

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-144409

衛生福利部疾病管制署 109 年度科技研究發展計畫

全自動核酸偵測平台開發與應用

研究報告

執行機構：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林智暉

研究人員：謝宗廷、曾雅鈴

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意\*

## 目錄

一、前言 .....	5
二、材料與方法.....	12
三、結果 .....	25
四、討論 .....	28
五、結論與建議.....	31
六、重要研究成果及具體建議 .....	32
七、參考文獻 .....	33
八、圖、表 .....	37

## 中文摘要

關鍵詞：腹瀉、病原、定量即時聚合酶鏈鎖反應

健保資料統計我國近 2 年因腹瀉門急診平均每萬人口每周就診率約 3.5；本署目前腹瀉病原相關通報檢驗，包括法定傳染病及腹瀉群聚症狀通報，以及配合特殊疫情之擴大調查群聚案件。依腹瀉症狀送驗的個案，有 35% 以上依現階段通報監測病原項目檢驗結果仍為陰性，為使疾病防治更加完整，以及協助群聚調查，有必要釐清陰性個案的致病原，以切確進行防治工作。近年來由於全球化趨勢，使得各種傳染病病原體變異及傳播速度更勝以往，造成新興疾病的突發，必須在疫情初期即時以多樣標的化的檢測方法，正確地偵測找到病原體，疾病才能有效控制。然而，目前腹瀉病原的常規檢驗，仍無法應付這種環境變化，開發新的檢驗方法及偵測更多項病原是必要的趨勢。而為了在有限的量能，以及從有限的採樣檢體中檢測更多種類的腹瀉致病原，同時符合檢驗之即時性與準確性，本研究將使用已廣泛應用於檢驗研究之即時定量聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)系統來開發整合性的檢測方法，同時偵測 18 種常規及新興的腹瀉相關病原及致病基因，達到快速獲得檢驗結果以協助疫情控制之目的。本年重點在 LDTs 之偵測極限、專一性、靈敏度、精密度、線性與準確度之確效試驗及評估將本平台實際應用於疾管署腹瀉群聚檢驗之可行性。

## 英文摘要

keywords : Diarrhea , pathogen , real-time PCR

The weekly proportion of emergency visits for acute diarrhea is over 3.5% in Taiwan. The diarrhea specimens are collected from patients associated with mandatory infectious diseases or diarrhea outbreak. More than 35% of these cases were examined as negative. To control the possibly existed disease, we should figure out if there was any other undetectable pathogen existed in those negative specimens. Due to the globalization, many pathogens have changed more rapidly and spread more widely than ever, and this makes newly emergency infectious disease occurred unexpectedly. Therefore, it is necessary to detect the emergency pathogen as soon as possible to control these diseases. However, the current examinations are not sufficient to deal with such environmental changes, hence new examinations should be developed. In order to control infectious diarrhea, we has developed a nucleic acid extraction method which can simultaneously extract bacterial and viral pathogens from feces, and constructed a multiplex Real-time PCR-based panel for simultaneous detection of 21 targets from 18 microbial species, including diarrheal bacteria and viruses, to achieve the goal of rapid and accurate detection for diarrhea-related pathogens. In this year, we focused on the performance of this panel, including LOD, sensitivity, specificity, precision, linearity and accuracy. We also applied this panel to routine assays to screen emerging and special diarrhea pathogens in the diarrhea outbreak.

## 一、前言

### 1. 腹瀉疾病的檢驗現況

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

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

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

## 2. 腹瀉疾病的流行現況及發展需求

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

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

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

可整合多種單項進行多重分析。可以僅以單一檢體用於多重項目之檢測以減少操作人力；並可減短檢測全部病原的時程。

本計畫預計將國內最常見的腹瀉病原(現行常規檢驗項目)，與以下所述之國外常見但在全球化的環境下有可能傳入國內或是氣候變遷造成新興再浮現的病原，整合在一個多重檢測平台：

#### (1) 致病性大腸桿菌

目前的常規通報檢驗只有出血性大腸桿菌 (EHEC)，但自 2008 年至 2014 年，所有通報的案件均排除為 EHEC，但這些案件很有可能是其它病原性大腸桿菌引起，如 EPEC、ETEC、EIEC。這些病原性大腸桿菌雖然不如 EHEC 會引起大量血便及嚴重的溶血性尿毒症，但仍會造成程度不一的腹瀉。ETEC 主要是造成兒童腹瀉及旅行者腹瀉，因具有熱穩定毒素(ST)，易造成大流行，在孟加拉淹水過後，ETEC 與霍亂弧菌同時大流行；典型的 EPEC 最常造成新生兒腹瀉，但近來發現了非典型株，感染成人會引起類似 EHEC 的症狀，可能發展成新興突發的病原(6)；EIEC 腹瀉，大部份出現衛生條件不佳的開發中國家，造成地區性流行，也會引起旅行者腹瀉，但 2014 年，歐洲也發現 EIEC O96:H19 引起的群聚感染，顯示 EIEC 也是有高傳染力的型別(7)。各種類



型的大腸桿菌的分類以血清型別與臨床表現型歸類，檢驗受限於菌種血清型別眾多，目前市售的抗血清套組無法完全涵蓋，另以分子檢測需搭配多套致病基因，以綜合研判感染菌株類別。

## (2) 梭狀桿菌

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

## (3) 曲狀桿菌

曲狀桿菌是因食用未煮熟的肉類或未正確消毒的乳製品，會造成血便，腹痛，發燒。在美國是常見的腹瀉病原，依其 FoodNet 的監測，發生率達 14.3/100000，較常見的是散發病例，少見群聚感染(10)。過去在台灣，因缺少常規的監測且因培養不易，病例數少，但在 2014 年的食媒計畫對 5 歲以下兒童以 PCR

方式偵測，發現有 1.4%的分離率，在此監測研究中僅次於沙門氏菌的(10%)，因此有必要放入平台常規偵測。

#### (4) 星狀病毒

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

#### (5) 沙波病毒

沙波病毒與諾羅病毒均屬於 *Caliciviridae* 科，是單股正 RNA 病毒，主要引起急性幼兒腹瀉(16)，但近期也發現造成長期照護

中心的成人住民群聚感染(17)。沙波病毒感染引起的臨床症狀，相較於諾羅病毒感染的病人，嘔吐與腹瀉症狀均較輕微。雖並未列入台灣腹瀉群聚與食品中毒事件之常規病原檢測項目，但曾於多起腹瀉群聚調查案件中檢出，如 2007 年之某大學學生之群體腹瀉事件(18)，2010 某中餐廳食物汙染及 2011 年某連鎖餐廳生蠔汙染之腹瀉群聚案件等(19)。

