

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-123507

衛生福利部疾病管制署 107 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

107 年 度 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、崔佩怡、蔡善格、梁忠誌、陳羿伶、
黃信憲、徐育麟、陳國卿、林豐平、吳玉屏、
劉秉誠

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，如對媒體發布研究成果應
事先徵求本署同意*

目 錄

中文摘要.....	5
英文摘要.....	7
本文.....	9
一、 前言.....	9
二、 材料與方法.....	14
1. 參考菌株.....	14
2. 細菌培養.....	14
3. 糞便檢體前處理之比較.....	15
4. 核酸萃取.....	17
5. 核酸定量.....	23
6. 探針微球製備.....	24
7. 多重聚合酶連鎖反應.....	26
8. T7 核酸外切酶(T7 exonuclease)反應.....	28
9. 微球雜合反應與流式細胞儀分析直接雜交反應.....	29
10. 偵測極限之分析.....	31
11. 資料統計與分析.....	31
三、 結果.....	32
1. SSMP-SBA 檢測原理介紹.....	33
2. 建立多重腹瀉性病原微流體核酸偵測平台.....	36
3. 多重腹瀉性病原核酸偵測平台之臨床檢體初步檢測.....	52
4. 多重腹瀉性病原核酸偵測平台與市售商業產品之比較.....	66

5. 糞便前處理方法之評估.....	69
四、討論.....	72
五、重要研究成果及具體建議.....	77
六、參考文獻.....	78
七、期末報告審查意見回復表.....	81
附錄、經費支用情形.....	83

表 目 錄

表 1、2011-2015 年台灣腹瀉性法定傳染病統計	11
表 2、2011-2015 年台灣感染性病原引起食物中毒案件統計	11
表 3、15 對腹瀉性致病原引子組合	38
表 4、15 種探針微球混合物內容.....	43
表 5、以陽性對照組驗證多重懸浮微球陣列反應之原始數值.....	45
表 6、以陽性對照組驗證多重懸浮微球陣列反應之分析結果.....	46
表 7、多重腹瀉性病原核酸偵測平台之偵測極限分析.....	50
表 8、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 對結果.....	54
表 9、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.....	65
表 10、多重腹瀉性病原核酸偵測平台與市售商業產品之比較.....	68
表 11、模擬金黃色葡萄球菌陽性糞便檢體之各種前處理方法比較結果...	70
表 12、諾羅病毒陽性糞便檢體之各種前處理方法比較結果.....	71

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 14 種腹瀉性病原標的基因之同步檢測平台，該平台對於致病原之偵測極限可達 5-1000 GE，經過 112 項臨床檢體的實際測試，分析的專一性可達 99.0%，靈敏度為 92.9~100%，後續將持續納入多項細菌、病毒與寄生蟲偵檢項目，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 have constructed a multiple diarrheal pathogen detection panel against 14 target genes with the limit of detection equivalent to 5-1,000 genome copies. This assay is validated via assessment of 112 clinical specimen and achieves a specificity of 99.0~100% and sensitivity of 92.9-100%. We will continue to include numbers of bacteria, virus and protozoan detection and 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	本土	境外	本土	境外	本土	境外	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	案件數	患者數	案件數	患者數	案件數	患者數	案件數	患者數	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 ATCC 167、*Salmonella paratyphi* A (TCDC 提供, sal-1)、*Shigella boydii* ATCC 9207、*Shigella dysenteriae* ATCC 11835、*Shigella flexneri* ATCC 11836、*Shigella sonnei* ATCC 25931、*Listeria monocytogenes* ATCC 984、*Escherichia coli* ATCC 23895 (EPEC, TCDC 提供)、*Escherichia coli* ATCC 43890 (STEC, stx-1 (+))、*Escherichia coli* ATCC 43889 (STEC, stx-2 (+))、*Escherichia coli* ATCC23515 (ETEC)、*Escherichia coli* ATCC 35401 (ETEC, TCDC 提供)、*Vibrio cholerae* ATCC 9458、*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802、*Staphylococcus aureus* ATCC 8095、*Clostridium difficile* ATCC 9689、*Clostridium perfringens* ATCC 3626、*Clostridium perfringens* cp3-2 (TCDC 提供)、*Bacillus cereus* ATCC 11778、*Campylobacter* WHOC.16.1 (TCDC 提供)。

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 固態培養於 35-37°C 培養 20-24 小時。

3. 糞便檢體前處理之比較

(1) 細菌陽性糞便檢體之前處理比較

由-80°C 冰箱取出 *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095)之保存菌株，以四區畫線法接種於 BHIA 培養基中，於 37°C 培養箱靜置隔夜培養。隔天取出培養基，以無菌接種環挑取 1-2 個菌落接種至 5 ml BHI medium，於 37°C 培養箱旋轉 200 rpm，隔夜培養。取 0.5 ml 之隔夜培養 *Staphylococcus aureus* 菌液，加入 9.5 ml 之新鮮 BHI 培養液中，於 37°C 培養箱旋轉 200 rpm，培養 2 小時後，將菌液以無菌生理食鹽水進行 10 倍序列稀釋，稀釋度為 1:10~1:10⁸，每管各為 1 ml 菌液(或稀釋菌液)加入 9 ml 無菌生理食鹽水。

細菌計數：取 1/10⁶、1/10⁷、1/10⁸ 三種稀釋度各 1ml 之菌液，利用倒皿培養法進行細菌計數分析，每種稀釋度三重複反應，培養 3 天後，依據細菌菌落數推測出原始菌液之細菌量為 1.2 x 10⁹ cfu/ml。

製作模擬細菌陽性檢體：由-80°C 冰箱取出事先保存之陰性糞便檢體，取出大約 0.6 克之糞便至 25 ml 離心管中，共 2 管，各加入 1/10 與 1/100 兩種稀釋度菌液 6 ml，並以 1 ml 微量吸管反覆吸取，以便將菌液和糞便混合均勻。

前處理方法與核酸萃取：

1.1 SK-38 法，均質機震盪 4.5 分鐘

取 0.6 ml 之模擬細菌陽性檢體至 SK-38 之均質管(Bertin SK-38 Soil Kit, 台灣均泰公司代理) 中，將 SK-38 玻璃珠均質管放入 Bertin precellys 24 tissue homogenization 中，震盪 5000rpm 1.5 分鐘，3 次，每次間隔 15 秒，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。

1.2 SK-38 法，均質機震盪 1.5 分鐘

取 0.6 ml 之模擬細菌陽性檢體至 SK-38 之均質管中，以 Bertin precellys 24 tissue homogenization，震盪 5000rpm 1.5 分鐘，1 次，於室溫靜置 10 分鐘後，離心 14000rpm，2 分鐘，吸取上清液，取出 200 μ l 以 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) 進行核酸萃取。

1.3 TCDC 使用之方法

取 2 ml 模擬細菌陽性檢體至 15ml 離心管中(含 0.5ml 之 3mm beads，紫外光公司販售)，以震盪器均勻混合(Vortex scale 8-9，30 秒至 1 分鐘)，取液體部分 1.2 ml 至 2 ml 離心管(含 0.25ml, 0.5mm glass beads (Biospec Products Cat No. 11079105)及 0.25ml, 0.1mm glass beads (Biospec Products Cat No. 11079101))，用震盪器震盪 5 分鐘，取出 200 μ l 以 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) 進行核酸萃取。

(2) 病毒陽性糞便之前處理比較

由 -80°C 冰箱取出諾羅病毒陽性糞便檢體，取出大約 0.4 克之糞便至 15ml 離心管中，加入 4ml 生理食鹽水(糞便檢體與稀釋菌液之比例為 1:10)，以震盪器(Scale 8-9)混和均勻 30 秒，吸出上清液至另一新管中。

前處理方法與核酸萃取：

2.1 SK-38 法，均質機震盪 4.5 分鐘

取 0.7ml 諾羅病毒陽性糞便檢體上清液至 SK-38 之均質管中，將 SK-38 玻璃珠均質管放入 Bertin precellys 24 tissue homogenization 中，震盪 5000rpm 1.5 分鐘，3 次，每次間隔 15 秒，於室溫靜置 10 分鐘後，4°C 離心 5000 rpm，2 分鐘，吸取上清液，取出 200 μ l 以 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) 進行核酸萃取。

2.2 SK-38 法，均質機震盪 1.5 分鐘

取 0.7 ml 之模擬細菌陽性檢體至 SK-38 之均質管中，以 Bertin precellys 24 tissue homogenization，震盪 5000 rpm 1.5 分鐘，1 次，於室溫靜置 10 分鐘後，4°C 離心 5000 rpm，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。

2.3 SK-38 法，震盪器作用 5 分鐘

取 0.7ml 諾羅病毒陽性糞便檢體上清液至 SK-38 之均質管中，於震盪器(scale: 9)室溫震盪 5 分鐘後，4°C 離心 5000 rpm，5 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。

2.4 TCDC 使用之方法

取 2 ml 模擬細菌陽性檢體至 15ml 離心管中(含 0.5ml 之 3mm beads)，以震盪器均勻混合(Vortex scale 8-9，30 秒至 1 分鐘)，取液體部分 1.2 ml 至 2 ml 離心管(含 0.25ml, 0.1mm beads 及 0.25ml, 0.5mm beads)，用震盪器震盪 5 分鐘，4°C 離心 5000 rpm，取出 200 µl 以 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) 進行核酸萃取。

