

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-124516

衛生福利部疾病管制署 107 年度科技研究發展計畫

全自動核酸偵測平台開發與應用

研究報告

執行機構：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林智暉

研究人員：謝宗廷、吳靜怡

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目錄

目錄.....	2
中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
壹 前言.....	5
貳 材料與方法.....	12
參 結果.....	24
肆 討論.....	26
伍 結論與建議.....	28
陸 重要研究成果及具體建議.....	28
柒 參考文獻.....	30
捌 圖、表.....	33

中文摘要

關鍵詞：腹瀉、病原、定量即時聚合酶鏈鎖反應

健保資料統計我國近 2 年因腹瀉門急診平均每萬人口每周就診率約 3.5；本署目前腹瀉病原相關通報檢驗，包括法定傳染病及腹瀉群聚症狀通報，以及配合特殊疫情之擴大調查群聚案件。依腹瀉症狀送驗的個案，有 35% 以上依現階段通報監測病原項目檢驗結果仍為陰性，為使疾病防治更加完整，以及協助群聚調查，有必要釐清陰性個案的致病原，以切確進行防治工作。近年來由於全球化趨勢，使得各種傳染病病原體變異及傳播速度更勝以往，造成新興疾病的突發，必須在疫情初期即時以多樣標的化的檢測方法，正確地偵測找到病原體，疾病才能有效控制。然而，目前腹瀉病原的常規檢驗項目，仍無法應付這種環境變化，為防疫目的開發新的檢驗項目是必要的趨勢，而為了在有限的量能，以及從有限的採樣檢體中檢測更多種類的腹瀉致病原，同時符合檢驗之即時性，本研究利用已廣泛應用於檢驗研究使用的定量即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)系統平台，開發整合性的即時性檢測方法；實驗設計利用以定量即時聚合酶鏈鎖反應原理，偵測 18 種常規及新興的腹瀉相關病原及致病基因，並將各病原項目進行多重整合，以便在同一反應中可同時偵測多種病原，並達到快速檢驗以協助疫情控制目的。

英文摘要

keywords : Diarrhea , pathogen , real-time PCR

The nationwide weekly proportion of emergency visits for acute diarrhea is over 3.5% in Taiwan. The diarrhea specimens we accept are from two sources , one is cases with mandatory infectious diseases , and the other is cases involved in diarrhea outbreak. More than 35% of the cases were examined as no pathogen. To control the possibly existed disease , we should figure out if there was any other undetectable pathogen existed in those negative specimens. Due to the globalization , many infectious pathogens changed fast and spread widely than ever. This make newly emergency infectious disease occurred unexpectedly , we should detect the emergency pathogen at the first timing , and then the disease can be under control. However , the current examinations are not enough to overcome such environmental changes , new examinations should be developed. To examine multiple diarrhea pathogens at same time , development of combined real-time detection platform is a good strategy. We will take advantage of quantitative real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) to detect at least 18 kinds of conventional and emerging pathogens associated with diarrhea , and combine these reactions to multiplex assay on a platform. By doing this, we can confirm the result rapidly to assist in epidemic control.

壹 前言

1 腹瀉疾病的檢驗現況

從本署委託國衛院以健保資料庫分析我國急性腸胃炎發生狀況之研究報告，於 2001-2014 年期間，我國因急性腸胃炎就醫之每年發生率約 15,000~20,000/ 100,000 人，就醫人口以小於 5 歲以下孩童較高，並近年有微幅上升的趨勢；另近 2 年因腹瀉門急診平均每萬人口每周就診比率每週均在 3.5% 之上(1)；通報本署腹瀉病原相關檢驗，包括法定傳染病及腹瀉群聚的通報管道。依據傳染病防治法第三條規定，法定傳染病係由中央主管機關依致死率、發生率及傳播速度等危害風險程度高低分類之疾病，並經行政院公報公告之。其中與腹瀉疾病相關之項目包括第二類傳染病：霍亂、傷寒、副傷寒、桿菌性痢疾、腸道出血性大腸桿菌感染症等。上述的致病原，在符合疾病的病例定義下，以法定傳染病送驗。

腹瀉群聚通報包括食品中毒案件，適用於出現腹瀉症狀的群聚事件，檢驗項目除了原有的法定傳染病病原如霍亂弧菌、腸道出血性大腸桿菌感染症、桿菌性痢疾外，還包括了國內常見的腹瀉致病原如腸炎弧菌、沙門氏菌、金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌、諾羅病毒、輪狀病毒，這些病原的檢驗方式，細菌病原以培養為主，病

毒病原檢測以酵素免疫反應法檢測病毒抗原或 PCR 檢驗為主。但目前市售整合型腸道病原檢測試劑，仍以臨床醫院端常見病人感染病原項目為主，並未涵蓋通報之法定傳染病病原(如霍亂、桿菌性痢疾等)、食品中毒事件常見病原(如金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌、諾羅病毒等)，或新興腸道病原項目。

2 腹瀉疾病的流行現況及發展需求

近年(1981年~2011年)食品中毒事件統計資料如表一，在已知原因的案件中，以細菌性病原所佔比例最高，包括腸炎弧菌、金黃色葡萄球菌、沙門氏菌等。另依疾病管制署資料，我國近年在非法定傳染病之腹瀉疾病中，以諾羅病毒所造成之群聚疫情最為常見，全年都有通報確認群聚事件，而在氣溫較低的冬天與初春，病例數明顯急遽增多，經常造成學校及人口密集機構之群聚事件。依疾病管制署腹瀉群聚通報結果(2, 3)，檢出諾羅病毒引起的群聚事件高於39%，近幾年逐年增加更超過50%，並常發生在學校、人口密集機構，或國人常出現的旅遊景點發生大型群聚事件。雖歷年統計資料顯示這些常規檢驗項目仍為國內盛行率最高的病原，但由腹瀉群聚檢驗資料來看，仍有超過35%無法確認病因(2, 3)，並由衛生單位聯合本署進行疫情之擴大調查，因此有必要開發並新增病原檢驗

項目。

近年來氣候環境變化劇烈及全球化趨勢，使得各種傳染病病原體變異及傳播速度更勝以往，如何於疫情初期即時而正確地偵測未知病原體，釐清其傳播路徑及感染原，以針對疾病進行有效控制，已成為跨國公共衛生相關部門或研究領域熱切關注的議題。然目前的腹瀉病原的檢驗項目或方法，恐無法應付這種環境或病原變化，為了在有限的量能下檢測更多種類的腹瀉致病原，我們將開發多重病原核酸檢測方法，以腹瀉症狀為基礎之整合性檢測。

