin，而此類毒素又可被細分爲 2 類即 STX1 與 STX2 [4]。它引起人類疾病之症狀由輕微的不帶血腹瀉症、較嚴重之血便症狀 (hemorrhagic colitis)以及嚴重之出血性尿道感染症 (HUS)包括微小血管出血性貧血以及急性腎衰竭等。在北美以及歐洲，每年大約有 73,000 個感染案例，而約有 60 個由 O157 STEC 引起的死亡案例 [1]，除了 O157 STEC 之外，許多非 O157 之其它血清型 EHEC 也都與腹瀉症或是 HUS 有關。ETEC 爲開發中國家引起人類偶發性腹瀉症 (尤其是小孩)的一個重要致病菌，同時它也是旅行者腹瀉 (traveler’s diarrhea)的重要元兇之一 [5]，感染症狀由輕微的水瀉至嚴重腹瀉均有。除了偶發性感染之外，ETEC 也常藉由污染飲食引起學校、餐廳、或是軍隊中的集體感染 [6,7]。它的致病機轉是會產生熱穩定 (heat-stable, ST)與熱敏感性 (heat-labile, LT)的 2 種腸毒素 (enterotoxin)。目前世界各國對此菌的感染通報率均不高。

爲了提昇腹瀉性大腸菌的檢驗能力，近年來已慢慢朝向利用其生物表現型 (phenotype)或致病因子來作爲其鑑定的另一項依據。它主要是利用傳統培養後在培養基上得到的單一菌落以細胞培養、免疫法或是 PCR 與墨點法等來偵測其特有與毒性相關的因子包括毒素、與侵入性等。例如 ETEC 的偵測以往利用特殊的免疫法如 EIA 或吸附法來偵測 ST 與 LT 毒素的產生與否 [8]、EPEC 需要利用細胞培養以及免疫螢光顯微鏡 [8,9]、EaggEC 則需要觀察其特有對 Hep-2 細胞的黏附現象等等 [8]。這些方式皆需要很專業的訓練與經驗，而且目前已上市之現用鑑定套組均集中在 O157 STEC 的部分，對於另 4 類的 DEC 並無積極研發的動作，若自行準備相關之試劑與耗

材則相當耗時，因此更快速以及準確之腹瀉性大腸菌分子生物診斷法之研發近年來愈趨重要。由於 DEC 的毒性因子皆由 DNA 層面控制其表現，包含在染色體、質體或是噬菌體 (phage)DNA 等，因此以基因序列爲標的物的 PCR 診斷方法，有被積極開發的必要性。

先前的不少研究已針對 5 大類的 DEC 找出其特定致病因子的基因標的，以傳統 PCR 的方式設計引子放大出該基因片段，並將 PCR 增殖過後的 DNA 片段以洋菜膠電泳進行分析來作爲區分鑑定的證據。這些標的物分別爲 EHEC 可製造兩種 verotoxin 的 *stx1* 和 *stx2* 基因 [1,10]、ETEC 可製造 ST 與 LT 毒素之兩個基因 [1,10,11]、EPEC 的細胞黏附相關因子(intimin 和 EPEC adherence factor [EAF])的兩基因 [1,10]、EIEC 之兩個細胞侵入相關因子 *ipaC* 和 *ipaH* 兩基因 [1,10]以及 EaggEC 之 CVD432 DNA 特定序列 [1,10]等。隨著即時 PCR 技術的日漸成熟，傳統 PCR 已漸不敷使用，除了無法明確地將大小相近之增殖產物於洋菜膠上清楚的區分開來之外，也因所需時間較長的緣故無法應付集體感染的大流行案件，雖然除了 O157 STEC 之外目前其餘 4 類之大流行案件較少見，但本局身爲國家級防疫的最高單位，確實必須具備成熟之腹瀉性大腸菌之快速檢測流程，以應付突如其來的爆發疫情。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。此方法可以電腦即時地分析而省去洋菜膠電泳的步驟，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。