4. 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) MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche) 進行核酸萃取

2.1 打開 MagNA Pure LC 2.0 儀器與操控軟體

2.2 Sample ordering

2.3 Key in sample 編號

2.4 選 Protocol DNA III Bacteria

2.5 Post Elution protocol: None

2.6 Sample volume: 100 µl

2.7 Elution volume: 100 µl

2.8 Press stage setup

2.9 依畫面擺放相對應之耗材及加入試劑

	Reagent tube	8 samples	16 samples	24 samples	32 samples
R1-L(黑)	Wash buffer I	10.8ml	17.6ml	24.4ml	31.2ml
R2-L(藍)	Wash buffer II	7.6ml	11.2ml	14.8ml	18.4ml
R3-M20(紅)	Wash buffer III	4.6ml	8.2ml	11.8ml	15.4ml
R4-M20(綠)	Lysis /Binding buffer	3.6ml	6.0ml	8.4ml	10.8ml
R5-M20	Not Used				
R6-M20(褐)	MGP	2.2ml	3.4ml	4.6ml	5.8ml
R7-M20(黃)	Elution buffer	3.8ml	6.6ml	9.4ml	12.3ml
R8-M30	Not Used				

2.10 點擊畫面 check 相對應之耗材及加入試劑皆已完備，門關好後按 Run。

2.11 萃取完成後，取出 Elution 部分之 Sample cartridge，將核酸萃取液依序轉移至 1.5 ml 微量離心管中保存。

2.12 使用後之儀器部分進行 decontamination，30 分鐘至 2 小時。

(3) 糞便檢體核酸萃取

取大約 0.1-0.2 g 之糞便檢體至 15ml 離心管中(含 0.5ml 之 3mm beads)，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)，以震盪器均勻混合(Vortex scale 8-9，30 秒至 1 分鐘)，取液體部分 1.2 ml 至 2 ml 離心

管(含 0.25ml, 0.1mm beads 及 0.25ml, 0.5mm beads)，用震盪器震盪 5 分鐘，4°C 離心 5000 rpm，取出 200 μ l 以 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche)或 MasterPure Complete DNA& RNA Purification kit 進行核酸萃取。

(4) MagNA Pure LC Total NA Isolation Kit (Roche)進行核酸萃取

4.1 取檢體各 200 μ l (50-200 μ l)依指定位置加入 Roche 之 sample cartridge。

4.2 加入 300 μ l Lysis/Binding Buffer (Bottle 4)，以微量吸管混合均勻

4.3 進行後續自動化核酸萃取或暫時保存於-70°C。

4.4 打開 MagNA Pure LC 2.0 儀器與操控軟體

4.5 Sample ordering

4.6 Key in sample 編號

4.7 選 Total NA External_lysis protocol

4.8 Post Elution protocol: None

4.9 Sample volume: 500 μ l

4.10 Elution volume: 60 μ l

4.11 press stage setup

4.12 依畫面擺放相對應之耗材及加入試劑

	Reagent tube	8 samples	16 samples	24 samples	32 samples
R1-L(黑)	Wash buffer I	10.8ml	17.6ml	24.4ml	31.2ml
R2-L(紅)	Wash buffer III	11ml	18.2ml	25.4ml	32.6ml
R3-M20	Not Used				
R4-M20(粉紅)	Proteinase K	1.8ml	2.6ml	3.4ml	4.2ml
R5-M20(褐)	MGP	2.2	3.4	4.6	5.8
R6-M20(黃)	Elution buffer	2.4ml	3.8ml	5.2ml	6.6ml
R7-M20(藍)	Wash buffer II	5.1ml	8.7ml	12.3ml	15.9ml
R8-M30(綠)	Not Used				

4.13 點擊畫面 check 相對應之耗材及加入試劑皆已完備，門關好後按 Run。

4.14 萃取完成後，取出 Elution 部分之 Sample cartridge，將核酸萃取液依序轉移至 1.5 ml 微量離心管中保存。

4.15 使用後之儀器部分進行 decontamination，30 分鐘至 2 小時。

(5) MasterPure Complete DNA& RNA Purification kit 核酸萃取 total nucleic acid

5.1 開啟 65°C 之乾浴器。

5.2 製備 Lysis buffer：

1 μ l 之 proteinaseK + 100 μ l 2X T and C Lysis Solution (各反應用量)

5.3 經過前處理之上清液取出 100 μ l 至新的 1.5 ml 螺旋蓋離心管中，各螺旋蓋離心管加入 100 μ l 之 Lysis buffer，以震盪器混和均勻。

5.4 將離心管置入 65°C 之乾浴器，每靜置 5 分鐘取出以震盪器混和，共靜置 15 分鐘。

5.5 將離心管冰浴靜置 5 分鐘，之後短暫離心(spin down)。

5.6 於離心管中加入 100 μ l 之 MPC Protein Precipitation Reagent，以震盪器震盪 10 秒。

- 5.7 放入低溫離心機中，溫度 4°C，離心 12000xg，10 分鐘。
- 5.8 將上清液以 200 µl 微量吸管小心地吸到新的 1.5 ml 螺旋蓋離心管中，如果必要將原離心管含沉澱物短暫離心 10 秒，再以 200 ul 微量吸管將剩餘上清液吸到新的螺旋蓋離心管，原離心管含沉澱物部分丟棄。
- 5.9 於離心管中加入 350 µl 之 isopropanal 至上清液中，將離心管上下翻轉 30-40 次。
- 5.10 放入低溫離心機中，溫度 4 度，離心 12000 xg，10 分鐘。
- 5.11 小心地將上清液倒除，勿讓沉澱物飄起(若沉澱物飄起，再離心 2 分鐘，以微量吸管吸取上清液)
- 5.12 清洗沉澱物：於離心管中加入 800 µl 之 70% ethanol，將離心管上下翻轉 10 次，放入低溫離心機中，溫度 4°C，離心 12000 xg，2 分鐘。小心地將上清液倒除，勿讓沉澱物飄起。重複此步驟。
- 5.13 短暫離心後，以 200 µl 微量吸管盡量將上清液吸除，勿移除沉澱物。
- 5.14 將離心管蓋子打開，將離心管放在操作櫃中靜置 5-10 分鐘(讓殘餘 70% ethanol 揮發)。
- 5.15 各管加入 23 µl TE Buffer，以震盪器震盪 20-30 秒後，短暫離心，該核酸萃取物應立即進行後續分析，或於測定前先保存於-20°C 冰箱。

(6) 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，1.5 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。

(7) MagNA Pure LC Total NA LV (Roche) 進行核酸萃取

7.1 取檢體各 1,000 ul 依指定位置加入 Roche 之 sample cartridge。

7.2 打開 MagNA Pure LC 2.0 儀器與操控軟體

7.3 Sample ordering

7.4 Key in sample 編號

7.5 選 Protocol Total NA LV serum_Plasma

7.6 Post Elution protocol: None

7.7 Sample volume: 1000 µl

7.8 Elution volume: 100µl

7.9 Press stage setup

7.10 依畫面擺放相對應之耗材及加入試劑

	Reagent tube	8 samples	16 samples	24 samples	32 samples
R1-L(黑)	Wash buffer I	10.8ml	17.6ml	24.4ml	31.2ml
R2-L(紅)	Wash buffer III	11ml	18.2ml	25.4ml	32.6ml
R3-M20(綠)	Lysis /Binding buffer	4.6ml	8.2ml	11.8ml	15.4ml
R4-M20(粉紅)	Proteinase K	2.2ml	3.4ml	4.6ml	5.8ml
R5-M20(褐)	MGP	3.8	6.2	8.6	11.0
R6-M20(黃)	Elution buffer	2.2ml	3.5ml	4.7ml	6.0ml
R7-M20(藍)	Wash buffer II	5.6ml	9.2ml	12.8ml	16.4ml
R8-M30(綠)	Lysis /Binding buffer	8.2	15.4	22.6	29.8

7.11 點擊畫面 check 相對應之耗材及加入試劑皆已完備，門關好後按 Run。

7.12 萃取完成後，取出 Elution 部分之 Sample cartridge，將核酸萃取液依序轉移至 1.5 ml 微量離心管中保存。

7.13 使用後之儀器部分進行 decontamination，30 分鐘至 2 小時。

5. 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 µl Dye Working Solution 於 0.5 ml 專用微量離心管(不含螢光劑)，加上 10 µl 核酸標準液；每一測試檢體取用 199~190 µl Dye Working Solution 於 0.5 ml 專用微量離心管，加上 1~10 µl 核酸萃取液，使最終體積為 200 µl。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, Swizerland)測定 A260 與 A280 之 optical density (O.D.)，以計算核酸濃度和

評估核酸品質。

6. 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)。

7. 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.....9.6 μ l

5X First Strand Buffer.....	8.0 μ l
10 mM dNTP.....	6.4 μ l
25 mM MgCl ₂	8.0 μ l
3 μ g/ml Random primer	2.0 μ l
0.1 M DTT.....	4.0 μ l
RNase inhibitor (40U).....	2.0 μ l
SuperScript III (200U/ml).....	0.1 μ l
總體積.....	40.1 μ l

