

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 88-2313-B-041-004

執行期限：87年08月01日至88年07月31日

主持人：王淑珍 嘉南藥理學院食品衛生系

一摘要

使用兩組 PCR primers 之多套式 PCR 已被發展出來，對含 LT gene 之大腸桿菌(ETEC)及沙門氏菌具有特異性，其 PCR 產物分別為 425bp 及 163bp。使用此多套式 PCR 檢測食品，當 ETEC 及沙門氏菌分別接入 100/101CFU/ml 經培養其檢測率分別為 88% 及 72%，隨著接菌量的增加，檢測率亦增加。使用此多套式 PCR 檢測自然污染之食品，以此多套式 PCR 檢測呈正反應之食品，以傳統方法檢測亦呈正反應。

Abstract

Multiplex PCR with two sets of primers was developed for the detection of Enterotoxigenic *E. coli* (LT gene) and *Salmonella* spp. The two amplified DNA fragments 425bp and 163bp respectively, were separated by agarose electrophoresis. When this multiplex PCR system was used for the screening of ETEC and *Salmonella* spp. In food samples, it was found that after enrichment step, 10⁰CFU/ml for *E. coli*, 10¹CFU/ml for *Salmonella* inoculation, could be detected 88% and 72% respectively. If the inoculation number increased, the detection rate of this multiple PCR increased. In detection of natural contaminated food, the results from multiplex PCR were in agreement with the conventional method for 100 samples.

二緣由與目的

病原性 *E. coli*(Enterotoxigenic *E. coli*

ETEC)對人類和其它動物如豬，都是具有病原性對 ETEC 而言，有好幾個毒素型被發現，有 heat liable toxin(LT), LT11 及 Reat stable toxin(ST)I, STII⁽¹⁻⁴⁾。LT1 及 ST1 之 ETEC 主要由人及或豬分離而得，LT11 則很少被分離出來，除了巴西和泰國之外^(1,5,6)，引起 ETEC 感染主要的原因是 ETEC 污染了食物和水，而感染人和動物。

沙門氏菌(*Salmonella*)屬於感染型，世界各國如台灣和美國在食品的發生率仍然居高不下^(7,8)，其感染途徑與 *E. coli* 頗為相似，主要食用了不潔的食品或飲水而導致食物中毒。人類食用了被 ETEC 或 *Salmonella* 感染的食物和水，而引發食物中毒的可能性很高，一種快速可靠的方法可以同時檢測 ETEC 或 *Salmonella* 的存在是重要的。以往 PCR 單獨檢測 ETEC 或 *Salmonella*，近年來多套式 PCR 系統^(8,9,13)(multiplex PCR system)已成功同時檢測多種微生物，如水中 *E. coli* 及 *Shigella* spp⁽¹⁴⁾之檢測，*Listeria* spp 及 *Listeria monocytogenes* 的確認乳製品，除此之外，multiplex PCR 亦應用於 LT, ST1 及 *Shigella* 之檢測⁽¹⁶⁾，LT1, ST1 檢測⁽⁴⁾，*Salmonella* spp., *Salmonella enteridis*, *S. typhumurium* 之檢測⁽¹⁷⁾，SLT1, SLT11 之檢測⁽¹⁸⁾及 *E. coli* 中 SLT1, SLT11, LT1 及 STII 之檢測⁽¹⁹⁾。

無論如何，multiplex PCR 之檢測技術，並沒有應用於 *E. coli* LT 與 *Salmonella* spp 之檢測。故在本研究中我們利用 multiplex PCR 技術同時檢測 LT 之 *E. coli* 及 *Salmonella* spp.。PCR

primers M1-M2 是由 Mahon et al et al⁽⁸⁾ 所發展，主要對 *Salmonella* 染色體上的複製源(thorigin of replication on chromosome, Oric)具有特異性，此 PCR primers 對 *Salmonella* spp. 具有特異性，可產生 163bp 的產物。此外 primer LT1L-LT1R 是利用 ETEC 之 LT gene⁽²⁰⁾ 設計出來，此 primers 與其它實驗室所發展之 LT 基因之 primer 不相同，此 primer 經單獨比對，發展對 *E. coli* LT 具有特異性，可產生 425bp 的產物。

