

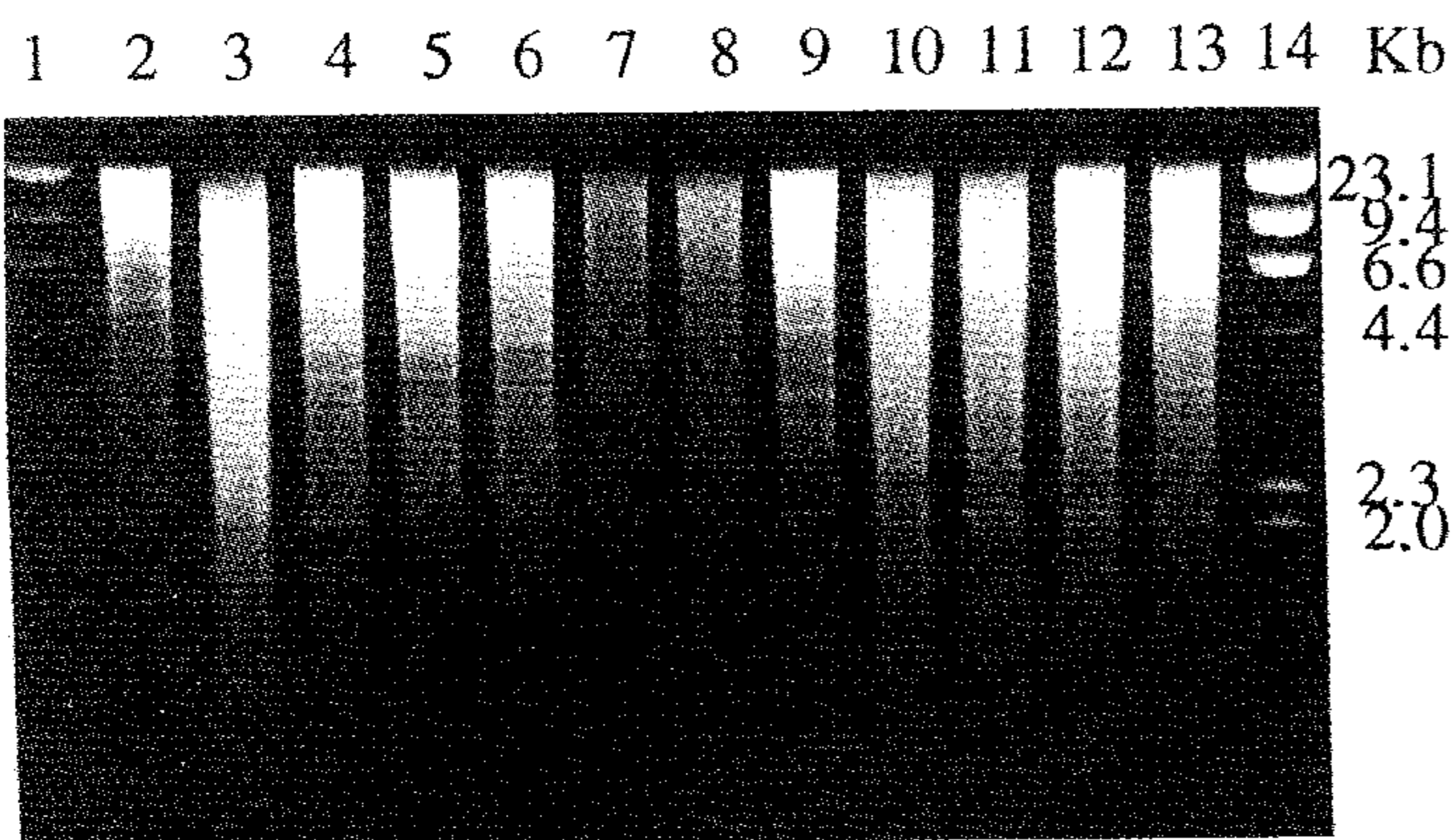
利用分子生物學方法作細菌分型（Ⅱ）

廖旭方

沙鹿童綜合醫院院內感染管制委員會

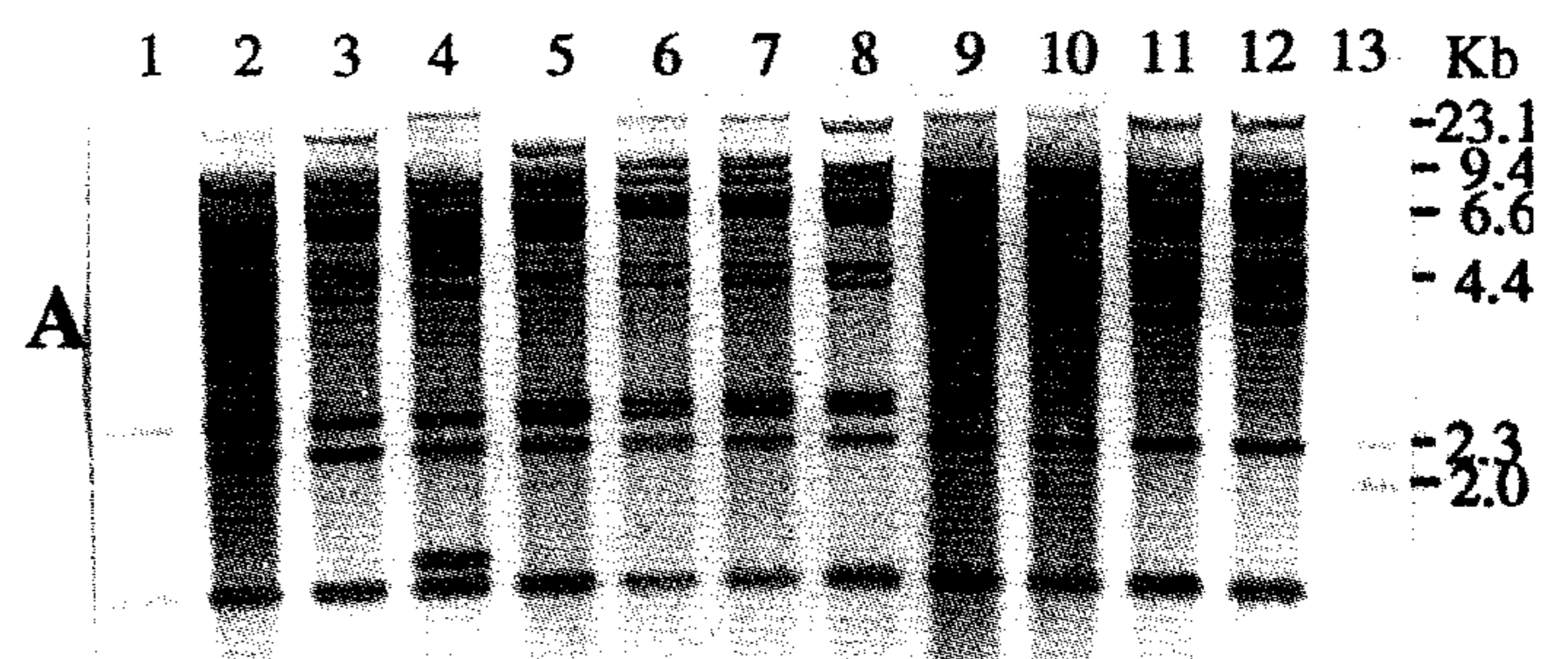
核糖體基因分型法 (ribotyping)

由於質體分型法有上文所說的缺點，因此便發展了以染色體基因作為分型工具的方法，最早期發展出來的染色體基因分型法，是先用核酸限制酶切割，切割完後再跑電泳，在洋菜膠上把這些分子量大小不一的染色體片段分開，如此便可形成不同的圖型 (patterns)，這種直接用限制酶切割分析染色體的方法，我們稱為REA (restrictive endonuclease analysis)。這種方法雖然簡單，問題是染色體是一條非常長的核酸鏈 (由約 10^6 個核酸組成)，這樣的切割結果有可能形成超過100條以上的片段，因而在洋菜膠上無法判讀 (圖一)。所以最好的方法，是能利用一些帶有放射