混合液配製完成後，依以下條件進行 Reverse Transcription 反應：

25°C	10 min	1 cycle
50°C	50 min	1 cycle
85°C	15 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. (μ l)
	DNA (cDNA) 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

i. forever

8. 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/ μ l	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

9. 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 well flat-bottom plate

1.7. 96 孔磁盤架(Luminex Magnetic Plate Separator)

(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。

10. 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)。

11. 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

107 年規劃完成之工作項目包括：

- (1) 延續涵蓋第一年的檢測技術，新增檢測項目。
- (2) 細菌病原檢測項目：至少完成重要引起食媒性與腹瀉性疾病之細菌 (Salmonella spp.、Shigella spp.、Listeria monocytogenes、pathogenic E. coli、EHEC、ETEC、V. cholerae、V. parahaemolyticus、S. aureus、Clostridium difficile、Clostridium perfringens、Bacillus cereus、Campylobacter 等) 共計 9-10 種以上。
- (3) 新增病毒病原檢測項目：至少包含重要引起食媒性與腹瀉性疾病之病毒或基因(Norovirus GI、Norovirus GII、Norovirus GIV、Rotavirus VP4/VP7/NSP3、Sapovirus GI、Sapovirus GII、Adenovirus 40/41、Astrovirus 等) 2-4 種以上。
- (4) 研究內容：以參考菌株、病毒株或核酸標準品評估單一病原檢測之偵測極限及評估多重病原檢測之可行性。
- (5) 提供本署腹瀉細菌及病毒性病原感染之臨床檢體初步檢測評估。
- (6) 提供學術研討會報告或論文。

1. SSMP-SBA 檢測原理介紹

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]。

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)。

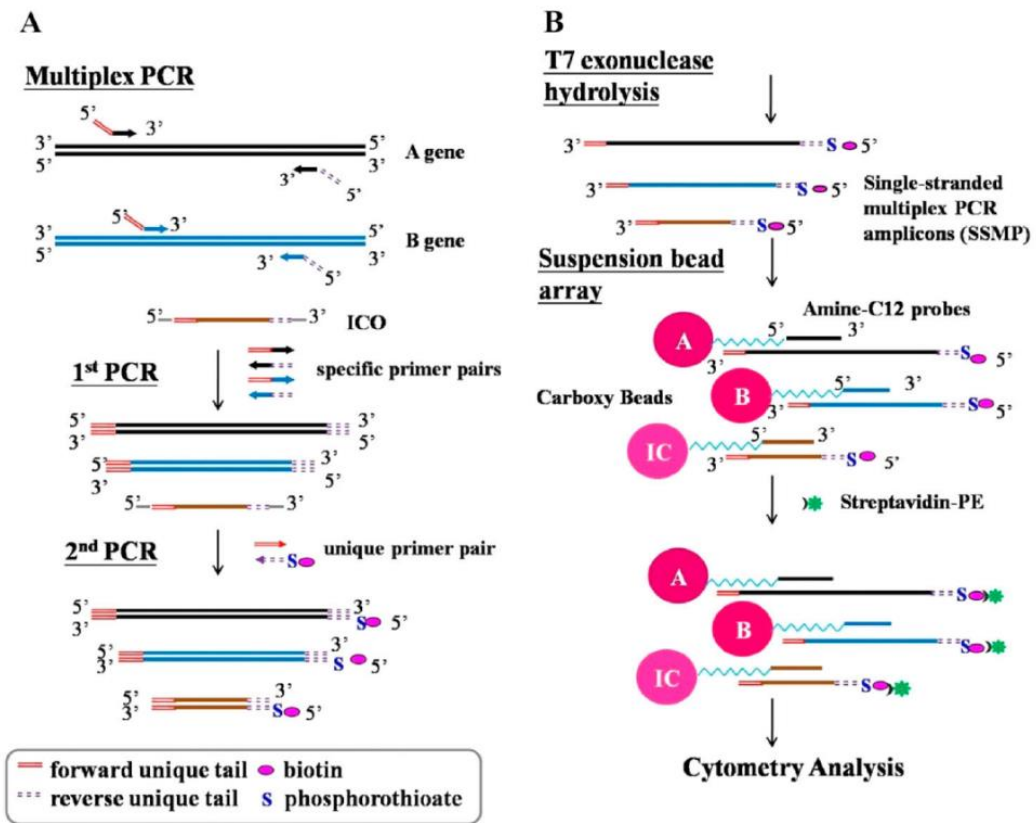


圖 1、SSMP-SBA 設計原理

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組合，參考本實驗室發表文獻[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。

(1) 多重聚合酶連鎖反應之建立

針對沙門氏菌屬 (*Salmonella* spp.)、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)、病原性大腸桿菌 (pathogenic *E. coli*, EPEC)、產毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic *E.coli*, ETEC)、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)與困難梭狀桿菌 (*Clostridium difficile*)、諾羅病毒 (Norovirus GI)與諾羅病毒 (Norovirus GII)之 14 種標的基因設計專用引子對，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或陽性檢體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 15 對混合引子組合 (表 3)。

為確認混合引子於多重聚合酶連鎖反應之可行性，細菌部份各以 1-2 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，病毒部分則以陽性臨床檢體之核酸萃取物作為陽性對照組，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。考量病毒性病原之核酸為 RNA，臨床檢體純化核酸需先經反轉錄反應(reverse transcription)後，再進行多重聚合酶連鎖反應與後續懸浮微球陣列分析。為確定各陽性對照組經多重聚合酶連鎖反

應後之結果，PCR 產物經由洋菜膠電泳分析結果顯示如圖 2，各腸胃道致病原(10 種參考菌株與 2 種病毒陽性臨床檢體)之陽性對照組均出現符合預期大小之 DNA 條帶(參見表 3)，並出現內部控制寡核酸擴增的產物大小約 65 bp。以無菌蒸餾水與陰性糞便檢體反應僅得到內部控制寡核酸擴增產物，未出現非專一性產物。

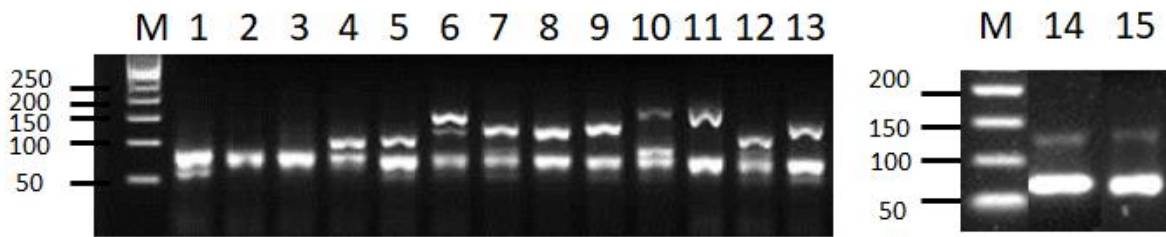


圖 2、多重聚合酶連鎖反應電泳結果

圖 2 說明：以純水、陰性對照組與 12 種腹瀉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 與 3: 陰性糞便檢體核酸；4: Sal；5: Vch；6: Shi；7: STEC-1；8: STEC-2；9: EPEC；10: ETEC；11: Vpa；12: Sau；13: Cdi；14: NorV GI；15: NorV GII。(lane 4~15 為陽性對照組，參考菌株之全名如表 3)

表 3、 15 對腹瀉性致病原引子組合

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>ttrC, ttrA</i>	UF-Sal-ttrC, ttrA-F UR-Sal-ttrC, ttrA-R	103	AY578070	Sal : <i>Salmonella</i> <i>typhi</i> ATCC 167	[12]
2	霍亂弧菌 (<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>)	<i>ompW</i>	UF-Vch ompW-R UR-Vch ompW-F	122	X51948	Vch : <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> ATCC 9458	[13] modified
3	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i>)	<i>ipaH1.4</i>	UF-Shi-F1-n1F UR-Shi-R-n1-R	160	AY206449	Shi : <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> ATCC 11835;	[12]

4	志賀毒性大腸桿菌 (Shiga-like Toxin producing <i>E. coli</i> , STEC)	<i>stx1</i>	UF+stx1-JMS1 F UR+stx1-JMS1 R	128	AP010953	STEC1: <i>Escherichia coli</i> ATCC43890	[14] modified
5	志賀毒性大腸桿菌 (Shiga-like Toxin producing <i>E. coli</i> , STEC)	<i>stx2</i>	UR-STEC-stx2- F UF-STEC-stx2 R	126	CP018250.1	STEC2: <i>Escherichia coli</i> ATCC43889	[14] modified
6	病原性大腸桿菌 (pathogenic <i>E. coli</i> , EPEC)	<i>bfpA</i>	UR-EPEC-bfpA - F UF-EPEC-bfpA - R	143	AF474407	EPEC: <i>Escherichia coli</i> ATCC 23895 (CDC)	[14] modified

7	病原性大腸桿菌 (pathogenic <i>E. coli</i> , EPEC)	<i>eae</i>	UR-EPEC- <i>eae</i> - F	135	Z11541.1	EPEC: Escherchia coli ATCC 23895(CDC)	[13] modified
			UF-EPEC- <i>eae</i> - R				
8	產毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic <i>E.coli</i> , ETEC)	<i>lt</i>	UR-ETEC- <i>lt</i> -F	95	X83966.1	ETEC: Escherchia coli ATCC 35401(CDC)	[14] modified
			UF-ETEC- <i>lt</i> -R				
9	產毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic <i>E.coli</i> , ETEC)	<i>st</i>	UF-ETEC- <i>st</i> -F	180	M25607.1	ETEC: <i>E. coli</i> ATCC 35401	[14] modified
			UR-ETEC- <i>st</i> -R				