材料與方法

1. Multiplex PCR

取一支 0.2ml tube 中含 1.2 μ l 10mM dNTP，4 μ l 10xPCR buffer 含 15mM MgCl₂，1pmole/1 μ l (M1-M2 及 LT1L-LT1R)，及 10 μ l 目標菌，以無菌水調至最終體積 40 μ l，於 94°C，10min 進行熱水解，加入 10 μ l 1x PCR buffer 含 0.2unit DNA Taq polymerase，DNA 於 94°C denature 2min，接著進行增幅作用，94°C、40sec 進行 denature，annealing 於 55°C、50sec，extension 於 72°C，40sec，如此共循環 35cycles，接著於 1.6% agarose 於 1xTBE 進行電泳分析，最後於 72°C，3min。

2. 應用 multiplex PCR 檢測食品中

Salmonella spp. 及 LT *E. coli* 食品包括蛋、飼料、魚、肉，切碎後取 1g 加入 9ml lactose broth，分別接入 *Salmonella* 及 LT *E. coli* 於 37°C 培養 24 小時，取 1ml 移入 9ml lactose broth-SCB(1:2 w/w)，37°C 培養 24 小時，將此食品培養液作 10 倍稀釋，取 10 μ l 作為目標菌進行 PCR 檢測。此外，亦進行自然污染食品之檢測。

結果

Multiplex PCR 檢測特異性

Primers M1(5' TTATTAGGATC GCGCGAG GC3') 及 M2(5' AAAGAAATAACCGTT GTTCAC3')

對 *Salmonella* Chromosome 的 origin of replication(Oric)，具有特異性(8)，所以我們利用此 primers 來檢測 *Salmonella* spp.，它所增幅的 PCR 片段大小為 163bp。

Primers LT1R(5' ATGAATTTCCACAACC C TAT3') 及 LT1L(5' CAAACCGGCTTTGTTCAGATA T3')，由 *E. coli* labile toxin gene(LT) 之序列而來，此為本研究自行由 LT gene 找出之片段，經測試比對，發現此 primers 對含有 LT gene 之 *E. coli* 呈正反應，對於其它不含 LT gene 之 *E. coli* 或其它菌株皆呈負反應，它增幅之 PCR 片段為 425bp，與預測之片段大小相符合。

這兩組 primers M1-M2 與 LT1L-LT1R 混合加入於一個 multiplex PCR，同時檢測 *Salmonella* spp 及具有 LT gene 之 *E. coli*。為了確認此條件不會產生假性正反應，我們測試了 *Salmonella* spp.，Enterotoxigenic 及 non-Enterotoxigenic *E. coli* 及一些腸內菌(Table 1)，由 Table 1 結果顯示此 multiplex PCR 條件下，對於所測試之菌株並不會有假性正反應。

Multiplex PCR 的靈敏度

將含 LT 之 *E. coli*(ETEC 02) 或 *Salmonella typhimurium*(ATCC12947) 之新鮮培養液，連續稀釋，各取 10 μ l 進行 multiplex PCR 檢測。若每次 PCR 分析 10⁶CFU，則二者在電泳上的 band 非常清楚。在接菌量 ETEC02 與 *S. typhimurium* 相等，則在低菌數時，只能檢測 ETEC02，我們將 *S. typhimurium* 之菌量提高 10 倍時，發現 *S. typhimurium* 之檢測結果較好，故檢測食品之靈敏度時，我們採用之 *S. typhimurium* 之接種量高於 ETEC 10 倍。利用 multiplex PCR 檢測食品中之 ETEC 及 *S. typhimurium*