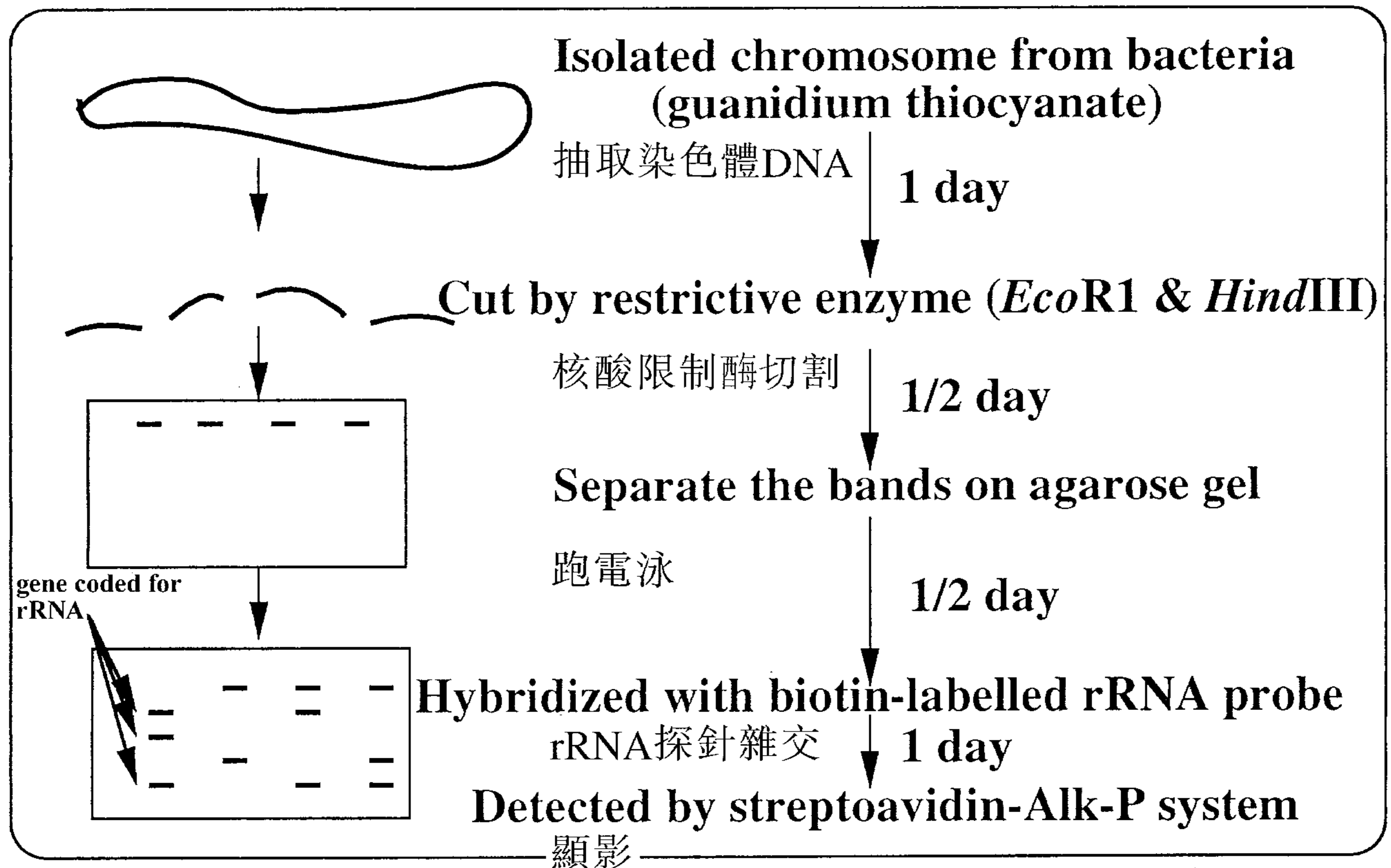
圖一 用核酸限制酶切割後之*S.marcescens*菌株染色體DNA。
第1列與第14列為marker

性或非放射性標記的探針，使某些從洋菜膠轉印至尼龍膜上的基因片段顯影，如此顯影出來的圖型，因只有10~15個片段左右，比較容易判讀與比較 (圖二)，核糖體基因分型法便是利用轉錄核糖體RNA基因 (16S及23S rRNA) 的cDNA作為探針，用以偵測細菌染色體中轉錄核糖體的基因片段。



