

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-114709

衛生福利部疾病管制署 106 年委託科技研究計畫

計畫名稱：全自動核酸偵測平台開發與應用

年度/全程研究報告

執行機構：疾病管制署

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：邱譯弘、魏孝倫

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 174.3 萬元整

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

頁 碼

封面

目錄

目次

壹、計畫中文摘要 3

貳、計畫英文摘要 4

參、本文

一.前言 5

二.材料與方法 10

三.結果 15

四.討論 25

五.結論與建議 25

六.重要研究成果及具體建議 25

七.參考文獻 26

表次

表一 17

表二 18

表三 19

圖次

圖一 17

圖二 19

圖三 20

圖四 21

圖五 22

圖六 23

圖七 24

圖八 25

共 (30) 頁

貳、計畫中文摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

關鍵詞：腹瀉、病原、Taqman

我國因急性腹瀉就診比率每週均在 3.5% 之上，本署目前腹瀉病原相關檢驗，包括法定傳染病及腹瀉群聚症狀通報，依腹瀉症狀送驗的個案，有 35% 以上均為現階段監測之病原檢出陰性，為使疾病防治更加完整，有必要釐清這些陰性個案的致病原。本計畫將利用以 Taqman 定量即時聚合酶鏈鎖反應(Taqmanreal-time PCR)原理，偵測多種常規及新興的腹瀉相關病原。目前的研究建立了同時萃取細菌及病毒核酸的萃取方法，設計了 11 種細菌病原的引子及探針組並完成測試，利用 Taqman 定量即時聚合酶鏈鎖反應(Taqmanreal-time PCR), 發現偵測極限在各種病原在 0.5 至 5.2 顆菌之間，可應用於即時腹瀉群聚偵測。

參、計畫英文摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

keywords : Diarrhea , pathogen , Taqman

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. We will take advantage of Taqman quantitative real-time polymerase chain reaction (Taqman real-time PCR) to detect various kinds of conventional and emerging pathogens associated with diarrhea. In the current study, the simultaneously extracted method for virus and bacteria associated with diarrhea disease was developed. Various sets of primers and probes were designed for 11 bacteria pathogens, all sets were validated and the detection limit was found ranged from 0.5 to 5.2 bacteria, this system was useful for real time detection in emergent diarrhea outbreak.

一、前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。

背景分析：

請敘述本計畫產生之背景及重要性，如：(1)政策或法令依據，(2)問題狀況或發展需求，(3)國內外相關研究之文獻探討，(4)本計畫與防疫工作之相關性等。

(一)腹瀉疾病的檢驗現況

我國因急性腹瀉就診比率每週均在3.5%之上(1)，本署的腹瀉病原相關檢驗，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。

(二)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，在已確知原因的案件中，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，尤其在氣溫較低的冬天與初春，經常造成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%，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)，因此有必要開發新病原檢驗項目。

表一：1981年至2011年食品中毒事件統計資料。

單位：案

病因物質	70年 至 79年	80年	81年	82年	83年	84年	85年	86年	87年	88年	89年	90年	91年	92年	93年	94年	95年	96年	97年	98年	99年	100年	總計
病因物質判明合計	337	47	55	57	68	79	128	180	117	96	126	86	124	113	96	96	97	89	102	131	207	160	2,591
細菌小計*	299	42	49	54	62	75	122	177	114	91	116	78	111	105	81	88	92	85	98	125	170	128	2,362
腸炎弧菌	144	12	20	25	35	46	105	160	102	75	84	52	86	82	64	62	58	38	52	61	60	52	1,475
沙門氏桿菌	23	3	3	0	5	8	9	4	5	7	9	9	6	11	8	7	8	11	14	22	27	11	210
病原性大腸桿菌	40	0	4	0	2	7	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	1	10	11	16	96
金黃色葡萄球菌	96	23	18	24	13	12	7	14	3	6	22	9	18	7	9	12	18	23	14	30	41	27	446
仙人掌桿菌	44	13	15	12	12	11	7	15	12	12	5	8	4	11	7	9	10	7	12	11	46	36	319
肉毒桿菌	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	6	1	8	3	34
其他	7	1	0	2	0	4	1	0	0	0	0	3	1	0	0	1	1	0	4	6	5	1	37
化學物質	12	3	2	2	1	2	0	0	0	1	2	1	2	3	4	2	2	1	1	3	2	1	47
天然毒	26	2	4	1	5	2	6	3	3	4	8	7	11	5	11	6	3	3	3	3	11	13	140
諾羅病毒																						35	26
病因物質不明合計	342	46	33	20	34	44	50	54	63	54	82	92	138	138	178	151	168	159	170	220	296	266	2,798
總計	679	93	88	77	102	123	178	234	180	150	208	178	262	251	274	247	265	248	272	351	503	426	5,389

*細菌性中毒案件數之小計，為扣除重複計數之值。

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，恐無法應付這種環境變化，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(4, 5)及化學法(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Taqman real-time PCR檢驗方法與搭配高專一性的MGB探針(6)提高病原檢測之準確性，並經分項病原測試後再配對整合，目標為將多樣病原反應探針，以標準化模式設計向原廠訂製多重病原同步測試檢測片(Taqman Array Card)(7)，操作只需加入檢測樣本核酸，以減省操作人力之誤差及操作之汙染。

本計畫預計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，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細菌病原，整合在一個檢測平台，因此將逐步納入以下的檢驗項目：

1. 李斯特菌

李斯特菌病在美國每年約2,000餘病例(8)，但住院與死亡率皆遠高於其它食媒性病原，該病原菌也經常引發群聚感染事件，例如2011年9月爆發的哈密瓜李斯特菌污染事件(9)，有28州至少有126人感染發病，當中30人死亡(死亡率24%)，另有1名孕婦流產。在我國缺少相關監測與檢驗，全國性流行狀況不明。

