

李峻璋 1,3 莊銀清 1,2

奇美醫學中心 1 醫學研究部 2 內科部 3 國立成功大學基礎醫學研究所

前 言

疫情爆發時，若能正確地判斷傳染的模式，就可採取資源花費最少的防治措施，而菌株的分子分型(molecular typing)結果可用於確定傳染的模式。可提供 流行病學上追蹤感染過程與感染源的資料。

感染疾病的群突發經常來自相同的感染源。一般而言，引起大流行的病原體大都來自遺傳結構相同或相近的生物。在流行病學角度而言，因為 來自大流行的生物體都有相同來源，因此生物體間彼此都有相關性。同源生物體是(clonally related organisms)同種的不同個體，分享毒力因子 (virulence factors)、生化特徵 (biochemical traits)和基因體特性(genomic characteristics)。然而，生物體在不同時間、不同來源、分離自不同地理區域，在種 (species)的層次仍存有其差異可分成亞型(subtypes)或基因型 (genotype)，甚至不相同。在流行病監測方面，生物體分型 對於感染疾病大流行 的辨識是相當重要的；例如監測院內病原菌的交叉感染、追蹤傳染來源和辨識具 高度毒力的生物體品系。

分型或基因型鑑定(genotype classification)可以利用許多方法完成。同種的不同個體必須利用分型法來加以分型。對一些表現 型分型法(phenotypic methods)所依據的是與抗體反應或是噬菌體接受器(bacteriophage receptor)的存在。但是這些特有的特徵不一定存在所有的物種。假如一血清型 標記存在，則這血清型(serotype)就可以被鑑定出。例如，約有 10%至 15%的分支桿 菌屬鳥 型分支桿菌(Mycobacterium avium)血清型無適當抗血清可 以分型[1]。相似的情況發生在金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)[2]，金黃色葡萄球菌缺乏噬菌體接受器。無法被分型噬菌體 所感染，所以金黃色葡萄球菌不適合以噬菌體分型。任何分型法皆需有高度的鑑 別能力。它必須能清楚區分出不相關的菌株。如，來自相同源頭但不同地理區和 同時確定分離自遭受相同感染源感染的不同個體的生物體之間的關係。

分子分型法(molecular methods)具有廣泛鑑定基因型 間差異的能力，並且有 很好的再現性(reproducibility)。分型的再現性對於建立已知物種資料庫是 很重要的。若有未知物種需要鑑定，可以分子分型的結果比對已有的分型資料庫做為 鑑定依據。然而，若是多變的表型特徵(如偶而表現的毒力基因或抗原)可能在 再現性上會有問題[3]。近來發展分子分型法主要是以電泳法 分離不同分子量大小的 DNA 片段。電泳的結果是呈現片段分佈模式。因此，這 些片段也許相當複雜，如何可以容易解釋彼此間的相關性，是分型法實用性的 主要考量。在獲得結果上，技術的困難度、花費和時間等 是必須仔細評估此分型法是否適用的考量因素[4]。表現型分型法的缺點促成了以微生物基因型(microbial genotype)為基礎的分子分型法。分子分型法改善了表現型分型法在分型能力與 結果再現性的問題，並有利進一步建立已知生物體的巨大資料庫。其中脈衝式電 泳(pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)這項技術已經成功應用在許多不同 細菌性致病原引起疾病的追蹤[5]，包含 Escherichia coli O157:H7、Neisseria meningitidis、Pseudomonas aeruginosa、Listeria

monocytogenes、Bordetella pertussis、Legionella pneumophila、Vibrio cholerae、Staphylococcus aureus 和 enterococcal isolates。

接下來，介紹脈衝式電泳的原理、檢體製備和所需的裝置與藥品(表一)。期望這些資料可以做為有興趣接觸脈衝式電泳分析的人參考。

脈衝式電泳原理與製備

以整體染色體 DNA 進行分子分型的脈衝式電泳分析，經常被稱為分子分型法的「黃金標準」(gold standard)[4]。對脈衝式電泳而言，分離的菌株培養在液態培養基或是固態培養基皆可，再與低熔點洋菜膠混合後注入小模子 (mold)。製成洋菜膠塊(agarose plugs)中包含完整的細菌。將包埋的細菌置入試管中，以清潔劑和蛋白酉每(proteinase K)分解細菌，再以適合的核酸內切酉每 (restriction endonucleases)辨識切位。許多研究已經確定不同細菌有不同適用的限制酉每[6]。經限制酉每處理的細菌膠塊(bacterial plugs)插入洋菜膠製成的電泳膠中。電泳膠在固定兩極距離且可交換電場方向的電泳槽中進行電泳過程。脈衝式電場可以清楚分離 10 至 800kb 大分子量的 DNA 片段[7]。以螢光染劑(如 ethidium bromide)將電泳膠染色，即可見到電泳的模式。拍照紀錄電泳膠上的結果，並儲存成圖檔。利用商業數位分析軟體(Math、Bio-Rad、BioSystematics、Media Cybernetics、或 Canalytics)分析紀錄圖檔。