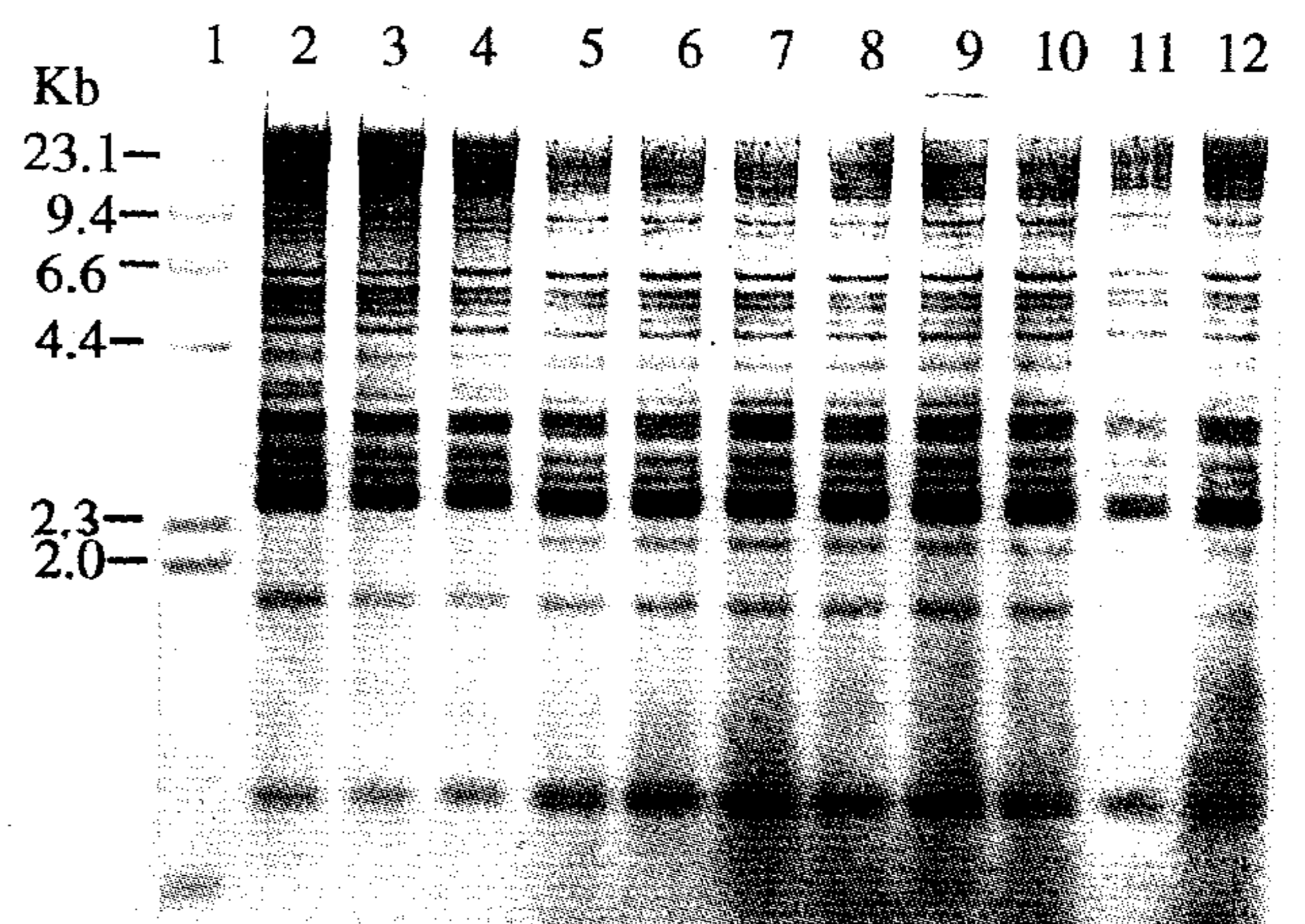
圖二 圖一之*S. marcescens*染色體DNA用核糖體探針雜交並顯影後之結果。
第13列為marker

核糖體基因之所以會被利用作為細菌分型的依據，是因為這一段基因在染色體中是最不容易突變，非常穩定的基因，這剛好能彌補質體分型法的缺點。目前很多細菌都是根據核糖體基因的相似性 (similarity) 而重新命名與分類，例如 *Branhamella catarrhalis*，現在歸類為 *Moraxella*，故稱為 *Moraxella catarrhalis*。



圖三 核糖體基因分型法之步驟

由於核糖體基因相當穩定，核糖體基因分型法的最大優點便是再顯性很高，這對細菌來源的調查，特別是長時間的追蹤有很大的幫助。但是核糖體基因分型法也有三大缺點。第一大缺點就是費時費力，圖三顯示出核糖體基因分型法的全部過程，最少需三天才能完成，這對需要爭取時效的群突發調查是一個致命傷。第二個缺點是每一種細菌所需用的核酸限制酶都不一樣，不是每一種限制酶對菌株都有相同的區分能力，這樣一來，我們便需要準備很多不同種類的限制酶，但核酸限制酶保存有一定時間，並且相當昂貴，這對臨床使用來說並不划算。核糖體分型法的第三個缺點，也是最重要的一個缺點是：因為核糖體基因非常穩定，所以對某些細菌來說，可能缺乏菌株間的區分能力。例如 *Shigella sonnei*，我們嘗試用各種核酸限制酶來切割，但核糖體分型法對這種細菌