2. 其他致病性大腸桿菌(EAEC，EPEC，ETEC，EIEC)

目前的常規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，這些案件很有可能是其它病原性大腸桿菌引起，EAEC、EPEC、ETEC、EIEC雖然不若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(10)，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，因俱有熱穩定毒素(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(11)。

3. 梭狀桿菌(*Clostridium spp.*)

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(12)。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(13)，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。

4. 曲狀桿菌(*Campylobacter jejuni*)

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(14)。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。

5. 星狀病毒(astrovirus)

屬Astroviridae科，是單股正RNA病毒，常引起急性兒童腹瀉(15)，也與地區性的腹瀉群聚有關(16)，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%)(17)。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(18)，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(19)，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上半年，顯示主要腹瀉群聚的傳播途徑藉由食媒性引起。

6. 沙波病毒(sapovirus)

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(20)，但近期也發現造成長期照護中心的成人住民群聚感染(21)。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(22)，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(23)。

7. 愛知病毒(aichi virus)

屬Picornaviridae科，是單股正RNA病毒，會引起腹瀉，腹痛，噁心，嘔吐等腸胃道相關症狀，日本曾有aichi virus污染牡蠣造成食物中毒(24)，其發生率在各個地區都相對較低。

8. 腺病毒(adenoviruses)

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(25)。

研究目的：

本研究計畫為期四年（106-109年），計畫之實施方法為利用以Taqman定量即時聚合酶鏈鎖反應(Taqman real-time PCR)原理來建立包括國內分離率較高的痢疾桿菌、沙門氏菌、腸炎弧菌、霍亂弧菌、仙人掌桿菌、金黃色葡萄球菌、輪狀病毒、諾羅病毒等病原，並逐步開發李斯特菌、曲狀桿菌、產氣莢膜桿菌、困難腸梭菌、致病性大腸桿菌EHEC，EAEC，ETEC，EPEC，EIEC、腺病毒、aichi virus、sapovirus、astrovirus等腹瀉相關病原檢測。目標在建立可由糞便檢體同時偵測多種腹瀉病原的Taqman多重微流體偵測平台，以解決不易培養病原的檢驗問題，並達到快速做防疫的目的。

1. 全年度預期目標

建立同時偵測糞便檢驗中19種腹瀉病原的檢測平台。

2. 第一年目標(106)為建立通報腹瀉病原之 Taqman real-time PCR 檢驗方法:包括菌株及糞便檢體處理、核酸萃取、引子及探針設計、放大、定序、資料處理的實驗流程。

二、材料與方法：

1. 菌種及病毒株來源

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 (22)。

3.1. 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。

3.2 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或傷寒副傷寒桿菌者，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。

3.3 腸炎弧菌

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。

3.4. 霍亂弧菌

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。

3.5 仙人掌桿菌

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

3.6 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。

3.7 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。

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. 病毒鑑定之標準法

輪狀病毒及諾羅病毒依常規檢驗方法進行分離鑑定(26)，其它病毒的鑑定方式如下：

5.1 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 25µL，加入 5µL 病毒 RNA 抽取液，及混合液內含 5µL 5×TaqMan EZ 緩衝液 (Applied Biosystems)，3mM MnCl₂，dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 300µM，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。

5.2 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 作用 45 分鐘進行反轉錄反應，合成 cDNA 後保存於 -20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C denature 3min，之後進入 40 個循環：94 $^{\circ}$ C 30sec，50 $^{\circ}$ C 30sec，72 $^{\circ}$ C 1min，之後 72 $^{\circ}$ C 加長作用 7 分鐘。

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(27)。

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引子及探針之設計

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20μL。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。反應結束後cDNA可以保存於-80度C當中。

10. Taqman RT real-time PCR

配製總體積20μL的PCR的混合物包含1倍的premix，0.5μM of primers，0.5μM的探針及1ng DNA模板。在及時定量循環偵測系統(QuantStudio 7 real-time PCR system，Thermofisher，US)進行:包括反轉錄45°C 10分、denaturation 95°C 10分，接著45個熱循環:denaturation 95°C 15秒、annealing 60°C 1分。PCR的過程可由螢幕上即時監控得知。

11. 建立標準曲線及資料分析

各病原DNA以10倍數序列稀釋，作為模板，進行Taqman real-time PCR，比較不同引子組間之Ct值，可得知該組引子及探針的 Efficiency與Concentration Dynamic。找到效能最佳之引子及探針組，將其Taqman real-time PCR 反應完的結果，以excel的形式輸出，利用不同濃度相對之Ct值，可作出標準曲線，該標準曲線可作為後續定量檢體之用。

12. SYBR real-time PCR

配製總體積20μL的PCR的混合物包含1倍的premix，0.5μM of primers，1ng DNA模板。在及時定量循環偵測系統(Bio-Rad multicolor real-time PCR detection system，Bio-Rad，UK)進行35個熱循環:包括denaturation 95°C 45秒、annealing 57°C 45秒、extension 72°C 1分鐘，最後extension 72°C 7分鐘；最後會有一個熔點曲線分析。PCR的過程可由螢幕上即時監控得知。

三、結果

1. 引子及探針設計:表一為已針對 13 種病原設計一系列引子及探針組,11 種細菌病原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、序列如下:

表一

Organism	Target	Sequence	測試結果 (陽性數/測試數)	備註
Norovirus GII	ORF1-ORF2	F, CARGARBCNATGTTYAGR TGGATGA R, TCGACGCCATCTTCATTCA P, TGGGAGGGCGATCGCAATCT	明年測試	
Norovirus GI	ORF1-ORF2	F, CGYTGGATGCGNTTYCATGA R, CTTAGACGCCATCATCATTYAC P, AGATYGCGATCYCCTGTCCA	明年測試	
EHEC	stx1	F, ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG R, ACAAATTATCCCCTGWGCCACTATC P, CTCTGCAATAGGTACTCCA	1/1	1. 標準菌株 ATCC43890,基因 stx1(+), stx2(-) 2. 無臨床株
	stx2	F, CCACATCGGTGTCTGTTATTAACC R, GGTCAAACGCGCCTGATAG P, TTGCTGTGGATATACGAGG	0/1	1. 標準菌株 ATCC43890,基因 stx1(+), stx2(-) 2. 無臨床株
EIEC/Shigella	ipaHc	F, CCTTTTCCGCGTTCCTTGA R, CGGAATCCGGAGGTATTGC P, CGCCTTTCCGATACCGTCTCTGCA	13/13	以已確認 Shigell 臨床株作為標準
ETEC	LT	F, TTCCCACCGGATCACCAA R, CAACCTTGTGGTGCATGATGA P, CTTGGAGAGAAGAACCCT	1/1	1.標準菌株 ATCC35401 2.無臨床株
	ST	Fh, GCTAAACCAGYAGRGTCCTCAAAA 15 Fp, TGAATCACTTGACTCTTCAAAA Rh, CCCGGTACARGCAGGATTACAAC Rp, GGCAGGATTACAACAAAGTT Ph, TGGTCCTGAAAGCATGAA Pp, TGAACAACACATTTTACTGCT	1/1	1.標準菌株 ATCC35401 2.無臨床株

EPEC	<i>eae</i>	F, CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGAT R, CTCATGCGGAAATAGCCGTTA P, ATACTGGCGAGACTATTTCAA	1/1	1.標準菌株 ATCC23985 2.無臨床株
	<i>bfpA</i>	F, TGGTGCTTGCCTTGCT R, CGTTGCGCTCATTACTTCTG P, CAGTCTGCGTCTGATTCCAA	1/1	1.標準菌株 ATCC23985 2.無臨床株
Salmonella	<i>invA</i>	F, TCGGGCAATTCGTTATTGG R, GATAAACTGGACCACGGTGACA P, AAGACAACAAAACCCACCGC	12/12	以已確認 Salmonella 臨床株 作為標準株
V. cholerae	<i>toxR</i>	F, GTTTGGCGAGAGCAAGGTTT R, TCTCTTCTTCAACCGTTTCCA P, CGCAGAGTCGAAATGGCTTGG	4/4	以已確認 V.cholerae 臨床株 作為標準株
C. difficile	<i>tcdB</i>	F, GGTATTACCTAATGCTCCAAATAG R, TTTGTGCCATCATTTTCTAAGC P, CCTGGTGTCCATCCTGTTTC P, CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG	13/13	以已確認 C.diffic 臨床株作為標準
Bacillus cereus	<i>nhe</i>	F, GAGAGAAGAMAAATGAYAAAAAA CC R, GYATGAGCCGGCATRATATTTCT P, TATAAAGTAATGGCTCTATCAGC	16/16	以已確認 Bacillu cerus 臨床株 為標準株
Staphylococcus aureus	<i>femB</i>	F, GCTCAGCAAATGCATCACAAA R, CACTATATACTGTTGGRCTTTCWGAA CCA P, AGATAAYGGCGTAAATAGAA	12/14	以已確認 S. aure 臨床株作為標準
Clostridium perfringens	<i>cpe</i>	F, TGGHGAAAGATGYGTTTTAA R, TGTAGMAGYAGCTAAATCAAGRAT P, GTTSCAYYTWCAGATATARA	3/3	以已確認 C.perfringens (cpe+)臨床株作為 標準株
Vibrio parahaemolyticus	<i>tdh</i>	F, CAATCAGTATTCACAACGTCAGGTA R, CGCTGCCATTGTATAGTCTTTATCA P, TGACATCCTACATGACTGTG	11/11	以已確認 V. parahaemolyticus 臨床株作為標準株

2. 糞便檢體處理、核酸萃取法測試：以不同萃取方法處理模擬檢體，再以實驗室目前常規的檢測方法檢測。

(1)製作模擬檢體: 將定量格蘭式陽性菌(沙門氏菌)及格蘭式陰性菌(金黃色葡萄球菌)加入諾羅病毒陽性糞便檢體, 使最終偵測細菌濃度達到每種菌含 10^3 個/ μl 或 10^2 個/ μl 或 10^1 個/ μl 。

(2) 糞便萃取法: 測試 3 種方法, 一種為玻璃珠機械式磨碎法(bead beating), 第二種為酵素處理法(Enzymatic), 第三種為加強酵素處理法(Enhanced enzymatic), 將 3 種方法測試於 2 組模擬檢體。

(3)細菌病原測試效果: 以 Taqman RT-PCR 檢測細菌病原, 比較各組之 Ct 值, 發現無論是格蘭式陽性菌或格蘭式陰性菌, 以玻璃珠機械式磨碎法及加強酵素法測得的 Ct 值均最低(表二)、由增幅曲線來看, 以機械式磨碎法的 RT-PCR 效率較佳(圖一)