PFGE 製備過程

列出標準 PFGE 製備過程(係依據美國 CDC 處理 Escherichia coli O157:H7 步驟進行)以供參考[5]。細菌菌株的培養：分離細菌培養在 37°C 適當的生長培養基隔夜或是更久(例如 Bordetella 和 Legionella)。

檢體的製備：挑取單一菌落培養在 3ml TSB 培養液(standard trypticase soy broth, Becton Dickinson and Co., Cockeysville, Md.)，在 37°C 培養 16-18 小時。次日，以 10,000rpm 離心 3mL TSB 培養液、5 分鐘，棄上清液，再以 SE 緩衝液 (75 mM NaCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0)清洗。將菌液密度調整為 1.40 (O.D.610nm)。以 TE 緩衝液(10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)溶解染色體級洋菜膠 (chromosomal grade agarose, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)至 1.2%，維持在 55°C。以 0.5 mL 細胞懸浮液(cell suspension)和 0.5mL 洋菜膠均勻混合，再將混合液加入填充模型(plug mold, Bio-Rad Laboratories)中，4°C 靜置 10 分鐘使其凝固。等填充物凝固後，取出填充物放進 lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% sarcosine; 1 mg of proteinase K per mL)中，在 55°C 水浴 16-20 小時。移除 lysis buffer。以 5mL 滅菌水(sterile distilled water)浸泡填充物 5 分鐘；在室溫中以 TE 緩衝液浸泡填充物 5 分鐘。以 TE 緩衝液清洗 4 次，每次 30 分鐘。將填充物浸泡在 200 μ L 置於不含限制酵素之反應溶液中 30 分鐘。移除反應溶液。將填充物放在剛混合好的限制酉每反應液(50 U restriction enzyme 和 1x restriction buffer)中，培養在 37°C 16 至 20 小時。完成上述步驟後，將填充物預先浸泡在 0.5xTBE 電泳緩衝液，置室溫備用。

脈衝式電泳：以電泳槽 CHEF-mapper 脈衝式電泳系統跑 1.0%洋菜膠。電泳條件為溫度 14°C、電場角度 120°、變換時間為 2.16 至 54.17 秒、電泳時間 22 小時、電壓 200 V。以 Lambda Ladder PFG marker (BioLabs, New England)當作分子量標記。將電泳膠放在 1L 之 EtBr 溶液(含 100 μ L ethidium bromide, 10 mg/mL)中染色 30 分

鐘。再以 1 公升蒸餾水退染 3 次，每次 30 分鐘。拍照紀錄電泳膠上的結果，並儲存成圖檔。利用數位分析軟體分析紀錄圖檔。並進行 PFGE 模式分析。

PFGE 模式分析：Tenover et al. 1995 提出適用在 30 個檢體以下來辨識脈衝式電泳呈現 DNA 片段模式的準則，用以解釋菌株間相關性。這些準則不需用到統計與數字化，使脈衝式電泳分析更方便適用於分型。根據 Tenover 準則(表二)，(1)菌株間獲得相同脈衝式電泳模式，可能是源自同一基因型的菌株。(2)細菌發生單一但可能不同的遺傳事件，而反應出二至三個片段的差異，菌株間有高度的相關性。(3)細菌發生二個獨立的遺傳事件，而反應出四至六個片段的差異，菌株間可能有相關性。(4)細菌發生三個或是更多獨立的遺傳事件，而反應出大於或是等於七個片段的差異，菌株間的基因型相異。這個準則適用於小規模且區域性的研究。這些準則並提供醫院臨床微生物學家快速判定預測可能爆發流行的疾病是否真的發生。

結 論

脈衝式電泳可以提供由 restriction enzyme analysis、phage typing、ribotyping、plasmid analysis 和 randomly amplified polymorphic DNA analysis 無法呈現的檢體間差異。且脈衝式電泳在不同實驗室間呈現的高度準確性與再現性，使脈衝式電泳分析已經成為公共衛生機構標準的檢驗方法。若能進一步建構所有生物體之 PFGE 模式資料庫[4]。藉由電腦數位化圖檔紀錄 PFGE 模式，建構所有生物體之 PFGE 模式資料庫。未來，只要獲得新的基因型的 PFGE 模式，比較資料庫已有的生物體紀錄。就可以得到新基因型與其他基因型間親緣關係(phylogenetic relationship)與相似度。這個特性可以應用在檢驗食物上是否帶有傳染性的生物，藉由快速分型與比對來完成。