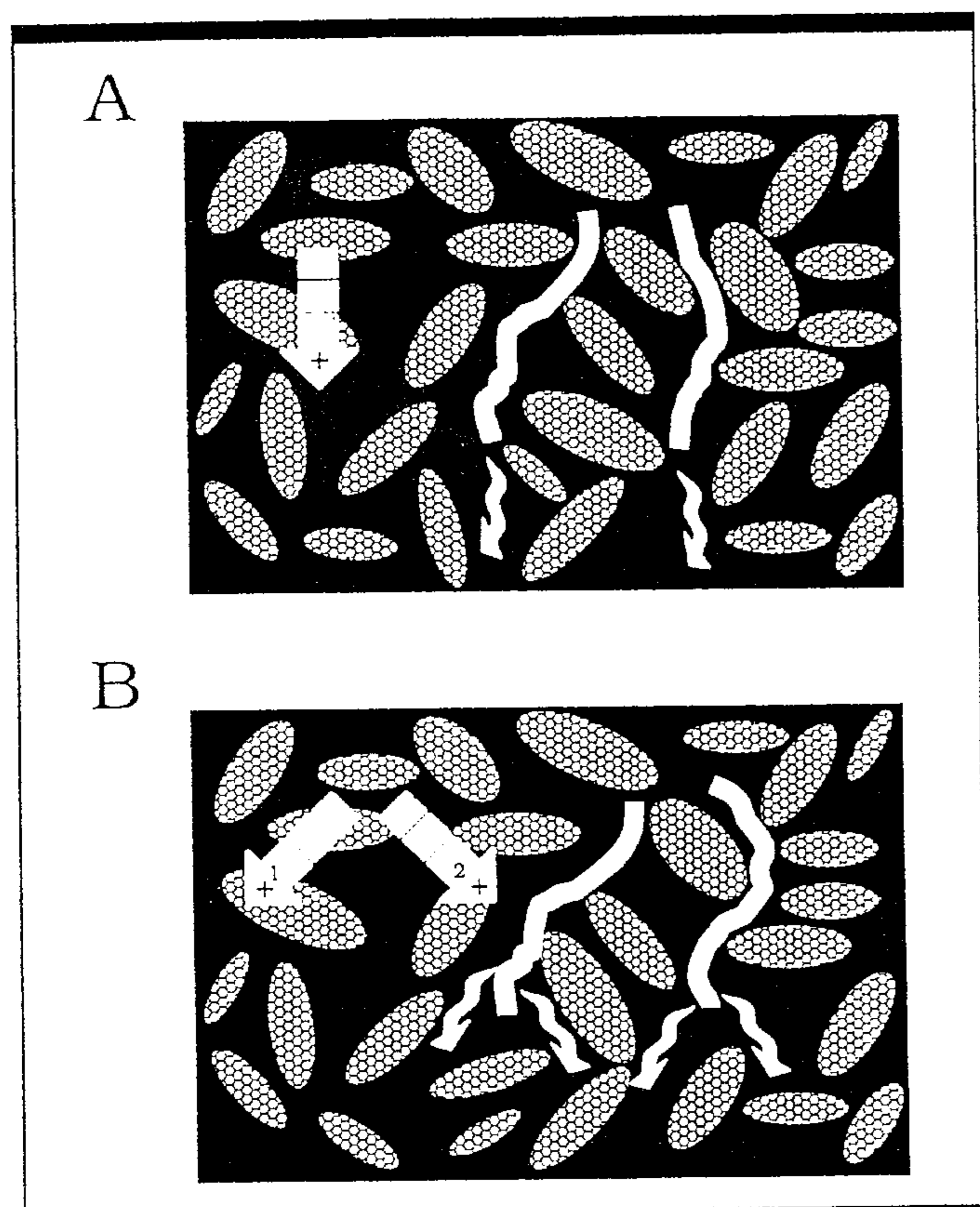


圖四 五組 *Shigella sonnei* 菌株之核糖體基因分型結果。第1列為marker，第2列為第一組，第3列為第二組，第4列為第三組，第5-7列為第四組，第8-12列為第五組。