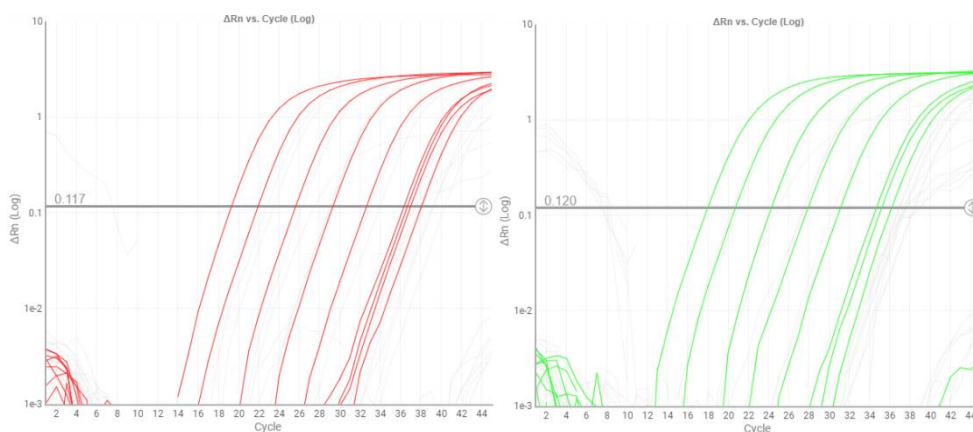
表二、以 3 種萃取方法處理金黃色葡萄球菌或沙門氏菌模擬檢體之偵測極限

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

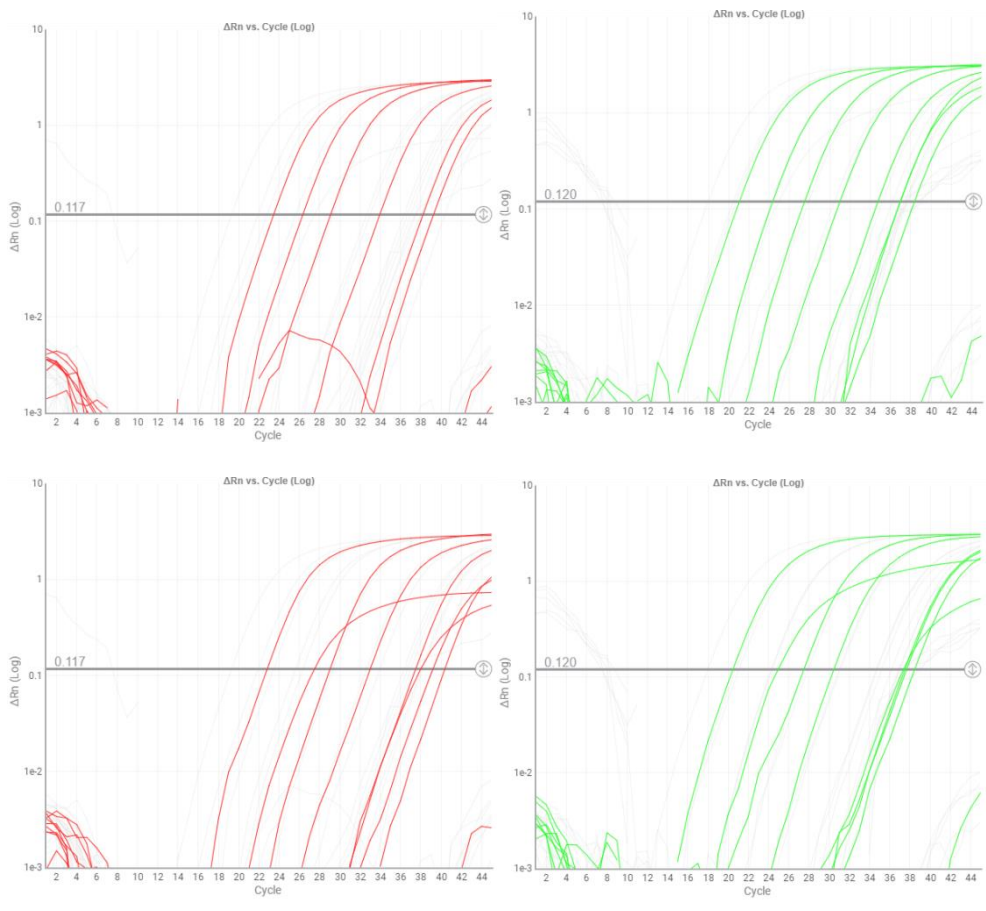
圖一、以 3 種萃取方法處理不同菌量模擬檢體之增幅曲線

(a) 金黃色葡萄球菌

(b) 沙門氏菌



磨碎法



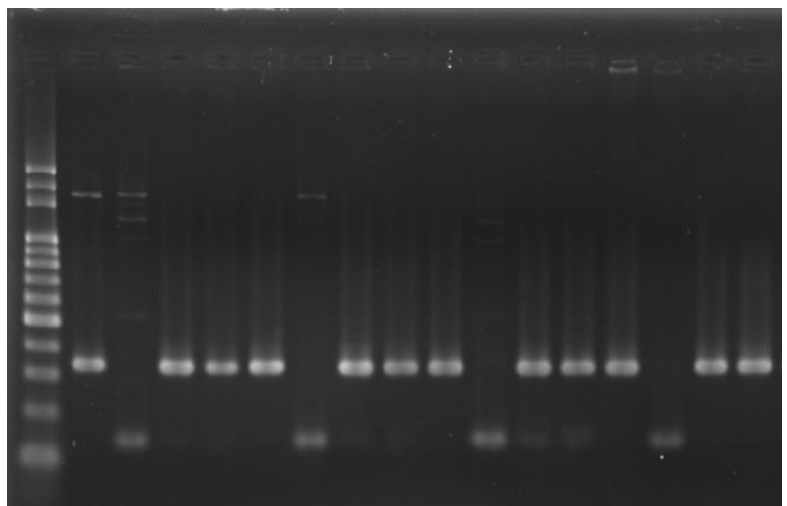
酵素法

加強酵素法

(4)以 PCR 方法檢測 4 個病毒檢體(S1, S3, S4 為陽性病毒檢體, S2 為陰性病毒檢體), 各方法萃取模擬檢體均增幅出諾羅病毒 GII, 顯示磨碎法(M1)、酵素法(M2)、加強酵素法(M3)萃取病毒的效果與病毒專用試劑套(M4)組效果相當(圖二)。

