

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-114706

衛生福利部疾病管制署 106 年科技研究計畫

多重病原菌實驗室診斷方法之開發

年度研究報告

執行機構：行政院衛生福利部疾病管制署

計畫主持人：李淑英

研究人員：廖美惠、陳育辰、陳國緯、黃彥康

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

計畫摘要.....	1
一、 中文摘要.....	1
二、 英文摘要.....	3
本文.....	5
一、 前言.....	5
二、 材料與方法.....	10
三、 結果.....	14
四、 討論.....	16
五、 結論與建議.....	18
六、 計畫重要研究成果與具體建議.....	19
七、 參考文獻.....	20
八、 圖.....	23
附錄：圖表目錄.....	27

計畫摘要

一、中文摘要

關鍵詞：多重鑑定，性傳染病，共同感染，核酸增幅檢測，流式微珠技術

近年來隨著氣候變遷，人類行為改變，國際交流接觸頻繁，各種新興和再興傳染病不斷崛起，許多病原菌以多種不同的面貌重新崛起，或增加致病力，或增加抗藥性，或出現新的傳播途徑及危險族群，對於傳染病防治形成莫大的挑戰。傳統檢測多使用培養方法，在人力和時間上花費甚多，檢驗準確性也有極大的不足，增加院內傳染的風險和延誤治療時機。因性觀念的解放，造成性傳染病在全世界的案例節節升高，許多患者在感染期其中一種性病後，因為免疫力的下降，藉由類似的傳染途徑可能感染另一種性傳染病，這種共同感染情形占總性病病例不小的比例，且部分性病所導致的發炎反應可增加其他性病的傳染力，顯示對性病共同感染檢測技術的需求。因此快速且精準之多重病原菌檢測技術的發展對於降低疾病的傳染、疾病的治療與降低社會醫療成本的支出有極高相關。

本研究計畫目標為發展多重性病病原體快速檢驗方法，首先利用新的引子設計方法 (LNA primers) 改良 multiplex PCR 檢測及引入 multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 技術，並將這些技術與Luminex流式微珠技術結合發展偵測性病多重感染病原菌檢測平台。

以監測傳染性病病原引入、崛起傳播情形。本計畫所研發之系統期望提供高危險族群篩檢服務，挖掘及鑑別國內新興高危險群，以協助防治資源之分配及介入措施之研擬。本年度建立淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)，砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)，泌尿生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)及陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*) multiplex oligonucleotide ligation-PCR

(MOL-PCR) 技術，實驗結果顯示淋菌偵測極限為1 ng。並將Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 技術與Luminex xTAG[®] assay結合可成功檢測出砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)及泌尿生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)。

二、英文摘要

keywords : rapid identification method, Multiplex detection, sexually transmitted infections, nucleic-acid amplification testing, coinfection, microsphere-based suspension array

In recent years, due to climate change, social and behavior changes, and frequent international travel and contacts, new pathogens keeps emerging and old pathogens re-emerge with multiple faces, such as with increased virulence and resistance or new transmission routes and high-risk groups, which constitute great challenges for disease control. Traditional tests use more culture methods, which cost much manpower and time. The accuracy of the test is also a great shortage, which causes delay in treatment time and increases the risk of nosocomial infection. With the openness of sexual attitudes and frequent sexual contact between people, the cases of sexually transmitted diseases have been rising around the world. After a period of time infect with a sexually transmitted disease, many patients may be infected with the other sexually transmitted disease with a similar mode of transmission because of the decline in immunity. Such a coinfection is not a small proportion in total sexually transmitted diseases case. Moreover, inflammation caused by some sexually transmitted diseases increase the infectivity of other sexually transmitted diseases. These show the need for detection technology of sexually transmitted disease coinfection. From the above, the development of rapid and accurate detection of multiple pathogens is highly associated to the decrease of disease infection, enhancing treatment of disease and reducing social expenditure of medical costs.

This research is aiming at developing multiplex detection technology of sexually transmitted diseases pathogen coinfection. First, a new primer design method (LNA primers) is used to modify multiplex PCR detection and the

oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) technique is introduced. Then, these techniques combined with Luminex beads technology for developing multiplex detection technology of sexually transmitted diseases pathogen coinfection. We had established (1) multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) technique for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* , *Chlamydia trachomatis* , *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma genitalium*. The limit of detection (LOD) for *Neisseria gonorrhoeae* was 10 ng of its genomic DNA. (2) The combination of multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) with the Luminex xTAG® assay can detect *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium*.

本文

一、前言

性病是人類最常見的傳染病之一並且在全球造成重大的公共衛生問題，主要的病原菌為淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)，砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)，泌尿生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)，人類黴漿菌(*Mycoplasma hominis*)，尿溶解黴漿菌(*Ureaplasma urealyticum*)，單純皰疹病毒(*Herpes simplex virus*, HSV)，人乳頭狀瘤病毒(*Human papillomavirus*, HPV)，人類免疫缺陷病毒(*Human immunodeficiency virus*, HIV)，梅毒螺旋體(*Treponema pallidum*)和陰道滴蟲(*Trichomoniasis vaginalis*)。2008 年美國估計有 1.1 億人罹患性病，其中有 20% 以上是 15-24 歲的年輕人¹，造成醫療照護支出高達 156 億美元²。性病感途徑類似，且感染性病常誘發其他病症並降低人體免疫力，因此性病共同感染的情形甚為普遍，據估計 60% 的患者，同時感染至少二種性病。近年發現 HIV 常伴同感染梅毒、HBV、HCV、淋菌、生殖道披衣菌等。HIV 感染者若伴同感染性病，其性病症狀較嚴重、再發率、及治療失敗之比例亦較高。本署慢性組統計顯示性病患者感染愛滋病毒的機率比常人高出許多。近年研究更顯示，若干非潰瘍性性病如淋菌、披衣菌的感染，可能增加 3-4 倍 HIV 的感染及傳播的機率；若是潰瘍性性病，如初期梅毒、軟性下疳、性器官疱疹(HSV-2)等，增加的機率則更高達 2.2-11.3 倍³。女性 HIV 感染者，若伴有細菌型陰道炎、單純皰疹病毒(*herpes simplex virus*; HSV)、人類乳突病毒(*human papillomavirus*, HPV)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、生殖道披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)、念珠菌(*Candida spp.*)感染、生殖道潰瘍或陰道有分泌物者會分泌較多的 HIV 病毒。男性 HIV 感染者，若伴有淋菌、巨細胞病毒(*Cytomegalovirus*, CMV)、陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)、尿道

