

計畫編號：DOH92-DC-2030

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

計畫名稱：血液中微量起炎菌的迅速檢出及鑑定方法之建立

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：周振英

研究人員：李智隆、姚淑滿、陳英彥、鄭麗容、江美嫻

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

目 錄

	頁 碼
封面	1
目錄	2
壹、摘要	
中文摘要	3-4
英文摘要	5-7
貳、本文	
(一)、前言	8-9
(二)、材料與方法	10-12
(三)、結 果	13
(四)、討 論	14-15
(五)、結論與建議	16
(六)、參考文獻	17
參、圖表	18-23
附件	

摘要：

中文摘要

發熱是感染症的主要症狀，但是在發病的早期卻無法找出病因，諸如敗血症之前的菌血症、新疾患症候群通報中的不明熱，都是因為此時血液中起炎菌的菌量非常少，由血液來培養細菌，其檢出率非常低，通常在20%以下。因此不須經由培養的分子生物學的細菌 DNA 檢測方法受到重視，亦即使用 PCR 法。這個方法的應用可使用極微量的菌體核酸，在短時間內增幅而達到檢測的目的。

本研究採用細菌的共通基因 Ribosome DNA 中的 16S rDNA 為檢測對象。此基因為所有菌種所保有，同時鹽基的置換速度與進化上有一致的關係，因此各菌種都有其特異的配列存在。亦即各菌種間的配列相異，可做菌種分類的指標。16S rRNA 的鹽基數長約 1600bp，近來的研究已經發現配列中前段的 350bp 中有三處的特異配列，可以充分辨別出菌種間關係，因此其配列解析更形簡單，在短時間內可決定配列，並直接與 data-base 作比對，可以迅速得到菌種的鑑定。

本研究為符合迅速及微量之原則，其檢體直接採用急診室之早期病患的全血。在進行實驗前階段，已完成直接菌株之實驗，即 PCR 所得到之 products 進行 sequence 配列與 Data base 的比對，均得到正

確結果。但是在臨床檢體進行 PCR 法時，無法得到預期的 products(血液培養與 PCR 法陽性比為 18:8)。檢討原因可能是早期菌量太低及血液中阻害物質存在，在後期實驗改用 RT-PCR 法直接測試 m-RNA，結果同時進行的血液培養未能得到菌株時，PT-PCR 法成功地檢出，完成二症例之菌株決定。

現在有採用 16S rRNA 決定菌種之高價儀器販賣中，但其檢體均為取得之菌株，與本研究尚有一段距離。如何克服直接由血液或各種體液之檢體來檢定才是困難點，本實驗獲得以 PT-PCR 法之成功案例，要如何確立安定此方法之檢出率是今後努力的目標。

英文摘要：

Having fever is a common symptom during the course of infectious diseases. In the early stage of the disease development, it is often difficult to detect the causing agent by the conventional culture method, especially in the case of bacteremia before sepsis and fever is the only sign before the acute syndrome to show up. During this period, the concentration of the responsible pathogen is usually too low to be detected and thus fails in getting in time the needed accurate diagnosis and treatment.

The success rate of blood culture is less than 20%. Therefore, we may have to rely on molecular diagnoses such as bacterial DNA detection and PCR methods in such circumstances because such approaches are fast and require small sample amount.

In this study, we used 16S rRNA as the target gene. It is one of the operon genes of ribosomal DNA present in all bacteria. The gene is very stable and changes only in accordance with the evolution of the bacterium, so it is a good indicator for differentiating between bacterium species. The entire length of 16S rRNA is about 1600bp. Recently, it has been found that in its anterior part of 350bp there are three specific regions, which sequential variations are enough to reflect the differences among all

bacterium species ever reported. With direct comparison to database, one can easily identify all bacteria under investigation.

Our whole blood samples come from hospital emergency wards and most of which are collected from patients in the early stage of infections. Therefore, successful early diagnosis is essential to intervene the disease development.