圖二、

	M1				M2				M3				M4			
M	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4



3. 測試不同廠牌酵素之效果:以細菌株之菌液或陽性病毒檢體之 RNA 測試 A、B、C 三種 one-step mastermix RT-QPCR 反應酵素之活性，3 種試劑在 8 種病原的測試結果如表三，其中 C 廠牌有最佳的反轉錄活性。

表三、測試 3 種試劑在不同病原之效果

病原 \ 方法	A	B	C
Norovirus	25.33	30.39	20.44
Clostridium difficile	21.58	19.18	18.91
EHEC (stx1)	20.89	17.43	18.87
EHEC (stx2)	18.91	16.32	17.77
Salmonella	18.34	17.01	19.49
Shigella sonnei	16.72	15.68	17.72
Vibrio cholerae	18.57	15.05	14.89

4. 以 Taqman RT real-time PCR 測試模擬檢體與純菌之比較

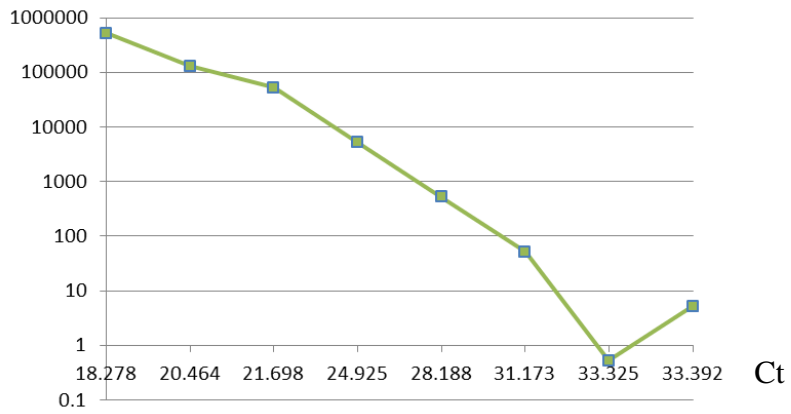
為了解磁珠法萃取法的偵測極限，我們將序列稀釋之定量純菌菌種，或加入糞便製成模擬檢體，均以磁珠法萃取後，再以 Taqman real time PCR 偵測加入的病原。

一共偵測了金黃色葡萄球菌、沙門氏菌、痢疾桿菌、霍亂弧菌、腸炎弧菌、困難腸梭菌 6 種菌，模擬糞便檢體均有較低 Ct 值，其偵測極限介於依菌種不同介於 0.5~5.2 顆菌之間，而純菌雖有較高的 Ct 值(圖三至圖八(b))，但與各自病原的模擬檢體之偵測極限相同(圖三至圖八(a))，比較各病原之間的偵測極限，以金黃色葡萄球菌較差(5.2 顆菌)。

圖三、金黃色葡萄球菌比較圖

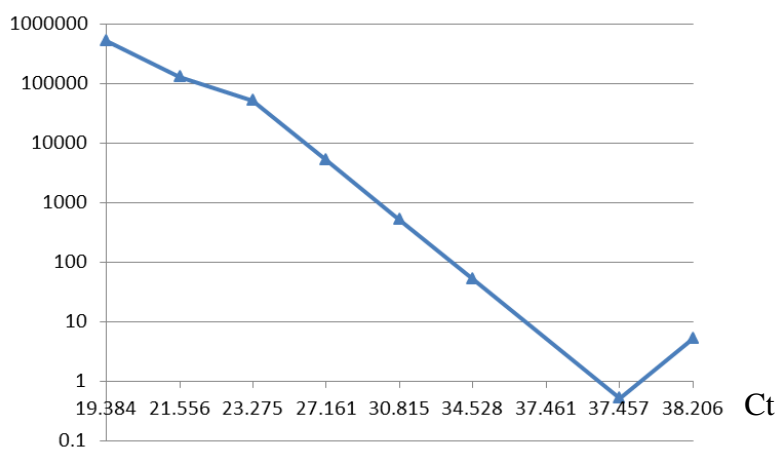
(a) 糞便模擬檢體序列稀釋圖

CFU (log)



(b) 純菌檢體序列稀釋圖

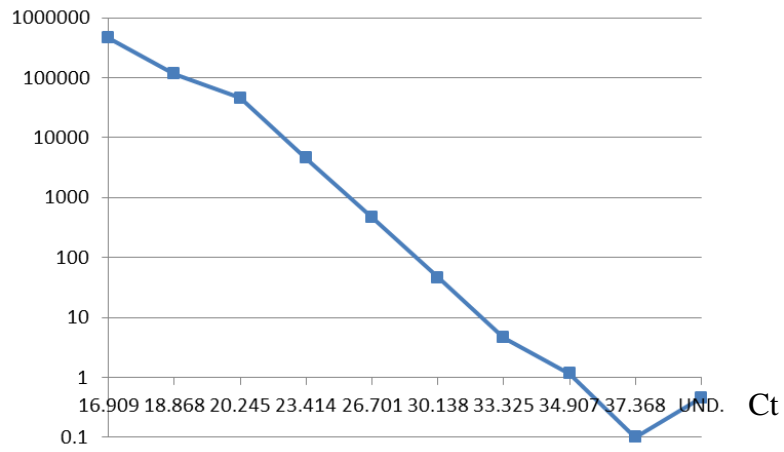
CFU (log)