10	腸炎弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	<i>gyrB</i>	UR-Vpa-gyrB-F	181	AY527390.1	Vpa: <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	[15]modified
			UF-Vpa-gyrB-R				
11	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	UF-Sau-femB-F	118	CP020020 HF937103	Sau: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 8095	[13] modified
			UR-Sau-femB-R				
12	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	UF-Cdi-tcdB-F-n1	148	KC292190	Cdi: <i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	[14] modified
			UR-Cdi-tcdB-R-n1				
13	諾羅病毒 Norovirus GI	ORF1-PRF 2 junction	UF-NorV-GI-JJ V1R	128	M87661;	NorV GI: 陽性臨床檢體 CDC-183	[16] modified

			UR-NorV-GI-J				
			VMF				
14	諾羅病毒 Norovirus GII	ORF1-PRF 2 junction	UF-NorV-GII-C OG2R	131	AF145896	NorV GII: 陽性 臨床檢體 CDC-202	[16] modified
			UR-NorV-GII-J				
			JV2F				
15	Unique primer pair		UF (forward unique primer) UR (reverse unique primer) ICO (Internal control oligonucleotide)	65			[12]

(2) 多重懸浮微球陣列反應與分析

以 SSMP-SBA 技術偵測多重聚合酶連鎖反應產物，設計 14 組探針微球 (14 種標的基因之探針微球)，第 15 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、15 種探針微球混合物內容

No.	Bacteria	Target gene	Bead name	參考文獻 References
1	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>ttrC, ttrA</i>	Sal-ttrC, ttrA	[12]
2	霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	<i>ompW</i>	Vch ompW-P	[13] modified
3	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	<i>ipaH1.4</i>	Shi-probe-n1	[12] modified
4	志賀毒性大腸桿菌 (Shiga-like Toxin producing <i>E.coli</i> , STEC)	<i>stx1</i>	STEC-stx-1-JMS-P	[14] modified
5	志賀毒性大腸桿菌 (Shiga-like Toxin producing <i>E.coli</i> , STEC)	<i>stx2</i>	STEC-Stx-2-P	[14] modified
6	病原性大腸桿菌 (pathogenic <i>E. coli</i> , EPEC)	<i>bfpA</i>	EPEC-bfpA-P	[14] modified
7	病原性大腸桿菌 (pathogenic <i>E. coli</i> , EPEC)	<i>eae</i>	EPEC-eae-P	[13] modified
8	產毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic <i>E.coli</i> , ETEC)	<i>lt</i>	ETEC-lt-P	[14] modified
9	產毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic <i>E.coli</i> , ETEC)	<i>st</i>	ETEC-st-P	[14] modified
10	腸炎弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	<i>gyrB</i>	Vpa-gyrB-P	[15]modified
11	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	Sau-femB-P	[13] modified
12	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	Cdi-tcdB-P-n1	[14] modified

13	諾羅病毒 Norovirus GI	ORF1-PRF2 junction	NorV-GI-RING1-P	[16] modified
14	諾羅病毒 Norovirus GII	ORF1-PRF2 junction	NoV GII-P	[16] modified
15	ICO (Internal control oligonucleotide)		IC-probe (internal control probe)	[12]

擴增產物經 T7 核酸外切酶作用後，單股核酸產物再與 15 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 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)，此實驗中以陰性糞便檢體之核酸反應作為陰性對照組，彩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

表 5、以陽性對照組驗證多重懸浮微球陣列反應之原始數值

Beads Sample	Sal-ttrC&A	Vch-omp-P	Shi-ipaH1.4-P	STEC-Stx1-JMS -P	STEC-Stx2-P	EPEC-bfpA-P	EPEC-eae-P	ETEC LT(3)	ETEC-st-P	Vpa-gyrB-P	Sau-femB-P	Cdi-tcdB-P-n1	NoroGI	NoroGII	IC-probe
NTC	183	155	178.5	89	101.5	112	429	141	147	150.5	141	1778	116	82	14542
陰性糞便檢體	188.3	253.8	127.5	132.5	134.8	154	514.5	150.8	173	140	155	1513	116.3	111	193.5
Sal	14527	126	157	129	121	109	126.5	147	423	117	140.5	1546	92	75	998
Vch	161	5948	164.5	95	87.5	93	298	122	90	129.5	146	1732.5	91	73	1672
Shi	186	121	12084	2657	97	92.5	360	128	79	116	155.5	1509	108.5	74	2186.5
STEC-1	168	220	170.5	12008.5	104	101	9964	143	66	269	153	1510	122.5	63	5670.5
STEC-2	147	103	190	99.5	25552.5	103	6453	183	57	180.5	137.5	1589.5	83	51.5	1116
EPEC	144	130	159	96.5	109	11731	7861	140	100	210	150.5	2011	124.5	85	2697
ETEC	437	187	190	102	110.5	116.5	334	25066	4108	156.5	153	1708	123	68	2618
Vpa	142	182	152	98	121	115	442	188.5	101	19139	275.5	1637	109	74.5	584
Sau	138	91	146	92	102.5	104	288.5	125	93.5	134	15413	1578	96.5	88	3345
Cdi	147	115	148	80	83	94	253	110.5	62	115	137.5	7584	97	29	6129
CDC-183	82	135	135.5	43.3	47	51.5	288.8	67.3	64.5	45.8	75	1220.5	459.5	25.8	514.5
CDC-202	76	147	90.5	40.8	56.5	58	245.5	73.8	62.3	40.8	86.5	1365.5	32.5	1839	310.5
Blank	47.8	23	34	35	37	41	37.5	52	12.5	16	59.5	1041	12.5	8.5	40.5

(單位: MFI)

表 6、以陽性對照組驗證多重懸浮微球陣列反應之分析結果

Beads Sample	Sal-ttrC&A	Vch-omp-P	Shi-ipaH1.4-P	STEC-Stx1-J MS-P	STEC-Stx2-P	EPEC-bfpA-P	EPEC-eae-P	ETEC LT(3)	ETEC-st-P	Vpa-gyrB-P	Sau-femB-P	Cdi-tcdB-P-n1	NoroGI	NoroGII
陰性糞便檢體	5.3	98.8	0	43.5	33.3	42	85.5	9.8	26	0	14	0	0.3	29
Sal	14344	0	0	40	19.5	0	0	6	276	0	0	0	0	0
Vch	0	5793	0	6	0	12	0	0	0	0	5	0	0	0
Shi	3	0	11905.5	2568	0	0	0	0	0	0	14.5	0	0	0
STEC-1	0	65	0	11919.5	2.5	0	9535	2	0	118.5	12	0	6.5	0
STEC-2	0	0	11.5	10.5	25451	0	6024	42	0	30	0	0	0	0
EPEC	0	0	0	7.5	7.5	11619	7432	0	0	59.5	9.5	233	8.5	12
ETEC	254	32	11.5	13	9	6	0	24925	3961	6	12	0	7	0
Vpa	0	27	0	9	19.5	3	13	47.5	0	18988.5	134.5	0	0	0
Sau	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	15272	0	0	8
Cdi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5806	0	0
CDC-183	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	343.5	0
CDC-202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1757
Cut-off	381.8	148.5	19.8	73.5	51.2	54.4	117.4	77.1	342.5	164.1	167.0	288.5	15.2	39.2

(單位: MFI-bkgd)

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 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，其中參考菌株 Shi (*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 [17]，故其陽性反應之出現符合預期，此外，參考菌株 STEC-1 (*Excherichia coli* ATCC43890) 與 STEC-2 (*Excherichia coli* ATCC43889) 除了相對應的 *stx-1* 與 *stx-2* 基因呈現陽性反應外，在 *eae* 基因亦出現陽性反應，文獻 [18] 指出 STEC 除了帶有 *stx1* (20%) 或 *stx2* (54%)，或同時帶有 *stx1* 與 *stx2* (26%)，這些菌株當中有 29% 另有 intimin (*eae*) virulence gene，[19, 20] 亦指出 *Excherichia coli* ATCC 43890 與 ATCC 43889 均帶有 *eae* gene，凸顯平台絕佳的專一性。