腹瀉病原的分子診斷法較傳統方法有較高敏感度及產出，其中較為關鍵的步驟為糞便核酸的萃取,包括打破菌體及純化的階段，市售套組打破菌體的方式有磨碎法及化學法(4, 5)，我們將測試這些方法的效能，純化的方式目前市售商品常用的有磁珠系統或是管柱方式，在之前的實驗中，我們發現管柱法敏感度較低但有較低的偵測極限，因此擬採用管柱純化。偵測方式是分子診斷的另一關鍵，考量用於群聚通報之病原即時篩檢，將以實驗室目前已穩定使用的 Real-time PCR 儀器，利用 Real-time PCR 檢驗方法經分項病原測試後再配對整合，目標為將多樣病原反應建立為同一整合偵測平台。在本研究使用實驗室常見的 Real-Time PCR System 平台，該平台已

廣泛使用於相關檢驗與研究開發，除可設計單獨項目檢測分析，也可整合多種單項進行多重分析。可以僅以單一檢體用於多重項目之檢測以減少操作人力；並可減短檢測全部病原的時程。

本計畫預計先將國內最常見的腹瀉病原(現行的常規檢驗項目)，與國外常見但在全球化的環境下有可能傳入國內的，或是氣候變遷造成新興再浮現的病原，整合在一個多重檢測平台，因此預定將納入以下的檢驗項目：

1 致病性大腸桿菌

目前的常規通報檢驗只有出血性大腸桿菌，但自 2008 年至 2014 年，所有通報的案件均排除為 EHEC，但這些案件很有可能是其它病原性大腸桿菌引起，如 EAEC、EPEC、ETEC、EIEC。這些病原性大腸桿菌雖然不如 EHEC 會引起大量血便及嚴重的溶血性尿毒症，但仍會造成程度不一的腹瀉。EAEC 主要是散發性的感染兒童(6)，會造成 14 天以上的持續腹瀉，也有可能造成成人的食物中毒；ETEC 主要是造成兒童腹瀉及旅行者腹瀉，因具有熱穩定毒素(ST)，易造成大流行，在孟加拉淹水過後，ETEC 與霍亂弧菌同時大流行；典型的 EPEC 最常造成新生兒腹瀉，但近來發現了非典型株，感染成人會引起類似 EHEC 的症

狀，可能發展成新興突發的病原；EIEC 腹瀉，大部份出現衛生條件不佳的開發中國家，造成地區性流行，也會引起旅行者腹瀉，但 2014 年，歐洲也發現 EIEC O96:H19 引起的群聚感染，顯示 EIEC 也是有高傳染力的型別(7)。各種類型的大腸桿菌的分類以血清型別與臨床表現型歸類，檢驗受限於菌種血清型別眾多，目前市售的抗血清套組無法完全涵蓋，另以分子檢測需搭配多套致病基因，以綜合研判感染菌株類別。

2 梭狀桿菌

在美國 CDC 1998-2008 食媒性監測資料中產氣莢膜梭狀芽孢桿菌(*Clostridium perfringens*)引起之細菌性食媒案件高達 1 萬多件確診個案(8)。困難腸梭菌(*Clostridium difficile*)大多因造成院內腹瀉感染而被注意，但近來發現動物包括馬、牛、豬、狗、貓、雞等也存在困難梭狀桿菌，動物分離株與人類分離株有共通的 ribotype 型別如 078、014、020 等型別(9)，因此困難梭菌也可能經人畜共通的傳染而傳染給人類，雖無直接證據證明經食物傳染的關聯性，但在目前已漸漸引起注意。

3 曲狀桿菌

曲狀桿菌是因食用未煮熟的肉類或未正確消毒的乳製品，

會造成血便，腹痛，發燒。在美國是常見的腹瀉病原，依其 FoodNet 的監測，發生率達 14.3/100000，較常見的是散發病例，少見群聚感染(10)。過去在台灣，因缺少常規的監測且因培養不易，病例數少，但在 2014 年的食媒計畫對 5 歲以下兒童以 PCR 方式偵測，發現有 1.4%的分離率，在此監測研究中僅次於沙門氏菌的(10%)，因此有必要放入平台常規偵測。

4 星狀病毒

屬 Astroviridae 科，是單股正 RNA 病毒，常引起急性兒童腹瀉(11)，也與地區性的腹瀉群聚有關(12)，法國巴斯德研究所針對 16 歲以下腹瀉的兒童進行監測，發現在這個族群中，astrovirus 有 2.1%的盛行率，僅次於 rotavirus(38%)和 norovirus(6%)(13)。台灣星狀病毒的感染可見於兒童及食媒性群聚腹瀉，2009 年針對 5 歲以下有腹瀉症狀的兒童的研究發現(14)，星狀病毒的陽性率約在 1.6%，其盛率低於輪狀病毒的 20.2%，引起的症狀也較輕微。2012 年針對腹瀉群聚的檢驗(15)，發現有 18 起為星狀病毒陽性腹瀉群聚，佔 2012 年所有腹瀉群聚案件的 5.9%(18/303)，影響年齡層自 0~70 歲之間皆有感染案例，主要流行季節為春季並只在 2012 前半年，顯示主要腹瀉群聚的

傳播途徑是藉由食媒性引起。

5 沙波病毒

沙波病毒與諾羅病毒均屬於 Caliciviridae 科，是單股正 RNA 病毒，主要引起急性幼兒腹瀉(16)，但近期也發現造成長期照護中心的成人住民群聚感染(17)。沙波病毒感染引起的臨床症狀，相較於諾羅病毒感染的病人，嘔吐與腹瀉症狀均較輕微。雖並未列入台灣腹瀉群聚與食品中毒事件之常規病原檢測項目，但曾於多起腹瀉群聚調查案件中檢出，如 2007 年之某大學學生之群體腹瀉事件(18)，2010 某中餐廳食物汙染及 2011 年某連鎖餐廳生蠔汙染之腹瀉群聚案件等(19)。