圖四、沙門氏菌比較圖

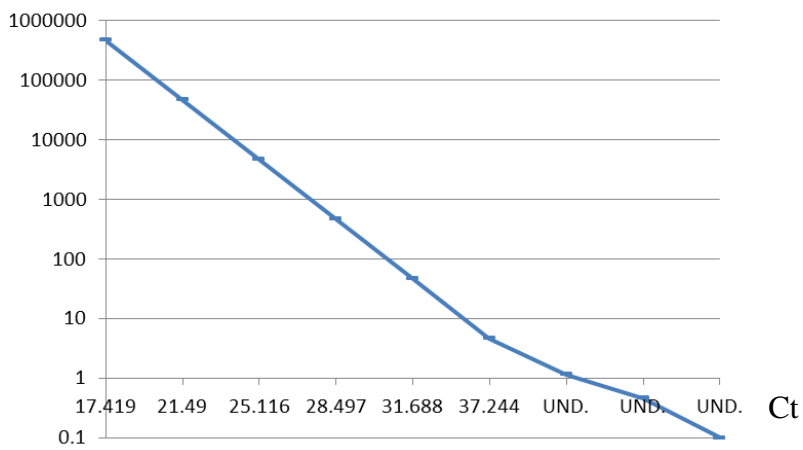
(a) 糞便模擬檢體序列稀釋圖

CFU (log)



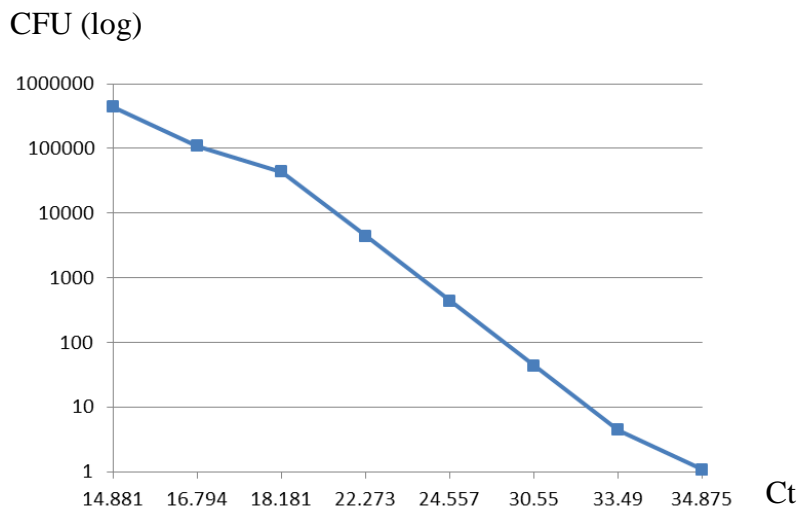
(b) 純菌檢體序列稀釋圖

CFU (log)