取食品蛋、飼料、雞肉、豬肉、魚接入不同菌數之 ETEC 及 *S. typhimurium* 經

培養後，進行檢測。由表二結果顯示，當 ETEC/ *S. typhimurium* 接菌量為 $10^0/10^1$ ， $10^1/10^2$ ， $10^2/10^3$ ， $10^3/10^4$ ， $10^4/10^5$ CFU/ml 時，在 25 個樣品中，LT1L-LT1R/M1-M2 之檢測率分別為 22/18，23/19，23/20，23/23，25/25。即在低菌量時，M1-M2 之檢測率較 LT1L-LT1R 低，但隨著 *S.*

typhimurium 菌數的提高，M1-M2 檢測率隨著提高，若菌數增至 $10^4/10^5$ CFU/ml，則可 100% 檢出 ETEC 與 *S. typhimurium*。

除了食品檢測靈敏度外，我們亦檢測天然食品(表三)。天然食品共檢測 100 種食品，其中 50 種以人工感染方式作為正反應，由結果顯示，除了人工感染之食品以 multiplex 檢測全部為正反應外，在未感染部份亦檢測到天然污染之 ETEC 及 *Salmonella* SPP.，以傳統方法檢測，發現以 Multiplex PCR 檢測為正反應者，以傳統檢測亦為正反應。由以上結果顯示，multiplex PCR 檢測食品，若接入低菌數，需經培養過程，方能提高檢測率。

參考文獻

1. Guth, B.E., Pickett, C.L., Twiddy, E.M. et al. (1986) Production of type II heat labile enterotoxin by *Escherichia coli* isolated from food and human feces. *Infection and Immunology* 59, 587-589.
2. Livine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhoea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Disease* 155, 377-389.
3. Woodward, M.J., Carroll, P.J. and Wray, C. (1992) Detection of enterotoxin and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 31, 251-261.
4. Stacy-Phipps, S., Mecca, J.J. and Weiss, J.B. (1995) Multiplex PCR assay and simple

preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1054-1059.

5. Candrian, U., Furrer, B., Hofflein, C., Meyer, C.R., Jermini, M. and Luthi, J. (1991) Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. *International Journal of Food Microbiology* 12, 339-351.
6. Cerqueira, A.M.F., Tibana, A., Gomes, T.A.T. and Guth, B.E.C. (1994) Search for LT II and STb DNA sequences among *Escherichia coli* isolated from bovine meat products by colony hybridization. *Journal of Food Protection* 57:734-736
7. 食品中毒發生狀況, 1996, 行政院衛生署, 台北, 台灣
8. Mahon J.C.K., Murphy, P.W., Jones and P.A. Barrow 1994. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin.
9. Miyamoto T, H.Z. Tian, T Okabe. Application of Random amplified polymorphic DNA analysis for detection of *Salmonella* spp. in foods. *J. Food protection*, 61:785-791
10. 劉珮如, 王添貴, 林建益, 潘子明, 曾浩洋 1996 應用聚合 每鏈反應 (PCR) 方法快速鑑定傷寒桿菌. *J. Food and Drug Analysis* 4:65-73
11. Gouws P.A., M. Uisser and V.S. Brozel 1998. A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. *J. Food protection* 61:1039-1042
12. Tsen H.Y., W.R. Chi and Lin C.K. 1996. Use of Novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of heat labile toxin I, heat stable toxin I and II enterotoxigenic *Escherichia coli* in milk. *J. Food Protection* 59:795-802
13. Bej. A.K., R.J. Steffan., J.L. Dicesare, L. Haf

f and R.M. Atlas. 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene

probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:307-314

14. Bej, A.K., Dicesare, J.L., Haff, L. and Atlas, R.M. (1991) Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in waters by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Applied and Environmental Microbiology.*

15. Herman, L.F., H.F.M. De Ridder., and G.M.M. Vlaemynck 1995. A multiplex PCR method for the identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in dairy samples. *J. Food protection* 58:867-872

16. Frankel, G., Giron, J.A., Vamasso, J. and Schoolik, G. (1989) Multiplex amplification; simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Molecular Microbiology* 3, 1729-1734.

