

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※
※ 應用聚合酶鏈反應(PCR)檢測食品中赤痢菌(<i>Shigella</i>) ※
※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：☐個別型計畫

計畫編號: NSC 89-2313-B-041-008

執行期限：88年08月01日至89年07月31日

計畫主持人：王淑珍 副教授

研究人員：高熾婷 講師

執行單位：嘉南藥理科技大學

中 華 民 國 89 年 10 月 20 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號: NSC 89-2313-B-041-008

執行期限: 88 年 08 月 01 日至 89 年 07 月 31 日

主持人: 王淑珍 嘉南藥理科技大學

摘要

自行發展之 PCR primers VirF2-VirF3 及 VirF3-VirF4 檢測 *Shigella boydii*, *S. Dysenteriae*, *S. flexneri* 及 *S. sonnei* 具有特異性, 其 PCR 產物大小分別為 412bp 及 341bp。使用此 PCR primers 檢測食品, 當接菌量為 10^1 - 10^4 CFU/ml 經培養後, 皆可檢測出 *Shigella*。使用此 PCR primers 檢測自然污染之食品, 其檢測結果與傳統方法相符合。

Abstract

PCR primers VirF2-VirF3 及 VirF3-VirF4 have been developed for the detection of *Shigella* specifically. The amplified DNA fragments was 412bp and 341bp respectively. When these PCR primers was used to detect the artificially contaminated food samples, The results showed that it could be detected in inoculation of 10^1 CFU/ml after enrichment. In detection of natural contaminated food samples, the results from PCR method were in agreement with the conventional method.

一、緣由與目的

Shigella (赤痢菌) 有 4 種 species 或 serotype, 分別為 *Shigella boydii* (serovars 1-15), *S. Dysenteriae* (serovars 1-10), *S. flexneri* (serovars 1-6, subserovars 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b) 及 *S. sonnei* (serovars 1)⁽¹⁾。Virulent *Shigella* 引起人類疾病稱為桿菌痢疾 (bacillary

dysentery) 有如 Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) 一樣。Shigellosis, 潛伏期約 1-7 天 (一般低於 4 天), 會起下痢、發燒、肚痛, 嚴重脫水, 通常只要攝取含 10-100 cell/person, 即會引起疾病⁽²⁾。所有病原性 *Shigella* 含有 20-230 kb 質體 (plasmid) 稱為 virulence plasmid, 首先在 *S. flexneri* 2a 中發現⁽³⁾。Sansonett et al⁽⁴⁾ 曾報告, 若 *Shigella* 失去 virulence plasmid, 則 *Shigella* 無病原性。但目前 *Shigella* 這種病原性 (virulent function) 不只存在 virulence plasmid 上, 也存在於染色體上⁽⁵⁾。

Shigella 傳統檢測法, 依照血清型的不同, 有的需數天, 有的甚至於需數星期方可得到結果⁽⁶⁾。另一方面依 DNA 特性發展之快速, 高靈敏度, 特異性高之技術, 近年來已發展出來, DNA 探針雜交法及 PCR (polymerase chain reaction), 是其中較為大家熟悉之技術及被用來作為病原菌的檢測⁽⁷⁻¹⁰⁾。故本研究發展檢測食品 *Shigella* spp. 之 PCR primers, 以期快速檢測食品中之 *Shigella* sp。

二、研究方法

1. 聚合酶鏈反應

菌體 DNA 500 ng, 取 10mM dNTP 1 μ l, 10 x PCR buffer (含適當 Mg^{+2} 濃度) 5 μ l, 加入適量 primers, Taq DNA polymerase, 無菌水加至最終體積 50 μ l, 最後加入 mineral oil 蓋住表面, 將離心管放入 Microprocessor Controlled thermal cycler (Gene Amp PCR system 2400,

Perkin Elmer CT,USA) 先升溫進行 denature 94°C, 40 秒, 降溫至 55°C, 50 秒進行黏合, 接著進行聚合作用, 72°C, 50 秒, 如此共進行 30-35 cycles。取 10 μ l 聚合酶鏈反應產物, 以 1.5-2.0% agarose gel 於 1 x TBE 中進行電泳分析。

