

傳統細菌分型法

廖旭方

台中榮民總醫院院內感染管制委員會

從本期開始，我們將會給大家介紹各種細菌分型方法，和我們如何實際利用這些細菌分型法在院內感染上。首先我們要與大家介紹的是傳統的細菌分型法。所有的傳統細菌分型法都有一個共同點，就是利用細菌外在表現的特徵作為分型的工具，故稱為外顯型（phenotype），這些外顯型可以受各種外在環境與細菌培養的條件所影響，故此法有時候並不太穩定。話雖如此，但傳統的分型法在細菌分型中，還是有其一定用處。第一，大部份傳統的細菌分型法為確定式分型法（definitive typing）：可確定把細菌分成第一型、第二型、第三型等。而這些分型已有國際標準，所以可在不同實驗室中互相比較；相反的，新的分型法，特別是基因分型法，通常祇是比較式分型法（comparative typing），各種型之編號並無一致標準，故只能在同一實驗室中，作為菌株來源比較的工具。確定式分型法除了可應用於流行病學群突發的調查外，也可作為細菌的毒性與致病性研究的工具。例如引起出血性腸炎的大腸桿菌（enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC）為血清型O 157:H7的大腸桿菌，另外引起嚴重菌血症的A群鏈球菌則多為表面蛋白M1型，對penicillin有抗藥性的肺炎雙球菌則多為莢膜第6、19、23

及14型等。常用的傳統細菌分型法除了ICN常用的抗藥性分型法（resistotyping）外，還包括血清分型法（serotyping）、噬菌體分型法（phage typing）、殺菌素分型法（biocin typing）、生化反應分型法（biotyping）等。

一、細菌抗藥性分型法 （Resisto typing）

以細菌的抗藥性分型，正如在簡介中所述，是最簡單的細菌分型法，可作為ICN每天在翻查細菌學報告中，用以作細菌來源區分的工具，一般我們認為只要細菌對不同抗生素的抗藥性有三種以上相異，我們便可認定為不同菌株，若其抗藥性完全相同，則很可能為同一菌株。這種分型法的最大缺點，就是細菌抗藥性的不穩定：病人所使用的抗生素，可在病人體內促進細菌的突變，而產生不同的抗藥性。另外細菌培養的條件不同，也可影響細菌抗藥性表現方式，例如，金黃色葡萄球菌最好在含有2~4%的NaCl的培養基中培養，否則某些能產生大量 β -lactamase的葡萄球菌會呈現為對oxacillin有抗藥性，因而被誤判為MRSA等。最後細菌的抗藥性，也可因人為判讀因素而有所出入。另外，某些細菌，特別是有多重抗藥性的細

菌，例如*Enterobacter cloacae*常常對所有抗生素都有抗藥性，而只對imipenem與amikacin有效，MRSA也有類似情形，對所有抗生素都有抗藥性，只對vancomycin敏感，這樣，要區分不同菌株便有困難。總之，以細菌抗藥性分型並不準確，但因為這方法很簡單，可作為細菌菌株區分的初步依據。

二、生化反應分型法 (Biotyping)

細菌生長需要營養，因此我們可以利用細菌在各種不同的營養基中所產生的生化反應，作為細菌鑑別的依據。某些生化反應的不同，也可用以區分不同的菌株。例如我們可以透過*Haemophilus influenzae*利用indole、urea及ornithine等所產生的不同生化反應而把它們分成七組生化反應型 (biotypes)。淋病雙球菌也可以其利用arginine、hypoxanthine與uracil等15種生長因素 (growth factor) 所產生的不同反應來分型。至於其它革蘭氏陰性菌，特別是*Enterobacteriaceae*，也有報告利用生化反應來分型。當然，所使用的不同營養基愈多，其敏感度愈高。目前，有API 50 CH (API-BioMerieux, La Balme les grottes, France) 系統，認為是很好的生化反應分型工具。不過，生化反應分型法有與抗藥性分型法同樣的缺點，就是不穩定，細菌對使用不同培養基後所產生的生化反應，常受培養條件所影響。

三、血清分型法 (Serotyping)

血清分型法可以說是其中一種最古老的分型法，到目前為止，對某些細菌來

說，還是一種很好的分型工具，例如肺炎雙球菌、*Klebsiella pneumoniae*及綠膿桿菌等。血清分型法的原理主要是抗原與抗體反應。在本專欄第二章中，我們曾與大家介紹在細菌身體表面上，有很多結構可以用作血清分型法中的抗原，例如莢膜、脂多糖中的O抗原與鞭毛等。我們把不同型的抗原打在動物如白兔身上，二至四週後，其血清中便會出現針對此型抗原的抗體。如此我們便可利用這些針對不同型抗原的抗體，作細菌血清分型。這種細菌分型法的最大優點是簡單、快速，並且相當穩定，反應的再顯性佳。但是利用動物身上直接分離出抗體，有時候不夠純，所以可能會產生多重凝集反應 (poly-agglutination) 或自體凝集反應 (auto-agglutination)。所以有人建議使用單株抗體作試劑，這樣可減少上述非特異反應發生的機會，問題是單株抗體製造的成本相當昂貴，一組綠膿桿菌分型用單株抗體試劑 (約可作60個標本)，價值約為新台幣十二萬元。