本研究的重點是希望倚重即時 PCR 之高敏感性以及特異性，在短時間

之內，將症狀符合的腹瀉患者檢體培養過後的可疑大腸桿菌菌株進行二類腹瀉性大腸菌的鑑定區分。爲達此目的疾管局細菌實驗室建立一套以即時 PCR 快速診斷 ETEC 以及 EHEC 的流程。檢測的標的物爲此 2 類大腸菌的毒素基因，期望能夠改善以往此菌在臨床上被低估的情形，對於群聚之大流行感染相信也可輕鬆應付。

材料與方法

(一) 菌種與檢體來源

ETEC 以及 O157 等由日本岐阜大學提供 (表二)。測試 PCR 專一性所用之腸內菌菌株 (表二)均爲臨床分離株。此系統的檢測適用對象以由各地區醫療院所、衛生局、定點醫師所送驗之急性腹瀉、腹痛患者之棉棒或糞尤其是霍亂、傷寒、沙門氏菌屬、痢疾桿菌、金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌檢驗結果皆爲陰性的檢體所培養出之大腸桿菌菌株爲主。

(二) 大腸桿菌之分離與培養

將患者之肛門拭子或是糞便檢體直接接種於 MacConkey agar 或是 MacConkey sorbitol agar 中，置於 35℃培養 18-24 小時，挑選可疑菌落利用 triple sugar iron agar (TSIA)與 lysine iron agar (Creative Micro, Ltd)檢出大腸菌。

(三) 細菌 DNA 之萃取

將大腸桿菌於 35℃次培養在 5 mL TSB 或 BHI 培養液 (Creative Micro, Ltd)18~24 小時後，以 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN；Cat. No. 51304)萃取細菌的染色體 DNA。

(四) 即時 PCR 試驗

(1) 即時 PCR 引子、探針、試劑與反應條件

腹瀉性大腸菌ETEC使用之PCR引子與探針，是自行根據其毒素基因

序列設計而來 (表三)。而EHEC之引子與探針序列則是參考文獻[4]。它們分別增殖出ETEC之*lt*、*st*與EHEC之*stx1*、*stx2* 毒素基因片段。*lt*與*stx2*之探針標定上Red 640 螢光劑，*st*與*stx1*則爲Red 705 螢光劑 (表三)。本研究使用Roche LightCycler 1.0 之儀器並配合Roche LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybPROBE (Cat. No. 03 515 575 001) 之DNA定量PCR試劑。PCR反應總體積爲 20μL，內含 1μL無菌水、10μM之引子各 1μL、1μM探針各 4μL、4μL LightCycler FastStart DNA MasterPlus HybProbe 5X conc. reagent以及 5μL 模板DNA。ETEC *lt*與*st*的反應條件爲 (1) Denature：95℃ 10 分鐘；(2) Cycling： 95℃ 5 秒、50℃ 7 秒、72℃ 10 秒 45 個循環；(3) Cooling：40℃ 45 秒。EHEC *stx1* 與*stx2*則爲 (1) Denature：95℃ 10 分鐘；(2) Cycling： 95℃ 5 秒、56℃ 7 秒、72℃ 18 秒 45 個循環；(3) Cooling：40℃ 45 秒。反應總時間約 60 分鐘。

(2) 即時 PCR 之靈敏度 (sensitivity)測試

將菌株 No.1063 以及 No.1061 在 35℃培養於 5 ml BHI 培養液，取 0.1 ml 培養液計算其中所含的菌落數目，並另取 0.1 ml 培養液利用 QIAamp DNA mini kit 萃取 DNA，之後以該 DNA 及其 10 倍序列稀釋後的各倍數 DNA 作爲模板，進行一系列即時 PCR 分析。利用電腦計算出該 DNA 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，作爲日後各 Cp 值定性與定量之參考標準。

結果

一、即時 PCR 反應結果與其特異性

利用 *Bacillus cereus*、*Salmonella typhi*、*Salmonella paratyphi*、*Shigella flexneri*、*Vibrio parahemolyticus* 經純化過的染色體 DNA 分別針對 ETEC 之 *lt*、

st 與 EHEC 之 *stx1*、*stx2* 進行即時 PCR 的特異性測試。結果 (表四)顯示 ETEC 的 *lt*、*st* 僅在本身有陽性訊號出現而其它菌種均無，EHEC 之 *stx1* 與 *stx2* 也有類似反應結果。將上述即時 PCR 的產物以洋菜膠電泳分析，4 組反應之陽性產物均有預期之毒素基因片段 (*lt* 248 bp、*st* 149 bp、*stx1* 418 bp、*stx2* 246 bp)。