#### (6) 腺病毒

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

## 二、材料與方法

### 1. 菌株來源

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

### 2. 檢體採集

來自腹瀉群聚通報送驗之臨床糞便剩餘檢體。

### 3. 細菌之分離、鑑定、培養法

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

#### (1) 痢疾桿菌(*Shigella spp.*)

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

#### (2) 沙門氏菌(*Salmonella spp.*)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體接種於 SS、HE 培養基，

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

### (3) 腸炎弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)

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

(4) 霍亂弧菌(*vibrio cholera*)

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

(5) 仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*)

將糞便、嘔吐物以無菌棉花棒沾取或以無菌滴管吸取少許接種於 MYP 培養基上；若是輸送培養基內之直腸拭子則直接接種於 MYP 培養基上。置於 37°C 培養 18~24 小時後，觀察有無可

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

(6) 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

將菌株或輸送培養基上之直腸拭子檢體接種於 BP 培養基上，於 37 °C 培養 24~48 小時後，觀察有無可疑菌落。挑選黑色發亮、圓弧隆起且具透明環之獨立菌落，作革蘭氏染色，符合革蘭氏陽性呈堆狀或葡萄狀球菌，再次接種於 TSA agar，於 37 °C 培養箱培養 18~24 小時後作生化鑑定。如無可疑菌落則至少繼續培養 24 小時至隔日觀察。金黃色葡萄球菌陽性判讀標準如下：(1) 符合革蘭氏陽性堆狀或葡萄狀球菌。(2) Catalase test 陽性。(3) Staphylase 試驗陽性或 API ID 32 STAPH 生化鑑定套組反應結果為金黃色葡萄球菌者。若其中有一不符合者，即判定為金黃色葡萄球菌陰性。當檢驗確認為金黃色葡萄球菌後，再以 RPLA 方式進行腸毒素試驗，檢測該菌株是否產生腸毒素。

(7) 病原性大腸桿菌(*pathogenic E. coli*)

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

(8) 曲狀桿菌(*Campylobacter jejuni*)

檢體塗於 Campy agar，在微需氧環境(O<sub>2</sub> 含量 6~12%，CO<sub>2</sub> 含量 5~8%)42 °C培養箱培養 48 小時，選取灰色有光澤，看起來像水滴之菌落以 PCR 鑑定 23 rRNA 基因，若被增幅出一段 650 bp 大小的片斷，則為 *Campylobacter* spp.。

(9) 困難腸梭菌(*Clostridium difficile*)

檢體塗於 Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar (Oxoid, Hampshire, UK)，在厭氧環境培養 37°C 48 小時，細菌病原之保存，挑選黃色菌落，以 PCR 鑑定 *tpi* 基因，若增幅出 230 bp 大小片斷，判定為陽性，其毒素基因 *tcdA*，*tcdB* 也以 PCR 方式鑑定。



(10) 產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)

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

4. 菌株之保存

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

5. 病毒鑑定法

輪狀病毒及諾羅病毒依常規檢驗方法進行鑑定(21), 其他病毒的鑑定方式如下:

(1) 沙波病毒

病毒 RNA 萃取液 5 $\mu$ L 為模板, 加入 1 $\mu$ L 10 $\mu$ M 隨機引子及 2 $\mu$ L 20mM dNTP 於 70°C 作用 10 分鐘後, 馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後; 再加入單管 RT 混合液, 內含 200U 反轉錄酵素 (Invitrogen SuperscriptIII Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液, 反應總體積為 20 $\mu$ L。於 25°C 作用 10 分鐘, 50°C 50 分鐘反轉錄作用, 之後 85°C

作用 15 分鐘。Nest-PCR：病毒分析引子對為 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SV-R13 及 SV-R14。以 RT 產物 2 $\mu$ L 為模板，加入 23 $\mu$ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034) 及 0.8 $\mu$ M 每個分析引子。反應條件：先 95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 2 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘。以第一次 PCR 產物 1 $\mu$ L 為模板，加入 24 $\mu$ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、Platinum Taq DNA Polymerase 及 0.4 $\mu$ M 每個分析引子 (1245Rfwd/ SV-R2)。反應條件：95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 45 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘，進行 capsid 基因片段 nest PCR。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 430bp，進一步做序列分析。

## (2) 星狀病毒

病毒 RNA 萃取液 5 $\mu$ L 為模板，加入 1 $\mu$ L 10 $\mu$ M 隨機引子及 2 $\mu$ L 20mM dNTP 於 70°C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1

分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200U 反轉錄酵素 (Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 $\mu$ L。於 25°C 作用 10 分鐘，50°C 50 分鐘反轉錄作用，之後 85°C 作用 15 分鐘。PCR：病毒分析引子對為 Mon269 及 Mon270。以 RT 產物 2 $\mu$ L 為模板，加入 11.5 $\mu$ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034) 及 0.8 $\mu$ M 每個分析引子。反應條件：先 95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 1 分鐘、annealing 50°C 1 分鐘、extension 72°C 1 分鐘，共 30 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 449bp，進一步做序列分析。

### (3) 腺病毒

病毒核酸萃取液 2.5 $\mu$ L 為模板，加入 12.5 $\mu$ L PCR premix，含有 1X PCR Buffer、2.5 unit HotStarTaq DNA Polymerase、200 $\mu$ M of each dNTP，及各 5mM Adhex1/Adhex2 分析引子。反應條件：

先 95°C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 60°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°C 10 分鐘；將 PCR 產物進行電泳分析。

#### 6. 糞便前處理及病原核酸萃取

0.2g 糞便加入 2mL PBS 緩衝液及 0.5mL 3mm beads 進行 vortex，在未沉澱前取出 200 $\mu$ L 液體至含有 0.25mL 0.1mm beads 及 0.25mL 0.5mm beads 之 1.5 mL 微量離心管，並加入 200 $\mu$ L ASL buffer (Qiagen)，vortex 5 分鐘。接著取出上清液 200 $\mu$ L 至新的 1.5mL 微量離心管，依序加入 20 $\mu$ L proteinase K、100 $\mu$ L VXL buffer (Qiagen) 及 1 $\mu$ L carrier RNA 翻動混和均勻，在室溫作用 15 分鐘。後續加入 350 $\mu$ L ACB buffer (Qiagen)，翻動混和均勻，將液體轉移至 QIAamp column 離心 8000rpm 1 分鐘。接著更換收集管，加入 600 $\mu$ L AW1 buffer(Qiagen)，離心 8000rpm 1 分鐘。再更換收集管，加入 600 $\mu$ L AW2 buffer(Qiagen)，離心 8000rpm 1 分鐘。再次更換收集管，離心 13000rpm 1 分鐘，接著下方收集管更換成 1.5mL 微量離心管，並 air dry 1 分鐘。後續加入 100 $\mu$ L AVE buffer(Qiagen)，室溫下靜置 10 分鐘進行 Elution。最後離心 13000rpm 1 分鐘，將病原核酸收集至下方離心管內。