6 腺病毒

屬 Adenoviridae 科，是 DNA 病毒，是透過飛沫或接觸傳染的呼吸道病毒，會引起感冒，咽喉炎，支氣管炎，結膜炎及發燒等症狀，但有些型別如 types 31，40，41，52 也會造成腹瀉的腸胃症狀，易感族群的高峯是在 2 歲以下的兒童，易在日間照護中心造成群聚感染，美國的研究發現有 2.9%日間照護中心兒童的腹瀉與 Adenoviruses 有關(20)。

貳 材料與方法

1 菌株及病毒株來源

實驗室原有之購自 ATCC 及 CCRC 之標準菌株，標準病毒株或標準品，及實驗室自臨床檢體分離確認保之細菌株。

2 檢體採集

來自以法定傳染病送驗之臨床糞便剩餘檢體。

3 菌株之分離、鑑定、培養法

腹瀉群聚通報檢驗之細菌項目包括痢疾桿菌、沙門氏菌、腸炎弧菌、霍亂弧菌、仙人掌桿菌、金黃色葡萄球菌、致病性大腸桿菌之分離培養依常規檢驗方法進行分離鑑定(18)。

1 痢疾桿菌(*Shigella* spp.)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體直接塗抹於 SS 或 HE 培養基上，置於 37 °C 培養 18~20 小時後，挑選無色半透明之可疑菌落次接種於 TSIA、LIA、SIM 培養基上，37 °C 培養 18~20 小時，觀察其生化反應特性。生化反應符合 *Shigella* 之菌落，再以 A、B、C、D 亞群多價抗血清作玻片凝集反應決定其菌型。

2 沙門氏菌(*Salmonella* spp.)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體接種於 SS、HE 培養基，

37 °C 培養 18~24 小時後，挑選無色半透明或具有黑色中心可疑菌落，使用接種針以穿刺劃線法接種於 TSIA、LIA 和 SIM 培養基上，37 °C 培養 18~24 小時，觀察其生化反應特性。生化反應符合沙門氏菌、傷寒桿菌或副傷寒桿菌者，先以 poly O 群抗血清進行凝集試驗，如果反應陽性再以個別單一價型 O 型抗血清分別試驗。傷寒疑似菌株(O9 陽性)另需進行 Vi 抗血清的測試。

3 腸炎弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體直接接種於 TCBS 培養基上。除了直接分離培養外，應將糞便、直腸拭子放入含 1 % NaCl 之 Peptone water 內，於 37°C 經 6-15 hr 之增菌培養後，再塗抹在 TCBS 培養基上。置於 37 °C 培養 18~20 小時後，於 TCBS 培養基挑取綠色粘稠的可疑菌落，使用接種環接種於含 1 % NaCl 之 TSA，並使用接種針以穿刺劃線法接種於含 1 % NaCl TSIA 及 LIA，以穿刺法接種於 SIM，置 37 °C 培養箱培養 18 -24 hr 後，觀察其生化反應特性。生化反應符合腸炎弧菌之菌落再以腸炎弧菌 K 混合 I 至 IX 型多價血清作玻片凝集反應。若多價血清為陽性，次以相對應之次因子血清作玻片凝集反應以決

定其型別。

4 霍亂弧菌(*vibrio cholera*)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體直接接種於 TCBS、PMT 培養基上。除了直接分離培養外，應將糞便、直腸拭子放入 Alkaline peptone water pH 8.6 內，於 37°C 經 6-15 hr 之增菌培養後，再塗抹在 TCBS、PMT 培養基上。若是環境檢體取(水)180 mL 加上 20 mL 之 10 倍濃度 Alkaline peptone water (pH 9.2)稀釋成 1 倍液體，充分搖盪混合成檢液，將檢液置於 37 °C 經 6 - 15 hr 之增菌培養後，塗抹在 TCBS、PMT 培養基上。置於 37 °C 培養 18~20 小時後，於 TCBS 培養基挑取黃色扁平透明菌落與於 PMT 培養基挑取鵝黃色菌落如荷包蛋周圍透明菌落，再接種於 Nutrient agar 或 TSA agar 及鑑別培養基 TSIA、SIM、LIA 上，37 °C 培養箱培養 18-24 hr 後執行生化鑑定。生化反應符合霍亂弧菌之菌落再進行血清凝集反應與霍亂弧菌毒素試驗決定菌型與基因型。

5 仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*)

將糞便、嘔吐物以無菌棉花棒沾取或以無菌滴管吸取少許接種於 MYP 培養基上；若是輸送培養基內之直腸拭子則直接接種

於 MYP 培養基上。置於 37 °C 培養 18~24 小時後，觀察有無可疑菌落，如有則進行鑑定，如無則繼續培養及隔日觀察，至少需培養 48 hr。菌落型態挑選淡粉紅色，且有大沉澱環之獨立可疑菌落，進行革蘭氏染色，符合革蘭氏陽性產芽孢桿菌，再次接種於 Nutrient agar plate 或 TSA，37 °C 培養箱培養 18 - 24 hr 後作生化鑑定。生化反應符合仙人掌桿菌之菌落即判定為仙人掌桿菌。

6 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體接種於 BP 培養基上，於 37 °C 培養 24~48 小時後，觀察有無可疑菌落。挑選黑色發亮、圓弧隆起且具透明環之獨立菌落，作革蘭氏染色，符合革蘭氏陽性呈堆狀或葡萄狀球菌，再次接種於 TSA agar，於 37 °C 培養箱培養 18~24 小時後作生化鑑定。如無可疑菌落則至少繼續培養 24 小時至隔日觀察。金黃色葡萄球菌陽性判讀標準如下：

- (1) 符合革蘭氏陽性堆狀或葡萄狀球菌。
- (2) Catalase test 陽性。
- (3) Staphylase 試驗陽性或 API ID 32 STAPH 生化鑑定套組反應結果為金黃色葡萄球菌者。若其中有一不符合者，即判定為金黃色葡萄球菌陰性。當檢驗確認為金黃色葡萄球菌後,再以

RPLA 方式進行腸毒素試驗，檢測該菌株是否產生腸毒素。

7 病原性大腸桿菌(pathogenic E. coli)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體直接塗抹於 MacConkey 培養基上，置於 37 °C 培養 18~20 小時後，挑選紅色且周圍有沉澱之可疑菌落次接種於 TSIA、LIA、SIM 培養基上，37 °C 培養 18~20 小時，觀察其生化反應特性。生化反應符合大腸桿菌之菌落，先以病原性大腸桿菌 poly O 群抗血清進行凝集試驗，如果反應陽性再以個別的 O 群抗血清分別試驗定出其 O 血清型。