Our standard detection procedure includes performances of PCR and RT-PCR as well as blood culture isolation for comparison purposes. In our method development, we first tested PCR and found although it worked fine with artificial samples, it fell short when dealing with real clinical samples. We assume the reason would be either the amount of bacterium was too low for the method or there were some unknown inhibiting factors existing in the blood. However, when we used RT-PCR to assay m-RNA, the result we got is quite satisfactory. In two test cases, we successfully detected *S. pneumoniae* as the causing agent while the culture method turned out nothing but negative results.

Recently, a new device for identification of pathogens using 16S rRNA as the target gene has become available on the market, which sounds similar to the idea in our study. However, the sample required for the kit to diagnose is said having to be culture isolation. Now, it posts an obvious problem, i.e. how are we going to apply this new kit to identify

the causing agent if we could not isolate any bacterium particles at the first place? It seems somewhat similar to the problem we came across with the PCR trial when we have difficulty to detect the existence of bacteria in early stage due to too low a concentration. After all, our study shows RT-PCR is a good method for such circumstances, except its stability may be a problem for us to study in the future.

本文

(一) 前言 (Introduction)

一般用 PCR 法來鑑定感染症的病原體時，是以該菌種之特異基因或特異的病原因子來設計引子 (Primer) 或將這些因子做成特異的探針 (Probe) 來測定菌種。但是在不明起炎菌的情況下，用這些方法是不切實際的，亦即不可能準備所有的菌種特有的 Probe 或 Primer，並一一加以測試，因此本研究採用所有細菌的共通基因 16S rDNA (16S rRNA) 為檢測對象，此基因為所有菌種所保有，同時鹽基的置換速度與進化上有一致的關係，因此各菌種都有其特異的配列存在。亦即各菌種間的配列相異，可做菌種分類的指標。16S rRNA 的鹽基數長約 1600bp，近來的研究已經發現配列中前段的 350bp 中有三處的特異配列，可以充分辨別出菌種間關係，因此其配列解析更形簡單，在短時間內可決定配列，並直接與 data-base 作比對，可以迅速得到菌種的鑑定。

DNA microarray 的進展及使用，有些實驗室嘗試去把重要的臨床病原菌種約 500 種之 16S rRNA 基因固定在 array 上，再將檢體與之進行雜交後，用各種包括螢光、冷光、發色來測定，但是需要鑑定的機器的開發及其靈敏度之確認，都是一時無法解決的

問題。而現在 sequencing 方法及儀器之進步一日千里，數百 base pair 的配列決定只要數小時的時間，而且 16S rRNA 的 Data base 蓄積已是可完全包括所有臨床病原菌種在內，因此 sequence 的比對已經不成問題，目前最大的難關還是在於如何由檢體萃取病原體的 DNA，尤其是在早期診斷、早期治療的原則下，微量的檢體檢出是最大考驗。因此本研究同時並用 PCR 法及 RT-PCR 法，這是因為顧慮到 RT-PCR 法的 RNA 抽取比較困難，容易造成污染，但是由技術者的熟練度及 kit 的改良，這些問題都可迎刃而解。由此研究的結果顯示 PCR 法在血液為檢體的早期偵測上有其困難點，今後直接由 RT-PCR 法來進行增幅可使敏感度增加而達到早期迅速診斷的目的。

(二) 材料與方法 (Material and Method) :

(1) 菌株

使用本實驗室保存之呼吸道細菌 *L.pneumophila* (ATCC 33156), *H. influenza*, *N.meningitidis*, *S.pneumonia*, *S.pyogenes* 及 *B.pertusis* 6 菌種及 *E.coli* 各種血清型 17 株 , 其他菌種 15 共 38 株 (表一)。

