

利用分子生物學方法作細菌分型（IV）

廖旭方

沙鹿童綜合醫院院內感染管制委員會

聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）分型

PCR發展到今天剛過十年，在這十年中，PCR的使用很廣，除了我們一般所想到的可以作為細菌診斷的工具以外，PCR也可以用作細菌分型，有關PCR的原理與方法，在本專欄的第七章已經介紹過。不過細菌分型所用的PCR方法，一般是用低嚴謹性（low stringency）的條件（例如把引子與模板DNA結合的溫度降低，增加鎂離子的濃度等），如此一來PCR產物的特異性便會降低，所增殖出的圖紋（bands）才會豐富。圖紋愈多愈易看出菌株間的變異性。這一點剛好是與作細菌診斷用的PCR相反，一般PCR我們希望其產物特異性愈高愈好，所以使用高嚴謹性（high stringency）的條件，因為我們不希望有任何的假陽性。細菌分型用的PCR另一與一般PCR不一樣的地方，就是有時候只用一條引子（primer），而不是成對引子（圖一）。利用PCR作細菌分型，常用的有三種不同的方法：

（一）增殖特異DNA序列之PCR方法：

就是利用一對特異性高的引子來

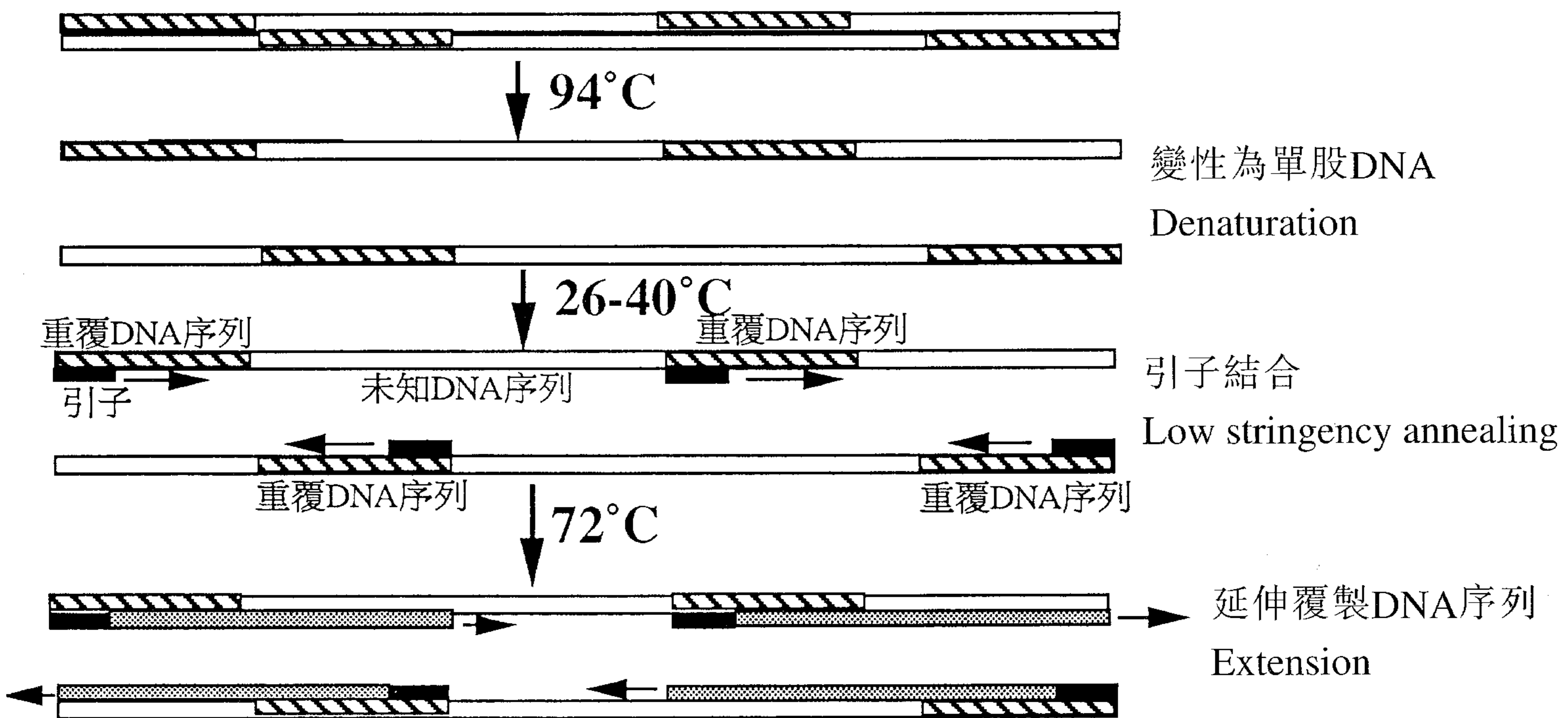
增生一段特異的DNA序列，例如增殖產生尿素分解酶（urease）的DNA序列來作*Helicobacter pylori*菌株的分型，或增殖產生核糖體的DNA序列作為*Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*的分型等，後者我們又稱為PCR核糖體基因分型（PCR ribotyping）。這一類PCR分型法，因所選擇的是特異性比較高的引子，並且用high stringency的條件，所以增殖出來的圖紋很少，若要增加這種方法對菌株的區分能力，我們可以把增殖後的產物用核酸限制酶切割後再跑電泳。這種PCR方法的優點是增殖的產物非常穩定，不易受PCR條件輕度改變所影響，所以再顯性很高，圖二(B)所顯示即為利用PCR核糖體基因分型法對三株不同的*B. cepacia*，在三天所作出來的結果的比較，我們可以發現不同時間所作出來的結果，圖型沒有甚麼變異，甚至很淡的圖紋也一致。不過這一種PCR方法的最大缺點就是對沒有流行病學相關性的菌株，區分能力較差。