血清分型法還有兩個缺點，一為血清型有時候分佈不均，二為有部份菌株可能無法用血清分型法分型，比方有些菌株，我們稱為rough strain，缺乏O抗原，因此我們不能利用O抗原對其作血清分型。表一所列的是我們利用血清分型法對台中榮民總醫院所分離出的綠膿桿菌作O抗原血清分型。我們發現有40%的綠膿桿菌分離株為第十一型，另外19%為第六型。此一發現與英、美大致相同，另外我們又發現有12%的綠膿桿菌分離株無法用O抗原分型。血清型的分佈不均，常常造成我們對

菌株區分的困難。

〈例一〉：某ICN發現同一病房中出現三個綠膿桿菌引起的泌尿道感染個案，其抗藥性完全相同，於是馬上請細菌室保留菌種，並作血清分型，結果發現此三株綠膿桿菌皆為O11型，我們是否可依據上述結果判定此一事件為群突發？上述三位病人的感染是否皆有流行病學的相關性？

不能。因為O11型本來就是在綠膿桿菌菌株中分佈最多的一型，正如我們不能推論說在同一個房間開會的人仕中，凡姓陳的都有血緣關係一樣，因為姓陳的人本來就很多。因此，我們利用PCR及PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) 方法對上述三株綠膿桿菌進一步分型，結果發現有二株綠膿桿菌為同一型，另外一株則為不同型。此一結果不僅告訴我們血清分型法的缺點：血清型的分佈不均，並且告訴我們沒有一種分型法能百分之百把所有個別菌株區分，有時需借助其他分型法才能確實把菌株區分出來。

四、噬菌體分型法 (Phage typing)

細菌極易受到更小生物，即所謂噬菌體的侵染。噬菌體其實是一種病毒顆粒，它們僅能生長在細菌細胞體內。當它在細菌體內繁殖至一定程度後，可使受感染的細菌細胞破裂並溶解，因而可使在瓊脂膠 (agar) 上培養的一層細菌形成透明的小斑點，我們稱為空斑 (plaque) (圖一)。不同的噬菌體可感染不同型的菌株而在培養基上產生不同程度的溶解，因而我們可用一組標準的噬菌體組合，把不同的菌株區分出來。噬菌體分型法的優點是很敏感，

當某些細菌的菌株不能用一般分型法區分時，噬菌體分型法有時候卻可以分出來。但噬菌體不易保存，其分型法的操作步驟也很繁複，非一般實驗室所能操作，最大缺點是再顯性不佳，故有所謂Rule of Three，即需噬菌體的反應有三個以上的差異，才能認定為不同的菌株。目前噬菌體分型法仍被應用於綠膿桿菌與金黃色葡萄球菌的分型，主要以研究為目的，不適合於一般臨床使用。

五、殺菌素分型法 (Biocin typing)