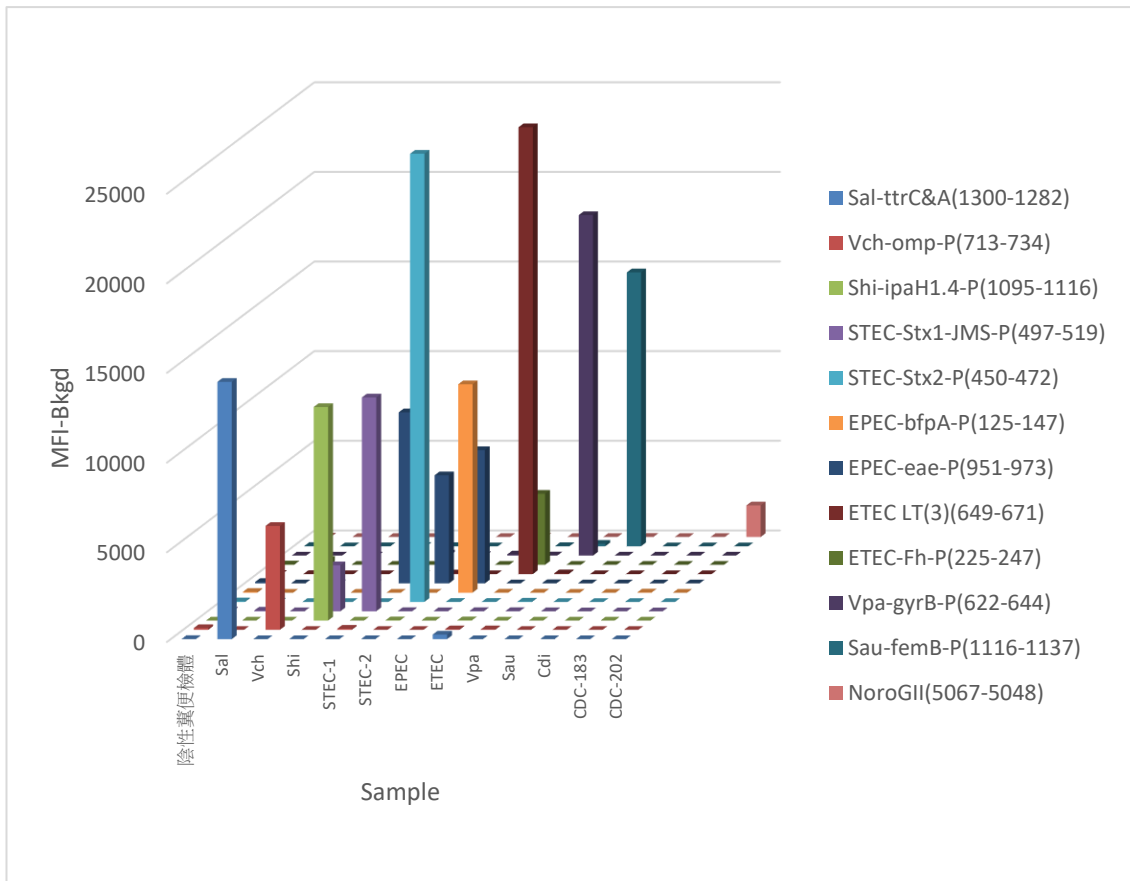


圖 3、多重懸浮微球陣列分析結果 1

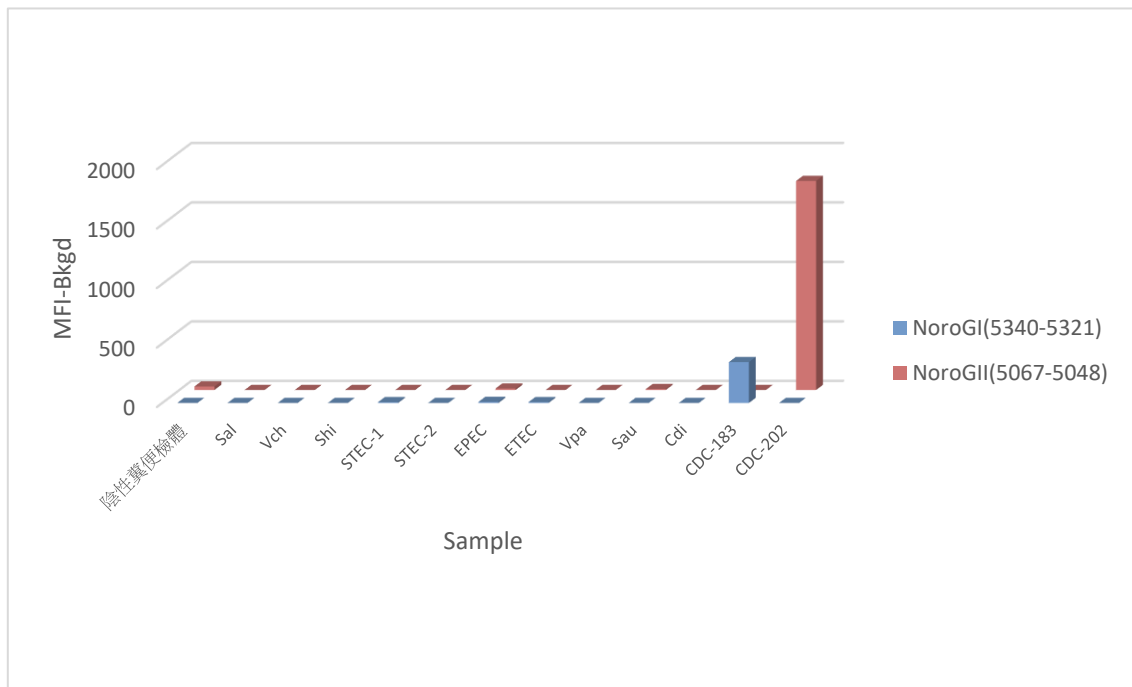


圖 4、多重懸浮微球陣列分析結果 2

(3) 多重腹瀉性病原核酸偵測平台之偵測極限分析

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、10、5、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)，表 7 顯示平台偵測極限分析結果，大部分病原的偵測極限值為 5~100 GE，目前僅有兩項病原基因(EPEC 之 *eae* gene 與 ETEC 之 *st* gene)之偵測極限為 1000 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，與純致病原核酸之偵測極限值 50 GE 差異不大，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 7、多重腹瀉性病原核酸偵測平台之偵測極限分析

No.	Bacteria	Target gene	SSMP-SBA	LOD (GE)	LOD of Spiked specimen (GE)
1	沙門氏菌屬 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>ttrC, ttrA</i>	UF-Sal-ttrC, ttrA-F UR-Sal-ttrC, ttrA-R Sal-ttrC, ttrA-P	10	
2	霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	<i>ompW</i>	UF-Vch ompW-R UR-Vch ompW-F Vch ompW-P	50	100
3	志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	<i>ipaH1.4</i>	UF-Shi-F1-n1 UR-Shi-R-n1 Shi-ipaH1.4-n1-P	50	100
4	志賀毒性大腸桿菌 Shiga-like Toxin producing <i>E.coli</i> (STEC)	<i>stx1</i>	UF+stx1-JMS1F UR+stx1-JMS1R STEC-stx-1-JMS-P	100	
5	志賀毒性大腸桿菌 Shiga-like Toxin producing <i>E.coli</i> (STEC)	<i>stx2</i>	UR-STEC-stx2-F UF-STEC-stx2 R STEC-Stx-2-P	<100	
6	病原性大腸桿菌 (pathogenic <i>E. coli</i> , EPEC)	<i>bfpA</i>	UR-EPEC-bfpA- F UF-EPEC-bfpA- R EPEC-bfpA-P	100	
7	病原性大腸桿菌 (pathogenic <i>E. coli</i> , EPEC)	<i>eae</i>	UR-EPEC-eae-F UF-EPEC-eae-R EPEC-eae-P	1000	
8	產毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic <i>E.coli</i> , ETEC)	<i>lt</i>	UR-ETEC-lt- F UF-ETEC-lt-R ETEC-lt-P	5	
9	產毒性大腸桿菌	<i>st</i>	UF-ETEC-st-F	1000	

	(enterotoxigenic <i>E. coli</i> , ETEC)		UR-ETEC-st-R ETEC-st-P	
10	腸炎弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	<i>gyrB</i>	UR-Vpa- <i>gyrB</i> -F UF-Vpa- <i>gyrB</i> -R Vpa- <i>gyrB</i> -P	<100
11	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>femB</i>	UF-Sau- <i>femB</i> -F UR-Sau- <i>femB</i> -R Sau- <i>femB</i> -P	10
12	困難梭狀桿菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>tcdB</i>	UF-Cdi- <i>tcdB</i> -F-n1 UR-Cdi- <i>tcdB</i> -R-n1 Cdi- <i>tcdB</i> -P-n1	100
13	諾羅病毒 Norovirus GI	ORF1-PRF2 junction	UF-NorV-GI-JJV1R UR-NorV-GI-JVMF NorV-GI-RING1-P	
14	諾羅病毒 Norovirus GII	ORF1-PRF2 junction	UF-NorV-GII-COG2R UR-NorV-GII-JJV2F-5(UR-3) NoV GII-P	
15	ICO (Internal control oligonucleotide)		UF (forward unique primer) UR (reverse unique primer) IC-probe (internal control probe)	

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，以疾病管制署腹瀉病原實驗室提供之臨床分離菌株、臨床陽性糞便檢體與陰性糞便檢體，以及本所收存之陰性腹瀉檢體進行SSMP-SBA 檢測與平行比對。以SSMP-SBA 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反轉錄反應用後進行SSMP-SBA 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 (ND, undetectable)。表 8 呈現各檢體以SSMP-SBA 平台檢測與其他檢測方法之結果，比對所有結果後判為符合或不符合。測試112個臨床檢體中，檢體種類以分離菌株佔52.7% (59/112)；糞便檢體佔31.3% (35/112)；DNA 佔16.1% (18/112)。陽性檢體共有90個，包括59個分離菌株、15支糞便檢體與16支陽性檢體核酸DNA；陰性檢體為22個，含20支糞便檢體與2管陰性糞便檢體核酸。經SSMP-SBA 檢測，有4項陽性檢體之檢測結果經平行比對判為不符合，其餘結果均為符合，正確率達96.4% (108/112)。