二、ETEC 之 *lt*、*st* 即時 PCR 試驗的敏感性與定量線性區間

爲了決定此偵測系統之敏感度與Cp值的可信賴區間，將已知菌量之ETEC染色體DNA進行一系列 10 倍序列稀釋 (10^0~10^{-7})，並將稀釋後的各倍數DNA作爲模板以即時PCR分析。結果顯示*lt*基因的Cp值於 15.81 至 39.05 之間具有線性關係 (圖一A)，此線性區間涵蓋 7 個 10 倍稀釋倍數點。而*st*基因的Cp值於 17.06 至 39.83 之間具有線性關係 (圖一B)，線性區間同樣涵蓋 7 個 10 倍稀釋倍數點。對照每一稀釋倍數菌落數目計算後的結果，得出ETEC *lt*與*st*基因偵測的敏感度均至少在 3.3~3.3 x 10^6 CFU / 每PCR反應，檢測所需時間約 58 分鐘。

三、EHEC 之 *stx1*、*stx2* 即時 PCR 試驗的敏感性與定量線性區間

利用與上述相同的方法，顯示EHEC之*stx1* 毒素基因的Cp值於 17.43 至 37.93 之間具有線性關係 (圖一C)，此線性區間涵蓋 7 個 10 倍稀釋倍數點。而*stx2* 基因的Cp值於 15.69 至 41.10 之間具有線性關係 (圖一D)，線性區間同樣涵蓋 7 個 10 倍稀釋倍數點。對照每一稀釋倍數菌落數目計算後的結果，可得出STX1 與STX2 毒素基因偵測的敏感度至少在 1.4~1.4 x 10^6 CFU / 每一PCR反應，檢測所需時間約 67 分鐘。

討論

要區分病原性與非致病性大腸桿菌，在臨床上一直存在著困難性，由於先前已提及前者與特定的血清型有關，因此傳統上以菌落培養出來後之生化鑑定 (biochemical identification)與血清型別分析 (serotyping)等方法進行

DEC 的鑑定，但這些方法存在很大的限制性。5 大類的腹瀉性大腸菌中，除了 O157 STEC 可利用其在 sorbitol MacConkey (SMAC)培養基上之特殊型態初步區分之外，其餘 4 類的菌落外觀皆類似 [1,2]，而生化反應的特性同樣除了 O157 STEC 之外，其餘 4 類仍相似，並無法利用它將 ETEC、EPEC、EIEC 與 EAEC 互相區分開來。血清型別鑑定雖可以藉由凝集試驗定出某菌種特定 O 與 H 抗原，但各具致病性之大腸菌的許多血清抗原往往相當類似 [10]，有出現僞陽性結果的可能性，因此仍缺乏強有力的證據證明該菌種確實具致病性 [10]。此外，由於作菌種分型所需採用之抗血清種類繁多，除了利用血清鑑定出 O157：H7 之外，一般的醫療檢驗機構往往礙於金錢成本並無法將所有的抗血清組合準備齊全，加上目前市售之檢驗試劑仍不普及，因此一般臨床檢驗室不作大腸桿菌之區分鑑定，而是把分離出來之可疑菌株委託較大型的參考實驗室 (reference laboratory)進行後續的鑑定工作。