## 7. 病原標準品製備

### (1) 病毒標準品

為含病毒目標基因片段的質體(plasmid)，以分光光度計測得質體 DNA 濃度，再根據質體的理論分子量計算 copy number 以完成定量。

### (2) 細菌標準品

挑取一菌落回溶於 1mL 生理食鹽水製備混合菌液，再取適量混合液連續 10 倍稀釋，選取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  三種稀釋濃度，各取 100uL 稀釋液接種至 TSA 培養基，每種濃度重複 2 片，37°C 培養 24-48 小時後，計算平板上菌落數目，選取菌落數範圍在 25-250 (CFU)間之培養基，以稀釋倍率回推並換算混合菌液總菌數。接著，將完成定量之混合菌液經 100°C 加熱處理，便可得細菌標準品。

## 8. PCR 引子設計

自 NCBI 網站的下載標的病原基因的序列，利用 Primer 3 軟體針對標的序列設計數個後選引子，後選引子序列與 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. 定量即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)

配置總體積 25 $\mu$ L 的反應混合物包含 1 倍的 RT-PCR Master Mix(QuantiTect, QIAGEN), 0.25 $\mu$ L RT mix(QuantiTect, QIAGEN), 0.7 $\mu$ M of primers, 4 $\mu$ L 核酸萃取液模板；在即時定量循環偵測系統 (LightCycler 480 II, Roche)進行 40 個熱循環:包括 reverse transcription 50°C 30 分鐘、PCR initial activation 95°C 15 分鐘 denaturation 95°C 15 秒、annealing 60°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘(data acquisition)；最後進行 PCR 產物熔點曲線分析(Melting curve analysis)，分析之溫度區間為 65-95°C。

## 10. 確效試驗

### (1) 偵測極限(LOD, Limit of Detection)

將適量之定量菌株/含病毒基因片段質體混於陰性樣本糞便中製作成模擬檢體，接著進行核酸萃取；所得之病原核酸進行 10 倍系列稀釋，以本平台進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，根據其 Cp 值推得該病原於糞便中的偵測極限。

### (2) 靈敏度(Sensitivity)

取用各病原之模擬檢體或陽性糞便檢體進行核酸萃取，以本計畫全自動核酸偵測平台進行各病原檢測，計算真陽性率(true

positive rate)以評估靈敏度。

$$\text{真陽性率} = \frac{\text{檢出陽性檢體數}}{\text{實際陽性檢體數}} \times 100\%$$

### (3) 專一性(Specificity)

取用 12 名無症狀人士陰性糞便檢體進行核酸萃取，以本計畫全自動核酸偵測平台進行各病原檢測，計算其真陰性率(true negative rate)以評估專一性。

$$\text{真陰性率} = \frac{\text{檢出陰性檢體數}}{\text{實際陰性檢體數}} \times 100\%$$

### (4) 精密度(Precision)

事前萃取本計畫 18 種目標病原陽性檢體核酸，接著使用這些核酸，在相同條件下分別進行當次 3 重複試驗及三天異日間(inter-day)試驗，再依所測定 Cp (Cut point)值計算變異係數(CV, %)，分別用於評估可重複性(Repeatability)及中間精密度(Intermediate precision)。

### (5) 線性(Linearity)

取用濃度  $2.5 \times 10^1$ 、 $2.5 \times 10^2$ 、 $2.5 \times 10^3$ 、 $2.5 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^5$  copies /uL 之病原標準品，進行本平台多重即時定量聚合酶鏈鎖反應，接著依其濃度及相對 Cp 值建立其檢量線，計算決定係數( $R^2$ )以評估

線性。

#### (6) 準確性(Accuracy)

各別取適當含量病原標準品，spike 至由陰性空白檢體所萃取的核酸，並配置成濃度  $2.5 \times 10^3$  copies /uL 的模擬檢品。接著取用前述濃度模擬檢品，進行本平台的多重即時定量聚合酶鏈鎖反應(每組反應起始 template 相當於含有  $1 \times 10^4$  copies)，接著將所測定 Cp 值依相對應檢量線換算出測定拷貝值(copy number)，最後計算偏差值(Bias)以評估準確度。

$$\text{Bias} = \frac{|\text{測定值}-\text{真值}|}{\text{真值}} \times 100 \%$$

#### 11. 盛行率(Prevalence)

期盛行率=某一時期地點病例數/同一時期地點所有人口數(每 100 萬人)。



### 三、結果

#### 1. 分析方法確效

本計畫所開發的多重腹瀉病原核酸偵測平台，偵測目標包含 6 種病毒及 12 種細菌性病原 (表一)，屬於實驗室自行研發檢驗技術(LDTs)，為符合 LDTs 規範中分析方法確效要求(24)以評估平台分析效能(25,26)，規劃執行偵測極限(LOD)、靈敏度(Sensitivity)、專一性(Specificity)、精密度(Precision)、線性(Linearity)與準確度(Accuracy)等共 6 項確效項目，分析結果如下：

- (1) 偵測極限：本平台對於各腹瀉病原最低可偵測到 1 至 3.5 copies / uL stool (表二)。
- (2) 靈敏度：各腹瀉病原陽性檢體對於各病原的檢測真陽性率介於 92.9~100%(表三)。
- (3) 專一性：陰性檢體對於各腹瀉病原的檢測真陰性率皆為 100 %(表四)。
- (4) 精密度：使用 18 種目標病原陽性檢體之核酸，在相同條件下分別進行 3 重複試驗及三天異日間(inter-day)試驗，以分別評估可重複性(Repeatability)及中間精密度(Intermediate precision)，而各病原所得變異係數分別介於 0.05~2.2%(表五)及 0.59~12.8%(表六)，均位於

15%可接受範圍內。

(5) 線性：取用濃度  $2.5 \times 10^1$ 、 $2.5 \times 10^2$ 、 $2.5 \times 10^3$ 、 $2.5 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^5$  copies /uL 之病原標準品建立檢量線(圖一)，各病原據此推導所得決定係數 ( $R^2$ ) 介於 0.9803-0.99997(表七)，均大於 0.98，符合一般線性標準要求。

(6) 準確度：取用濃度  $2.5 \times 10^3$  copies /uL 的模擬檢品進行測試，接著將所測定 Cp 值依相對應檢量線換算出測定拷貝值(copy number)，最後計算偏差值(Bias)以評估準確度。而各病原所得之偏差值(Bias)介於 3.4-21% (表八)，均位於 25%可容許偏差值內。