的菌株區分能力很差，在七組完全沒有流行病學相關性的菌株中，只能區分為兩種不同的圖型，圖四顯示其中五組的結果。

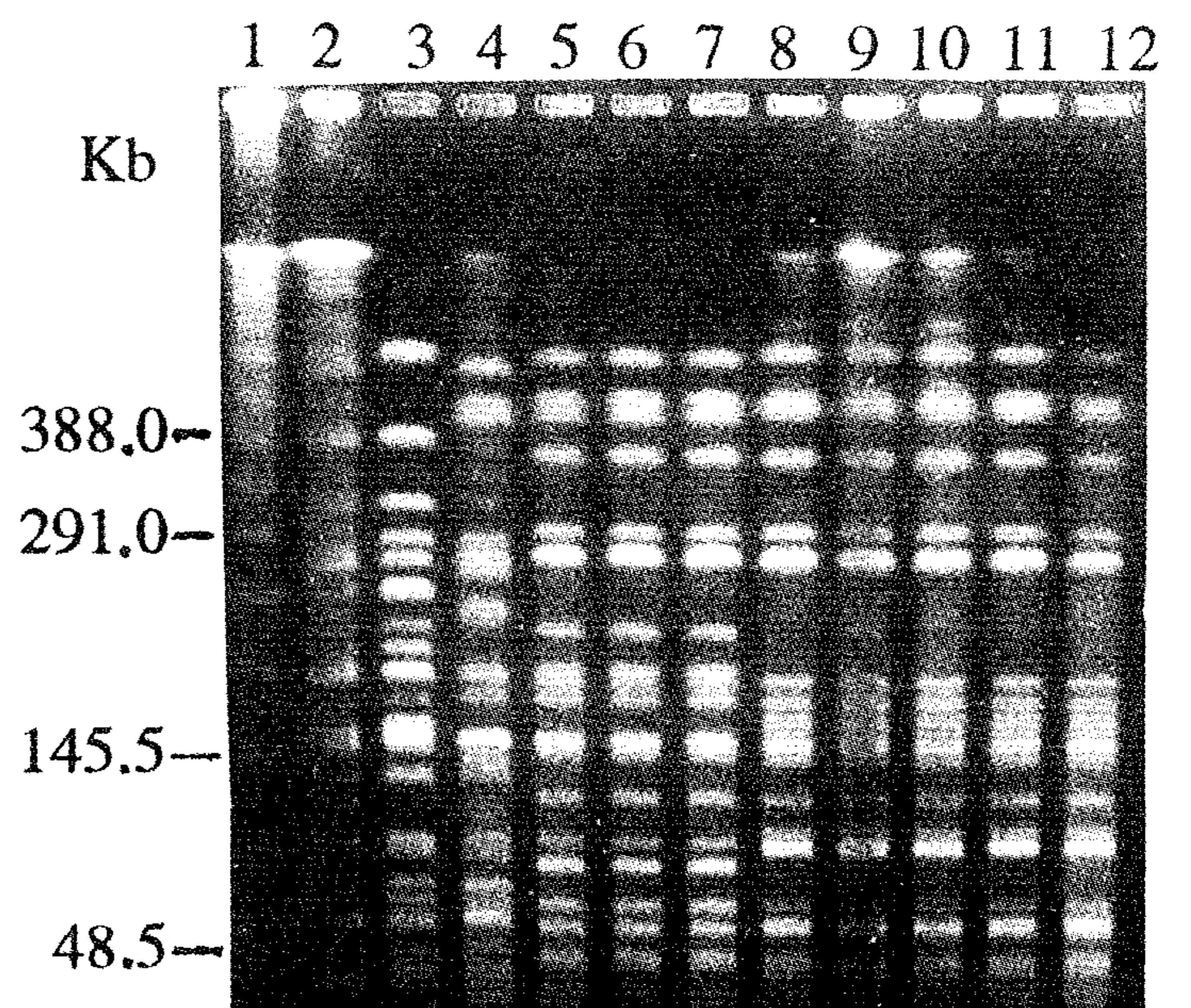
脈衝電場電泳法 (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

由於核糖體基因分型法只是看染色體



圖五 A圖為傳統洋菜膠電泳，大箭頭為電泳方向一直線向下。
B圖為PFGE。電泳方向先按箭頭1，再變成箭頭2方向。

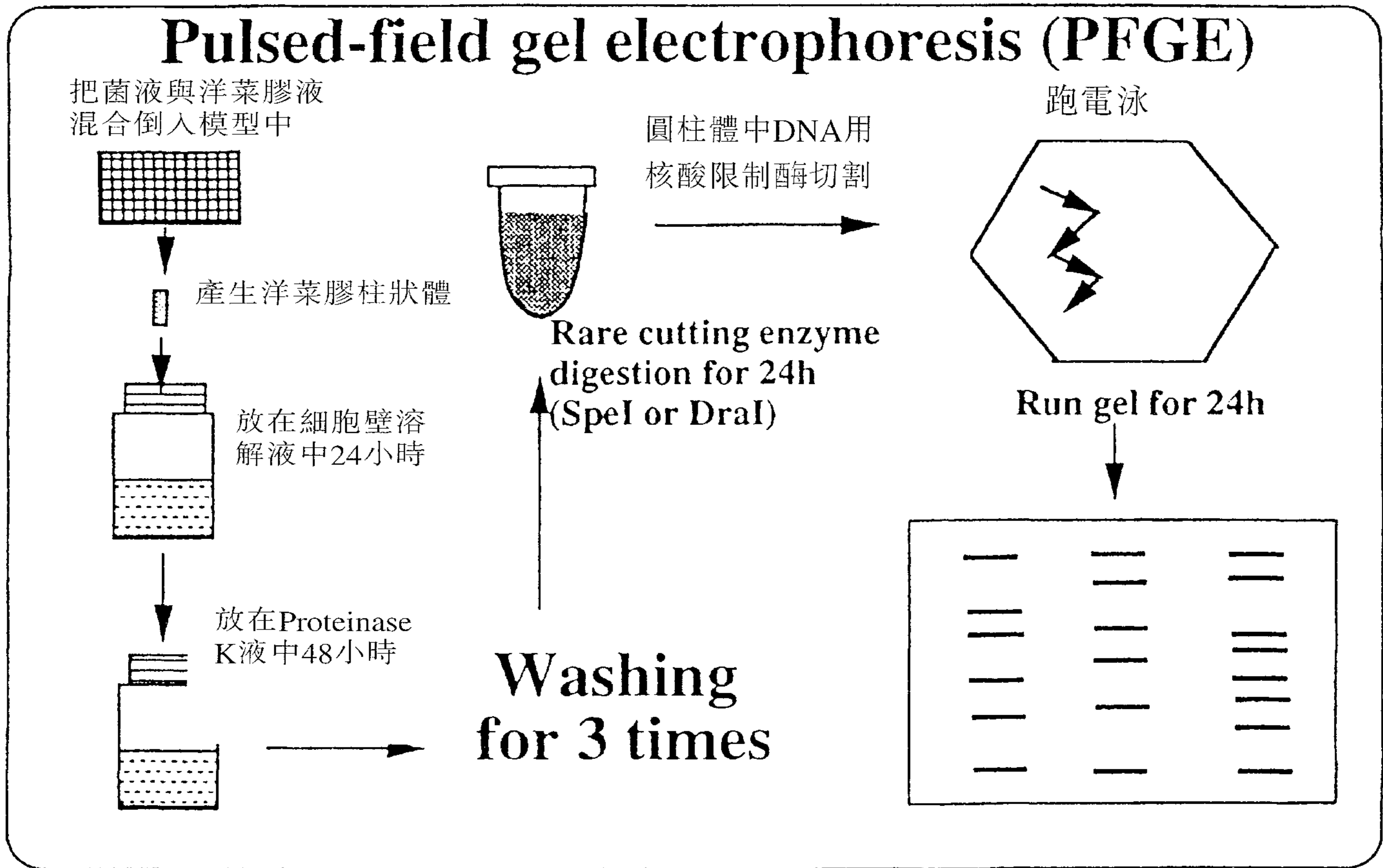
中某幾段基因的差異，所以變異性比較少。脈衝電場電泳法則是看整條染色體基因的變異，所以對菌株的區分能力可能比較強。其實PFGE與前面所提到的REA很像，但REA效果不好，是因為一般的核酸限制酶會把染色體切成100條以上的小片段，所以不易判讀。為了克服以上缺點，PFGE則是利用一類特殊的限制酶，我們稱為rare-cutting enzyme，它們可以把一條染色體切割成少於30條的大片段。但每一片段DNA都在40kb以上，如此一來，一般的洋菜膠電泳法無法把它們分開，因此利用脈衝電場——在每一定時間，把電場中正極方向改變，使DNA分子的電泳方向呈120度來回變換，如此便可把大分子量的DNA片段區分出來(圖五)。