(2) 靈敏度與專一性分析

依照疾病管制署腹瀉實驗室細菌培養、生化試驗、血清學分析與其他方法檢測(傳統PCR或qPCR)的結果，陽性檢體中*Salmonella* spp.有30個陽性檢體(14個分離菌株、1支糞便檢體與15管陽性糞便檢體核酸)，有29個經SSMP-SBA 檢出為*Salmonella* spp. 陽性，1個未檢出；*Shigella* spp.有13個陽性檢體(均為分離菌株)，經SSMP-SBA 檢出均為*Shigella* spp.，結果

完全符合；*Vibrio cholerae* 有 6 個陽性檢體(均為分離菌株)，經 SSMP-SBA 檢出均為 *Vibrio cholerae*，結果完全符合；*Vibrio parahaemolyticus* 有 8 個陽性檢體(2 株分離菌株與 6 支陽性糞便檢體)，經 SSMP-SBA 檢出均為 *Vibrio parahaemolyticus*，結果完全符合，但有一支 *Bacillus cereus* 陽性檢體亦被驗出 *Vibrio parahaemolyticus*，該檢體尚需進一步以 *Vibrio parahaemolyticus* 之 qPCR 方法確認是否含該菌。*Staphylococcus aureus* 有 15 個陽性檢體 (11 株分離菌株與 4 支糞便檢體)，其中 14 個檢體經 SSMP-SBA 檢出為 *Staphylococcus aureus* 陽性，1 個未檢出。*Clostridium difficile* 有 14 個陽性檢體 (13 株分離菌株與 1 支糞便檢體)，其中 12 個檢體經 SSMP-SBA 檢出為 *Clostridium difficile* 陽性，未檢出的 2 個檢體中，編號 CDC-95 雖為 *Clostridium difficile*，但其毒素鑑定反應為 A-B-，因 SSMP-SBA 針對 *Clostridium difficile* 檢測的標的基因為毒素 B，結果屬於符合，故該檢測結果符合者為 13 項，不符合者為 1 項。

經過計算，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呈現於表 9，所有項目之 sensitivity 為 92.9~100%；specificity 為 99.0~100%，顯示利用 SSMP-SBA 方法偵測的靈敏度與專一性均相當好。

表 8、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結果

編號	檢體編號	實驗室編號	檢體類型	平行檢測(疾管署檢測結果)		多重腹瀉性病原核酸偵測平台 (SSMP-SBA)	比對結果
				檢測方法	檢測結果		
1	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. +	符合
2	CDC-28	0911d1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella O8	Salmonella spp. +	符合
3	CDC-29	0918t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. +	符合
4	CDC-30	0829t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella O9	Salmonella spp. +	符合
5	CDC-31	1129d9	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella spp.	Salmonella spp. +	符合
6	CDC-32	0221t3	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella O8	Salmonella spp. +	符合
7	CDC-33	0501t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. +	符合
8	CDC-34	0626t2	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. +	符合
9	CDC-35	0626t3	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. +	符合

10	CDC-36	0914d21	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. +	符合
11	CDC-37	SMN-CHOL200 3002	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella choleraesuis	Salmonella spp. +	符合
12	CDC-38	1060831t1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. +	符合
13	CDC-39	1060904d13	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella	Salmonella spp. +	符合
14	CDC-106- 07	0914d6	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella serogroup O3,10	Salmonella spp. +	符合
15	CDC-41	6-3	糞便	culture, 生化試驗, 血清鑑定,	Salmonella	Salmonella spp. +	符合
16	CDC-241	104-901-D016	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp. +	符合
17	CDC-242	104-901-D018	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp. +	符合
18	CDC-243	104-901-D023	DNA	qPCR	Salmonella spp.,EAEC	Salmonella spp.,+	符合
19	CDC-247	105-004-D197	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
20	CDC-248	105-006-C099	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合

21	CDC-249	105-006-C136	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
22	CDC-250	105-006-D120	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
23	CDC-251	105-006-D140	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
24	CDC-252	105-006-D167	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
25	CDC-253	105-006-D177	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
26	CDC-254	105-006-D192	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
27	CDC-255	105-009-D039	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
28	CDC-256	105-401-D152	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
29	CDC-257	105-701-D015	DNA	qPCR	Salmonella spp.	Salmonella spp.,+	符合
30	CDC-261	104-006-D056	DNA	qPCR	Salmonella spp.	ND	不符合
31	CDC-106-08	0919s1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Shigella sonnei	Shigella spp. +	符合

32	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
33	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
34	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
35	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
36	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
37	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
38	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
39	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
40	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
41	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

42	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
43	CDC-01-08	0919s1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Shigella sonnei	Shigella spp. +	符合
44	CDC-106-09	1017vc	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae O1, ogawa	Vibrio cholerae +	符合
45	CDC-89	1060716v1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae	Vibrio cholerae +	符合
46	CDC-90	1060904V1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae	Vibrio cholerae +	符合
47	CDC-91	1060905V1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae	Vibrio cholerae +	符合
48	CDC-92	1060906V1	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae	Vibrio cholerae +	符合
49	CDC-1-09	1017vc	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae O1, ogawa	Vibrio cholerae +	符合
50	CDC-106-06	0504d21	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	V. parahaemolyticus K6	Vibrio parahaemolyticus +	符合
51	CDC-106	22-2	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	V. parahaemolyticus/腸 炎弧菌混合血清型1群	Vibrio parahaemolyticus +	符合
52	CDC-125	28-17	糞便	culture, 生化試驗	V. parahaemolyticus/腸	Vibrio parahaemolyticus +	符合

					炎弧菌		
53	CDC-126	6-1	糞便	culture, 生化試驗	V. parahaemolyticus/腸 炎弧菌	Vibrio parahaemolyticus +	符合
54	CDC-127	7-2	糞便	culture, 生化試驗	V. parahaemolyticus/腸 炎弧菌	Vibrio parahaemolyticus +	符合
55	CDC-128	8-6	糞便	culture, 生化試驗	V. parahaemolyticus/腸 炎弧菌	Vibrio parahaemolyticus +	符合
56	CDC-129	4-9	糞便	culture, 生化試驗	V. parahaemolyticus/腸 炎弧菌	Vibrio parahaemolyticus +	符合
57	CDC-120	2-4	糞便	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Bacillus cereus	Vibrio parahaemolyticus +	不符合
58	CDC-121	2-6	糞便	culture, 生化試驗, 血清鑑定	V. parahaemolyticus/腸 炎弧菌	Vibrio parahaemolyticus +	符合
59	CDC-106- 10	0227d20	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	S. staphylococcus C	S. aureus +	符合
60	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
61	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
62	CDC-44	0731d6	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus B	Undetectable	不符合

63	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
64	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
65	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
66	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
67	CDC-49	0821d10	臨床分離菌株	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus enterotoxin C	S. aureus +	符合
68	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
69	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
70	CDC-52	43152	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 A 型	S. aureus +	符合

71	CDC-96	21-30	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 A 型	S. aureus +	符合
72	CDC-100	43152	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 A 型	S. aureus +	符合
73	CDC-101	24-23	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 C 型	S. aureus +	符合
74	CDC-106-11	106002D006	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	符合
75	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 +	符合
76	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 +	符合
77	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 +	符合
78	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 +	符合
79	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

80	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
81	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 +	符合
82	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 +	符合
83	CDC-26	106-004-C067	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	符合
84	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
85	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
86	CDC-1-11	106002D006	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株	Clostridium difficile	Clostridium difficile +	符合
87	CDC-246	104-004-D315	DNA	PCR	Clostridium difficile A+B+	Undetectable	不符合
88	CDC-183	20-7	糞便	PCR	Norovirus GI	NorV GI (+)	符合
89	CDC-202	3-11	糞便	PCR	Norovirus GII	NorV GII (+)	符合
90	CDC-203	3-12	糞便	PCR	Norovirus GII	NorV GII (+)	符合
91	CDC-65	3-18	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合

92	CDC-66	20-3	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
93	CDC-67	20-4	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
94	CDC-68	20-5	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
95	CDC-69	23-6	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
96	CDC-70	8-12	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
97	CDC-71	20-8	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
98	CDC-72	9-20	陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
99	IPM-01		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
100	IPM-02		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
101	IPM-03		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合

102	IPM-04		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
103	IPM-05		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
104	IPM-06		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
105	IPM-07		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
106	IPM-08		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
107	IPM-09		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
108	IPM-10		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
109	IPM-11		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
110	IPM-12		陰性糞便檢體	Bacterial culture	未檢出	undetectable	符合
111	CDC-278	104-901-D001	DNA	*PCR	未檢出	undetectable	符合
112	CDC-279	104-901-D004	DNA	*PCR	未檢出	undetectable	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 9、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(N=109)					
	TP	TN	FP	FN	Sensitivity TP/(TP+FN) %	Specificity TN/(FP+TN) %
沙門氏菌屬(<i>Salmonella</i> spp.)	29	79	0	1	96.7%	100%
霍亂弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	6	103	0	0	100%	100%
志賀氏菌屬 (<i>Shigella</i> spp.)	13	96	0	0	100%	100%
志賀毒性大腸桿菌 (STEC)	0	109	0	0	NA	100%
病原性大腸桿菌 (pathogenic <i>E. coli</i> , EPEC)	0	109	0	0	NA	100%
產毒性大腸桿菌(enterotoxigenic <i>E. coli</i> , ETEC)	0	109	0	0	NA	100%
腸炎弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	8	100	1	0	100%	99.0%
金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	14	94	0	1	93.3%	100%
困難梭狀桿菌(<i>Clostridium difficile</i>)	13	95	0	1	92.9%	100%