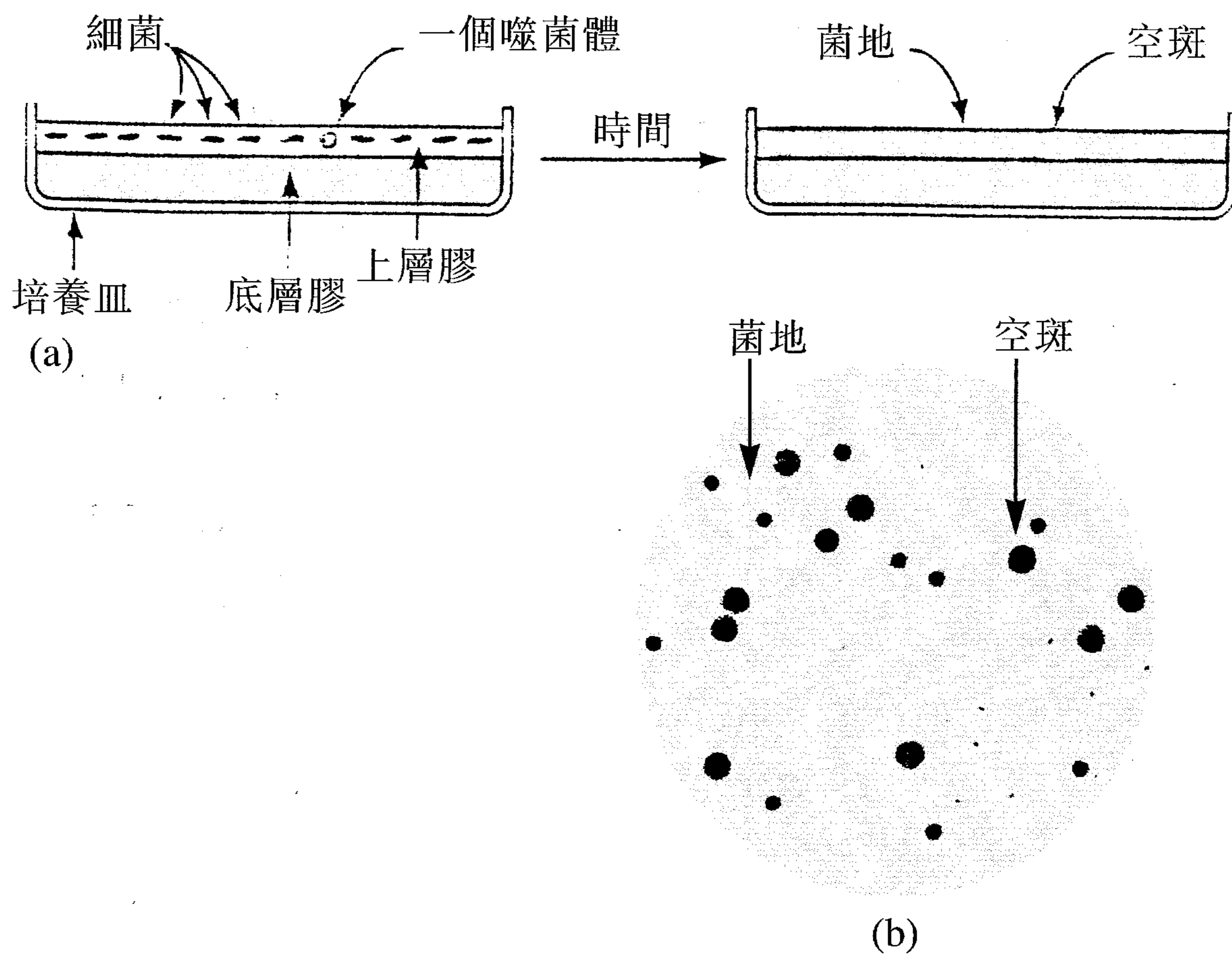
殺菌素或抑菌素其實就是抗生素的一種，通常為蛋白質，由某一菌株分泌，可抑制同種但不同株的細菌生長，這是細菌本身的保護機轉，藉著抑制其它菌株的生長，可爭取更多營養份供自己生長。幾乎所有細菌都會產生抑菌素，但作為細菌分型的工具，應用最廣的則是綠膿桿菌。我們可以利用未知菌株 (unknown strain) 能否產生抑菌素以抑制各種不同的指示菌株 (indicator strain) 的生長來作為未知菌株的分型，也可以利用各種指示菌株能否產生抑菌素來抑制未知菌株的生長來作為未知菌株的分型。一般抑菌素分型法以前者使用最多。

綠膿桿菌所產生的抑菌素，我們稱為pyocin，故綠膿桿菌的抑菌素分型法又稱為pyocin typing。目前我們所使用的指示菌株共有八株 (E1-E8)，另有五株 (A-E) 可供次分型 (subtyping) 之用。我們先把測試的未知菌株用多重接種器 (multipoint inoculator) 接種在瓊脂膠培養皿上，培養六個小時，待這些未知菌株都產生一定數