炎或生殖道潰瘍其精子也會有較多的 HIV 病毒。這可能導因於黏膜表面破損，病灶細胞發生病變，破壞了宿主防禦屏障。而發炎潰瘍反應，匯集了免疫細胞，助長了 HIV 病毒的繁殖滋長。此外，若淋菌等性病感染在 HIV 之後，可能意味著患者感染 HIV 後仍無視於散佈病毒給伴侶的風險，持續從事危險性行為，若其中有隱匿或蓄意的情事，嚴重時可視為犯罪行為。由此觀之，加強性病的檢驗確能有助 HIV 的防治⁴。

性病治療最為棘手的問題是在早期感染階段是無症狀，不同的病原菌感染經常出現的類似症狀而造成臨床診斷的困難及不正確。傳統上，顯微鏡檢查和病原體培養被認為是性病病原菌鑑定的標準方法，淋菌、砂眼披衣菌、泌尿生殖道黴漿菌、人類黴漿菌、尿溶解黴漿菌、單純皰疹病毒相關的鑑定方法已被制訂⁵⁻⁸。然而，病原菌培養過程需要三到七天，有時甚至數週才能完成⁹，人乳頭狀瘤病毒和梅毒螺旋體的培養是困難^{10,11}。性病相關病原菌檢測法方還包括了血清免疫學檢驗^{12,13}、核酸增幅檢驗或核酸雜交檢驗¹⁴。血清免疫學檢驗如酵素免疫分析法(Enzyme Immunoassay, EIA)、直接螢光抗體分析(direct immunofluorescence assays, DFA)，因不需病原菌培養可快速提供檢驗結果，但這些方法無法排除交叉反應及無法區分抗體是正在進行的或過去感染所產生的¹⁵。以核酸增幅的方法檢測性病病原菌被認為是比傳統的顯微鏡檢查或耗時病原菌培養更靈敏並適用於高通量無症狀個案篩檢。近來已有多種不同的方法如 ligase chain reaction (LCR)、strand displacement amplification (SDA)、transcription-mediated amplification (TMA)、Real-time PCR、helicase-dependant amplification (HDA)、membrane-based reverse line blot (RLB)、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)、DNA Microarray、bead-based Luminex hybridisation 分別用於淋菌、砂眼披衣菌、泌尿生殖道黴漿菌、尿溶解黴漿菌、單純皰

疹病毒、人乳頭狀瘤病毒、梅毒螺旋體、陰道滴蟲檢測¹⁶⁻²⁶。

Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 為改善由荷蘭的 Dr. Schouten JP 所帶領的研發團隊於 2002 年發表 Multiplex ligation dependent probe assay (MLPA) 的實驗方法。MLPA 是透過專一性探針組 (upstream Probe, downstream Probe) 黏合 (anneal) 至目標序列，若完全黏合，則連接酵素 (ligase) 會將兩條探針目標序列區域連接為片段，可利用通用引子組進行 PCR 增幅反應，將兩條探針目標序列區域連接的片段增幅，以利後端片段分析。若目標序列缺失 (deletion) 或產生突變，則兩條探針組無法連接成功，則不會有兩條探針目標序列區域之增幅產物，最後利用毛細管電泳來分離來自不同目標序列放大的 DNA 片段並偵測²⁷。至今此技術已應用於多種領域的研究及診斷，包括結核分枝桿菌 (Mycobacterium tuberculosis) 的抗藥性檢測、牙齒上的生物膜檢測、呼吸道的病毒的偵測²⁸ 及七種性傳染病的檢測²⁴。MOL-PCR 與 MLPA 不同的地方在於，將探針與目標序列雜交 (hybridization) 改為以溫度循環變化的方式，使雜交 (hybridization)、連接 (ligation) 反應交互進行來縮短反應時間，而產物則利用 Luminex 微珠陣列系統做偵測而^{29,30}。MOL-PCR 可用來檢測特殊的 DNA 序列片段，其精準度甚至可用來檢測 SNP 的變異、移除與重複，以及 DNA 片段的插入^{28,29}，且帶有快速、高效率、易於操作、資料容易於不同實驗室傳遞等特性²⁹，已被使用於多種病原菌的檢驗，並證明和商業 real-time PCR kit 有相同的辨識能力³¹。MOL-PCR 是經由長度各約 40-70 個 upstream 及 downstream 二條核苷酸的單股探針辨識並與受溫度影響而打開的目標單股 DNA 片段結合，此時 upstream Probe 的 3' 端鄰近於 downstream Probe 的 5' 端受到接合酶 ligase 的作用，將兩條探針接成一個長度約 100-120 個核苷酸的片段，在多重目標物的檢測中，若是有任一探針因序列的不吻合而無