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

4. 多重腹瀉性病原核酸偵測平台與市售商業產品之比較

將本計畫建置之多重腹瀉性病原核酸偵測平台與市售多重腹瀉病原檢測 Luminex GPP®產品進行比較，除了均利用 Luminex suspension bead array 作為分析多重核酸標的這點相同外，在偵測原理上，本研究之技術採用自行開發之 SSMP-SBA 專利技術，檢測標的之專一性決定於引子與探針序列相符確認，Luminex GPP®採取 xTAG 技術(如圖 5)，專一性部分僅決定於引子序列相符確認。

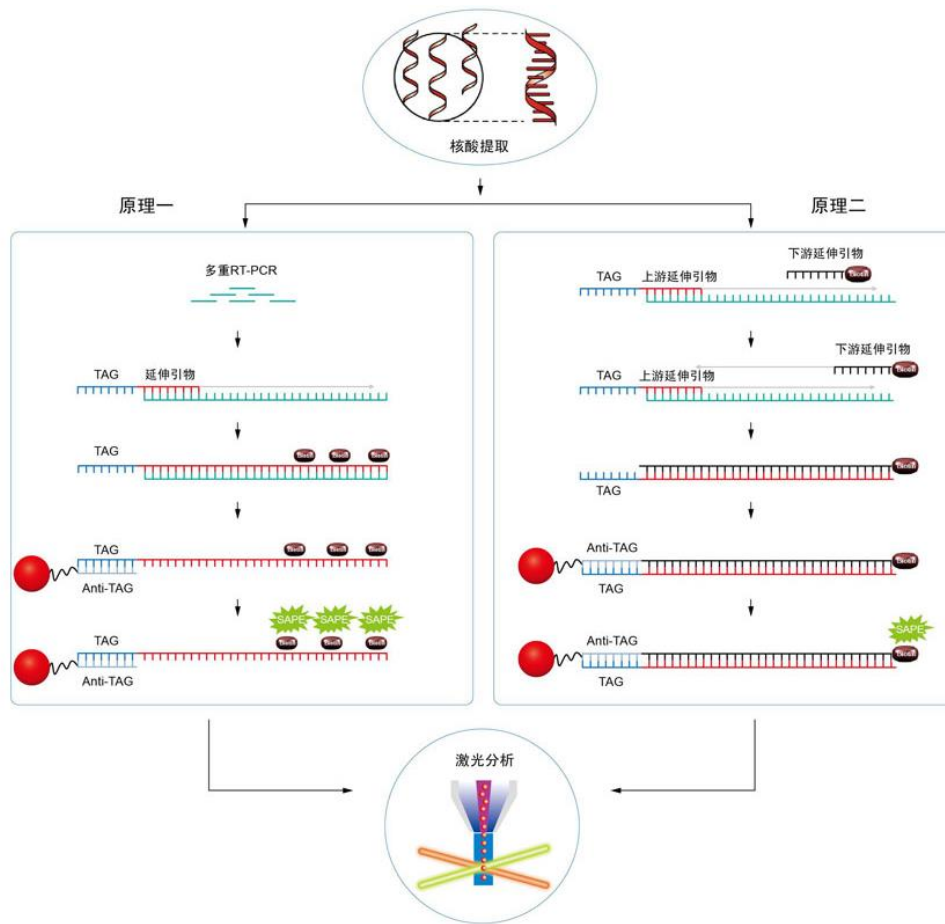


圖 5 、Luminex xTAG GPP 技術原理

(本圖擷取自 <http://www.bioon.com/z/luminex/>)

挑選 12 支疾管署提供之臨床檢體(包括 10 支陽性檢體與 2 支陰性檢體)以多重腹瀉性病原核酸偵測平台 (SSMP-SBA-GI)與市售商業產品 Luminex

GPP 檢測，同時與疾管署腹瀉實驗室之檢測結果比對如表 10，其中 SSMP-SBA-GI 與疾管署腹瀉實驗室之檢測吻合比例較高，為 83.3% (10/12)；Luminex GPP 檢測與疾管署腹瀉實驗室之檢測相符比例為 58.3% (7/12)；SSMP-SBA-GI 與 Luminex GPP 之吻合比例為 41.6% (5/12)。

表 10、多重腹瀉性病原核酸偵測平台與市售商業產品之比較

編號	檢體編號	檢體類型	疾管署腹瀉實驗室之檢測		多重腹瀉性病原核酸偵測平台 (SSMP-SBA)	市售商業產品 Luminex GPP 檢測結果	備註
			檢測方法	檢測結果			
1	CDC-17	臨床分離菌株	culture, PCR 菌株, 毒素鑑定 A+B+	Clostridium difficile	Clostridium difficile	Clostridium difficile: tcd A+/B +	三者均相符
2	CDC-28	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Salmonella O8	Salmonella spp. +	Salmonella: +	三者均相符
3	CDC-41	糞便	culture, 生化試驗, 血清鑑定,	Salmonella	Salmonella spp. +	Salmonella: +	三者均相符
4	CDC-52	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 A 型	S. aureus+	STEC: + (weak)	Luminex GPP 不符合(未有此檢測項目)
5	CDC-53	糞便	culture, 凝集試驗, 毒素鑑定	Staphylococcus aureus 腸毒素 A 型	Undetectable	ND	不相符, 但經 Staphylococcus aureus qPCR 反應確認該檢體為未檢出。
6	CDC-54	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Shigella sonnei phaseII	Shigella spp.+	Shigella:+	三者均相符
7	CDC-56	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	S.flexneri 3a	Shigella spp.+	Shigella:+	三者均相符
8	CDC-89	臨床分離菌株	culture, 生化試驗, 血清鑑定	Vibrio cholerae	Vibrio cholerae +	ND	Luminex GPP 不符合
9	CDC-106	1061148	08-102-215289	Vibrio parahaemolyticus/腸炎弧菌混合血清型 1 群	V parahaemolyticus +	ND	Luminex GPP 不符合(未有此檢測項目)
10	CDC-120	1050387	08-102-586674	B. cereus	V parahaemolyticus +	ND	均不相符, 需進一步利用 V. parahaemolyticus 之 qPCR 檢測。
11	CDC-65	糞便		陰性糞便檢體	undetectable	ND	三者均相符
12	CDC-66	糞便		陰性糞便檢體	undetectable	ND	三者均相符

5. 糞便前處理方法之評估

糞便檢體帶有黏液、食物殘渣與大量腸道細胞等，在進行核酸萃取前，通常需要先經過前處理步驟，除了將糞便稀釋至緩衝液中，並利用特殊方式處理使糞便變成均質之液態檢體，以利後續核酸萃取，提高回收率。在本研究最初採用商業套組 Luminex GPP 操作步驟所建議之糞便前處理方法，亦即以 Stool lysing kit (SK38, Bertin 公司生產，每一管中含有玻璃珠與氧化鋯珠混合物，適用於糞便、土壤、動物或植物組織當中之微生物溶解用)，搭配組織均質儀(tissue homogenizer, Bertin Percellys-24)，但考量 stool lysing kit 的售價逐年提高(由每管 100 元提高至 140 元)，且搭配之組織均質儀造價不斐(約 20 萬元)，而疾管署腹瀉實驗室提供之糞便前處理方法其材料平均每一件檢體費用不到 10 元，因此，為降低 SSMP-SBA 每一件糞便檢體操作之成本，將 Luminex GPP 建議之糞便前處理方法與疾管署提供之方法進行比較。本實驗中採用模擬金黃色葡萄球菌陽性糞便檢體與諾羅病毒陽性糞便檢體，經各種糞便前處理條件作用後(細節詳見實驗方法)，以自動化核酸萃取方式純化 total nucleic acid，再進行 qPCR 反應，由 qPCR 定量結果評估各處理方法之效能。

表 11 針對模擬金黃色葡萄球菌陽性糞便檢體之各種前處理方法比較中，以 SK38 lysing kit 搭配均質儀作用 1.5 分鐘(方法 A-2)，所得到的金黃色葡萄球菌核酸量最高，如果作用 4.5 分鐘(方法 A-1)細菌核酸量稍微減少，而疾管署提供之材料方法(方法 C)，結果與 A-1 差異不大，如果採用 SK38 lysing kit 但搭配震盪器(方法 B-1 與 B-2)，不論作用 4.5 分鐘或 1.5 分鐘，所得到的細菌核酸量最低。

表 12 針對諾羅病毒陽性糞便檢體之各種前處理方法比較結果，以 SK38

lysing kit 搭配均質儀作用 1.5 分鐘(方法 A-2)，所得到的諾羅病毒核酸量最高；以 SK38 lysing kit 搭配震盪儀於室溫震盪 5 分鐘(方法 A-3)所得到的病毒核酸量只比 A-2 略少；如果 SK38 lysing kit 搭配均質儀作用 4.5 分鐘(方法 A-1)，病毒核酸量明顯降低 1/10，顯然均質時間延長，可能造成檢體產熱而影響病毒核酸的回收。疾管署提供之材料方法(方法 B)，結果與 A-2 差異不大，所得到的病毒核酸量較多。