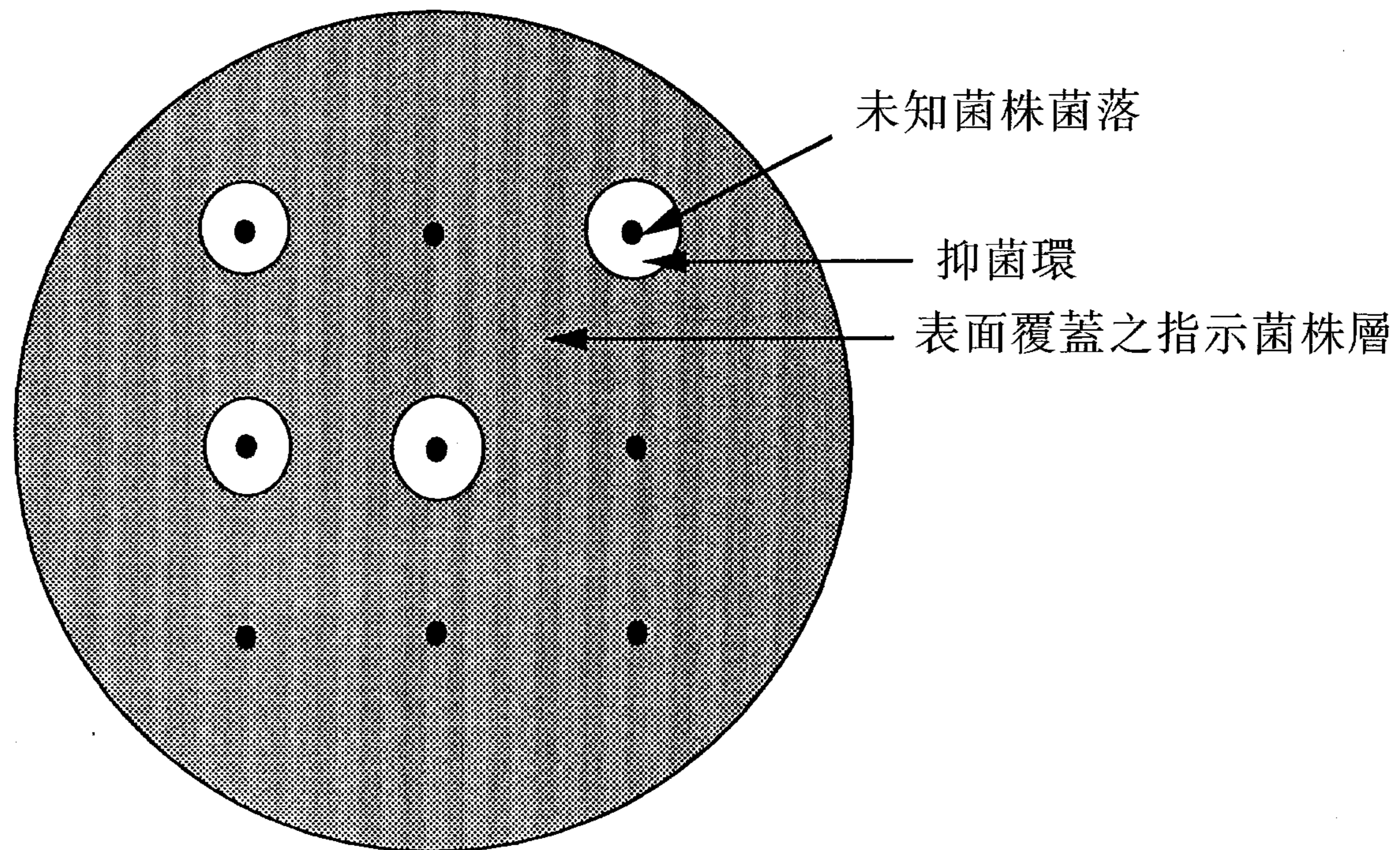
表一 台中榮總350株綠膿桿菌之O血清型分佈

型	%	型	%
1	5	10	2
2	1	11	40
3	3	12	5
4	5	13	0.3
5	1	14	0
6	19	15	9
7	2	16	0
8	2	17	0
9	0	NT	12

NT：不能分型菌株



圖一 細菌空斑形成圖解



圖二 殺菌素分型法

量的pyocin後，我們再使用氯仿把這些未知菌株悶死，然後我們把含指示菌株的軟瓊脂倒在這些已死的未知菌株菌落之上，繼續培養至第二天，我們可以觀察到凡能產生pyocin來抑制這一型指示菌株的未知菌株，其菌落周圍會形成一抑制環（圖二）。利用上述八種（E1-E8）不同的指示菌株，我們便有一百零五種不同組合，可把綠膿桿菌分成105型。另五株（A-E）指示菌株，可以幫助我們再把每一型分成26亞型（subtypes）。殺菌素分型法與噬菌體分型法有相同的優點與缺點，但較噬菌體分型法優良的，則是其操作方法較為簡單，指示菌株也較易保存。

根據以上討論，我們可以知道沒有一種傳統分型法可以提供細菌最理想的分型工具。不同的細菌適用的分型法也不一樣，有時候甚至需要好幾種分型法同時使用才能達到最好的效果。下一章中，我們

將會討論如何應用分子生物學的方法來作細菌分型。

參考文獻

1. Tower KJ, Cockayne A: Molecular method for microbial identification and typing. London: Chapman & Hall. 1993.
2. Fyfe JAM, Harris G, Govan JRW: Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1984; 20: 47-50.
3. Pitt TL: Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988; 7: 238-47.
4. Aber RC, Mackel DC: Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. Am J Med 1981; 70: 899-905.
5. Poh CL, Yeo CC: Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect 1993; 24: 175-81.
6. Lindberg RB, Latta RL: Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*: clinical and epidemiologic considerations. J Infect Dis 1974; 130 (suppl) S33-S42.
7. Lau YJ, Liu PYF, Hu BS, et al: DNA fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis. J Hosp Infect 1995; 30: 61-6.