法結合到目標片段，因 upstream Probe 及 upstream Probe 無法靠近連接 (ligation) 反應無法發生。為將接合的片段以 PCR 增福 (PCR amplification) 反應增殖，於 upstream Probe 的 5' 端及 downstream Probe 的 3' 端加入通用引子序列 (forward and reverse primers)，並於 reverse primers 5' 端標示 Biotin。為利用 Luminex 檢測平台偵測 MOL-PCR 產物，在 upstream Probe 的 forward primer 序列後加入 MagPlex-TAG™ Microspheres 的 anti-TAG 序列^{28, 32}。

為解決 multiplex PCR 中引子相互干擾造成偽陽性和偽陰性的問題還有其他方法，鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA) 為一種核酸類似物，其原理為，在核苷酸中的五碳核糖的二號氧原子與四號碳原子形成亞甲基橋，此結構將使得五碳核糖維持在某一構形，而此構形類似於在形成雙股 DNA 時會使得每個核苷酸的鹼基堆疊的最緊密，形成能階較低的 B-type，此狀態也能降低鹼基的非專一性結合³³。LNA 常編於 DNA 或 RNA 的寡核苷酸鍊中，使其螺旋結構改變，增加形成雙股專一性、親合性和穩定性。在設計引子或探針合成時編入 LNA，也就是將原本序列中的核苷酸替換為 LNA 的形式時，melting temperature (T_m) 值會上升，樣本中 DNA 模板的需求量也會下降，使得 LNA 的修飾在 microarray、miRNA 的偵測、real-time PCR 等技術中被廣泛使用³⁴。由於提高專一性的特性，LNA 亦可用於 multiplex PCR，根據文獻，加在引子 5' 端的含 LNA 的序列才有穩定引子專一性的效果，且引子上必須是不能多於三個，且不能是連續的 LNA 存在時，提高引子專一性結合的能力才會最好³³。根據這些原則，在 2016 年的一篇研究報告中，作者在 5' 端引子的前端，和 3' 端引子的尾端 (也就是引子的 5' 端) 加上分別帶有三個 LNA 的額外序列，藉此可提高 annealing temperature 到 70°C，大幅降低引子非專一性結合的機率，且精確的利用此方法設計出五對豬傳染性病毒的引子，在進行 multiplex PCR

後進行 DNA 電泳分析觀察³⁵。本研究計畫，將利用文獻中所指示之方法來設計引子，藉以改良 multiplex PCR 技術。

條碼磁珠多元檢測平台為係採用半導體製程生產，以高端的金屬蝕刻技術在晶圓表面上切割出無數的條碼的，再以極穩定的多分子聚合物包埋，使其具有專一性的核苷酸探針或蛋白質的條碼磁珠，提供核酸、蛋白質等檢測。條碼磁珠使用二進位編碼原則，可提供不同編碼的磁珠，與探針序列鍵結後，高達 128 種不同的生物探針可混和在一起，利用螢光進行核酸分子或蛋白質等標的物之多元檢測，搭配使用高端顯微光學影像系統，在白光下條碼可被清楚的辨識，一次可做高達 96 個樣本。目前條碼磁珠多元檢測平台包括 Applied BioCode 公司研發的 Digital multiplexing molecular platform 及公司研發的 IntelliPlex multiplexing platform。

近年來由於醫療費用不斷的提高，醫療院所對多重病原菌快速檢測之臨床需求日益提升，臨床檢驗在人力、時間及實驗室的管理與維護上更需要選擇省時、簡單、快速、可靠並具經濟效益的檢驗方法。本研究計畫主要目的為建立多重病原菌檢測技術並配合微珠陣列系統(MSA；microsphere-based suspension array)、條碼磁珠(Barcoded Magnetic Bead) 或其多重檢測平台，快速精準鑑別性病多重感染病原菌，以協助釐清病原及適時抗生素治療建議，減少抗藥性病原菌的產生。

二、材料與方法

(一)、菌株與檢體的收集

1. 標準菌株

從國內外各菌種中心引進性病病原菌 *Chlamydia trachomatis*、*Mycoplasma genitalium*、*Mycoplasma hominis*、*Ureaplasma urealyticum*、*Ureaplasma parvum*、*Trichomonas vaginalis* 之標準菌株。

2. 性傳染病檢體

收集性病患者的檢體包括血清、子宮頸拭子、潰瘍處拭子與尿液檢體。

(二)、細菌病原分離株及檢體 DNA 的萃取

1. 細菌病原分離株

在培養基培養 1~2 天後，以 MasterPure yeast DNA Purification Kit (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, Wisconsin) 依試劑說明書萃取 DNA，萃取出 DNA 冰存於 -20°C 冰箱中，供後續實驗的分析。

2. 性病尿液及生殖泌尿道拭子

依循市售 QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany) 套組，進行尿液與子宮頸拭子檢體 DNA 萃取的實驗。萃取出 DNA 冰存於 -20°C 冰箱中，供後續實驗的分析。

(三)、鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA) 改良之 multiplex PCR 技術

根據前人的研究，將含 LNA 的額外序列進行改良加至 forward primer 與 reverse primer，改良依據為避免額外序列與待測物檢體 DNA 一致。(大寫部分為經過 LNA 改造後的核苷酸)。

For forward primer: cttCctGtcCagttcatcctgacc

For reverse primer : ccaCtacCtgCactgacacgtctc

之後根據參考文獻，將分析物與各種類帶額外序列的引子混合並進行 PCR 放大。總反應體積為 25 μ l，其中包含 0.2 μ M 帶有額外序列的引子與適量的待測 DNA，12.5 μ l 2X DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, K1071)，nuclease free distilled water 混勻。PCR 條件為 94 $^{\circ}$ C 反應 2 min 使 DNA 解開為單股，之後執行 10 個循環來略許放大分析物，每個循環包含 94 $^{\circ}$ C 反應 20 s，60 $^{\circ}$ C 反應 30 s，72 $^{\circ}$ C 反應 30 s，10 個循環結束後，再執行 30 個循環進行 annealing temperature 之高專一性放大，每個循環包含 94 $^{\circ}$ C 反應 20 s，70 $^{\circ}$ C 反應 10 s，72 $^{\circ}$ C 反應 30 s，循環結束後以 72 $^{\circ}$ C 反應 5 min。初步反應後的產物以 DNA 電泳進行分析。