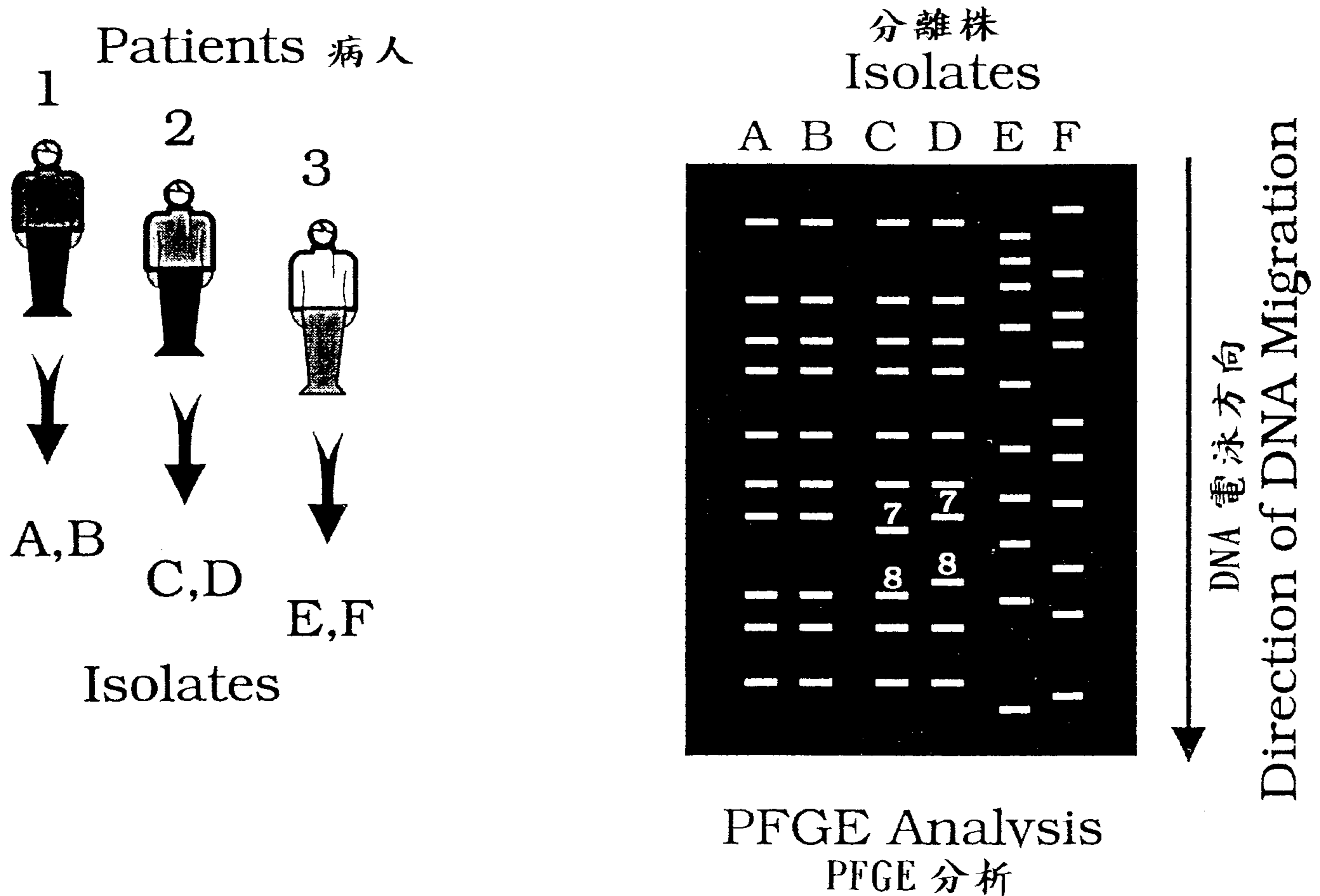
圖七 五組*Shigella sonnei*菌株之PFGE結果。第1列為marker，第2列為第一組，第3列為第二組，第4列為第三組，第5-7列為第四組，第8-12列為第五組。