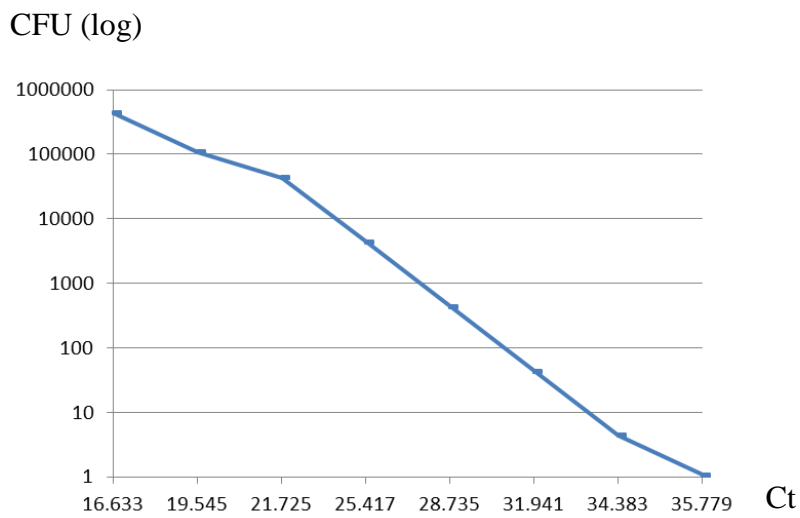


圖五、痢疾桿菌

(a) 糞便模擬檢體序列稀釋圖



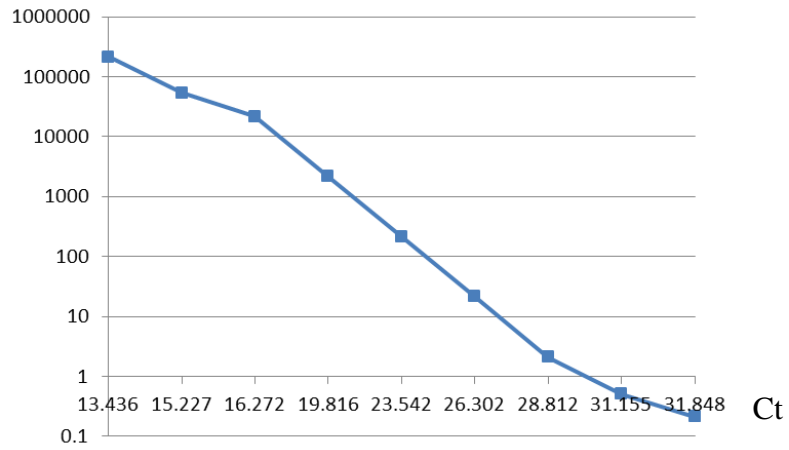
(b) 純菌檢體序列稀釋圖



圖六、腸炎弧菌

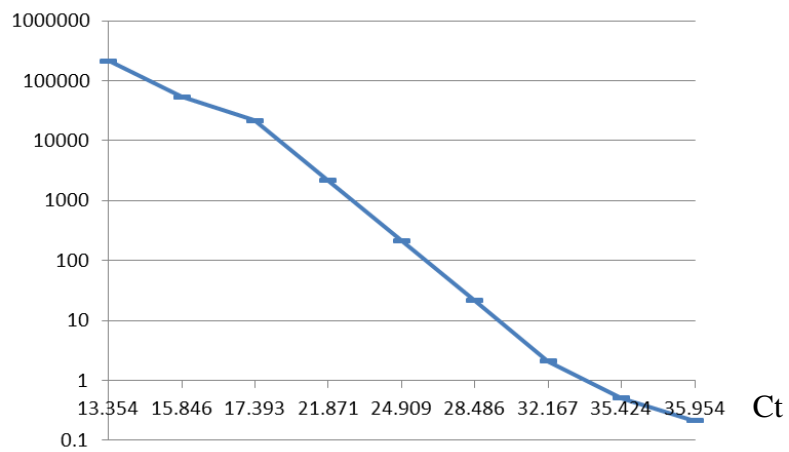
(a) 糞便模擬檢體序列稀釋圖

CFU (log)



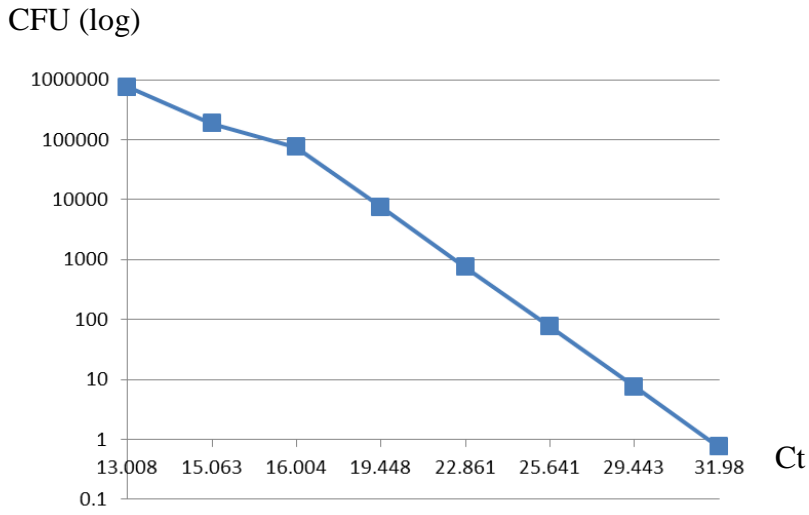
(b) 純菌檢體序列稀釋圖

CFU (log)