(四)、Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR)

1. 目標序列選定及 MOLigo Probe 設計

在 NCBI 資料庫搜集性病病原菌及院內感染致病性真菌目標基因序列，並找出變異較大之區域做為 MOL-PCR 的目標序列設計 MOLigo Probe。並利用 NCBI blast 功能以避免探針非特異性的結合，排除會造成偽陽性的序列。

為進行 MOL-PCR，在 upstream MOLigo Probe 5' 端與 downstream MOLigo Probe 3' 端探分別加入 T7 primer 與 T3 primer 序列，當 MOLigo Probe 完全黏合 (anneal) 至目標序列，連接酵素 (ligase) 會將 MOLigo Probe 連接，可利用 T7 primer 與 T3 primer 序列進行 PCR 增幅反應。

為利用 Luminex 檢測平台偵測 MOL-PCR 產物，在 upstream MOLigo Probe 於 T7 primer 序列後加入 MagPlex-TAGTM Microspheres 的 anti-TAG 序列，並於 T3 primer 的 5' 端標示生物素 (Biotin)。

2. Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR)

反應體積為 10 μ l，包含 2 nM 的 upstream MOLigo Probe，downstream MOLigo Probe，1X Taq DNA ligase reaction buffer (New England BioLabs)，2 units of Taq DNA ligase (New England BioLabs)，2 μ l 待測 DNA 及 nuclease free distilled water。

雜合 (hybridization)、連接 (ligation) 初始以 95°C 反應 10 分鐘，之後進行 30 次循環 58°C 45 秒的連接反應及 95°C 10 分鐘的變性反應。雜合 (hybridization)、連接 (ligation) 完成後取 5 μ l 產物進行片段增殖放大，反應體積為 25 μ l，包含 0.25 U 的 HotStartTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)，1 \times DNA polymerase buffer, 125 nM T7 primer，500 nM 5'-biotin-T3 primer 及 200 mM dNTPs。反應條件為初始以 95°C 15 分鐘，35 次循環的變性反應 94°C 30 秒 \rightarrow 黏和 58°C 30 秒 \rightarrow 72°C 30 秒的聚合延長反應，之後再進行 72°C 5 分鐘延長反應。最後的 PCR 產物保存於 4°C。

(五)、微珠陣列核酸檢測系統 (MSA ; microsphere-based suspension array)

磁珠 (MagPlex-TAG™ Microspheres) 以 2X T_m Hybridization Buffer (0.4 M NaCl, 0.2 M Tris, 0.16% Triton X-100) 稀釋為 100 顆磁珠/ μ l。取 2X T_m Hybridization Buffer 包含 2,500 顆磁珠與 25 μ l 2. Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 增幅產物混合均勻，置於暗室於 95°C 反應 10 分鐘，接著於 37°C 反應 30 分鐘。去除上清液，加入 75 μ l 1X T_m Hybridization Buffer 包含 10 ng/ μ l streptavidin-R-phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR)，置於暗房 37°C 10 分鐘。最後將樣本分別加至 96 孔 ELIS A 盤，以 Bio-Plex 200 Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) 檢測。螢光強度中位數值 (Median fluorescent intensity, MFI) 為測量 100 個訊號

數值之中位數，再由 Bio-Plex Manager 4.1.1 軟體分析結果

(六)、統計分析

使用 SPSS(16.0 版)軟體分析各種偵測病原菌方法的準確性、以及其靈敏度。

三、結果

(一)、以鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA) 改良 multiplex PCR 技術檢測淋菌

依據淋菌 PorA pseudogene 序列並參考文獻設計專一性嵌合體引子 (chimeric primer)，專一性嵌合體引子(chimeric primer) 包含 3' 端淋菌 PorA pseudogene 專一性序列及 5' 端不與淋菌 PorA pseudogene 序列互補通用序列 (universal sequence)，而通用引子(universal primer)則以專一性嵌合體引子(chimeric primer)的通用序列 (universal sequence)做為通用引子序列。為了將專一性嵌合體引子(chimeric primer)及通用序列 (universal sequence)至於單管反應並做多重檢測，而將通用序列 (universal sequence)以鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA)修飾。

分別以專一性嵌合體引子(chimeric primer)及通用引子(universal primer)經測試可成功擴增淋菌目標基因，淋菌 DNA 偵測極限為 10 ng (圖一)。而將專一性嵌合體引子(chimeric primer)及以鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA)修飾之通用引子(universal primer)於單管反應則無擴增淋菌目標基因。

(二)、建立淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)，砂眼披衣菌 (*Chlamydia trachomatis*)，泌尿生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*) 及陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*) Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR)技術

淋菌，砂眼披衣菌，泌尿生殖道黴漿菌及陰道滴蟲 species-specific 探針分別依據 PorA pseudogene，Open reading frame 8 cryptic plasmid，MgPa adhesion gene，Adhesive protein gene 的序列並參考文獻修改。經測試淋菌，砂眼披衣菌，泌尿生殖道黴漿菌及陰道滴蟲 species-specific 探針皆可成功

擴增目標基因；淋菌 species-specific 探針與砂眼披衣菌無交叉反應，砂眼披衣菌 species-specific 探針也與淋菌無交叉反應（圖 二）。