17. Soumet, C.G., Ermel, N., Rose, V., Rose, P., Drouin, G., Solvat and P. Colin. 1999 Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* from environmental swabs of poultry houses *Listeria* in *Applied Microbiology* 28:113-117

18. Cebula, T.A., Payne, W.L. and

Feng, P. (1995) Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 248-250

19. Tsen, H.Y. and L.Z. Jian 1998. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. *J. Applied Microbiology* 84:585-592

20. Victor, T., Toit, R.O., van

Zyl, J., Bester, A.J. and van

Helden, P.D. (1991) Improved method for the routine identification of toxigenic *Escherichia coli* by DNA amplification of a conserved region of the heat labile toxin A subunit. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 158-161

Table 1. Specificity of the multiplex PCR

species	No. of isolates	Positive results		species	No. of isolates	Positive results	
		M1-M2	LTIR-LTIL			M1-M2	LTIR-LTIL
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0	0	<i>Salmonella anatum</i>	1	1	0
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	0	<i>Salmonella arizonae</i>	1	1	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	0	<i>Salmonella bousso</i>	1	1	0
<i>Brevibacterium linens</i>	1	0	0	<i>Salmonella derby</i>	1	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	<i>Salmonella enteritidis</i>	1	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	<i>Salmonella essen</i>	1	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	<i>Salmonella hvittingfoss</i>	1	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	<i>Salmonella limete</i>	1	1	0

<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	<i>Salmonella london</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i>	16	0	0	<i>Salmonella manhattan</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i> (ETEC01)	1	0	1	<i>Salmonella miami</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i> (ETEC02)	1	0	1	<i>Salmonella typhimurium</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i> (ETEC04)	1	0	1	<i>Salmonella typhimurium</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i> (ETEC07)	1	0	1	<i>Salmonella typhimurium</i>	1	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	<i>Salmonella worthington</i>	1	1	0
<i>Salmonella adelaide</i>	1	1	0	<i>Serratia marcescens</i>	1	1	0
<i>Salmonella agona</i>	1	1	0	<i>Shigella flexneri</i>	1	1	0
<i>Salmonella anatum</i>	1	1	0	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	0

CDC: Center for Disease Control, Georgia, U.S.A.

ATCC: American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.

PT: National Ping Tung Institute of Agriculture

US: The City of New York Department of Health, U.S.A.

CCRC: Culture Collection and Research Center Taiwan R.O.C

WHO: World Health Organization

FDB: Food Drug Bureau, Department of Health Executive Yuan, Taiwan, R.O.C

Table 2. Detection sensitivities of multiplex PCR to foods.

Food	Analytical Samples	PCR positive results by multiplex PCR LT1L-LT1R/M1-M2					
		0/0 ^a	10 ⁹ /10 ¹	10 ¹ /10 ₂	10 ² /10 ₃	10 ³ /10 ₄	10 ⁴ /10 ₅
Egg	5	4 ^b /3	3/4	3/5	4/5	4/5	5/5
Food	5	5/2	5/4	5/2	4/2	4/5	5/5
Chicken	5	1/0	5/4	5/4	5/4	5/5	5/5
Pig	5	2/1	4/2	5/4	5/4	5/3	5/5
Fish	5	4/2	5/4	5/4	5/5	5/3	5/5

a: Inoculation of ETEC and *S. typhimurium* (No. CFU of ETEC/No. CFU *S. typhimurium*)

b: Positive of results (LT1L-LT1R/M1-M2)

Table 3. Multiplex PCR for the detection ETEC and *S. typhimurium* in foods.

Sample	Analytical samples	PCR positive results by multiplex PCR	
		LT1L-LT1R	M1-M2
Meat	26(13) ^a	13	14
Poultry	6(3)	4	4
Sea food	22(11)	14	13
Egg	14(7)	8	9
Feces	28(14)	16	17
Water	4(2)	3	2
Total	100(50)	58	59

a : Positive control ETEC and *S. typhimurium* more inoculated 10⁴ and 10⁵ CFU/ml.