疾病管制局站在防疫的立場，對改善此一問題有其急迫性，於是細菌實驗室先從 5 類腹瀉性大腸菌中較常見的 ETEC 與 EHEC 著手，建立快速且準確之即時 PCR 偵測系統。首重之目標是希望倚重此方法之高敏感性以及特異性，在短時間之內，將查不出特殊致病菌的腹瀉症候群例如霍亂、傷寒、沙門氏菌屬、痢疾桿菌、金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌等皆爲陰性的患者檢體，由其培養出的疑似菌落中進行此兩大類病原大腸菌的檢測，藉以初步了解此兩類致病菌在腹瀉感染症所扮演的角色。至目前爲止，已成功達成直接由疑似菌落 DNA 檢測 4 種毒素基因。由於在設計引子時刻意將其 *Tm* 值均定在 50~55℃附近，因此 ETEC 與 EHEC 的各 2 種毒素基因可以分別在同一個 PCR program 中完成檢測，整個過程所需耗費的時間約爲 60 分鐘 (45 個循環)。本研究未來也會將檢測系統推廣至 EPEC、EIEC 以及 EaggEC 等另 3 類腹瀉性大腸菌之篩檢。此外也預計將同一菌種之各種毒素或是毒性因子於同一個 PCR 反應管中進行 (multiplex)，期望能夠在檢體收件之後，在最快的速度之內將檢測結果呈現出來，使本局儘早做相關的防疫措施。

在決定各毒素基因之 PCR 反應靈敏度時，*lt*、*st*、*stx1*、*stx2* 其最低倍數之 Cp 值分別為 39.05、39.83、41.97 以及 37.93。當以此系統進行 45 個循環之即時 PCR 偵測 4 種毒素基因時，可以上述 4 個 Cp 值作為定性與半定量分析的的臨界值，而當各反應所得到的 Cp 值小於臨界值時，可直接判定為陽性並可藉由定量曲線以內插法的方式計算出檢體中所含的菌量，至於當 Cp 值大於臨界值時仍需以電泳分析產物做輔助確認後方可作定性分析判定為陽性。

結論

本即時PCR方法的建立可作為細菌實驗室檢驗腹瀉性大腸菌之ETEC以及EHEC的一個新工具。它的敏感度分別約為 3.3~ 3.3 x 10^6 CFU與 1.4~1.4 x 10^6 CFU / 每PCR反應，偵測極限保守估計為 3.3 CFU與 1.4 CFU / 每PCR反應，檢測所需時間約 60 分鐘。此法的實用之處，是可彌補傳統生化區分鑑定之不足更可省去了鑑定時必須操作一連串血清試驗而需花費的人力、財力以及時間成本，對大批菌株例如大流行之鑑定工作上較能輕鬆應付。此外也可對於以往許多找不出致病原之腹瀉案件多提供一項可釐清之可能原因。未來對於另 3 大類腹瀉性大腸菌將比照本研究成果之模式進行，期望可繼續提昇此類細菌之檢驗技術。

參考文獻

1. Teng LJ, Hsueh PR, Tsai JC *et al*. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004, 37: 327-334.
2. Nguyen TV, Le VP, Weintraub A *et al*. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol*. 2005, 43: 755-760.
3. Campos LC, Franzolin MR and Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli*

categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004, 99: 545-552.

4. Bellin T, Pulz M, Gunzer F *et al*. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Clin Microbiol*. 2001, 39: 370-374.
5. Yoshida A, Noda K, Miyata Y *et al*. Bacteriological study of traveller's diarrhoea. 4) Isolation of enteropathogenic bacteria from patients with traveller's diarrhoea at Osaka Airport Quarantine Station during 1984-1991. *Kansenshogaku Zasshi*. 1992, 66: 1422-1435.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne outbreaks of enterotoxigenic Escherichia coli- Rhode Island and New Hampshire. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1994, 43: 81-89.
7. Mitsuda T, Muto T, Yokota S. *et al*. Epidemiological study of a food-borne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 1998, 36: 652-656.
8. Nataro JP and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998, 11: 142-201.
9. Law D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1994, 7: 152-173.
10. Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol*. 2004, 42: 5849-5853.
11. Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *J Clin Microbiol*. 1995, 33: 1054-1059.

