

計畫編號：DOH91-DC-2010

行政院衛生署疾病管制局九十一年度自行研究計畫

發展鏈球菌之快速脈衝式電泳方法與猩紅熱  
分子流行病學研究

自行研究成果報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

研究主持人：邱乾順

研究人員：廖采苓、王姿惠、張秀麗、廖棟樑、李俊青

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

# 目 錄

一、中英文摘要	2-5
二、本文	
(一)、前言	6-8
(二)、材料與方法	9-13
(三)、結果與討論	14-19
(四)、結論與建議	20-22
(五)、參考文獻	23
(六)、圖表	
圖一、使用標準化 <i>Listeria monocytogenes</i> ……	24
圖二、Lewis Taiwan No. 1 膠塊清洗機，一次 ……	25
圖三：限制酵素使用量測試，第 1-5 行是……	26
圖四：VT- <i>HaeIII</i> 圖譜。Vir regulon 區域……	27
圖五：VT- <i>Hinfi</i> 圖譜。Vir regulon 區域之……	28
圖六：根據 PFGE- <i>SmaI</i> 圖譜建構之 A 型鏈球……	29-30
圖七：根據 PFGE- <i>SfiI</i> 圖譜建構之 9 株 A……	31
表一： <i>emm</i> 、VT 與 PFGE 型別，與其分子型……	32
(七)、附錄	
附錄 A、PFGE Codes for Restriction Enzymes…	33-36

## 摘要

關鍵詞：脈衝式電泳法、Vir 分型、*emm* 基因分型、A 型鏈球菌

在本研究中，我們發展一快速又低成本的 A 型鏈球菌脈衝式電泳方法 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)，同時也使用此一新的 PFGE、Vir 分型與 *emm* 基因分型技術，分析 182 株 1996 至 1999 年間自台灣中部地區猩紅熱病人所分離之 A 型鏈球菌菌株之基因型。在使用自行組裝的膠塊清洗機的協助下，一個技術人員每天可分析 30-60 株菌株，得到良好品質的 DNA，並於第二天得到 PFGE 結果，在有良好品質 DNA 的情況下，每一例行性 *Sma*I 限制酵素反應的使用量，可由原先的 40 單位降到 5 單位，此一改善大為降低 PFGE 的成本。由新的 PFGE、Vir 分型與 *emm* 基因定序方法分析 182 株 A 型鏈球菌的分子分型試驗，我們將 173 株菌株區分為 27 種 PFGE-*Sma*I 型別，9 株的 DNA 不被 *Sma*I 作用，以 *Sfi*I 分析而得到 6 種 PFGE-*Sfi*I 型別；182 株菌株又可分成 20 種 VT 型別，當中的 181 株菌株攜有 10 種 *emm* 基因，而有 1 株菌株不含有 *emm* 基因。為了探討菌株的親緣關係，依據 PFGE-*Sma*I 圖譜建構了菌株親緣圖，以 60% 相同度為界，共有六個群組，群組的組合與 *emm* 基因種類有關，群組 A、B、C、D、E 和 F 分別由 *emm*22、*emm*4、*emm*12、*emm*12、*emm*6 與 *emm*1 的菌株所組成，*emm*12 菌株分佈在 2 個群組內，表示 2 群 *emm*12 菌株可能有不同演化來源。帶有

不同 *emm* 基因的菌株，彼此間有較遠的親緣性，攜有不同 *emm* 基因的菌株有不同的 PFGE 圖譜；而具有相同 *emm* 基因的菌株則可能有不同的 PFGE 圖譜與 VT 型別，有些具有相同 VT 型別的菌株可更進一步分成幾個 PFGE 型別，相對的，有些有相同 PFGE 圖譜的菌株則有不同的 VT 型別。雖然本研究指出 PFGE 是 A 型鏈球菌最具效力的分型方法，*emm* 基因分型卻能最明確的區隔不同群組，Vir 分型則有助於區分更多的基因型。本研究所發展的快速 PFGE 方法與所建構的基因型別資料庫，將能應用於研究 A 型鏈球菌分子流行病學與建立分子分型監測系統，接下來我們將應用此研究結果來探討最近猩紅熱病例高升與侵襲性 A 型鏈球菌感染重症大增的原因。