8 曲狀桿菌

檢體塗於 Campy agar，在微需養環境(O₂ 含量 6~12%，CO₂ 含量 5~8%)42 °C 培養箱培養 48 小時，選取灰色有光澤，看起來像水滴之菌落以 PCR 鑑定 23 rRNA 基因，若被增幅出一段 650 bp 大小的片斷，則為 *Campylobacter* spp.。

9 困難腸梭菌

檢體塗於 Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar (Oxoid, Hampshire, UK)，在厭氧環境培養 37°C 48 小時，細菌病原之保存，挑選黃色菌落，以 PCR 鑑定 *tpi* 基因，若增幅出 230 bp 大小片斷，判

定為陽性，其毒素基因 *tcdA*，*tcdB* 也以 PCR 方式鑑定。

10 產氣莢膜梭狀桿菌

檢體塗於 TSC Agar (Oxoid, Hampshire, UK)，在厭氧環境培養 37°C，24 小時，挑選有白色沉澱環之菌落，以 PCR 鑑定 16S 基因，若增幅出 279 bp 大小片斷者，判定為陽性，其毒素基因 *cpa*，*cpb*，*cpe*，*b2*，*etx*，*ipa* 等，則依的方式鑑定。

4 菌株之保存

困難腸梭菌以厭氧的孔珠保存管(Protect Select – Anaerobes, TS/73-AN 80)，其它菌株以 15% glycerol 保存，均置於-80°C。

5 病毒鑑定法

輪狀病毒及諾羅病毒依常規檢驗方法進行分離鑑定(21)。

1 輪狀病毒

引子設計選擇 A 群輪狀病毒非結構性蛋白 NSP3 基因片段中核酸序列高穩定區，引子對及探針序列如表一，反應產物 87bp。Real-time RT-PCR 為單步驟反應，反應總體積 25 μ L，加入 5 μ L 病毒 RNA 抽取液，及混合液內含 5 μ L 5 \times TaqMan EZ 緩衝液 (Applied Biosystems)，3mM MnCl₂，dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 300 μ M，2.5U rTth DNA Polymerase，0.25U AmpErase

UNG，引子均為 200nM，及探針 150nM。反應程序為：60°C 30min，之後進入 45 個循環：94°C 20sec，60°C 1min。結果由 ABI Prism 7000 sequence detector (Applied Biosystems)偵測分析。

2 諾羅病毒

引子設計在病毒之 ORF1-ORF2 junction site 區間，分別設計 Genotype I 及 Genotype II 兩種引子對，RT-PCR 的反應步驟分為兩階段，(1) 反轉錄(reverse transcription)反應：取病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入 3 μ g/ μ l random primer (invitrogen)，於 65°C 5min，再加入 19 μ L 的反轉錄混合液，內含 10mM dNTP，40U RNase inhibitor (Roach)，20U Reverse Transcriptase (Roche)，於 50°C 作用 45 分鐘進行反轉錄反應，合成 cDNA 後保存於-20°C。

(2) PCR 反應：取 2.5 μ L cDNA 為模板，加入 22.5 μ L PCR 反應混合液，內含有 0.625 mM dNTP、2.5U Taq DNA Polymerase，300nM 引子 Genotype I primer (GI-SKF 及 GI-SKR)或 Genotype II primer (GII-SKF/GII-SKR)，反應總體積為 25 μ L。反應程序為：94°C denature 3min，之後進入 40 個循環：94°C 30sec，50°C 30sec，72°C 1min，之後 72°C 加長作用 7 分鐘。

3 沙波病毒

病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M 隨機引子及 2 μ L 20mM dNTP 於 70 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200U 反轉錄酵素

(Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No.

18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、

3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積

為 20 μ L。於 25 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，50 $^{\circ}$ C 50 分鐘反轉錄作用，之

後 85 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。Nest-PCR：病毒分析引子對為 SaV124F、

SaV1F、SaV5F、SV-R13 及 SV-R14。以 RT 產物 2 μ L 為模板，

加入 23 μ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM

KCl、1.5 mM MgCl₂、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen

Cat. No. 10966-034) 及 0.8 μ M 每個分析引子。反應條件：先 95

$^{\circ}$ C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 秒、

annealing 50 $^{\circ}$ C 30 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，共 40 個 cycle，

最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。以第一次 PCR 產物 1 μ L 為模板，

加入 24 μ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM

KCl、1.5 mM MgCl₂、Platinum Taq DNA Polymerase 及 0.4 μ M 每

個分析引子 (1245Rfwd/ SV-R2)。反應條件：95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 45 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘，進行 capsid 基因片段 nest PCR。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 430bp，進一步做序列分析。

4 星狀病毒

病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M 隨機引子及 2 μ L 20mM dNTP 於 70°C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200U 反轉錄酵素

(Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No.

18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM

KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總

體積為 20 μ L。於 25°C 作用 10 分鐘，50°C 50 分鐘反轉錄作用，

之後 85°C 作用 15 分鐘。PCR：病毒分析引子對為 Mon269 及

Mon270。以 RT 產物 2 μ L 為模板，加入 11.5 μ L PCR premix，含

有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、

Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034)

及 0.8 μ M 每個分析引子。反應條件：先 95°C denaturation 作用 5

分鐘，熱循環 denaturation 94°C 1 分鐘、annealing 50°C 1 分鐘、extension 72°C 1 分鐘，共 30 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 449bp，進一步做序列分析。

5 腺病毒

病毒核酸萃取液 2.5 μ L 為模板，加入 12.5 μ L PCR premix，含有 1X PCR Buffer、2.5 unit HotStarTaq DNA Polymerase、200 μ M of each dNTP，及各 5mM Adhex1/Adhex2 分析引子。反應條件：先 95°C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 60°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°C 10 分鐘；將 PCR 產物進行電泳分析。

6 病毒標準品之製作

輪狀病毒及諾羅病毒依 Liu 之方法，在體外轉錄成 transcript，作為標準液(22)。

7 核酸萃取

細菌 DNA 的萃取，依細菌 DNA 萃取套組說明書操作(Tan beed，Taiwan); 糞便 DNA 及 RNA 的萃取，取 0.2 g 糞便，依照糞便 DNA 萃取套組的說明書進行(QiaAmp stool DNA extraction protocol，