12. Reischl U, Youssef MT, Strockbine NA. *et al*. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2004, 42: 4092-4100.
13. 蔡文城：實用臨床微生物診斷學 (Practical clinical microbiology)。九州圖書文物有限公司 (第九版)，民國 94 年；699 頁。

表一、腹瀉性大腸桿菌之各血清型別分類

腸產毒性 Enterotoxigenic (ETEC)	腸病原性 Enteropathogenic (EPEC)	腸侵襲性 Enteroinvasive (EIEC)	志賀氏菌樣毒素產生者 Shiga-like toxin producers(STEC)			
O6:NM	O26:NM	O28ac:NM	O1:NM	O50:H7	O113:H21	O153:H25
O6:H16	O26:H11	O29:NM	O1:H1	O52:H25	O113:H53	O157:NM
O8:NM	O55:NM	O112ac:NM	O1:H7	O55:NM	O114:H4	O157:H7
O8:H9	O55:H6	O115:NM	O2:H1	O55:H7	O114:H48	O163:H19
O11:H27	O55:H7	O124:NM	O2:H5	O55:H10	O115:H10	O165:NM
O15:H11	O86:NM	O124:H7	O2:H6	O73:H34	O115:H18	O165:H10
O20:NM	O86:H2	O124:H30	O2:H7	O75:H5	O117:H4	O165:H19
O25:NM	O86:H34	O135:NM	O4:NM	O82:H8	O118:H12	O165:H25
O25:H42	O111ab:NM	O136:NM	O4:H10	O84:H2	O118:H30	O166:H12
O27:NM	O111ab:H2	O143:NM	O5:NM	O85:NM	O119:H5	O166:H15
O27:H7	O111ab:H12	O144:NM	O5:H16	O86:H10	O119:H6	OX3:H21
O27:H20	O111ab:H21	O152:NM	O6:NM	O88:NM	O120:H19	Orough:H20[a]
O49:NM	O114:NM	O164:NM	O6:H1	O91:NM	O121:NM	ONT:NM[b]
O63:H12	O114:H2	O167:NM	O6:H28	O91:H14	O121:H8	ONT:H1
O78:H11	O119:H6		O18:NM	O91:H21	O121:H19	ONT:H28
O78:H12	O125ac:H21		O18-H7	O100:H32	O125:NM	
O85:H7	O126:H27		O22:H8	O101:H19	O125:H8	
O114:H21	O127:NM		O22:H16	O103:H2	O126:NM	
O115:H21	O127:H6		O23:H7	O103:H6	O126:H8	
O126:H9	O127:H9		O23:H16	O104:NM	O126:H21	
O128ac:H12	O128ab:H2		O25:NM	O104:H21	O128:NM	
O128ac:H21	O142:H6		O26:NM	O105:H18	O128:H2	
O128ac:H27	O158:H23		O26:H2	O110:H19	O128:H8	
O148:H28			O26:H8	O111:NM	O128:H12	
O149:H4			O26:H11	O111:H2	O128:H25	
O153:H45			O26:H32	O111:H7	O132:NM	
O159:NM			O38:H21	O111:H8	O133:H53	
O159:H4			O39:H4	O111:H30	O141:NM	
O159:H20			O45:NM	O111:H34	O145:NM	
O166:H27			O45:H2	O111:HNT	O145:H25	
O167:H5			O48:H21	O112:H21	O146:NM	
O169:H41			O50:NM	O113:H2	O146:H21	
				O113:H7		

NM, nonmotile; NT, not typeable; Orough, O antigen rough and serotype not determined.

本圖出自蔡文城：實用臨床微生物診斷學 (Practical clinical microbiology)第九版，民國 94 年；699 頁。

表二、即時 PCR 各測試菌之編號、菌種與來源

菌株編號	菌種	來源
1061	*Escgerichia coli O157*	*1997 Gifu case
1063	*Enterotoxigenic Escgerichia coli*	WHO 112
34	*Shigella flexneri*	Clinical isolated
15	*Salmonella typhi*	Clinical isolated
18	*Salmonella paratyphi*	Clinical isolated
10	*Bacillus cereus*	Clinical isolated
11	*Vibrio parahemolyticus*	Clinical isolated