## Abstract

Keywords: Pulsed-field gel electrophoresis, Vir typing, *emm* typing,

*Streptococcus pyogenes*

In the present study, we developed a rapid, cost-effective pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method for molecular subtyping of *Streptococcus pyogenes* and used the new PFGE, Vir typing, and *emm* typing techniques to analyze the genotypes of 182 streptococcal isolates recovered from scarlet fever patients in central Taiwan from 1996 to 1999. With aid of a plug washing machine assembled in our lab, a technician a day could finish DNA preparation with good DNA quality for 30-60 bacterial isolates and obtained PFGE result in the second day. In addition, the usage of *Sma*I for a routine restriction digestion had been reduced from 40 units to 5 units when high quality of DNA was used. The improvement had helped to cut down the cost of PFGE. From the molecular subtyping of the 182 *S. pyogenes* isolates with the rapid PFGE method, Vir typing, and *emm* typing, we obtained 27 PFGE-*Sma*I types for 173 isolates and 6 PFGE-*Sfi*I types for 9 isolates, whose DNA was resistant to *Sma*I digestion. We also obtained 20 VT types for the 182 isolates from which 10 *emm* genes were detected for 181 isolates and no *emm* gene for 1 isolates. To study the phylogenetic relationship for the isolates, a dendrogram was constructed with the PFGE-*Sma*I patterns. Six clusters were designated based on a cut off value of 60% identity. The clustering was related to the *emm* genes. Isolates with *emm*22, *emm*4, *emm*12, *emm*12, *emm*6, and *emm*1 were distributed in cluster A, B, C, D, E, and F, respectively. The fact that *emm*12 isolates located in two clusters suggested that they could be derived from two different origins. The

dendrogram also showed that isolates with different *emm* genes were genetically distant from each other. The data also indicated that the isolates with different *emm* genes were different in PFGE patterns and isolates with the same *emm* gene could be different in PFGE patterns and different in VT types. Some isolates with the same VT types could further be subtyped into several PFGE types, in contrast, some isolates with the same PFGE pattern could be different in VT types. Although PFGE was the most discriminatory method for molecular subtyping of the *S. pyogenes* isolates tested, *emm* typing could show the most distinct differences between the phylogenetic groups and Vir typing could help to discriminate more genotypes of isolates. The new rapid PFGE method and the database of the genotypes created in this study can be applied for molecular epidemiology study and for setting up a molecular subtyping system for surveillance of *S. pyogenes*. In the next, we will applied the results to investigate the abruptly increase in cases of scarlet fever and in severe cases of invasive group A streptococci infections in the past year.

## 前言

脈衝式電泳法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)可分析細菌之完整基因體，在眾多分子分型技術中，PFGE 因其高再現性(high reproducibility)與高區別性(high discrimination)，被認為是最強的分子分型法，是公認的分子分型法中之黃金標準，然而 PFGE 之操作手續繁雜且非常費時，只能在擁有優良技術的參考實驗室才能進行。一般而言，PFGE 操作時程約為 4-5 天，一個優秀技術人員一週五天的時間約只能分析 30-40 株菌株。由於病原菌株的分型工作能提供有用資料，用於監測傳染病的流行，是防疫工作的利器，因此美國疾病管制局於 1996 年開始建立了國家分子分型監視網，用以即時監視食因性疾病的流行—PulseNet (Swamnathan, et al. 2001)，此網絡結合美國各州的實驗室，以 PFGE 技術例行性地進行引發食品中毒之病原菌的即時分析工作，此網路系統未來將擴展為全球性的網絡，建構全球的防疫網，未來將大部分細菌納入分析對象，防疫界將能即時掌握疫病之流行，目前美國境外之國家已有加拿大加入 PulseNet 行列，許多歐洲國家、澳洲、紐西蘭等國也將陸續加入，鄰近之日本已建立自己的監視網—PulseNet Japan。PulseNet 之推展，關鍵在於 PFGE 操作及 DNA 圖譜影像分析的標準化，因此首先要改進 PFGE 的操作技術，目前 PFGE 分析 Gram(-)細菌的操作方法已大大的改進，特別是最近 Ribot 等人(2001)改進之方法，使萃取 DNA 的工作由原先的 3-4 天的操作時程縮短至 6 小時以內，