淋菌偵測極限測試以分離菌株以 10 倍序列稀釋，濃度由 100 ng/μl 至 100 fg/μl，經測試電泳顯示偵測極限為 1 ng（圖 三）。

以 11 隻臨床檢體(其中 7 支檢體以 in-house PCR 檢測為淋菌，4 支檢體為陰性)比較淋菌 species-specific 探針檢測之一致性，測試結果為 72.7 % (8/11)。以 11 隻臨床檢體(其中 4 支檢體以 Abbott RealTime CT/NG assay 檢測為砂眼披衣菌，7 支檢體為陰性)比較砂眼披衣菌 species-specific 探針檢測之一致性，測試結果為 81.8% (9/11)。

(三)、建立性病病原菌微珠陣列核酸檢測系統 (MSA；microsphere-based suspension array)

性病病原菌微珠陣列核酸檢測系統為結合性病病原菌 Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR)技術與 Luminex xTAG[®] assay 技術之多重核酸檢測模組。本年度初步建立淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)，砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)，泌尿生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)及陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)等四種病原菌之檢測模組。實驗顯示陽性結果的 S/B 比值(sample fluorescence intensity to background fluorescence intensity ratio)範圍為 7.3 至 14.0 (圖 四)。而砂眼披衣菌泌尿生殖道黴漿菌陰性對照 S/B 比值分別為 2.6 及 1.0 (圖 四)，因此在砂眼披衣菌泌尿生殖道黴漿菌可成功檢測出。淋菌及陰道滴蟲陰性對照 S/B 比值分別為 6.9 及 12.7(圖 四)與陽性 S/B 比值差異不大無法區分，其可能原因為淋菌及陰道滴蟲與陰性對照 Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR)非專一性產物與 MagPlex-TAG[™] Microspheres 的 anti-TAG 序列產生非專一性結合。

(四)、討論

因性觀念的解放，性病是人類最常見的傳染病之一並且在全球造成重大的公共衛生問題，性病感途徑類似，且感染性病常誘發其他病症並降低人體免疫力，這種性病共同感染的情形甚為普遍。因此快速、精準之多重病原菌的檢測技術的發展有助於降低疾病的傳染、疾病的治療。因此本計畫擬建立以鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA) 改良 multiplex PCR 技術及性病微珠陣列核酸檢測模組快速多重偵測性病病原菌，並與血清、培養、鏡檢等傳統方法做整合，有助於增加檢驗之準確性並使得檢驗實驗室之工作流程更形精簡流暢，更有助於臨床投藥防治之參考。

實驗結果顯示在鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA) 改良 multiplex PCR 技術以淋菌專一性嵌合體引子(chimeric primer)及鎖核酸 (Locked nucleic acid, LNA)修飾之通用引子(universal primer)於單管檢測因鎖核酸修飾之通用引子產生非專一性反應而無法成功擴增淋菌目標基因。若要改善此非專一性反應可修改通用序列 (universal sequence)或更改鎖核酸修飾通用引子核苷酸。

性病微珠陣列核酸檢測模組為結合 Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 與 Luminex xTAG[®] assay 技術。Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 為改善 Multiplex ligation dependent probe assay (MLPA)實驗方法，利用簡單的雜交(hybridization)、連接(ligation)及 PCR 增幅(PCR amplification)反應，以達到檢出更多病原菌標的。因此我們初步建立此種技術用於淋菌，砂眼披衣菌，泌尿生殖道黴漿菌及陰道滴蟲檢測，並與 Luminex xTAG[®] assay 技術結合配合微珠陣列系統(MSA; microsphere-based suspension array)發展多重性病病原菌檢測模

組。實驗結果顯示在砂眼披衣菌及泌尿生殖道黴漿菌可成功檢測出，而淋菌及陰道滴蟲因陰性對照 Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 非專一性產物可能與 MagPlex-TAG™ Microspheres 的 anti-TAG 序列產生非專一性結合導致 S/B 比值 (sample fluorescence intensity to background fluorescence intensity ratio) 與陽性結果相當無法成功檢測。若要改善或許可將更換 MagPlex-TAG™ Microspheres 的 anti-TAG 序列。

性病微珠陣列核酸檢測模組初步測試檢驗時間可控制在 6 小時之內，如此可望增加檢測效率。顯現本方法確能有助於臨床診斷、投藥之參考。

四、結論與建議

本研究計畫目標為性病多重感染病原菌之快速及精確多重檢測技術平台，以達到快速檢驗病原菌。一般Multiplex PCR是依檢測標的設計引子及專一性探針做PCR增幅(PCR amplification)及偵測，在PCR增幅步驟因多對引子可能會有交叉反應及干擾，因此無法做過多標的檢測，Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 利用專一性探針雜交(hybridization)、連接(ligation)後再以共通性引子做PCR增幅(PCR amplification)反應可避免引子間可能會有交叉反應及干擾，因此至少可做40個以上的檢測標的，在本計畫我們建立多重性病病原檢測模組，以達到快速檢驗釐清病原菌，適時提供治療用藥參考。

本年度建立檢測淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)，砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)，泌尿生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)及陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*) multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 技術，並將該技術與Luminex xTAG[®] assay技術結合配合微珠陣列系統(MSA; microsphere-based suspension array)發展多重性病病原檢測模組，經初步測試部分Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR)非專一性產物有可能會與MagPlex-TAG[™] Microspheres 的anti-TAG 序列產生交叉反應而無法正確判讀我們將繼續改閃反應調檢或更換MagPlex-TAG[™] Microspheres 的anti-TAG 序列。

五、計畫重要研究成果與具體建議

Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 技術，為利用專一性探針雜交(hybridization)、連接(ligation)後再以共通性引子做 PCR 增幅(PCR amplification)反應可避免引子間可能會有交叉反應及干擾可配合微珠陣列系統(MSA；microsphere-based suspension array)、條碼磁珠(Barcoded Magnetic Bead) 或其多重檢測平台，達到快速檢驗病原菌，及抗藥性基因檢測，以協助釐清病原及適時抗生素治療建議，減少抗藥性病原菌的產生。