* 菌株編號 1061 來自日本岐阜大學於 1997 年所分離之臨床株，而編號 34、15、18、10 與 11 則是台灣疾病管制局細菌室之臨床分離株。

表三、即時 PCR 使用之引子以及探針序列

Primer or probe	Sequence (5'-->3')	Function	*Tm* (℃)
Primers			
LTS	TTT GTC AGA TAT GAT GAC GGA	Sense	50.6
LTA	TCA CAC CAA AAT TAA CAC GA	Antisense	50.9
STS	GAT GCT AAA CCA GTA GAG TCT TC	Sense	50.7
STrevshort	CCG GTA CAA GCA GGA TT	Antisense	59.1
StxA1 598	AGT CGT ACG GGG ATG CAG ATA AAT	Sense	60.2
StxA1 1015	CCG GAC ACA TAG AAG GAA ACT CAT	Antisense	58.7
StxA2 679	TTC CGG AAT GCA AAT CAG TC	Sense	55.9
StxA2 942	CGA TAC TCC GGA AGC ACA TTG	Antisense	58.4
Probes			
LT FL	ATT AGG CGT ATA CAG CCC TCA CCC-FL	FL probe	62.2
LT LC	**640**-TAT GAA CAG GAG GTT TCT GCG TTA GGT G-p	LC probe	64.4
ST FL	AAA GTG GTC CTG AAA GCA TGA AT-FL	FL probe	57.5
ST LC	**705**-GTA GCA ATT ACT GCT GTG AAT TGT GTT G-p	LC probe	61.3
StxA1 FL	CTG TCA CAG TAA CAA ACC GTA ACA TCG CTC-FL	FL probe	65.5
StxA1 LC	**705**-TGC CAC AGA CTG CGT CAG TGA GGT-p	LC probe	67.3
StxA2 FL	MAG AGC AGT TCT GCG TTT TGT CAC TGT CA-FL	FL probe	65.6
StxA2 LC	**640**-AGC AGA AGC CTT ACG CTT CAG GC-p	LC probe	63.3

表四、4 種毒素基因即時 PCR 之特異性分析

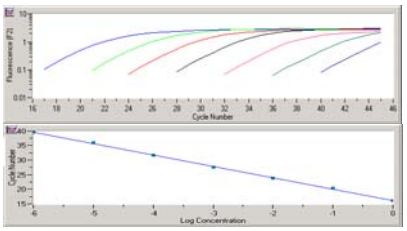
Organism	Real-time PCR result			
	LT	ST	STX1	STX2
Escgerichia coli O157 No. 1061	-	-	+	+
Enterotoxigenic *Escgerichia coli* No. 1063	+	+	-	-
Shigella flexneri	-	-	-	-
Salmonella typhi	-	-	-	-
Salmonella paratyphi	-	-	-	-
Bacillus cereus	-	-	-	-
Vibrio parahemolyticus	-	-	-	-

符號 + 表示即時 PCR 結果爲陽性，且產物經電泳分析及 DNA 序列確認之程序。

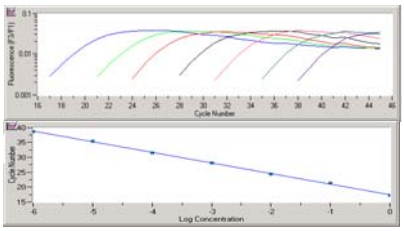
符號 - 表示即時 PCR 結果爲陰性，電泳分析並無任何 DNA 片段出現。

圖一、四種毒素基因之檢測靈敏度分析

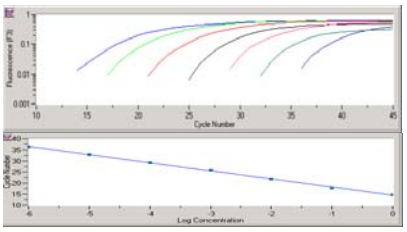
(A) ETEC *lt*



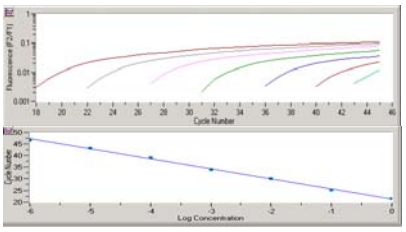
(B) ETEC *st*



(C) EHEC *stx1*



(D) EHEC *stx2*



(A)~(D)各圖上半部爲各 10 倍序列稀釋濃度模板之 PCR 循環數與螢光讀值關係圖。下半部爲各濃度之對數值與 PCR 循環數之關係圖，即『標準曲線(standard curve)』。(A)~(D)圖之標準曲線均有 7 個點具線性關係。