## 2. 特殊及新興腹瀉病原篩檢應用

本計畫亦對 108 年 11 月至 109 年 10 月間常規腹瀉群聚通報未能檢出常規腹瀉病原之群聚案，應用本平台技術進行特殊及新興腹瀉病原篩檢，包含沙波病毒(Sapovirus)、腺病毒(Adenoviruses)、星狀病毒(Astrovirus)、困難腸梭菌(*Clostridium difficile*)、產氣英膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、曲狀桿菌(*Campylobacter jejuni*)、EIEC、EPEC 及 ETEC 等病原，並依據檢驗結果分析了解臺灣近年特殊及新興腹瀉病原的流行概況。

於本次監測期間(108 年 11 月至 109 年 10 月)國內通報腹瀉群聚中，

常規病原檢驗為陰性的群聚事件共計有 176 件，其中以本平台檢出 53 件特殊及新興腹瀉病原之陽性群聚(表九)，包含沙波病毒 18 件、腺病毒 3 件、星狀病毒 2 件、產氣莢膜梭菌 7 件、曲狀桿菌 7 件、EIEC 3 件、EPEC 8 件及 ETEC 5 件，其中以沙波病毒的發生群聚件數最高；有關這些腹瀉病原在國內的盛行率，經過統計後每百萬人口共計有 23.99 人，包含沙波病毒 6.1 人、腺病毒 0.89 人、星狀病毒 0.59 人、產氣莢膜梭菌 6.06 人、曲狀桿菌 3.14 人、EIEC 0.97 人、EPEC 4.41 人及 ETEC 1.82 人，其中以沙波病毒盛行率最高(表十)；各別病原疾病的平均發病年齡/主要發病年齡層分別如下：沙波病毒為 7.5 歲/6 歲以下、腺病毒為 10.4 歲/ 12 歲以下、星狀病毒為 5.3 歲/ 6 歲以下、產氣莢膜梭菌為 39.4 歲/ 20 歲以上、曲狀桿菌為 29.7 歲/20 歲以上、EIEC 為 29.2 歲/20 歲以上、EPEC 為 31.7 歲/20 歲以上、ETEC 為 18.6 歲/16 歲以上(表十)；各病原的群聚發生場所分布情形，詳如圖二所示。

#### 四、討論

本研究已建立一個以 Real-time PCR 為基礎的多重檢測平台，配合所開發的核酸萃取技術，可讓使用者能夠使用同一個糞便檢體，經由同一次檢驗流程便可同時檢測多種腹瀉細菌及病毒病原。由於本平台屬於實驗室自行研發技術(LDTs)，因此進一步執行分析方法確效以評估分析效能。本研究所測試的精密度，內容包含可重複性及中間精密度，其中可重複性的意義是用來表示於短時間的區間內，以同樣操作條件所得到重覆測定值的集中程度，而中間精密度則是利用不同天重複試驗以表示分析方法在同一實驗室內的變異程度；本平台經由一連串的精密度測試，所得變異係數均在 15% 之容許範圍內，顯示本平台具有良好的再現性。又各病原檢量線的決定係數  $R^2$  均達 0.98 以上，再以取得的檢量線進行模擬檢體拷貝數之估算，其估算值與實際值之間的誤差均落於 25% 的容許偏差值內，顯示本平台具有良好的線性及準確性，未來可視檢測需要應用於各種腹瀉病原定量及定性檢驗。除此之外，各病原檢量線斜率介於 -3.132~-3.584(表七)，若換算成 PCR 效率(Efficiency)相當於 90.12%~108.59%，符合一般 Real-time PCR 效率要求(90-110%) (26)，顯示本平台並未因不同引子對(primer)互相干擾而出現核酸擴增效率過差之情形；以靈敏度與專一性而言，本平台若與目前市售的多重病原偵測系統

比較，包含 FILMARRAY® 與 Luminex®，其實並無顯著效能上的差異，然而本平台具有可配合市售各 Real-time PCR 設備規格之通用性，且檢驗所需成本較其他系統為低等優點，亦可依檢驗需求彈性調整病原檢驗項目。綜上，本研究所開發的多重腹瀉病原核酸偵測平台，其各項確效指標參數均落在合理範圍內，皆顯示本平台具良好的再現性及適用性。

系統	Q-PCR Panel(this study)	FILMARRAY®	Luminex®
操作時間 (含處理檢體)	2.5 小時	1.5 小時	5 小時
操作通量	96	1-8	96
病原檢測數	18	22 (不含 <i>B.cereus</i> 、 <i>S.aureus</i> )	14-19(不含 EPEC、Sapovirus、Astrovirus)
檢驗成本	低(約 33 美元)	高(155 美元)*	中(80-90 美元)*
適用狀況	可應用於通報腹瀉群聚之常規檢驗，亦可依檢驗需求彈性調整病原檢驗項目。	需緊急檢驗單一或少量檢體時。	可應用於通報腹瀉群聚之常規檢驗，亦可依檢驗需求客制化病原檢驗項目。
設備通用性	任何市面上的 Real-time PCR 儀器均可	需 FILMARRAY® 特定儀器	需 Luminex® 特定儀器
人員技術要求	中，需處理檢體及配置試劑。	低，僅需簡單處理檢體。	高，需進行繁瑣的上機前處理。
性能	靈敏度 92.9-100%， 專一性 100 %。	*靈敏度 > 90%， 專一性 91.7-100 %。	*靈敏度 > 90%， 專一性 90.8-100 %。

\*J Clin Microbiol. 2014 Oct;52(10):3667-73.