六、參考文獻

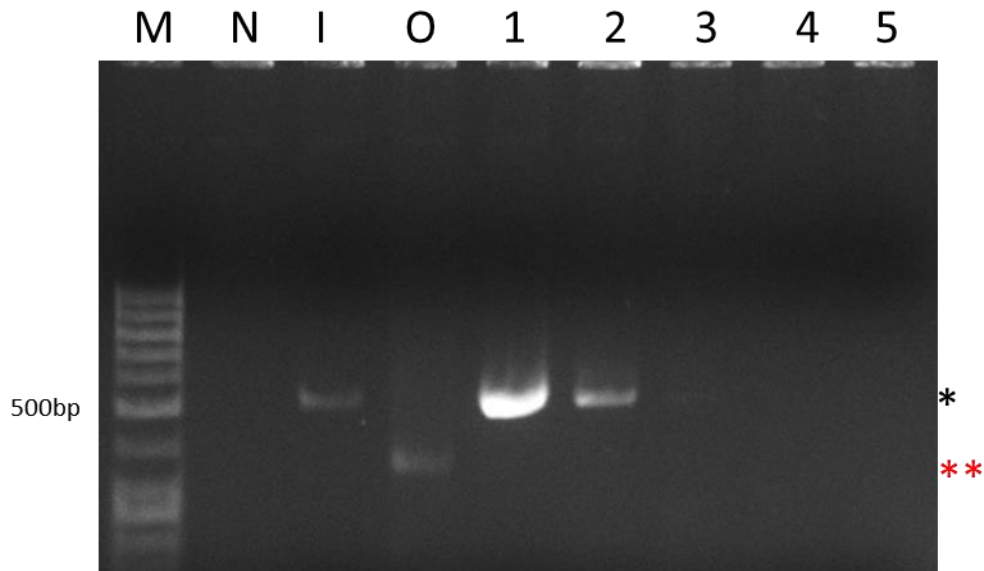
1. Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, et al: Sexually Transmitted Infections Among US Women and Men: Prevalence and Incidence Estimates, 2008. *Sexually Transmitted Diseases* 2013;40:187-93.
2. Owusu-Edusei K, Chesson HW, Gift TL, et al: The Estimated Direct Medical Cost of Selected Sexually Transmitted Infections in the United States, 2008. *Sexually Transmitted Diseases* 2013;40:197-201.
3. Rotchford K, Strum A, Wilkinson D: Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital-tract secretions - Systematic review and data synthesis. *Sexually Transmitted Diseases* 2000;27:243-8.
4. Da Ros C, Schmitt CD: Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Asian Journal of Andrology* 2008;10:110-4.
5. Jephcott AE: Microbiological diagnosis of gonorrhoea. *Genitourin Med* 1997;73:245-52.
6. Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, et al: Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol* 2001;39:1751-6.
7. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, et al: Phylogeny-based rapid identification of mycoplasmas and ureaplasmas from urethritis patients. *J Clin Microbiol* 2002;40:105-10.
8. Slomka MJ, Emery L, Munday PE, et al: A comparison of PCR with virus isolation and direct antigen detection for diagnosis and typing of genital herpes. *J Med Virol* 1998;55:177-83.
9. Hallsworth PG, Hefford C, Waddell RG, et al: Comparison of antigen detection, polymerase chain reaction and culture for detection of Chlamydia trachomatis in genital infection. *Pathology* 1995;27:168-71.
10. Dixit R, Bhavsar C, Marfatia YS: Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. *Indian J Sex Transm Dis* 2011;32:50-2.
11. Larsen SA, Steiner B, Rudolph AH: Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:1-21.
12. Tuuminen T, Palomaki P, Paavonen J: The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Meth* 2000;42:265-79.
13. Clad A, Freidank HM, Kunze M, et al: Detection of seroconversion and persistence of

- Chlamydia trachomatis antibodies in five different serological tests. *Eur J Clin Microbiol* 2000;19:932-7.
14. Morshed MG, Lee MK, Jorgensen D, et al: Molecular methods used in clinical laboratory: prospects and pitfalls. *Fems Immunol Med Mic* 2007;49:184-91.
 15. Cles LD, Bruch K, Stamm WE: Staining characteristics of six commercially available monoclonal immunofluorescence reagents for direct diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *J Clin Microbiol* 1988;26:1735-7.
 16. Kellogg ND, Baillargeon J, Lukefahr JL, et al: Comparison of nucleic acid amplification tests and culture techniques in the detection of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis in victims of suspected child sexual abuse. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2004;17:331-9.
 17. Chernesky MA, Martin DH, Hook EW, et al: Ability of new APTIMA CT and APTIMA GC assays to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in male urine and urethral swabs. *J Clin Microbiol* 2005;43:127-31.
 18. Cosentino LA, Campbell T, Jett A, et al: Use of Nucleic Acid Amplification Testing for Diagnosis of Anorectal Sexually Transmitted Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2012;50:2005-8.
 19. Le Roy C, Pereyre S, Bebear C: Evaluation of Two Commercial Real-Time PCR Assays for Detection of Mycoplasma genitalium in Urogenital Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2014;52:971-3.
 20. Teo JW, Chiang D, Jureen R, et al: Clinical evaluation of a helicase-dependant amplification (HDA)-based commercial assay for the simultaneous detection of HSV-1 and HSV-2. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;83:261-2.
 21. Swenson PD, El-Sabaeny A, Thomas-Moricz V, et al: Evaluation of a transcription mediated amplification assay for detection of herpes simplex virus types 1 and 2 mRNA in clinical specimens. *J Clin Virol* 2016;80:62-7.
 22. Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al: Evaluation of a PCR test for detection of treponema pallidum in swabs and blood. *J Clin Microbiol* 2012;50:546-52.
 23. McKechnie ML, Hillman R, Couldwell D, et al: Simultaneous Identification of 14 Genital Microorganisms in Urine by Use of a Multiplex PCR-Based Reverse Line Blot Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47:1871-7.
 24. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, et al: Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted

- disease pathogens. *Diagn Micr Infec Dis* 2011;71:29-37.
25. Cao B, Wang S, Tian Z, et al: DNA Microarray Characterization of Pathogens Associated with Sexually Transmitted Diseases. *PLoS One* 2015;10:e0133927.
 26. Schmitt M, Depuydt C, Stalpaert M, et al: Bead-based multiplex sexually transmitted infection profiling. *J Infection* 2014;69:123-33.
 27. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* 2002;30:e57.
 28. Deshpande A, Gans J, Graves SW, et al: A rapid multiplex assay for nucleic acid-based diagnostics. *Journal of microbiological methods* 2010;80:155-63.
 29. Wuyts V, Mattheus W, Roosens NH, et al: A multiplex oligonucleotide ligation-PCR as a complementary tool for subtyping of *Salmonella* Typhimurium. *Applied microbiology and biotechnology* 2015;99:8137-49.
 30. Wuyts V, Roosens NH, Bertrand S, et al: Guidelines for optimisation of a multiplex oligonucleotide ligation-PCR for characterisation of microbial pathogens in a microsphere suspension array. *BioMed research international* 2015;2015:790170.
 31. Stucki D, Malla B, Hostettler S, et al: Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PloS one* 2012;7:e41253.
 32. Ceysens PJ, Garcia-Graells C, Fux F, et al: Development of a Luminex xTAG(R) assay for cost-effective multiplex detection of beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016.
 33. Levin JD, Fiala D, Samala MF, et al: Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic acids research* 2006;34:e142.
 34. Ballantyne KN, van Oorschot RAMitchell RJ: Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance. *Genomics* 2008;91:301-5.
 35. Chen R, Gao XB, Yu XL, et al: Novel multiplex PCR assay using locked nucleic acid (LNA)-based universal primers for the simultaneous detection of five swine viruses. *Journal of virological methods* 2016;228:60-6.

七、圖

圖一、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 專一性嵌合體引子(chimeric primer)及通用引子(universal primer)測試



M: marker

N: negative control (H₂O)

I: inner primer only, 100ng genomic DNA

O: outer primer only, 100ng genomic DNA

1: 100 ng genomic DNA (2016NG0728)

2: 10ng genomic DNA (2016NG0728)

3: 1 ng genomic DNA (2016NG0728)

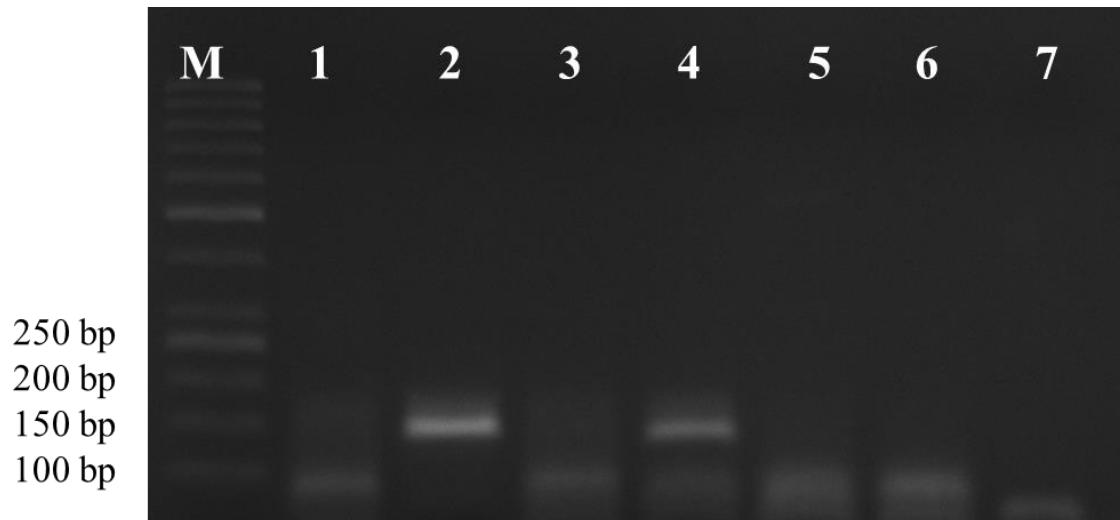
4: 100pg genomic DNA (2016NG0728)

5: 10pg genomic DNA(2016NG0728)