PFGE與核糖體基因分型法一樣有費時費事的缺點(圖六)，但它的優點是對菌株的區分能力很強，幾乎沒有一種細菌不適用，當然對菌株的區分能力還是與所選擇的核酸限制酶有關。圖七所示即是上文所述的七組*S. sonnei*菌株中的五組PFGE結果，我們用核糖體分型法無法將它們區分，但PFGE卻能清楚的區分出五組不同的圖型。目前，PFGE已被認為是細菌分型的金律(gold standard)。

不過PFGE圖型的判讀我們要相當小心，因為PFGE是看全條染色體，細菌在繁殖過程中，單一基因突變(point-mutation)有時候不能避免。如此一來，相同的菌株，在繁殖中若出現單一基因突變，其PFGE圖型可以發生改變。因此Tenover等認為最少要有三條圖紋(bands)以上的不同，才能認定兩株細菌為不同的菌株(圖



圖六 脈衝電場電泳法之步驟



圖八 PFGE圖型的判讀：從病人1身上所分離出的菌株，A與B，其圖型完全一樣，所以可以確定為同一菌株。從病人2身上分離出之菌株，C與D，其圖型與A，B菌株只有一到兩條圖紋的差異，仍可判定與A，B為同一菌株。惟有從病人3身上所分離出之E，F，其圖型與A-D有超過三條圖紋的差異，故判定為與A-D不同菌株。

八)。也有人用Disc coefficient或El-Adhami公式來計算菌株間PFGE圖型的相關性。

〈例一〉某醫學中心之加護病房發生MRSA群突發，用PFGE確定為同一型，於是對凡照顧其中病人的醫護人員，從他們鼻腔、手部、腋下採檢，結果從七位醫護身上皆分離出MRSA，經過PFGE分型結果，護士甲鼻腔所分離出之MRSA菌株型與引起病人群突發之流行菌株相似，我們是否即可據此認定護士甲為這次群突發的播菌者？

這裡，我們必須要瞭解細菌分型的限制，因為到目前為止，我們還沒有找到一種分型法可百分之一百的把所有沒有流行病學相關性的菌株區分出來。當我們從一位醫護人員身上分離出與群突發相似的流行菌株的時候，我們必須要用流行病學的知識來判斷其中的意義。對護士甲來說，她身上的MRSA與病患身上的MRSA的確有流行病學的相關性，所以很可能為同一流行菌株。話雖如此，我們也不能據此認定護士甲即為這次群突發的罪魁禍首，因她也有可能是受害者——因照顧有流行菌

株的病患而沾染到細菌。但不管怎麼樣，在處理這次群突發時，我們還是請護士甲暫停照顧病患，先用mupirocin藥膏塗抹鼻腔，直到身上的MRSA流行菌株根絕，才回到工作崗位工作。

參考文獻

1. Towner RJ, Cockayne A: Molecular methods for microbial identification and typing. London: Chapman & Hall. 1993.
2. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.
3. Dice LR: Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 1945;26:297-302.
4. Kaufmann ME, Pitt TL: Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. In: Chart H, ed. Methods in Practical Laboratory Bacteriology. Boca Raton: CRC Press. 1994: 83-92.
5. Stull TL, Lipuma JJ, Edlind TD: A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988;157:280-6.
6. Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, et al: Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. J Clin Microbiol 1995;33:1779-83.
7. Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, et al: Use of polymerase chain reaction to study the epidemiology of *Serratia marcescens* isolates in nosocomial infections. J Clin Microbiol 1994;32:1935-8.