Qiagen, Valencia, CA)。並評估建立最適合細菌及病毒共同檢測時之檢體前處理與核酸萃取方式。

8 PCR 引子設計

自 NCBI 網站的下載標的病原基因的序列，利用 Primer 3 軟體針對標的序列設計數個後選引子及探針，後選引子或探針序列與 NCBI 網站上的資料庫比對，去除與人類或其他物種相似的序列，剩下的保留作測試用。

9 反轉錄 cDNA 合成

病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M 隨機引子及 2 μ L 20mM dNTP 於 70 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200U 反轉錄酵素 (Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 μ L。於 25 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，50 $^{\circ}$ C 50 分鐘反轉錄作用，之後 85 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。反應結束後 cDNA 可以保存於-80 度 C 當中。

10 定量即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)

配置總體積 20 μ L 的 PCR 的混合物包含 1 倍的 premix，0.5 μ M of

primers, 0.5 μ M 的探針及 1ng DNA 模板。在即時定量循環偵測系統(Bio-Rad multicolor real-time PCR detection system /ABI 7500 FAST)進行 35 個熱循環:包括 denaturation 95 $^{\circ}$ C 45 秒、annealing 57 $^{\circ}$ C 45 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。

參 結果

1 引子設計

已針對 18 種病原設計一系列引子對，並已實際測試於陽性病原檢體，選出最適用的組別，病原及設計相對應基因及序列(表一)。

2 糞便檢體處理及核酸萃取法

本研究先以定量革蘭氏陽性菌(沙門氏菌)及革蘭氏陰性菌(金黃色葡萄球菌)加入沙門氏菌及金黃色葡萄球菌均陰性的糞便檢體，使最終偵測細菌濃度達到每種菌含 10^3 個/ μL 、 10^2 個/ μL 及 10^1 個/ μL 。並以三種糞便檢體的核酸萃取法(玻璃珠機械式磨碎法(bead beating)、酵素處理法(Enzymatic)、加強酵素處理法(Enhanced enzymatic)做偵測極限測試。比較各組結果，發現無論是革蘭氏陽性菌或革蘭氏陰性菌，以玻璃珠機械式磨碎法及加強酵素法測得的偵測極限較低(表二)、而由增幅曲線來看，以機械式磨碎法的 real-time PCR 效率較佳(圖一)。

3 各目標基因 T_m 值測試

將各目標基因分別確認其 T_m 值，以從細菌標準菌株萃取的 DNA 以及病毒做反轉錄後的 cDNA 作為模板，進行三重複的 real-time PCR 測試後得到其平均 T_m 值，並將得到的 T_m 值由小至大排序(圖

二)，而其中沙波病毒及星狀病毒因其具有 4 種分型，故此處為 4 種分型得到的 T_m 值做平均值的結果，此 T_m 值的排序將作為後續多重組合的配對的參考。

4 多重組合測試

依據各目標基因 T_m 值做多重組合的測試，決定多重組合的方式乃依據下列條件 1.若為目標來自同一病原，則分於不同組合中 2.目標產物的 T_m 值相差 2°C 以上， 3.於多個引子對混合的反應中可讀出顯著單一目標峰值，4.於多個引子對混合的反應中可以讀出多個目標峰值，5.將產物進行 DNA 電泳進行確認為目標產物。並以此可以得到下列 7 種組合(表三)與其多重組合之峰值(圖三)。

肆 討論

本研究擬建立一個以 RT real-time PCR 為基礎的多重檢測平台，希望能讓一個檢體在一次檢驗流程便可同時檢測腹瀉細菌及病毒病原。目前已建立檢體處理及核酸萃取流程，並設計共 18 個病原的 PCR 檢測引子對，並已完成多重組合的測試。

核酸萃取可以分為前處理以及核酸純化兩個部分，前處理相關的市售套組中打碎菌體的方式有磨碎法及化學法。本研究中測試了磨碎法、化學法以及加入 Lysostaphin 的加強化學法，發現以磨碎法敏感度較佳，而核酸純化方式則在先前研究中有比較過磁珠純化法及管柱離心法，發現管柱離心法所得到的核酸經過 Real-time PCR 後所得到的 Ct 值與處理前的細菌量有較佳的線性，因此採用管柱離心法作為核酸純化的方式。

本研究為了同時以 RT real-time PCR 檢測多種病原基因，目前常用的 real-time PCR 偵測方法為使用螢光探針(TaqMan Probes)及 SYBR Green。本次實驗選用 SYBR Green 的優點為不需為目標訂製探針，僅需使用市售 Kit 配合引子對即可，且可利用其產物的 T_m 值來分辨不同目標，缺點為其為非專一性結合，有可能會偵測到因引子錯誤結合所產生的產物。而雖然螢光探針優點為專一性結合，可以大幅提高準確度，但若需同時檢測多種(兩種以上)便需要設計不同的螢光染劑及專用的探針，

多種染劑彼此之間強度不同且會互相干擾，且訂製探針的價格較高，故本研究中暫不使用此一方法。

本研究中先針對目標基因設計一系列的引子對，且利用標準菌株及模擬檢體做對各目標測試 PCR 專一性，藉此選出較佳的引子對並記錄其 T_m 值，再依此 T_m 值做多重組合的測試，決定多重組合的方式乃依據下列條件 1.若為目標來自同一病原，則分於不同組合中(e.g. EPEC 的 *eae* 與 *bfpA*)，以避免引子競爭 DNA 模板而降低增幅效率，2.目標產物的 T_m 值相差 2°C 以上，如此可易於 Melting Curve 上分辨多個峰值，3.於多個引子對混合的反應中可讀出顯著單一目標峰值，4.於多個引子對混合的反應中可以讀出多個目標峰值，5.將產物進行 DNA 電泳進行確認為目標產物。

依條件篩選後將所有目標共分為 7 組，每組的多目標測試的峰值有強弱的差異，在先前的研究中有指出 SYBR Green I 會偏好結合於 G/C 比例較高的 DNA(23)，且較長的產物會結合較多的 SYBR Green I，故其訊號強度會較強，故可能需要做進一步的條件調校。

伍 結論與建議

本研究測試了數個細菌及病毒的核酸萃取法，以磨碎法及管柱純化可獲得較佳的萃取結果，並且設計了多組目標基因的引子對，均可以正確的得到我們所需要的產物。更進一步使用 SYBR Green I 做為 real-time PCR 的檢測方法，因 SYBR Green I 具有較低的試劑成本且可利用不同產物 Tm 值的不同作為判斷依據，並藉此得到各目標產物的 Tm 值後，經過多次實驗後確立了多重組合反應的基因組，並且各個基因組均可以在其 Melting Curve 上獲得顯著的峰值作為判別依據。