（二）增殖重覆性DNA序列的PCR方法（rep-

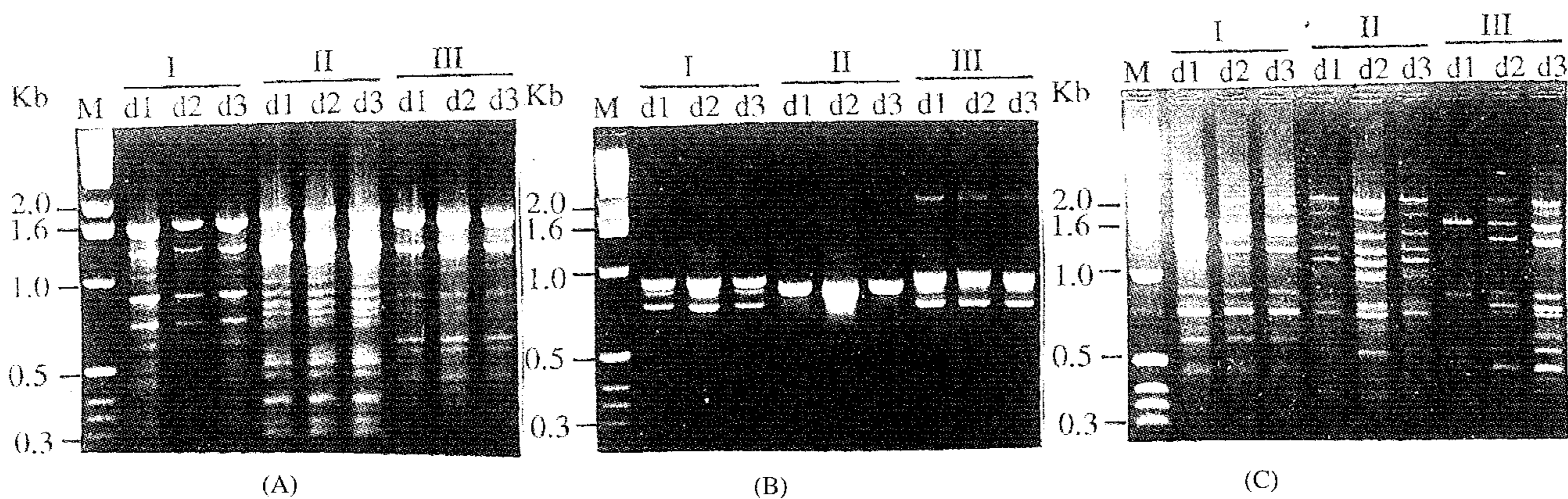
PCR)：

另一種PCR分型法，是增殖細菌染色體中重覆出現的序列。原來在細菌中，特別是*Enterobacteriaceae*，有些序列會在染色體中重覆出現（圖一），這一段序列不只在同種細菌中很像，甚至不同種細菌間也很像，所以可以根據這一段序列合成與它互補的引子。假如我們在low stringency的條件下，這一引子便能應用於所有含有