本研究亦應用本平台技術，針對國內常規未能檢出的未知病原腹瀉群聚，進行新興及特殊腹瀉病原篩檢。在這些腹瀉群聚檢體中，其陽性率約有 3 成左右，其中以沙波病毒佔比最高。另根據近 1 年來新興及特殊腹瀉病原的監測結果(圖二及表九~十)，以沙波病毒的發生群聚件數

(18 件)及盛行率(每百萬人口有 6.1 人)最高，流行時間集中於秋冬時期，發生場所包含學校及托嬰中心，主要感染對象為幼兒園的兒童(96 人/144 人)；腺病毒及星狀病毒盛行率較低(每百萬人口分別有 0.89 人及 0.55 人)，僅零星發生在學校，對象為幼兒園、國小及國中的學生；產氣莢膜梭菌具次高盛行率(每百萬人口有 6.06 人)，流行時間為 4-10 月間，發生場所類型主要為人口密集機構、公司團膳及學校；EPEC 盛行率位居第 3 位(每百萬人口有 4.41 人)，流行時間為 7-11 月間，主要發生場所為公司團膳；曲狀桿菌盛行率位居第 4 位(每百萬人口有 3.14 人)，流行時間為 7-10 月間，發生場所類型包括人口密集機構、學校及餐廳；ETEC 盛行率位居第 5 位，主要發生場所類型為旅行團及學校；EIEC 盛行率位居第 6 位，主要發生對象為旅客(16 人/23 人)。綜上，腹瀉性病毒的群聚感染場所主要為學校，對象大多為兒童，而細菌性的腹瀉群聚則常發生在人口密集機構、公司團膳、學校及旅行團等場所，感染對象則以 20 歲以上的成人為主。

## 五、結論與建議

本研究測試了數個細菌及病毒的核酸萃取法，以機械磨碎法及管柱純化可獲得較佳的萃取結果，並且引入多組目標基因的引子對，採用 Real-time PCR 做為本平台之基礎，透過該技術得到各目標產物的  $T_m$  值，經過多次實驗確立了多重組合反應的基因組，且各個基因組均可在其 Melting Curve 上獲得顯著的峰值以作為判別依據。本平台亦已完成分析方法確效，其各項重要確效指標參數均落在合理範圍內，顯示本平台具良好的再現性與適用性。本研究亦將此平台應用於現行常規病原為陰性的腹瀉群聚檢體檢驗，其中新興及特殊腹瀉病原的陽性檢出率約有 3 成左右，且根據近 1 年來新興及特殊腹瀉病原的監測結果，以沙波病毒的盛行率最高。

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

## 六、重要研究成果及具體建議

本研究已建立了 18 種腹瀉細菌及病毒病原的核酸萃取方法，並建構了 Real-time PCR 多重組合反應平台，亦完成分析方法確效，包括偵測極限、靈敏度、專一性、偵測極限、精密度、線性與準確度等確效項目，其各項確效指標參數顯示本平台具良好的再現性與適用性，可適用於國內外常見及新興特殊的細菌性與病毒性腹瀉病原篩檢。

目前本平台與其他市售產品相比，具有易於操作、檢驗成本較低、可根據需求多重選擇組合的優點，並於新興病原出現時僅需設計新引子對後便可直接加入多重組合做檢驗而不需額外購買新式產品。而本研究所開發的平台具高度延伸性與未來性，未來可以此平台為基礎進一步結合探針 (Probes) 作為檢測方法，提高此平台之專一性及靈敏度，且再經過後續的條件調整與改善後有機會可以將此檢驗技術技轉予國內生技公司進行產學合作，擴大檢驗量能至各醫學中心，強化防疫網絡。



## 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/xTAGGP>  
P.
5. Handbook. QcPM. Available at <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-cador-pathogen-mini-kit/#productdetails>.
6. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(1):142-201.
7. Newitt S, MacGregor V, Robbins V, Bayliss L, Chattaway MA, Dallman T, et al. Two Linked Enteroinvasive *Escherichia coli* Outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(7):1178-84.
8. Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(3):425-33.
9. Janezic S, Ocepek M, Zidaric V, Rupnik M. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC microbiology*. 2012;12:48.

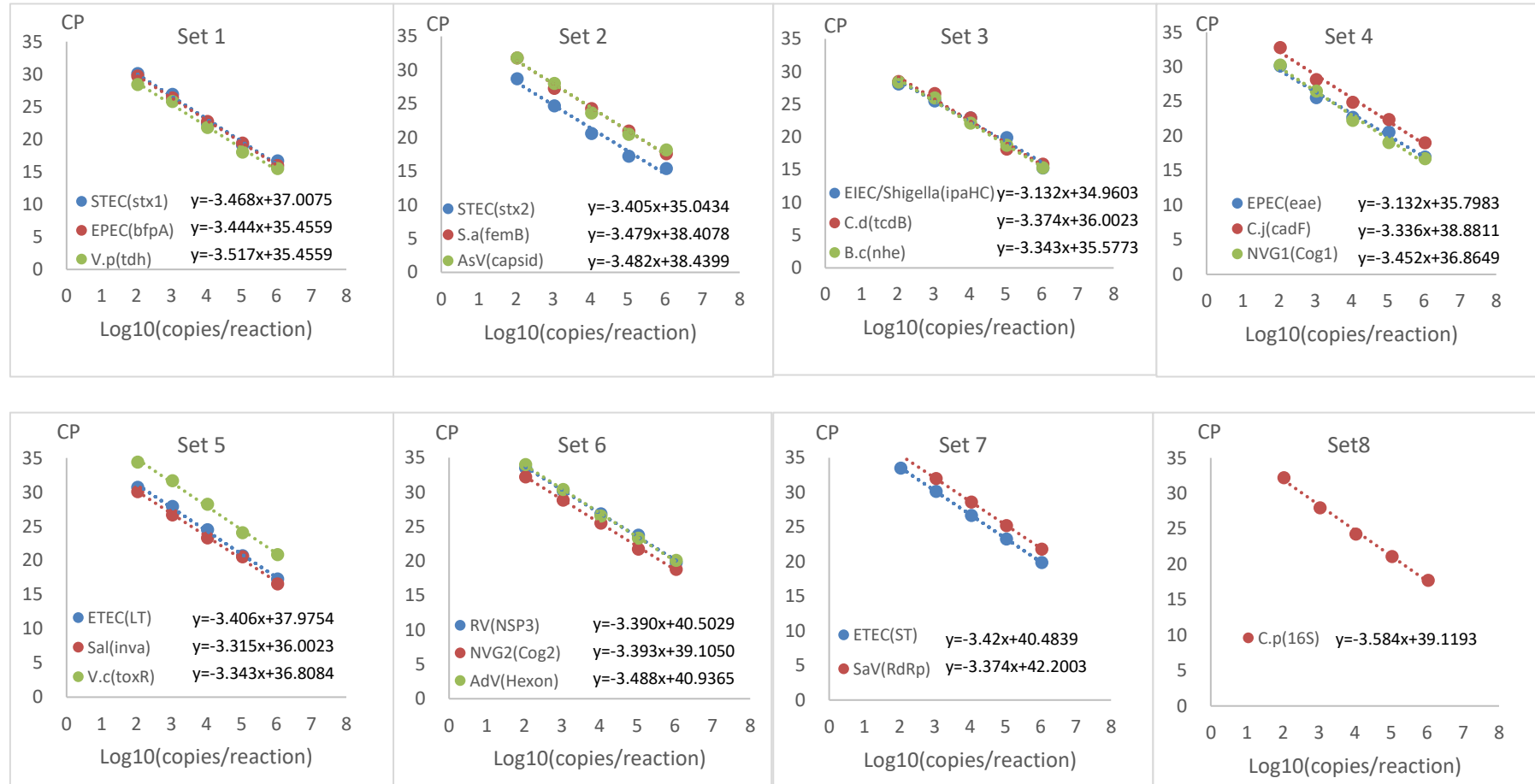
10. Longenberger AH, Palumbo AJ, Chu AK, Moll ME, Weltman A, Ostroff SM. *Campylobacter jejuni* infections associated with unpasteurized milk-multiple States, 2012. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(2):263-6.
11. Walter JE, Mitchell DK. Astrovirus infection in children. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(3):247-53.
12. Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, et al. Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(11):4114-20.
13. Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, et al. Human astrovirus gastroenteritis in children, Madagascar, 2004-2005. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(5):844-6.
14. Tseng WC, Wu FT, Hsiung CA, Chang WC, Wu HS, Wu CY, et al. Astrovirus gastroenteritis in hospitalized children of less than 5 years of age in Taiwan, 2009. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2012;45(4):311-7.
15. 陳協成, 吳靜怡, 盧祉彤, 吳芳姿, 吳和生. 2012 年臺灣星狀病毒腹瀉群聚事件流行病學分析. *疫情報導*. 2014;30(12):8.
16. Lyman WH, Walsh JF, Kotch JB, Weber DJ, Gunn E, Vinje J. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. *The Journal of pediatrics*. 2009;154(2):253-7.
17. Mikula C, Springer B, Reichart S, Bierbacher K, Lichtenschopf A, Hoehne M. Sapovirus in adults in rehabilitation center, upper Austria. *Emerging*