*: specific PCR product

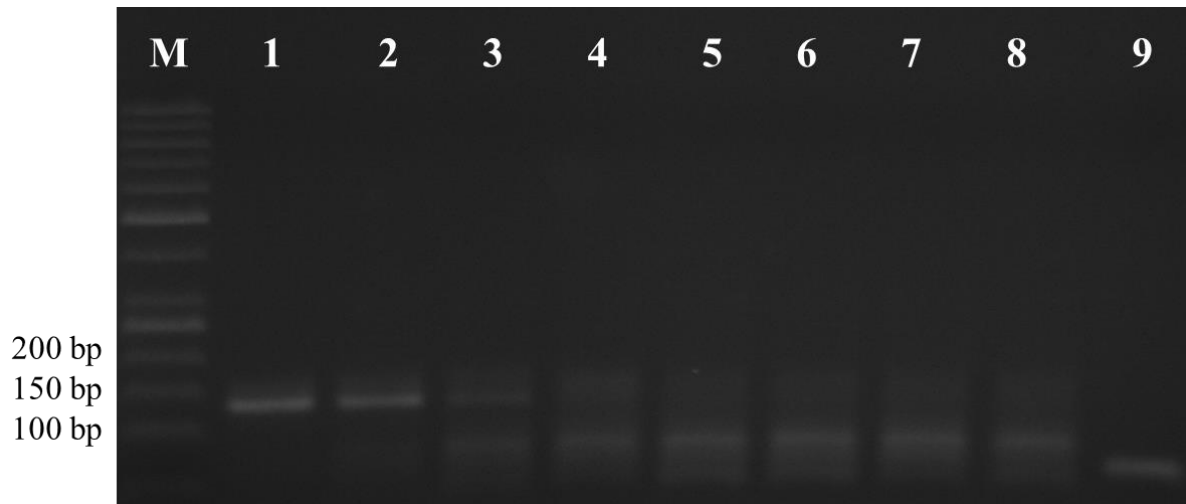
** : non-specific PCR product

圖二、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)及砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)探針專一性測試



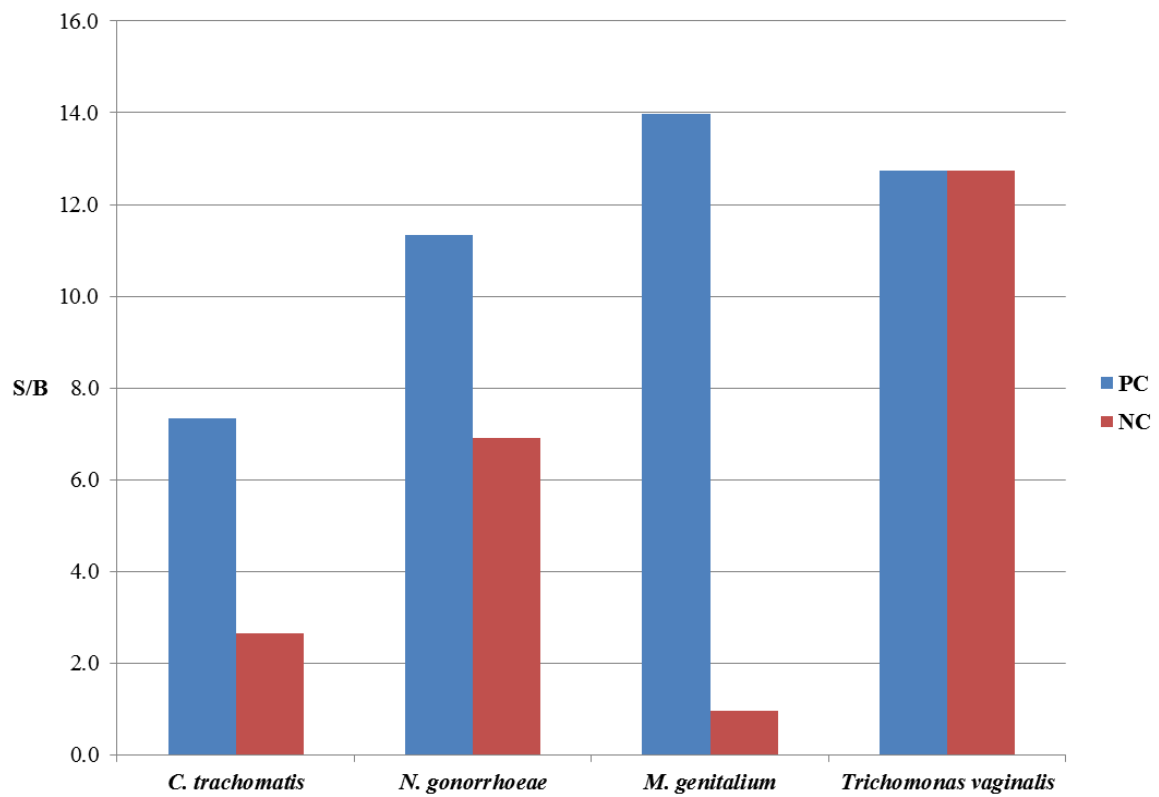
Lane1~Lane3 以淋菌專一性探針做雜交(hybridization)、連接(ligation)反應 (Lane1：砂眼披衣菌， Lane2：淋菌， Lane3：陰性對照)，Lane4~Lane 以砂眼披衣菌專一性探針做雜交、連接反應(Lane4：砂眼披衣菌， Lane5：淋菌， Lane6：陰性對照)，Lane7：PCR 陰性對照。

圖三、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*) Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 偵測極限(LOD)



Lane1：淋菌 DNA 濃度 100 ng，Lane2：淋菌 DNA 濃度 10 ng，Lane3：淋菌 DNA 濃度 1 ng，Lane4：淋菌 DNA 濃度 100 pg，Lane5：淋菌 DNA 濃度 10 pg，Lane6：淋菌 DNA 濃度 1 pg，Lane7：淋菌 DNA 濃度 100 fg， Lane8：陰性對照，Lane9：PCR 陰性對照。

圖 四、性病微珠陣列核酸檢測模組專一性測試



S/B : sample fluorescence intensity to background fluorescence intensity ratio

附錄：圖表目錄

圖 一、淋菌 (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)專一性嵌合體引子(chimeric primer)及通用引子 (universal primer)測試.....	23
圖 二、淋菌(<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)及砂眼披衣菌(<i>Chlamydia trachomatis</i>)探針專一 性測試.....	24
圖 三、淋菌(<i>Neisseria gonorrhoeae</i>) Multiplex oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR) 偵測極限(LOD).....	25
圖 四、性病微珠陣列核酸檢測模組專一性測試.....	26