重覆DNA序列（或相近重覆DNA序列）的細菌。當引子與重覆DNA序列結合後，便能把兩段重覆序列間的未知DNA序列增殖，這一段未知DNA序列在不同菌株間的長短不一，因而產生不同的PCR產物，如此我們便能把不同的菌株區分出來。這種rep-PCR所使用的引子包括REP（repetitive extragenic palindromic）引子、ERIC（enterobacterial repetitive intergenic



圖一 rep-PCR 分型法之原理



圖二 利用ERIC重覆序列引子(A)，核糖體序列引子(B)及任意序列引子(C)作PCR對*B. cepacia* 菌株 I、II、III 在三天 (d1、d2、d3) 之分型結果。M為marker

consensus) 引子及M13引子等。這一種方法的優點是對菌株的區分能力較第一種PCR方法高，不過PCR產物的穩定度較差(圖二A)，所以其再顯性的好壞，決定於每次所作PCR條件是否一致，但基本上輕度的PCR條件改變，對其結果影響有限，可能只有較淡的圖紋有變異，所以在我們判讀PCR圖型時，太淡圖紋的變異不能作為菌株區分的依據，除非重覆實驗都得到相同結果。這一種PCR的另一方面缺點是對革蘭氏陰性菌的區分能力都不錯，但對革蘭氏陽性菌卻不一定，例如對葡萄球菌的區分能力並不理想。事實上，到目前為止，葡萄球菌還沒有找到一種很好的PCR分型方法。

(三) 利用任意序列作引子的PCR方法：

這一種方法我們稱為隨機增殖PCR (randomly amplified polymorphic DNA analysis, RAPD) 或任意引子PCR (arbitrarily primed PCR, AP-PCR)。這種方法的原理是我們任意選擇一段通常為十個base pairs以下的序列作為引子。因為是隨機，所以我們不需要知道所要增殖的DNA的序列。然後使用low stringency的條件，使這一引子可隨機與染色體中有部份互補(matching)的序列結合增殖。所產生的圖型，和菌株中所含染色體DNA序列與所用引子的互補程度有關。所以只要菌株間有少許變異即可產生圖型明顯改變，這一種方法對菌株的區分能力很強。並且因為不需要菌株DNA

擁有任何特異DNA序列，所以可以應用於所有細菌中。不過，因為每一種細菌的染色體DNA序列不同，其所能產生最好效果的任意引子也不同，我們無法像核糖體基因PCR或rep-PCR一樣，用相同的引子對不同種類的細菌分型。另外，任意引子PCR雖然對菌株的區分能力很強，但其產物也較不穩定，再顯性較差，PCR條件輕度改變，皆可影響它的結果(圖二(C))。所以在作任意引子PCR分型時，我們必須把每一種PCR條件都標準化，最好能在同一片洋菜膠上比較其圖型。

利用PCR作細菌分型是目前細菌分型的趨勢，原因是方法簡單，並且省時省力。其對菌株的區分能力，當然與所選擇的引子有關，但很多研究皆顯示其對大部份革蘭氏陰性菌的菌株區分能力與PFGE相當，因而可取代PFGE來使用於一般臨床實驗室中。PCR分型的惟一缺點是其再顯性較PFGE差，不過，若所有PCR條件都能標準化，其結果還是相當理想。PCR分型已被廣泛應用於革蘭氏陰性菌中；但對革蘭氏陽性菌，特別是MRSA，其對菌株的區分能力還待進一步評估。