(2) 檢體來源

由台北市立萬芳醫院感染科提供由醫師確定之感染症可疑
病例及不明熱病例 200 例之全血各 10 C.C 之檢體。

(3) Primers

16S rRNA 之 8UA AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

519B ATTACCGCGGCTGCTCG

(4) 反應條件

	(PCR Program)	(RT-PCR Program)
	94 ---5 分鐘	60 ----30 分鐘
30cycles	94 ---20 秒	94 ----2 分鐘
	57 ---30 秒	94 ----15 秒
	72 ---40 秒	60 ----30 秒
	72 ---5 分鐘	68 ----30 秒
	4	68 ----5 分鐘
		4

(5) Sequencing

PCR 法所得到之 PCR products 交由民間公司定序。

(6) Data-base Sequence 比對

使用軟體經解析後，將 Sequencing 導入 Data-base 直接比對，決定菌種。

1. 將 Sequence 的序列存於附檔
2. 在 Meg Align 中將兩序列比對
3. 選擇相同序列片段後，copy 後另存新檔

4. 開放 NCB1 Data Base

5. 選擇 BLAST Standard Nucleotide - Nucleotide 貼

上所存之新檔 BLAST Format 比對結果 決定菌名

(identities 以 100 % 為佳)

(三) 結果 (Result):

(1) 將決定之 primers 的 sequence 配列直接與 Data-base 中的 各菌種約 400 株直接比對，除 8U 部分可能因最前段定序上關係有不符情形外，519 處完全符合，即多數菌種皆有指定之 primers 存在。以此 primers 測試 38 菌種全部得到預期 band。

(2) 以實際之已知菌株分別在測試中所得到的 PCR products 定序後，經過 Data-base 比對均為正確。

(3) 直接由急診室送來之臨床檢體同時進行血液培養及 PCR 法測試，其結果如表二、表三所示，167 檢體中獲得培養有 18 例，PCR 法有 8 例，此 8 例皆包含在獲得培養例中。

(4) 改由 RT-PCR 法增幅後，共計有 22 症例，卻有 4 例獲得增幅而無法獲得培養之症例，可知其敏感度是足夠的。

(四) 討論

發熱是感染症的主要症狀，但是在發病的早期卻無法找到病因，諸如敗血症之前的菌血症更新疾患症候群通報中的不明熱，都是因為血液中的起炎菌的菌量非常少，因此由血液直接來培養細菌，其檢出率是非常低的，通常在 20 % 以下，因此使用不需要經由培養的分子生物學的細菌 DNA 檢測方法受到重視，而由 PCR 法增幅來檢測細菌的存在，並非由其增幅的產物來鑑定出病原體。

16S rRNA 是細菌構造體中蛋白質合成場所的 Ribosome RNA 中重要的一部分。其控制基因的 16S rDNA 的 base pairs 大約在 1600bp 左右，鹽基排列的置換速度安定而且與進化上有一致的關係，並且長度在檢測上與 28S 及 5S 相比適中，而且其中含有各菌種間相異的配列存在，可做菌種分類的指標。自 1980 年起就被鎖定為細菌分類學上重要的指標之一。這 20 年來，16S rRNA 的鹽基配列 data 已累積至足以含蓋所有病原菌種的程度，因此如何從檢體中找出起炎菌的 16S rRNA 存在，以做為原因菌鑑定的努力一直被重視。

在實驗室的研究，早已證明其可行性，本研究在預備階段

也以直接菌體為檢體證明其正確性無誤。而後直接以臨床檢體的血液直接測試，在接近 200 例的檢驗中，把 PCR 法與血液培養法同時進行，以比較其正確性及迅速性。在一般的 PCR 法中，雖然培養症例比 PCR 法檢出症例多，但是由檢驗後段幾乎培養症例同時都出現 PCR 法陽性來看，可以推斷 PCR 法需要有熟練的技術，深信熟練及正確的 DNA 操作技術可以使 PCR 法達到迅速而微量的目的，而且最後的 22 症例改為 RT-PCR 後，直接檢測 m-RNA 時，居然成功地把全部無法培養成功的症例得到 4 例的增幅成功的症例，在 4 例中起先的 2 例定序後由於配序混亂而判定失敗，但是後 2 例卻非常正確地獲得配列分析完成比對，確定病原菌 (*S. pneumoniae*)，由此亦可推定熟練的操作技術，確信可以在早期把微量病原菌迅速檢測而達到目的。