Real-time PCR 的檢測方式在本署已具備有現成的儀器，本系統操作複雜度較低，且從處理檢體至完成檢驗所需時間比現行的檢驗方式短，不僅可作為大量常規檢驗使用，也可用作疫情緊急時須即時檢測的案例。由於同時萃取細菌及病毒病原，故可節省人力以及耗材，且因本系統具有模組化概念，不僅可做多個病原檢驗，也可選擇性的選用部分組合，具有相當的檢驗彈性，且若有新興病原出現，僅需額外添加組合即可便進行更多腹瀉病原的檢測。

陸 重要研究成果及具體建議

本研究目前建立了 18 種腹瀉細菌及病毒病原的萃取方法以及利用 SYBR RT real-time PCR 的檢測方法，並確立多重組合的反應條件。

此一平台可適用於常見引起腹瀉細菌性病原(革蘭氏陽性菌、陰性菌、弧菌及厭氧菌)以及病毒性病原(諾羅病毒、輪狀病毒、星狀病毒、沙波病毒及腺病毒)。

柒 參考文獻

1. 疾病管制署全球資訊網公開資訊
<http://nidss.cdc.gov.tw/ch/Default.aspx?op=5>.
2. 疾病管制署. 傳染病統計暨監視年報-102 年. 2014.
3. 疾病管制署. 傳染病統計暨監視年報-103 年. 2015.
4. Panel. LXGP. Available at
<http://www.luminexcorp.com/Products/Assays/ClinicalDiagnostics/xTAGGPP>.
5. Handbook. QcPM. Available at
<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-cador-pathogen-mini-kit/#productdetails>.
6. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(1):142-201.
7. Newitt S, MacGregor V, Robbins V, Bayliss L, Chattaway MA, Dallman T, et al. Two Linked Enteroinvasive *Escherichia coli* Outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(7):1178-84.
8. Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*--United States, 1998-2008. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(3):425-33.
9. Janezic S, Ocepek M, Zidaric V, Rupnik M. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC microbiology*. 2012;12:48.
10. Longenberger AH, Palumbo AJ, Chu AK, Moll ME, Weltman A, Ostroff SM.

- Campylobacter jejuni infections associated with unpasteurized milk--multiple States, 2012. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(2):263-6.
11. Walter JE, Mitchell DK. Astrovirus infection in children. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(3):247-53.
 12. Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, et al. Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(11):4114-20.
 13. Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, et al. Human astrovirus gastroenteritis in children, Madagascar, 2004-2005. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(5):844-6.
 14. Tseng WC, Wu FT, Hsiung CA, Chang WC, Wu HS, Wu CY, et al. Astrovirus gastroenteritis in hospitalized children of less than 5 years of age in Taiwan, 2009. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2012;45(4):311-7.
 15. 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):8.
 16. Lyman WH, Walsh JF, Kotch JB, Weber DJ, Gunn E, Vinje J. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. *The Journal of pediatrics*. 2009;154(2):253-7.
 17. Mikula C, Springer B, Reichart S, Bierbacher K, Lichtenschopf A, Hoehne M. Sapovirus in adults in rehabilitation center, upper Austria. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(7):1186-7.

18. Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, et al. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(7):1169-71.
19. 黃士澤, 吳岫, 吳芳姿, 慕蓉蓉, 羅一鈞, 黃頌恩, et al. 2012 年某連鎖自助餐廳沙波病毒群聚事件. *疫情報導*. 2012;28(21):5.
20. LeBaron CW, Furutan NP, Lew JF, Allen JR, Gouvea V, Moe C, et al. Viral agents of gastroenteritis. Public health importance and outbreak management. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. 1990;39(Rr-5):1-24.
21. 疾病管制署. *傳染病標準方法檢驗手冊*. 2015.
22. Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;50(4):308-13.
23. Giglio S, Monis PT, Saint CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic acids research*. 2003;31(22):e136.

捌 圖、表

表一、各病原及其對應之基因與序列

病原	基因	序列
Salmonella spp.	<i>invA</i>	For : 5'- TCGGGCAATTCGTTATTGG -3'
		Rev : 5'- GATAAACTGGACCACGGTGACA -3'
Vibrio parahaemolyticus	<i>tdh</i>	For : 5'- CAATCAGTATTCACAACGTCAGGTACT -3'
		Rev : 5'- CGCTGCCATTGTATAGTCTTTATCA -3'
Vibrio cholerae	<i>toxR</i>	For : 5'- GTTTGGCGAGAGCAAGGTTT -3'
		Rev : 5'- TCTCTTCTTCAACCGTTTCCA -3'
Bacillus cereus	<i>nhe</i>	For : 5'- TCACGGTGAGWACGTYCTCTATTTT -3'
		Rev : 5'- TGCTGTAACCAATAACCCTGTAATTAA -3'
Staphylococcus aureus	<i>femB</i>	For : 5'- GCTCAGCAAATGCATCACAAA -3'
		Rev : 5'- CACTATATACTGTTGGRTCTTCWGAACCA -3'
Clostridium difficile	<i>tcdB</i>	For : 5'- GGTATTACCTAATGCTCCAAATAG -3'
		Rev : 5'- TTTGTGCCATCATTTTCTAAGC -3'

Campylobacter jejuni	<i>cadF</i>	For : 5'- CTGCTAAACCATAGAAATAAAATTTCTCAC -3'
		Rev : 5'- CTTTGAAGGTAATTTAGATATGGATAATCG -3'
EIEC / Shigella spp.	<i>ipaHc</i>	For : 5'- CCTTTTCCGCGTTCCTTGA -3'
		Rev : 5'- CGGAATCCGGAGGTATTGC -3'
EPEC	<i>eae</i>	For : 5'- CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA -3'
		Rev : 5'- CTCATGCGGAAATAGCCGTTA -3'
	<i>bfpA</i>	For : 5'- TGGTGCTTGCCTTGCT -3'
		Rev : 5'- CGTTGCGCTCATTACTTCTG -3'
ETEC	<i>LT</i>	For : 5'- TTCCCACCGGATCACCAA -3'
		Rev : 5'- CAACCTTGTGGTGCATGATGA -3'
	<i>ST</i>	For : 5'- GCTAAACCAGYAGRGTCTTCAAAA -3'
		For : 5'- TGAATCACTTGACTCTTCAAAA -3'
		Rev : 5'- CCCGGTACARGCAGGATTACAACA -3'
		Rev : 5'- GGCAGGATTACAACAAAGTT -3'
STEC	<i>stx1</i>	For : 5'- ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG -3'
		Rev : 5'- ACAAATTATCCCCTGWGCCACTATC -3'