結 論

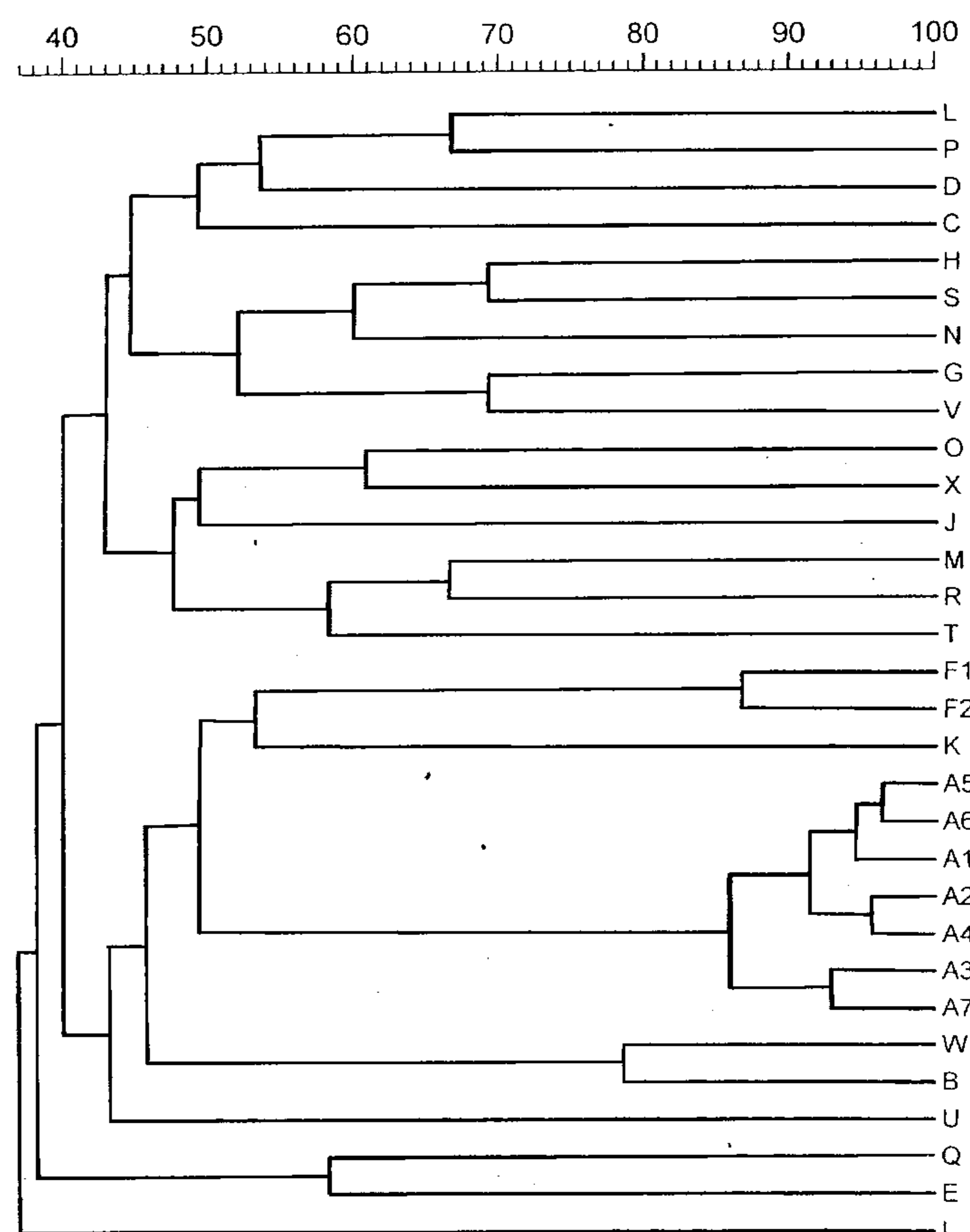
有關分子生物學與細菌分型的專欄已經進入尾聲，我們希望藉著本專欄，拋磚引玉，讓從事院內感染的同仁們認識基本的分子生物學與細菌分型，並知道如何利