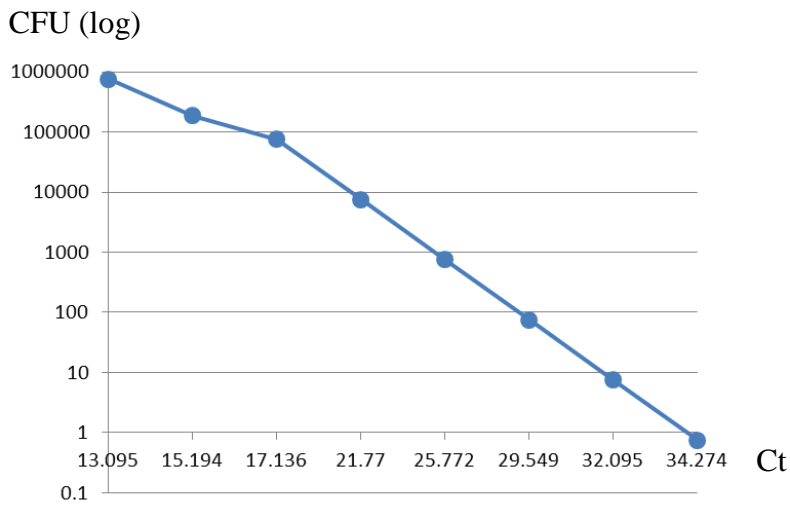


圖七、霍亂弧菌

(a) 糞便模擬檢體序列稀釋圖



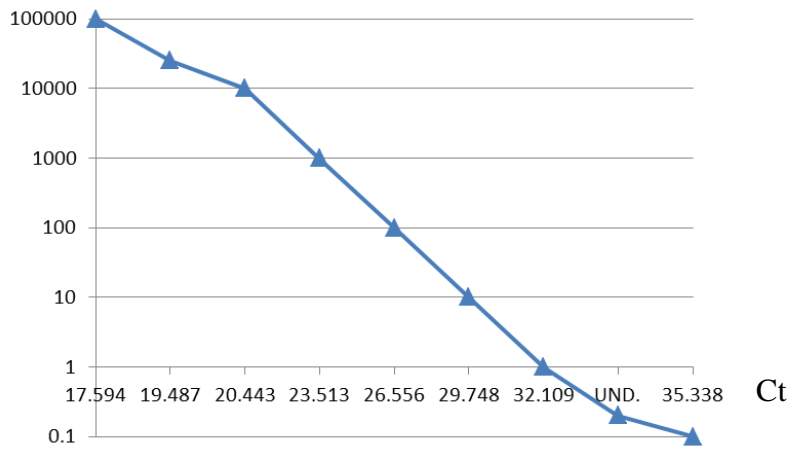
(b) 純菌檢體序列稀釋圖



圖八、 困難腸梭菌

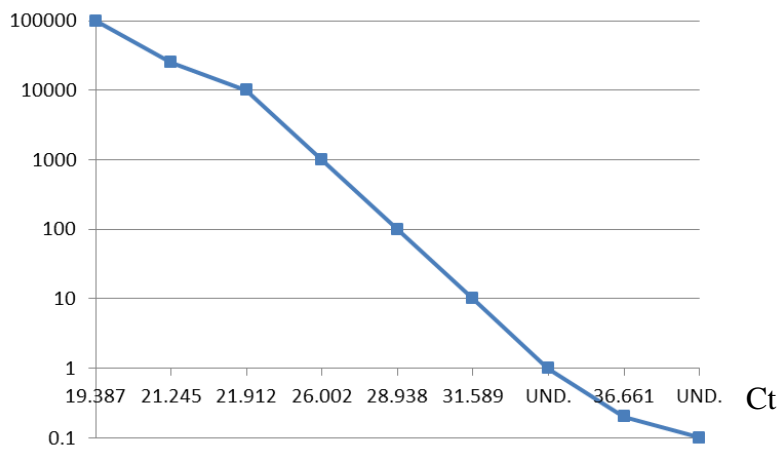
(a) 糞便模擬檢體序列稀釋圖

CFU (log)



(b) 純菌檢體序列稀釋圖

CFU (log)



四、討論

本研究擬建立一個腹瀉病原的以 Taqman RT real-time PCR 為基礎的多重檢測平台，希望由同一檢體在同一個處理流程可同時檢測細菌及病毒病原，本年度我們建立了檢體前處理與核酸萃取方式，並設計且測試了11種細菌病原。

核酸萃取方式，分為前處理及純化方式，前處理部份，目前的市售套組，以打破菌體的方式有磨碎法(4, 5)及化學法(5)為主，Luminex 是發展最成熟的方法，它的前處理採用陶珠磨碎方式，接續以磁珠吸附純化；本研究測試了磨碎法、化學法以及加強化學法(加入 Lysostyphin 處理)作前處理，也是發現以磨碎法敏感度較佳，而純化方式在先前的研究，比較了磁珠純化方式及管柱離心法，發現管柱離心法之 Ct 值與菌量關係有較佳線性，因此採用管柱離心法。

本研究所設計的引子探針組大部份可以100%的增幅陽性測試株，針對腸炎弧菌，我們測試了兩組引子探針組，第一組所設計的位置是在 *tdh* 基因的上游部份調控基因處，在與 NCBI 資料庫比對時，它較不會與其它含 *tdh* 基因的病原如 *Vibrio mimicus* 或 *Vibrio cholerae* 互補，但測不到 Kanagawa-negative 腸炎弧菌(28)等無法合成正常 thermostable direct hemolysin 的菌株。第二組引子探針組的設計是針對 *tdh* 基因的保守序列，這組與 NCBI 資料庫比對可比對到 Kanagawa-positive 及 Kanagawa-negative 腸炎弧菌，但也會比對到 *Vibrio mimicus* 或 *Vibrio cholerae* 等病原，因此可以先使用第二組引子探針組，結果陽性再以第一組探針組確認。

金黃色葡萄球的引子探針組在14株有2株無法偵測出，第一次測試時有4株無法偵測到，但再提高引子及探針濃度後，尚有2株無法偵測到，推測的可能原因包括(i)設計的引子及探針尚有其它退化性的位點未納入，(ii)設計的標的為 *femB*，是 MRSA 有俱有的基因(29)，未測到的菌株不俱有此抗藥基因。

各病原的偵測極限在0.5至5.2之間，其中以金黃色葡萄球菌較差(5.2顆菌)，推測與其細胞壁結構較難打破有關，而沙門氏菌在5顆菌以下之偵測值不穩定，推測為實驗操作之誤差。

五、結論與建議

本研究測試針對細菌及病毒不同的萃取方法，以磨碎法較佳。設計並測試了11組引子及探針組，並建立了 Taqman real-time PCR 檢測方式，測試其偵測極限，其敏感度至少可檢測到5顆菌量，另外也比較了純菌與模擬檢體的偵測極限，發現模擬檢體與純菌有相同的偵測極限。

Taqman real-time PCR 是一個很成熟的檢測方法，本署也已具備有現成的儀器，具有可擴充性，若可以逐步建立好須即時檢測的病原，即可作為疫情緊急時檢測用，由於同時萃取細菌及病毒病原，未來應可擴充至腹瀉病毒的檢測平台。

六、重要研究成果及具體建議

本研究目前建了 11 種腹瀉細菌病原的萃取方法及 Taqman real-time PCR 檢測方式，適用於常見引起腹瀉之格蘭氏陽性菌，陰性菌，弧菌及厭氧菌，其敏感度至少可檢測到 5 顆菌量。

七、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. Afonina IA, Reed MW, Lusby E, Shishkina IG, Belousov YS. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *BioTechniques*. 2002;32(4):940-4, 6-9.
7. Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, et al. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(2):472-80.
8. Centers for Disease C, Prevention. Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2013;62(22):448-52.
9. Centers for Disease C, Prevention. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe--United States, August-September 2011. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2011;60(39):1357-8.
10. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(1):142-201.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. Walter JE, Mitchell DK. Astrovirus infection in children. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(3):247-53.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 黃士澤、吳岫、吳芳姿、慕蓉蓉、羅一鈞、黃頌恩、江大雄. 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.
24. Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Utagawa E. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *Journal of clinical microbiology*. 1993;31(11):2938-43.
25. 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 / Centers for Disease Control*. 1990;39(RR-5):1-24.
26. 疾病管制署. 傳染病標準方法檢驗手冊. 2015.
27. 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.
28. Osawa R, Okitsu T, Morozumi H, Yamai S. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. *Applied and environmental microbiology*. 1996;62(2):725-7.
29. Jonas D, Grundmann H, Hartung D, Daschner FD, Towner KJ. Evaluation of the *mecA*

femB duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 1999;18(9):643-7.