	<i>stx2</i>	For : 5'- CCACATCGGTGTCTGTTATTAACC -3'
		Rev : 5'- GGTCAAACGCGCCTGATAG -3'
Norovirus GI	ORF1-ORF2	For : 5'- CGYTGGATGCGNTTYCATGA -3'
		Rev : 5'- CTTAGACGCCATCATCATTYAC -3'
Norovirus GII	ORF1-ORF2	For : 5'- CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG -3'
		Rev : 5'- TCGACGCCATCTTCATTCACA -3'
Rotavirus	<i>NSP3</i>	For : 5'- ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG -3'
		Rev : 5'- GGTCACATAACGCCCTATAGC -3'
Astrovirus	<i>Capsid</i>	For : 5'- CAGTTGCTTGCTGCGTTCA -3'
		Rev : 5'- CTTGCTAGCCATCACACTTCT -3'
Saprovirus	RdRp	For : 5'- GAYCAGGCTCTCGCYACCTAC -3'
		For : 5'- TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC -3'
		Rev : 5'- CCCTCCATYTCAAACACTA -3'
Adenovirus	<i>Hexon</i>	For : 5'- GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT -3'
		Rev : 5'- GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC -3'

表二、以金黃色葡萄球菌及沙門氏菌比較不同核酸萃取法之偵測極限

	磨碎法	酵素法	加強酵素法
金黃色葡萄球菌	1.6 CFU	130 CFU	1.6 CFU
沙門氏菌	2.5 CFU	5 CFU	2.5 CFU

表三、7種多重組合配對組合

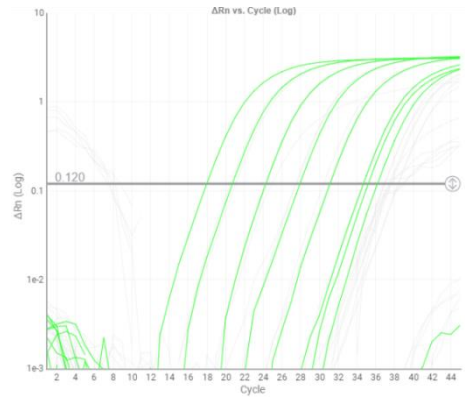
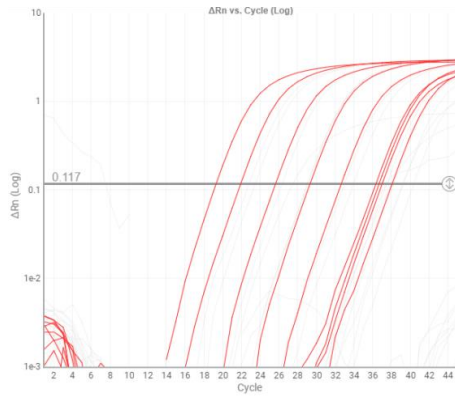
	細菌/病毒	基因	細菌/病毒	基因	細菌/病毒	基因
1	STEC	<i>stx1</i>	EPEC	<i>bfpA</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>
2	STEC	<i>stx2</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	Astrovirus	Capsid
3	EIEC / <i>Shigella</i> spp.	<i>ipaHc</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>tcdB</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>nhe</i>
4	EPEC	<i>eae</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>cadF</i>	Norovirus GI	ORF1-ORF2
5	ETEC	<i>LT</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>toxR</i>
6	Rotavirus	<i>NSP3</i>	Norovirus GII	ORF1-ORF2	Adenovirus	Hexon
7	ETEC	<i>ST</i>	Saprovirus	RdRp		

圖一、以 real-time PCR 比較不同核酸萃取法之效果

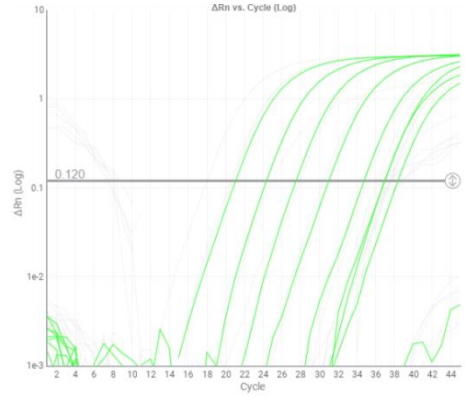
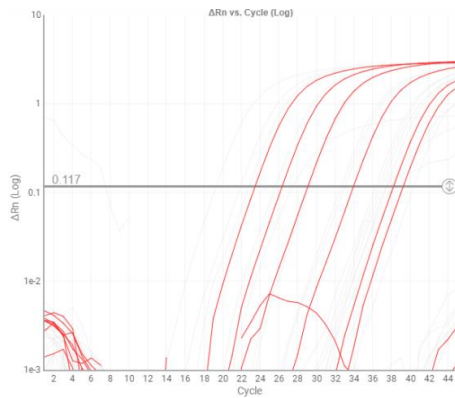
金黃色葡萄球菌

沙門氏菌

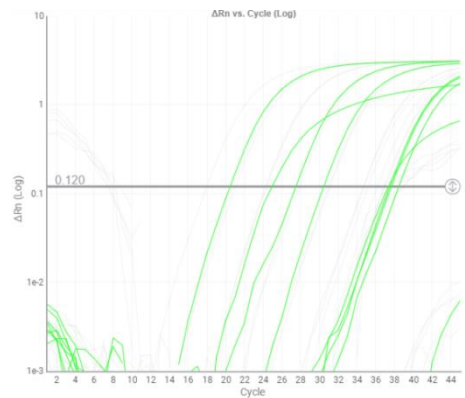
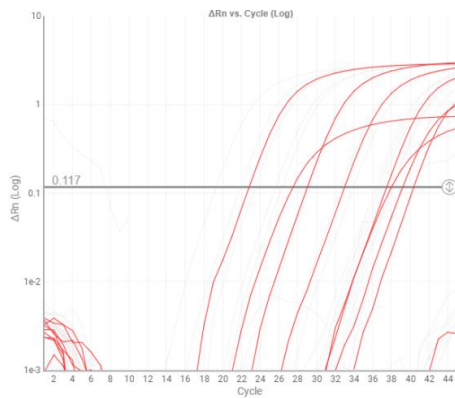
磨碎法