(五) 結論與建議

本研究利用 16S rRNA 的 Primers 直接由急診室的早期感染症可疑病例血液中檢測不明病原體。在 200 例病例中，先後使用 PCR 法及 RT-PCR 法同時並行血液培養法，以確定在實驗室中所證明之利用 16S rRNA 檢定病原體的正確性。結果不論在 PCR 法或 RT-PCR 法只要在熟練的操作下，直接由臨床血液檢體不經過培養即可以 PCR 法來迅速而且在微量情形下鑑定出病原體。

現在有採用 16S rRNA 決定菌種之高價儀器販賣中，但其檢體均為取得之菌株，與本研究尚有一段距離。如何克服直接由血液或各種體液之檢體來檢定才是困難點，本實驗獲得以 RT-PCR 法之成功案例，要如何確立安定此方法之檢出率是今後努力的目標。

(六)參考文獻

1. Wose CR. Bacterial evolution. 1987. Microbiol. Rev. 51:221-271
2. 江崎孝行等. 血液中的病原體的 PCR 法檢出. 1994. 臨床檢查 58:1405-1408
3. Validity and Limitation of Genetic Methods to Determine Species. 2001. J. jap. Ass. inf. Dis. 75:833-836
4. Kusunolis et al. Application of colorimetric microdilution pate hybridization for rapid genetic identification of 22 Mycobacterium species. 1991. J. Clin. Microbiol.29:1596-1603
5. Ezaki T. et al.Simple and rapid genetic identification of Legionella species with photo-biotin-labeled DNA. 1988. J. Gen. Appl. Microbiol. 34:191-199
6. 波多宏幸等. DNA microarray 的抗酸菌同定法的基礎檢討.2000. 日本臨床為微生物學會誌. 73:104-136

參、圖表

表一 使用菌株

1. <i>Legionella pneumophila</i>	20. <i>E.coli</i> (LT)
2. <i>Nisseria meningitides</i>	21. <i>E.coli</i> (LT)
3. <i>Bordella pertusis</i>	22. <i>E.coli</i> (JM109, transfer)
4. <i>Haemophilus influenza</i>	23. <i>E.coli</i> (K12)
5. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	24. <i>Shigella boydii</i>
6. <i>Streptococcus pyogene</i>	25. <i>Shigella flexnerii</i>
7. <i>E.coli</i> (type strain)	26. <i>Shigella sonnei</i>
8. <i>Enteroaggregative E.coli</i>	27. <i>Shigella dysenteriae</i>
9. <i>Enteroaggregative E.coli</i>	28. <i>Staphylococcus saprophiticus</i>
10. <i>Diffuse adhesive E.coli</i>	29. <i>Staphylococcus intermedius</i>
11. <i>Adhesive E.coli</i>	30. <i>Staphylococcus aureus</i>
12. <i>Localized adhesive E.coli</i>	31. <i>Staphylococcus caitis</i>
13. <i>E.coli</i> (VT 1)	32. <i>Staphylococcus cohnii</i>
14. <i>E.coli</i> (VT 2)	33. <i>Staphylococcus epidermitis</i>
15. <i>E.coli</i> (O157)	34. <i>Staphylococcus haemolytious</i>
16. <i>E.coli</i> (ST,LT)	35. <i>Staphylococcus sciuri</i>
17. <i>E.coli</i> (ST,LT)	36. <i>Staphylococcus simulans</i>
18. <i>E.coli</i> (ST)	37. <i>Staphylococcus warnei</i>
19. <i>E.coli</i> (ST)	38. <i>Staphylococcus xylosus</i>