然而，目前脈衝式電泳分析因為基因體 DNA 純化步驟繁瑣、限制酶每作用時間長、電泳時間長等因素。使得脈衝式電泳在流行病爆發期間緩不濟急。因此，若能改善脈衝式電泳耗時的製備過程，將可以提升脈衝式電泳在流行病監測的利用價值。例如快速檢測食品是否因受 *E. coli* O157:H7 或 *Salmonella* spp. 的污染，而造成流行性疾病爆發[5]。

對於脈衝式電泳分析不理想的地方。在樣品的製備與電泳操作過程約需要三至五天的時間。這項限制降低實驗室使用這項技術的意願[4]。有許多研究人員針對這個限制提出不同的解決方法，其中 Gautom 1997 發表的文獻中則提出快速脈衝式電泳分析法(rapid PFGE analysis)。適用在一天完成細菌檢體的製備與分析。並且證明分析結果的準確性(accuracy)和再現性(reproducibility)，與傳統多日製備與分析過程的結果相同。這個快速程序縮短下列幾個步驟，而節省許多時間。(1)直接利用臨床檢體生長在培養膠(culture plates)上的細菌體；(2)加速細胞裂解和蛋白酶每作用的時間；(3)利用預熱的水和 TE 緩衝液來縮短洗滌的時間；(4)使用允許快速電泳的 SeaKem Gold 電泳膠(SeaKem Gold agarose)。

脈衝式電泳在台灣流行病學的應用。以南投縣竹山鎮桿菌性痢疾流行事件為例[8]。此次對痢疾桿菌(*Shigella sonnei*)病原菌所進行的藥物敏感性試驗、質體圖譜與脈衝式電泳圖譜分型分析，證明傳染的模式為同一菌株所引發的接觸傳染，同時也追蹤到菌株來源可能與 5 個月前出現在另一地區的一個病例的菌株同源。在菌株分型效力上，因 *S. sonnei* 只有一種血清型，加上菌株常有地域化的現象，例如南投縣仁愛鄉流行菌株是 *S. flexneri* 2a，故傳統血清學的分型方法對痢疾桿菌的分型工作並無用處。此外，藥物敏感性試驗與

質體圖譜分析的分型效果也有其限制，無法單獨做為分型的方法。痢疾桿菌的分型方法，目前仍以脈衝式電泳法最具分型效力。

表一 以 Bio-Rad Pulsed Field Gel Electrophoresis 系統為例，列舉脈衝式電泳所需的藥品與裝置。(CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System Instruction Manual and Application Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc.)

Bio-Rad 脈衝式電泳系統內附配件	Bio-Rad 脈衝式電泳系統所需相關器材	Bio-Rad 脈衝式電泳系統所需相關藥品
脈衝式電泳主機 CHEF-DRII、DRIII、Mapper	搭配 UV 光之影像系統	50 × TAE 或 10 × TBE
電泳槽 electrophoresis cell	50 well disposable sample plug mold	脈衝式電泳專屬洋菜膠 pulsed field certified agarose
變速幫浦 variable speed pump	10 well reusable sample plug mold	CHEF DNA size marker
冷凝器 cooling module		EtBr 或其它染色劑
鑄膠台 casting stand		
齒模 comb		
連接管路 tygon tubing		
訊號及電源連接線		

表二 解釋脈衝式電泳模式的準則

類型	與群突發菌株相比較 之遺傳差異數目	與群突發菌株相比較 之片段差異數目	流行病學上的意義
難以辨別的	0	0	群突發
高度相關	1	2-3	很有可能是 (probably) 群突發
可能相關	2	4-6	可能是 (possible) 群突發
不同	≥ 3	≥ 7	排除群突發

參考文獻

1. Tsang AY, Denner JC, Brennen PJ, et al: Clinical and epidemiological importance of typing *Mycobacterium avium* complex isolates. *J Clin Microbiol* 1992;30:479-84.
2. Schlichting C, Branger C, Fournier JM: Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *J Clin Microbiol* 1993;31:227-32.
3. Arbeit RD: Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1995;190-208.
4. Olive DM, Bean P: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1661-9.
5. Gautam RK: Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997;35:2977-80.
6. 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.
7. Farber JM: An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J Food Prot* 1996;59:1091-101.
8. 邱乾順，江大雄，賴辛癸等：南投縣竹山鎮桿菌性痢疾流行事件。疫情報導 1999;15:291-301。