- infectious diseases. 2010;16(7):1186-7.
18. Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, et al. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(7):1169-71.
  19. 黃士澤, 吳岫, 吳芳姿, 慕蓉蓉, 羅一鈞, 黃頌恩, et al. 2012 年某連鎖自助餐廳沙波病毒群聚事件. *疫情報導*. 2012;28(21):5.
  20. LeBaron CW, Furutan NP, Lew JF, Allen JR, Gouvea V, Moe C, et al. Viral agents of gastroenteritis. Public health importance and outbreak management. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. 1990;39(Rr-5):1-24.
  21. 疾病管制署. *傳染病標準方法檢驗手冊*. 2015.
  22. Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;50(4):308-13.
  23. Giglio S, Monis PT, Saint CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic acids research*. 2003;31(22):e136.
  24. 食品藥物管理署. *精準醫療分子檢測實驗室檢測與服務(LDTS)指引*. 2018.
  25. FDA. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018.
  26. S.Broedersa, I. Huberb , L. Grohmannc , G. Berbend , I. Tavernierse , M. Mazzaraf , N. Roosensa and D. Morissetg. *Guidelines for validation of*

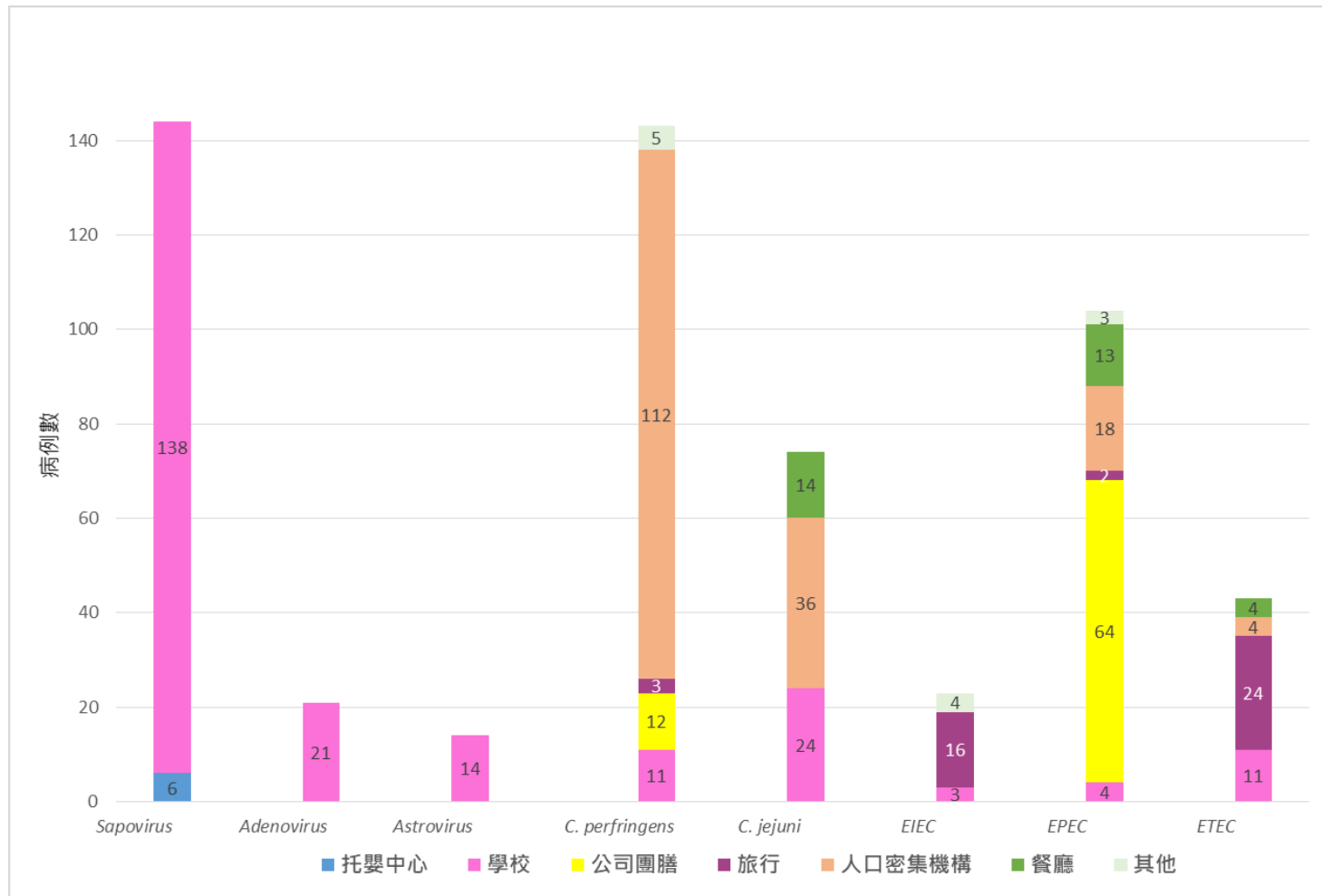
qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 2014;37(2):115-126.