2. 食品中病原性 *Shigella* 之檢測

取 1ml 食品均質液與 9ml 培養液混合, 接入 10¹ – 10⁴ cell/g 食品, 經培養, 並行 PCR 分析。此外亦分析自然污染之食品。

三. 結果與討論

1. PCR primers 之特異性

Primers

F2(5'AGCTGCATAAGCTCTTTCTTC3'),

F3(5'CCTCAGAATAGGAGTGTTGAA3') 及

F4(5'TCTTAGTTACTCTGTAAACAC3')

, 由 *Shigella* virulence plasmid 之 *virF* 基因之序列而來, 此為本研究自行發展之 PCR primer, 經測試比對, 發現 primer sets F2-F3, F3-F4 對所測試之 *Shigella* 呈正反應, 對於其它菌株如 *Salmonella* spp., *E.coli* 及一些腸內菌則無任何反應(Table 1), 它增幅之 PCR 片段為分別為 413 及 341bp, 與預測之片段大小相符合。

2. 檢測靈敏度

將 *Shigella* 之新鮮培養液, 連續稀釋, 取 10 μ l 進行 PCR 檢測。由圖一結果顯示, 此二組 primers 若每次 PCR 分析為 10⁴ CFU, 則在電泳上的 band 非常清楚。若在低菌數如 10³ 時, 則再現性較差。故此二組 PCR primers (F2-F3)及(F3-F4)其檢測靈敏度為 10⁴ CFU。

3. PCR primers 檢測食品之靈敏度

選擇 *Shigella* 常污染之食品 5 種, 分別為沙拉、蛋、糞便、肉及蔬菜。這些食品經接菌及不接菌培養, 分別以 primers VirF2-VirF3 及 VirF3-VirF4 檢測, 結果接菌數由 10¹-10⁴, 皆可以這兩組 primers 檢測出來(Table 2)。

4. PCR primers 檢測食品中 *Shigella*

檢測天然污染的食品我們以水、沙拉或用來作沙拉的生菜或沙拉醬等 *Shigella* 亦污染之食品為檢測對象。這些食品共檢測 200 種(Table 3), 由結果顯示, 水的部分並沒有檢測出 *Shigella*, 而沙拉樣品有 5 個被檢測含有 *Shigella* 或 EIEC, 以傳統檢測 *Shigella* 呈正反應。由上述結果顯示, 以 primers VirF2-VirF3 及 VirF3-VirF4 可同時檢測食品 *Shigella* 及 EIEC, 但無法區別 *Shigella* 及 EIEC。未來實驗目標將尋找 PCR primers 用來確認食品中的病原菌是 *Shigella* 或 EIEC。

參考文獻

1. Smith, J.L. .1987, *Shigella* as a Foodborne pathogen J. Food protection, 50:788-801
2. Bacteria Associated with Foodborne Disease .1988. A scientific status summary by IFT expert panel on food safety & nutrition. Food Teach. 42:181-200
3. Kopecko, D.J., O. Washington and S.B. Formal .1980. Genetic and physical evidence for plasmid control of *Shigella sonnei* form I cell surface antigen. Infection and Immunity, 29:207-214
4. Sansonetti, P., D. J. Kopecko and S.B. Formal .1982. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. Infection and Immunity 35:852-860
5. Hale T.C..1991. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. Microbiological Review 55:206-224

6.Hill,W.E, J.L.Ferreira, W.L. Payne and V.M. Jones 1985. Probability of recovering pathogenic *Escherichia coli* from food. Appl. Environ. Microbiol 49:1374-1378
 7.Batt,C.A..1997. Molecular diagnostic for dairy-borne pathogens. J. Dairy Sci. 80:220-2298
 8.Hill,W.E..1996. The polymerase chain reaction:applications for the detection of foodborne pathogens. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.36:123-173

9.Notermans,S.and K. Wernars.1990. Evaluation and interpretation of data obtained with immunoassays and DNA-DNA hybridilation techniques.Int.J.Food Microbiol,11:35-49
 10.Olsen,J.E., S.Aabo, W.Hill, S.Notermans, K.wernars, P.E.Granum,T.Popovic, H.N. Rasmussen and O.Olsvik.1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. Int J. Food Microbiol.28:1-78