用這些工具作流行病學，特別是群突發的調查。

在本專欄中，我們介紹了很多種不同的細菌分型工具，有時候我們會嘗試從各種不同細菌分型方法中，找出一種「萬能」的分型工具，這樣便可應用於所有不同細菌的群突發中。很可惜，到今天我們還找不到這樣一種工具，只是某些細菌分型法如PFGE、PCR等是較接近理想而已。事實上，現在還有很多新的細菌分型法在發展，如ARFP (amplified restriction fragment polymorphism)，是利用帶有螢光標誌的引子，作PCR，再用限制酶切割後跑電泳，其切出來的圖紋很多，但卻可以利用螢光偵測儀來分析。不過，這種螢光偵測儀卻是非常昂貴。

在我們認識各種細菌分型法後，我們常常有一些疑問，在追尋群突發時，我們一定需要細菌分型的幫助嗎？細菌分型會否增加院內感染控制的成本？我們醫院需要設立細菌分型嗎？有關第一個問題，我們在前言中已有詳細的說明。目前院內感染群突發調查的趨勢，是希望能利用細菌分型法來作群突發的確認，並可幫助追蹤感染源。為了我們院內感染工作能與國外並駕齊驅，細菌分型是應該要推動的。問題是醫療成本，並不容許每個醫院個別作細菌分型，所以最好是能像國外一樣，在不同的地區中選一兩所醫院，設立細菌分型中心，訂定收費標準，提供地區中各醫院細菌分型的服務。其實細菌分型，特別是利用PCR方法，並沒有想像中的昂貴。當有大量標本同時進行細菌分型時，更可以把成本壓低。所以細菌分型雖會稍微增加

院內感染控制的成本，卻可提供很多細菌流行病學的資訊，是值得推廣的。現在我們更可以利用細菌分型來劃出所謂dendrogram (圖三)，這更能幫助我們對各種細菌在醫院散播途徑的瞭解，並能幫助我們找出流行菌株 (epidemic strain)。我們知道流行菌株的散播是造成醫院中某種細菌固有感染 (endemic infection) 的主要原因之一，所以對流行菌株的瞭解，也許能幫助我們降低醫院中某些細菌的固有感染率。例如在英國，他們就是發現造成他們醫院MRSA 固有感染的菌株是EMRSA (epidemic methicillin-resistant *staphylococcus aureus*)，所以他們的隔離措施主要是針對寄生有EMRSA的病人。如此一來，既可節省醫療成本，又能把MRSA的固有感染



圖三 在某教學醫院加護病房流行之 *Enterobacter cloacae* 菌株分佈之 dendrogram。A1~A7型的相似度為85%以上，所以可能為同一流行菌株突變而來。

率維持在10%左右。

致 謝

本專欄要謝謝王志堅醫師的幫忙，撰寫分子生物學最重要的部份。也要謝謝台中榮總感染科劉美芳、李素芬、吳婉玲等醫檢師及施智源醫師過去在細菌分型的工作，及黃玉梅、任新菊、劉美容等護理師在院內感染群突發的調查，並台中榮總感染科其他同仁，幫忙保留菌種，大家發揮團隊精神，使台中榮總感染科在過去三年來，得以發表多篇有關細菌分型的研究，以到今天我們可以把過去的心得，寫成本專欄與大家分享。

參考文獻

1. Towner KJ, Cockayne A: Nucleic acid amplification and Sequencing techniques. In: Towner KJ, Cockayne A, eds. Molecular Methods for Microbial Identification and Typing. London: Chapman & Hall. 1993; 93-122.
2. Welsh J, McClelland M: Characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, eds. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications. Washington DC: American Society for Microbiology. 1993; 590-604.
3. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nu Acid Res 1991; 19: 6823-31.
4. Kostman JR, Edlind TD, Lipuma JI, et al: Molecular epidemiology of *Pseudomonas Cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. J Clin Microbiol 1992; 30: 2084-7.
5. Liu PYF, Shi ZY, Lau YJ, et al: Comparison of different PCR approaches for the characterization of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates. J Clin Microbiol 1995; 33: 3304-7.
6. Lin JJ, Kuo J, Ma J: A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. Nu Acid Res 1996; 18: 3649-50.
7. Shi ZY, Liu PYF, Lau YJ, et al: Epidemiological typing of isolates from an outbreak of infection with multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* by repetitive extragenic palindromic unit b1-primed PCR and PFGE. J Clin Microbiol 1996; 34: 2784-90.