## 八、圖、表

圖一、病原檢量線



圖二、近年國內新興及特殊腹瀉病原群聚發生場所



\*其他：自宅及夜市

\*統計期間：108 年 11 月至 109 年 10 月間

表一、8種多重配對組合

	細菌/病毒	基因	細菌/病毒	基因	細菌/病毒	基因
1	STEC	<i>stx1</i>	EPEC	<i>bfpA</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>
2	STEC	<i>stx2</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	Astrovirus	Capsid
3	EIEC / <i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>tcdB</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>nhe</i>
4	EPEC	<i>eae</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>cadF</i>	Norovirus GI	ORF1-ORF2
5	ETEC	<i>LT</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>toxR</i>
6	Rotavirus	<i>NSP3</i>	Norovirus GII	ORF1-ORF2	Adenovirus	Hexon
7	ETEC	<i>ST</i>	Sapovirus	RdRp	-	-
8	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>16s</i>	-	-	-	-

表二、全自動核酸偵測平台下各病原體之偵測極限(LOD)

病原體	偵測極限( no. copies /uL stool)
Norovirus GI	1
Norovirus GII	1
Rotavirus	3.5
Sapovirus	2.5
Astrovirus	2.5
Adenovirus	2.5
<i>Salmonella spp.</i>	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1
<i>Vibrio cholerae</i>	2.5
<i>Bacillus cereus</i>	2.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Clostridium difficile</i>	1
<i>Clostridium perfringens</i>	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	1
STEC	1
EIEC	1
EPEC	1
ETEC	1.5



表三、全自動核酸偵測平台對各病原體之靈敏度(Sensitivity)

目標病原	模擬/陽性檢體 檢測數量	判定陽性數	靈敏度(%)
Norovirus GI	21	20	95.2%
Norovirus GII	32	30	93.8%
Rotavirus	12	12	100.0%
Adenovirus	14	14	100.0%
Astrovirus	14	13	92.9%
Sapovirus	14	13	92.9%
<i>Salmonella spp.</i>	19	19	100.0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	19	95.0%
<i>Bacillus cereus</i>	15	14	93.3%
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	2	100.0%
<i>Vibrio cholerae</i>	2	2	100.0%
<i>Clostridium difficile</i>	14	14	100.0%
<i>Clostridium perfringens</i>	14	14	100.0%
<i>Campylobacter jejuni</i>	14	13	92.9%
STEC	14	14	100.0%
EPEC	14	14	100.0%
EIEC	14	14	100.0%
ETEC	14	13	92.9%

表四、全自動核酸偵測平台對各病原體之專一性(Specificity)

目標病原	陰性檢體檢測數量	判定陰性數	專一性(%)
Norovirus GI	12	12	100 %
Norovirus GII	12	12	100 %
Rotavirus	12	12	100 %
Adenovirus	12	12	100 %
Astrovirus	12	12	100 %
Sapovirus	12	12	100 %
<i>Salmonella spp.</i>	12	12	100 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	12	100 %
<i>Bacillus cereus</i>	12	12	100 %
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12	12	100 %
<i>Vibrio cholerae</i>	12	12	100 %
<i>Clostridium difficile</i>	12	12	100 %
<i>Clostridium perfringens</i>	12	12	100 %
<i>Campylobacter jejuni</i>	12	12	100 %
STEC	12	12	100 %
EPEC	12	12	100 %
EIEC	12	12	100 %
ETEC	12	12	100 %

表五、可重複性(Repeatability)

目標病原(基因)	I	II	III	均值	CV(%)
<i>V. parahaemolyticus</i>	32.31	32.37	33.59	32.76	1.8
STEC(Stx1)	33.49	33.24	33.84	33.52	0.73
EPEC(bfpA)	34.61	34.76	33.59	34.32	1.51
Astrovirus	30.32	29.94	29.23	29.83	1.51
<i>S. aureus</i>	35.91	37.38	35.79	36.36	1.99
STEC(Stx2)	32.17	32.53	32.59	32.43	0.57
<i>B. cereus</i>	32.31	32.31	33.84	32.82	2.2
<i>C. difficile</i>	36.78	36.81	36.77	36.79	0.05
EIEC/Shigella	24.51	25.5	25.22	25.08	1.66
Norovirus GI	27.1	26.85	26.47	26.81	0.97
<i>C. jejuni</i>	24.76	24.68	25.59	25.01	1.65
EPEC(eae)	31.18	31.87	31.74	31.6	0.95
<i>Salmonella spp.</i>	36.12	36.17	36.02	36.1	0.17
<i>V. cholerae</i>	32.11	32.85	32.28	32.41	0.98
ETEC(LT)	33.15	33.14	34.32	33.54	1.65
Norovirus GII	33.84	33.81	33.71	33.79	0.16
Rotavirus	27.6	28.01	27.88	27.83	0.61
Adenovirus	24.01	23.91	24.05	23.99	0.25
Sapovirus	33.21	33.05	33.57	33.28	0.65
ETEC(ST)	24.46	25.05	24.78	24.76	0.97
<i>C. perfringens</i>	24.76	24.68	25.59	25.01	1.65

表六、中間精密度(Intermediate precision)

目標病原(基因)	Day1	Day2	Day3	均值	CV(%)
<i>V. parahaemolyticus</i>	26.32	30.25	32.31	29.63	8.39
STEC(Stx1)	22.4	25.58	27.98	25.32	9.03
EPEC(bfpA)	27.05	30.72	34.61	30.79	10.02
Astrovirus	26.45	27.75	30.28	28.16	5.65
<i>S. aureus</i>	29.2	33.05	35.91	32.72	8.4
STEC(Stx2)	20.59	24.29	28.23	24.37	12.8
<i>B. cereus</i>	31.77	32.14	31.04	31.65	1.44
<i>C. difficile</i>	28.67	30.13	30.73	29.84	2.9
EIEC/Shigella	25.5	29.73	33.6	29.61	11.17
Norovirus GI	26.13	26.19	26.47	26.26	0.59
<i>C. jejuni</i>	24.76	24.85	25.56	25.06	1.43
EPEC(eae)	22.67	25.72	27.22	25.2	7.51
<i>Salmonella spp.</i>	26.37	27.86	30.7	28.31	6.34
<i>V. cholerae</i>	26	30.22	34.27	30.16	11.19
ETEC(LT)	27.43	27.66	29.59	28.23	6.34
Norovirus GII	32.59	33.23	33.84	33.22	1.54
Rotavirus	24.65	26.73	27.6	26.33	4.7
Adenovirus	23.17	23.31	24.01	23.5	1.56
Sapovirus	34.22	33.21	35.11	34.18	2.27
ETEC(ST)	24.46	25.32	25.65	25.14	2
<i>C. perfringens</i>	35.63	30.73	37.16	34.51	7.95