Table 1. Bacteria strains used in specificity of the PCR primers

Species	No. of isolates	Positive results		Species	No. of isolates	Positive results	
		F2-F3	F3-F4			F2-F3	F3-F4
<i>Enterobacteriaceae</i>				<i>Shigella dysenterias</i> (CCRC13983)	1	1	1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0	0	<i>Shigella flexneri</i> (CCRC 10772,13984)	2		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	0	<i>Shigella sonnei</i> (CCRC10773,10774)	2	2	2
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	0	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0
<i>Brevibacterium linens</i>	1	0	0	<i>Escherichia coli</i>			
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0	<i>ETEC</i>	6	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0	0	<i>EIEC</i>	2	2	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	<i>EHEC</i>	5	0	0
<i>Erwinia carotovora</i>	1	0	0	<i>Non-toxigenic E. coli</i>	22	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	<i>Salmonella</i>			
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0	<i>S. agona</i>	1	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	0	<i>S. anatum</i>	1	0	0
<i>Shigella boydii</i> (CCRC15959)	1	1	1	<i>S. azteca</i>	1	0	0

<i>S. berta</i>	1	0	0	<i>S. lagos</i>	1	0	0
<i>S. bonn</i>	1	0	0	<i>S. lanka</i>	1	0	0
<i>S. bousso</i>	1	0	0	<i>S. litchfield</i>	1	0	0
<i>S. bredeny</i>	1	0	0	<i>S. london</i>	1	0	0
<i>S. braenderup</i>	1	0	0	<i>S. manhattan</i>	1	0	0
<i>S. california</i>	1	0	0	<i>S. minnesota</i>	1	0	0
<i>S. cerro</i>	1	0	0	<i>S. muenchen</i>	1	0	0
<i>S. chester</i>	1	0	0	<i>S. montevideo</i>	2	0	0
<i>S. colorado</i>	1	0	0	<i>S. muenster</i>	1	0	0
<i>S. coleypark</i>	1	0	0	<i>S. ngor</i>	1	0	0
<i>S. cubana</i>	1	0	0	<i>S. nigeria</i>	1	0	0
<i>S. derby</i>	1	0	0	<i>S. ohio</i>	1	0	0
<i>S. djakarta</i>	1	0	0	<i>S. portsmouth</i>	1	0	0
<i>S. enteritidis</i>	5	0	0	<i>S. rubislaw</i>	1	0	0
<i>S. emek</i>	1	0	0	<i>S. ruiru</i>	1	0	0
<i>S. eppendorf</i>	1	0	0	<i>S. senftenberg</i>	3	0	0
<i>S. essen</i>	1	0	0	<i>S. seremban</i>	1	0	0
<i>S. gera</i>	1	0	0	<i>S. stanley</i>	1	0	0
<i>S. goerlitz</i>	1	0	0	<i>S. tananarive</i>	1	0	0
<i>S. hadar</i>	5	0	0	<i>S. tennessee</i>	2	0	0
<i>S. havana</i>	2	0	0	<i>S. thomasville</i>	1	0	0
<i>S. heidelberg</i>	1	0	0	<i>S. thompson</i>	1	0	0
<i>S. hvittingfoss</i>	1	0	0	<i>S. typhi</i>	1	0	0
<i>S. infantis</i>	1	0	0	<i>S. typhimurium</i>	4	0	0
<i>S. johannesburg</i>	2	0	0	<i>S. vejle</i>	1	0	0
<i>S. kentucky</i>	2	0	0	<i>S. victoria</i>	1	0	0
<i>S. kinshasa</i>	1	0	0	<i>S. weltevreden</i>	1	0	0
<i>S. kuru</i>	1	0	0	<i>S. worthington</i>	1	0	0

Table 2 The detection sensitivity with and without inoculation of *Shigella* using PCR primers

Food	Analytical samples		PCR positives results by PCR primers								
			VirF2-VirF3				VirF3-VirF4				
			0	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	0	10 ¹	10 ²	10 ³
Meat	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
Egg	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
Feces	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
Vegetable	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
Salad	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5

Table 3 Detection of *Shigella* or EIEC in natural contaminated food samples

Food	Analytic samples	PCR positives results by PCR primers		Conventional method of <i>Shigella</i> or EIEC
		VirF2-VirF3	VirF3-VirF4	
Water	150	0	0	0
Salad dressing	5	0	0	0
Vegetable	15	0	0	0
Salad	30	5	5	5
Total	200	5	5	5