綜整以上結果，不論對於細菌或病毒偵檢來說，疾病管制署腹瀉實驗室現行之糞便前處理方法都可媲美商業套組 Luminex GPP 建議之糞便前處理方法，但是在材料價格與儀器需求上，佔有更多優勢。

表 11、模擬金黃色葡萄球菌陽性糞便檢體之各種前處理方法比較結果

編號	前處理方法	模擬金黃色葡萄球菌陽性糞便檢體所含菌量	qPCR (Cq)	qPCR 定量結果 (genome equivalent)
A-1	SK-38 + homogenization 4.5 min	2x10 ⁵ cfu/μl	21.54	3.94 x 10 ⁴
		2x10 ⁴ cfu/μl	24.13	7.78 x 10 ³
A-2	SK38 + homogenization 1.5 min	2x10 ⁵ cfu/μl	20.05	9.54 x 10 ⁴
		2x10 ⁴ cfu/μl	23.75	1.07 x 10 ⁴
B-1	TCDC 玻璃珠 + homogenization 4.5 min	2x10 ⁵ cfu/μl	27.58	1.11 x 10 ³
		2x10 ⁴ cfu/μl	30.75	1.7 x 10 ²
B-2	TCDC 玻璃珠 + homogenization 1.5 min	2x10 ⁵ cfu/μl	26.93	1.63 x 10 ³
		2x10 ⁴ cfu/μl	30.89	1.57 x 10 ²
C	TCDC 前處理方法	2x10 ⁵ cfu/μl	21.62	3.77 x 10 ⁴
		2x10 ⁴ cfu/μl	25.62	3.55 x 10 ³

表 12、諾羅病毒陽性糞便檢體之各種前處理方法比較結果

編號	前處理方法	qPCR (Cq)	qPCR 定量結果 (genome equivalent)
A-1	SK38 + homogenization 4.5 min	26.44	9.07x 10 ³
A-2	SK38 + homogenization 1.5 min	22.19	1.49 x 10 ⁵
A-3	SK38 + Vortex 5 min	23.20	7.69 x 10 ⁴
B	TCDC 前處理方法	22.20	1.48x 10 ⁵

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[21-23]。*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[24]，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[25]，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。

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[26, 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[26]，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 11 株分離菌株中，我們以 SSMP-SBA 偵測結果 10 株為陽性，1 株為陰性，陰性部分再次經由 *Staphylococcus aureus* qPCR (針對 *femB* 基因)反應檢測亦呈現陰性，顯示該菌未帶 *femB* 基因。由於先前疾病管制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 考量 *femB* 檢測可能無法涵蓋所有金黃色葡萄球菌，我們曾經選用其他 housekeeping gene (如 nuclease)[30]進行檢測，但是陽性比例更低，可能是 PCR 效能不佳引起，將測試其他合適之標的基因。

挑選 12 支疾管署提供之臨床檢體(包括 10 支陽性檢體與 2 支陰性檢體)以多重腹瀉性病原核酸偵測平台 (SSMP-SBA-GI)與市售商業產品 Luminex GPP 檢測，同時與疾管署腹瀉實驗室之檢測結果比對如表 10，其中多重腹瀉性病原核酸偵測平台 (SSMP-SBA-GI)與疾管署腹瀉實驗室之檢測吻合比例較高，為 83.3% (10/12)，編號 CDC-53 之檢體經 *Staphylococcus aureus* qPCR (*femB* gene)反應確認該檢體為未檢出，推測可能是檢體當中之細菌量低於 SSMP-SBA-GI 與 qPCR 之偵測極限以致未測得，或該檢體當中之 *S. aureus* 未帶 *femB* gene；此外，CDC-120 為 *Bacillus cereus* 陽性檢體被驗出 *Vibrio parahaemolyticus*，該檢體尚需進一步以 *Vibrio parahaemolyticus* 之

qPCR 方法確認檢體中是否含該菌。此 12 支檢體經市售商業產品 Luminex GPP 檢測與疾管署腹瀉實驗室之檢測相符比例為 58.3% (7/12)，其中 CDC-52、53、106、120 結果不相符的主要原因是因為該平台未含這些項目的檢測，CDC-89 為 *Vibrio cholerae* 分離菌株，但 Luminex GPP 未檢出。由表 2 顯示，*Staphylococcus aureus*、*Vibrio parahaemolyticus* 與 *Bacillus cereus* 是台灣感染性病原引起食物中毒之常見原因，因此目前 Luminex GPP 的檢測內容不足應付國內之需求。

多重致病原核酸偵測平台的建立過程相當繁複，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 7 可看出目前部分項目偵測極限約為 1000 GE，為提升檢測的極限，後續研究將持續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

第二年(107年)計畫已完成 12 項腹瀉性病原之 14 種標的基因同步核酸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，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。

六、參考文獻

1. 林秋香等、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*. European communicable disease bulletin, 2009. **14**; 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 年 6 月 24 日 第 30 卷 第 12 期 p238-245.
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. Liu, J., et al., *Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study*. The Lancet Infectious Diseases. **14**(8): p. 716-724.

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. Cai, T., et al., *Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2006. **46**(2): p. 180-186.
16. Kageyama, T., et al., *Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(4): p. 1548-1557.
17. 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*. Int J Microbiol, 2010. **2010**.
18. Blanco, M., et al., *Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin -Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(2): p. 645-651.
19. McCleery, D.R. and M.T. Rowe, *Development of a model meat system and investigation of the growth characteristics and genetic stability of *Escherichia coli* O157:H7, in the absence of meat microflora*. Journal of Microbiological Methods, 2002. **49**(2): p. 135-145.
20. Mazaheri, S., S. Salmanzadeh Ahrabi, and M.M. Aslani, *Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from lettuce samples in tehran, iran*. Jundishapur journal of microbiology, 2014. **7**(11): p. e12346-e12346.
21. Zilinskas, R.A., *Iraq biological weapons: The past as future?* JAMA, 1997. **278**(5): p. 418-424.
22. Davis, C.J., *Nuclear blindness: An overview of the biological weapons programs of the former Soviet Union and Iraq*. Emerging Infectious Diseases, 1999. **5**(4): p. 509-512.
23. Török, T.J., et al., *A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars*. JAMA, 1997. **278**(5): p. 389-395.
24. Imperiale, M.J. and A. Casadevall, *Bioterrorism: Lessons Learned Since the Anthrax Mailings*. mBio, 2011. **2**(6): p. e00232-11.
25. Pabbaraju, K., et al., *Comparison of the Luminex xTAG™ Respiratory Viral*

- Panel with xTAG® Respiratory Viral Panel Fast for diagnosis of respiratory virus infections.* Journal of Clinical Microbiology, 2011.
26. Dasaraju PV, L.C., *Infections of the Respiratory System.*, in *Medical Microbiology. 4th edition.* , B. S, Editor 1996.
 27. De Wilde, B., et al., *Target enrichment using parallel nanoliter quantitative PCR amplification.* BMC Genomics, 2014. **15**: p. 184-184.
 28. Bellau-Pujol, S., et al., *Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses.* Journal of Virological Methods, 2005. **126**(1): p. 53-63.
 29. Morozumi, M., et al., *Simultaneous Detection of Pathogens in Clinical Samples from Patients with Community-Acquired Pneumonia by Real-Time PCR with Pathogen-Specific Molecular Beacon Probes.* Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(4): p. 1440-1446.
 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.

七、期末報告審查意見回復表

疾病管制署 107 年度科技研究計畫期末報告審查意見回復表

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-123507

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

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	執行方向合理。	謝謝委員意見!	
2	敏感度(92.9-100%)與專一性(99%)良好，已測試 112 個檢體，都是糞便檢體嗎?	檢體種類為糞便、菌株或核酸，病原陽性或陰性檢體。	
3	建議 Panel 先以 5-6 種台灣最常見的腹瀉病原為主，如 Rotavirus, Norovirus, Salmonella, Campylobacter 等，篩不出來再測少見的。	感謝委員! 平台內之項目可彈性應用，未來可依據委員建議，分成兩種或多種不同組合，達到精簡物力之原則。	
4	CDC-53 檢體不一致原因需要進一步探討。	有可能是檢體當中的菌量低於本平台偵測極限，將以其他方法如 qPCR 進一步確認。	
5	計畫執行內容與進度相符，平台可供腹瀉群聚調查使用，建議可多著墨如何應用於臨床或腹瀉群聚調查使用。	謝謝委員的寶貴建議!	

6	為何每個 NTC 的背景值不同?	推測與每種致病原標的之探針序列二級結構狀態不同有關。不過在最終分析各標的之反應時，我們會將檢體於各微球標的螢光訊號扣除 NTC 之螢光訊號所得到的淨值再與 cut-off 值比較，可減少背景值不同所造成的影響。	
7	<i>C. difficile</i> 是以院內感染為主，相對上不是重要的腹瀉病原，腹瀉的 Panel 中以 <i>C. perfringens</i> 較重要。	感謝委員的意見，已規劃將 <i>C. perfringens</i> 納入平台之檢測項目。	