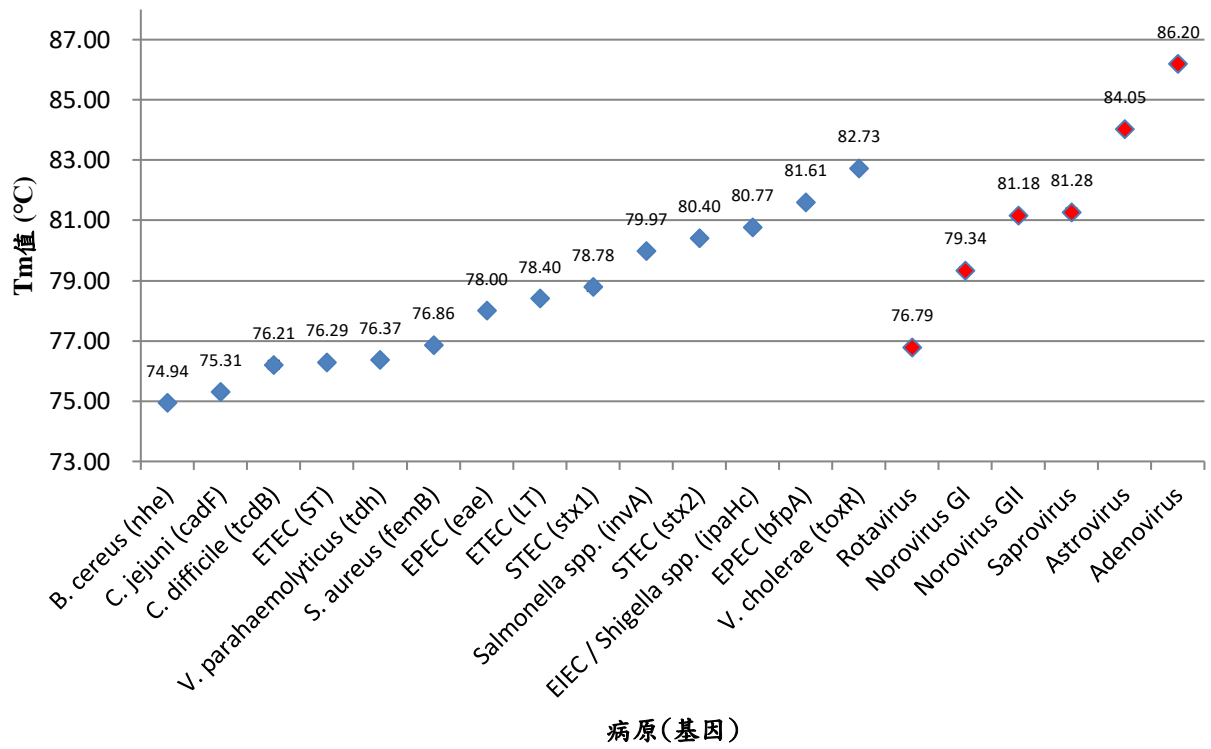
酵素法



加強酵素法

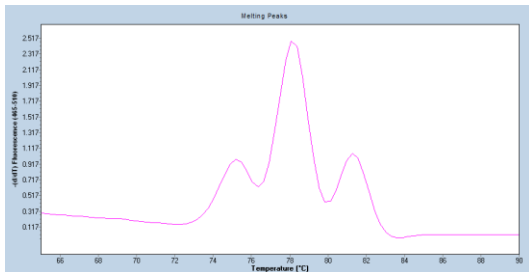


圖二、各目標基因 Tm 值

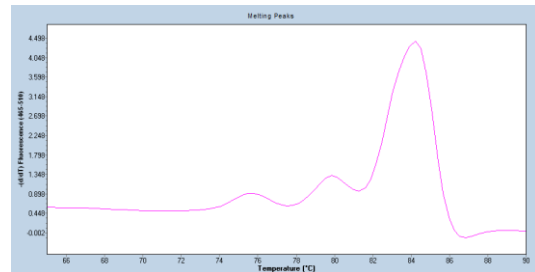


圖三、各組合以 SYBR Green I 進行 real-time PCR 所得到的 Melting Curve

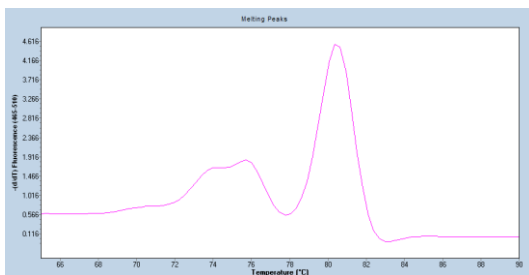
Set 1



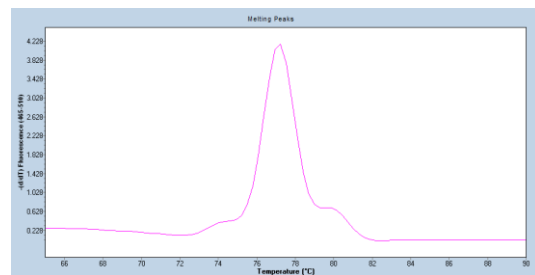
Set 2



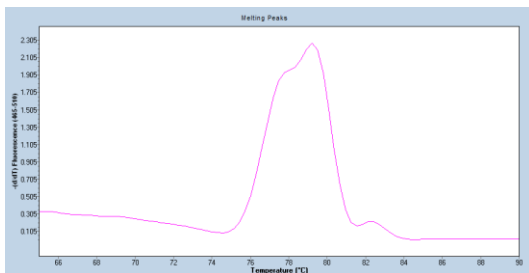
Set 3



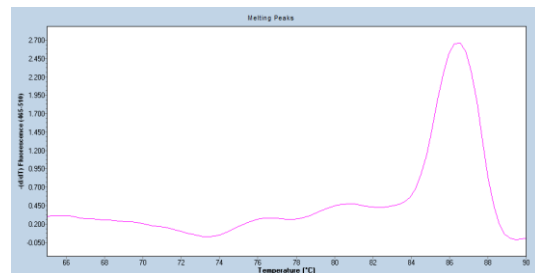
Set 4



Set 5



Set 6



Set 7