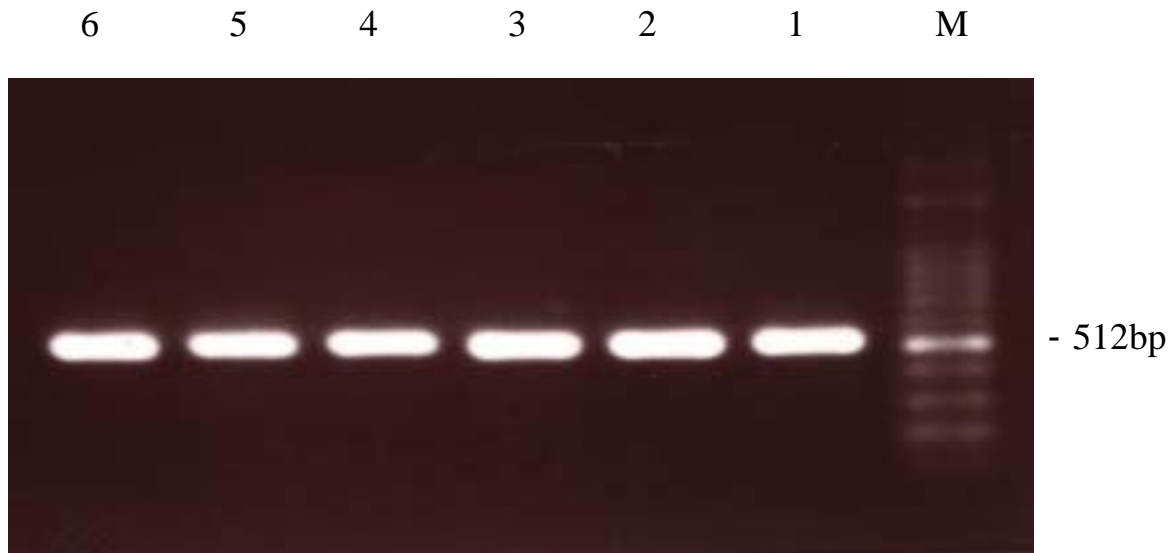
表二 PCR 法的結果

檢查回數	檢查數量	培養 (陽性)	PCR (陽性)	(日期)	備註
1	30	2	0	8.1~8.4	MRSA, <i>S.aureus</i>
2	17	1	0	8.4~8.5	<i>E.coli</i>
3	16	3	0	8.5~8.8	<i>K.pneumonia</i> , <i>S.epidermid</i> , <i>E.coli</i>
4	22	1	0	8.8~8.0	CNS(<i>Staphylococcus</i>)
5	25	3	2	8.11~8.14	<i>E.coli</i> 2 , <i>Bacillus</i> spp.
6	12	3	3	8.14~8.14	<i>E.coli</i> 2, <i>A.banmanni</i>
7	11	1	0	8.18~8.20	<i>Salmonella</i> gr.C
8	3	1	1	8.20	<i>P.arginosa</i>
9	4	0	0	8.23~8.25	
10	5	1	1	8.25~8.28	G(+) <i>Bacillus</i>
11	10	1	0	8.29~9.1	<i>E.coli</i>
12	8	1	1	9.6~9.7	<i>Streptococcus</i> spp.
13	4	0	0	9.9~9.17	
總計	167	18	8		