表七、線性(Linearity)

目標病原(基因)	R <sup>2</sup>	Slope	Efficiency
<i>V. parahaemolyticus</i>	0.9919	-3.517	0.9246
STEC(Stx1)	0.9905	-3.468	0.9425
EPEC(bfpA)	0.9999	-3.444	0.9515
Astrovirus	0.9874	-3.482	0.9373
<i>S. aureus</i>	0.9952	-3.479	0.9384
STEC(Stx2)	0.9821	-3.405	0.9665
<i>B. cereus</i>	0.9963	-3.343	0.9913
<i>C. difficile</i>	0.9803	-3.374	0.9787
EIEC/Shigella	0.9825	-3.378	0.9771
Norovirus GI	0.9894	-3.452	0.9484
<i>C. jejuni</i>	0.9887	-3.336	0.9942
EPEC(eae)	0.9844	-3.132	1.0859
<i>Salmonella spp.</i>	0.9977	-3.315	1.0029
<i>V. cholerae</i>	0.9956	-3.464	0.9439
ETEC(LT)	0.9975	-3.406	0.9661
Norovirus GII	0.999	-3.393	0.9712
Rotavirus	0.9983	-3.39	0.9724
Adenovirus	0.9977	-3.488	0.9351
Sapovirus	0.99996	-3.374	0.9787
ETEC(ST)	0.99997	-3.42	0.9606
<i>C. perfringens</i>	0.9964	-3.584	0.9012

表八、準確度(Accuracy)

目標病原(基因)	真值 (copy number/reaction)	測定值 (copy number/reaction)	Bias (%)
<i>V. parahaemolyticus</i>	$1 \times 10^4$	$1.075 \times 10^4$	7.5
STEC(Stx1)	$1 \times 10^4$	$1.081 \times 10^4$	8.1
EPEC(bfpA)	$1 \times 10^4$	$8.700 \times 10^3$	13
Astrovirus	$1 \times 10^4$	$1.085 \times 10^4$	8.5
S.aureus	$1 \times 10^4$	$8.900 \times 10^3$	11
STEC(Stx2)	$1 \times 10^4$	$9.66 \times 10^3$	3.4
<i>B. cereus</i>	$1 \times 10^4$	$9.020 \times 10^3$	9.8
<i>C. difficile</i>	$1 \times 10^4$	$8.8 \times 10^3$	12
EIEC/Shigella	$1 \times 10^4$	$1.180 \times 10^4$	18
Norovirus GI	$1 \times 10^4$	$1.054 \times 10^4$	5.4
<i>C. jejuni</i>	$1 \times 10^4$	$9.40 \times 10^3$	6
EPEC(eae)	$1 \times 10^4$	$7.900 \times 10^3$	21
<i>Salmonella spp.</i>	$1 \times 10^4$	$9.160 \times 10^3$	8.4
<i>V. cholerae</i>	$1 \times 10^4$	$1.042 \times 10^4$	4.2
ETEC(LT)	$1 \times 10^4$	$9.210 \times 10^3$	7.9
Norovirus GII	$1 \times 10^4$	$9.380 \times 10^4$	6.2
Rotavirus	$1 \times 10^4$	$1.065 \times 10^4$	6.5
Adenovirus	$1 \times 10^4$	$9.280 \times 10^3$	7.2
Sapovirus	$1 \times 10^4$	$9.320 \times 10^3$	6.8
ETEC(ST)	$1 \times 10^4$	$1.180 \times 10^4$	18
<i>C. perfringens</i>	$1 \times 10^4$	$9.35 \times 10^3$	6.5

表九、2019/11~2020/10 常規病原陰性之腹瀉群聚篩檢結果

Period Pathogen	2019		2020										Total	Positive rate
	Nov	Dec	Jan	Feb	Ma	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct		
Sapovirus	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	18	10.23 %
Adenovirus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	3	1.70 %
Astrovirus	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1.14 %
<i>C. difficile</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
<i>C. perfringens</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	1	7	3.98 %
<i>C. jejuni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	2	7	3.98 %
EIEC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3	1.7 %
EPEC	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2	8	4.55 %
ETEC	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	5	2.84 %
Total	11/17	5/17	0/10	0/5	0/9	1/14	1/15	5/13	4/16	3/10	12/28	11/22	53/176	30.11 %

\*2019 年 11 月至 2020 年 10 月期間共計篩檢 176 件腹瀉群聚。

表十、近年國內新興及特殊腹瀉病原盛行率及年齡統計

Pathogen	病例數	盛行率 (每百萬人口)	年齡分布區間	年齡平均值	主要年齡層
Sapovirus	144	6.1	1-50 歲	7.5 歲	6 歲以下
Adenovirus	21	0.89	3-14 歲	10.4 歲	12 歲以下
Astrovirus	14	0.59	3-9 歲	5.3 歲	6 歲以下
<i>C. perfringens</i>	143	6.06	1-83 歲	39.4 歲	20 歲以上
<i>C. jejuni</i>	74	3.14	13-55 歲	29.7 歲	20 歲以上
EIEC	23	0.97	11-55 歲	29.2 歲	20 歲以上
EPEC	104	4.41	7-57 歲	31.7 歲	20 歲以上
ETEC	43	1.82	10-38 歲	18.6 歲	16-歲以上

\*統計期間為 108 年 11 月至 109 年 10 月。

\*以內政部公告之 109 年 4 月全國人口數為監測期間平均人口數。



## 109 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：全自動核酸偵測平台開發與應用

計畫主持人：林智暉

填報日期：109 年 12 月 14 日

\*修正處請在報告中以紅字標示

序 號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
1	多種腹瀉病原體的 multiplex PCR 平台，可應用於諾羅病毒、輪狀病毒及沙門氏菌等病原體。	感謝委員肯定。	-
2	此應用平台是否有自糞便檢體驗出 SARS-CoV-2？腹瀉群聚疫情是否如呼吸道 ILI 監測因 COVID-19 大流行而下降？上述請補充說明之。	本平台可應用於 SARS-CoV-2 之檢驗，但未曾自糞便檢體驗出該病原；自武漢肺炎疫情開始後，今年 2-6 月份期間腹瀉群聚疫情確實因此明顯下降，但隨國內大規模解禁及開學等因素，其疫情已自 7 月份起逐步回升至往年水準。	-
3			
4			
5			

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 109 年 12 月 23 日  
前至 GRB 系統完成資料抽換。