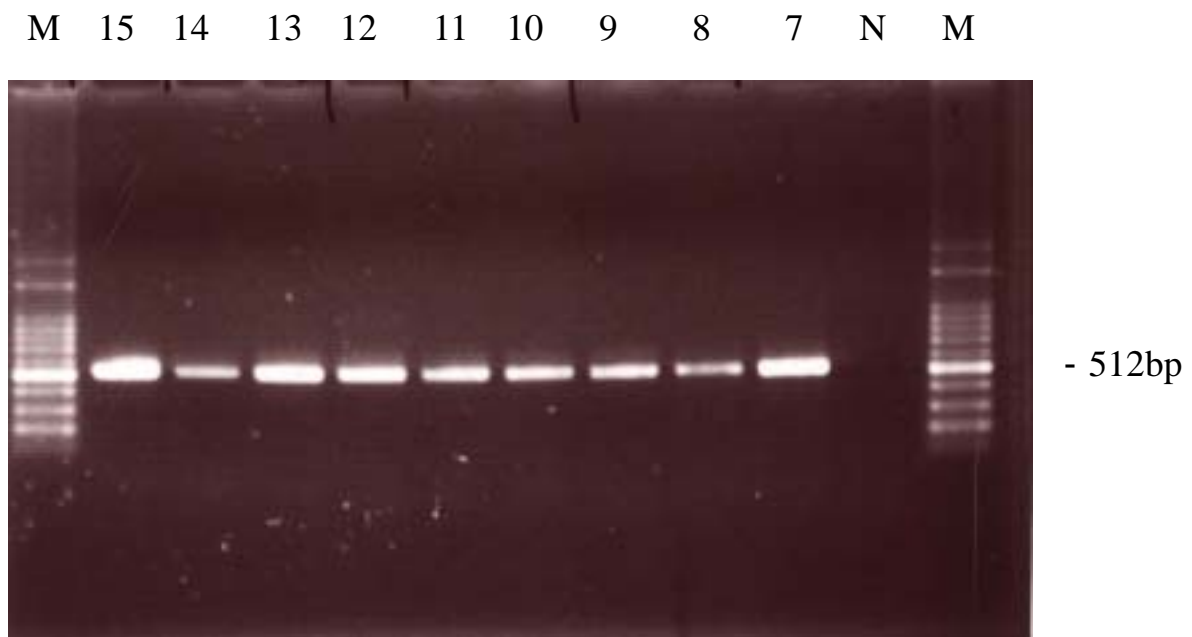
表三 RT-PCR 法的結果

檢查回數	數量	培養	RT-PCR	備註欄
1	17	0	2	noise
2	5	0	2	<i>S.pneumoniae</i>
計	22	0	4	

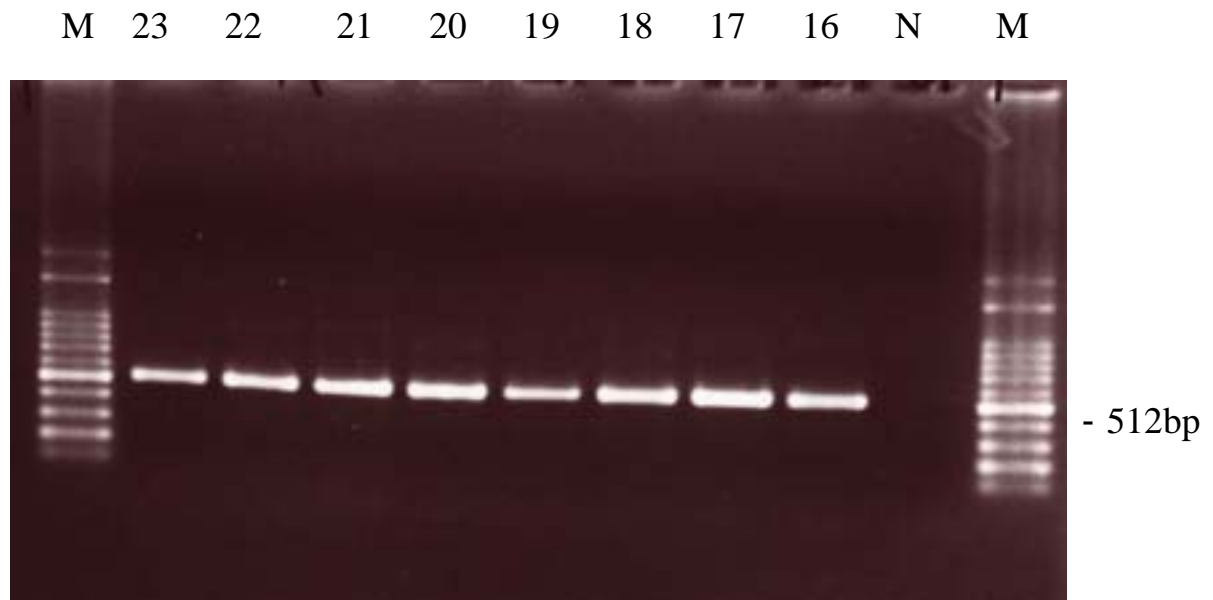
圖一



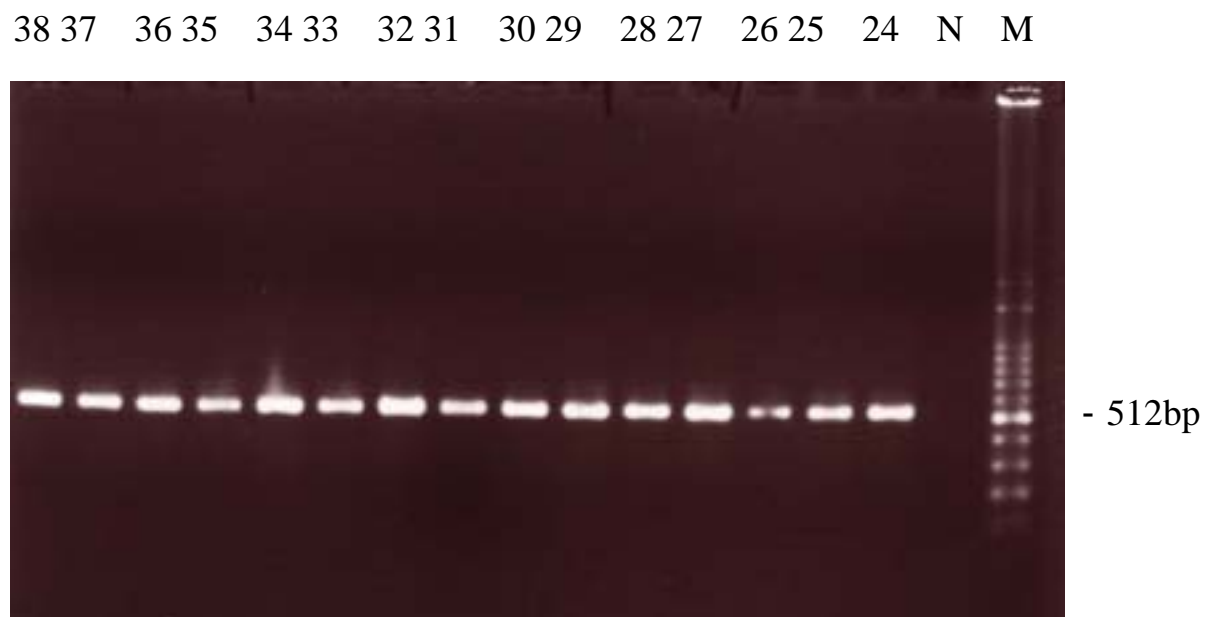
圖二



圖三



圖四



抽 DNA

取 20 μ l protease into 1.5ml tube , 加 200 μ l sample ,



加 200 μ l buffer AL



vortexing 15 sec



56 °C 10 min



spin-down



加 200 μ l(96-100%)ethanol



vortexing 15 sec , spin-down



transfer 至 QLAamo spin column



離心 8000rpm / 1 min



Discard the supernatant , 換新的 collection tube



加 500 μ l Buffer AW1



14000 rpm / 3 min



倒掉濾液 , 再多離心 1 min



將 QLAamp spin column 移至 1.5ml 離心管 , 加 60 μ l Buffer AE



8000rpm / 1 min