每一操作人員一天即能輕輕鬆鬆分析 30 株以上之菌株，但在 Gram(+)細菌的分析上，目前尚未有如此快速的方法，若要利用 PFGE 例行性地分析 Gram(+)細菌如 A 型鏈球菌等，PFGE 技術之改良仍為一關鍵環節。

A 型鏈球菌能引發許多類型疾病，其所引發之猩紅熱主要發生在 4-8 歲之兒童身上，2000 年至 2002 年，中部地區(甚至全台)之猩紅熱病例數增加至 2-3 倍，增加的原因是否源於特別的流行菌株的出現，或防疫單位通報的數目增加，或導因於其他原因所。鑑於 1996 年至 1999 年台灣食品中毒案例大增之原因仍導因於一新型的 O3:K6 腸炎弧菌菌株所造成(Chiou, et al. 2000)，我們因而懷疑猩紅熱病例大增原因可歸諸於病原菌的因素，利用 PFGE、Vir 分型(Gardiner, et al. 1995)、*emm* 基因分型(Beall, et al. 1996)方法可進行 A 型鏈球菌的分型，PFGE、Vir 分型可得到菌株 DNA 指紋圖譜資料，PFGE 圖譜代表細菌完整之基因體結構，Vir 分型只代表部份基因體，然而初步研究資料顯示，Vir 分型所得之圖譜分型效力相當強，不同 Vir 圖譜往往具有不同 PFGE 圖譜，或甚至不同 Vir 圖譜具有相同脈衝式電泳圖譜，因此比較此兩種方法，相當有意義，由於 Vir 分型為一 PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism)的方法，其擁有快速、易操作、且可大量分析菌株的便利，此方法或可取代脈衝式電泳法，做為 A 型鏈球菌的例行分型方法，或做為建立 DNA 指紋圖譜資料庫的方



法；*emm* 基因分型可決定菌株之特定 *emm* 基因(為 M 蛋白之基因)型別，M 蛋白與 A 型鏈球菌致病性有關，故決定 M 蛋白型別相當有意義，但因 M 蛋白之分型需要準備 80 種以上之血清，目前除了美國、澳洲等先進國家外，一般實驗室很難進行 M 蛋白之血清分型，但進行 *emm* 基因的定序工作，則可在一般具分子生物操作能力的實驗室進行，將 DNA 序列送至美國 CDC 之 *emm* 基因序列資料庫比對，即可鑑定出 *emm* 基因型別。

猩紅熱目前是容易治療的疾病，因仍為兒童之重要呼吸道傳染病，具有引發嚴重後遺症的可能，目前仍列為我國第三類乙種法定傳染病之一，以強化對該疾病之監視。對於引發猩紅熱之病原菌—A 型鏈球菌，國家防疫機關之實驗室有必要加以分析監測，以掌握菌株之流行狀況與動態變化趨勢，由於進年來分子生物技術的發展，已能對 A 型鏈球菌進行基因的分析，這些分型結果將相當有助於流病學的研究，做為防治的依據。

在本研究中，我們發展一快速又低成本的 A 型鏈球菌脈衝式電泳方法，同時也使用新的 PFGE、Vir 分型與 *emm* 基因分型技術，分析 182 株 1996 至 1999 年間自台灣中部地區猩紅熱病人所分離之 A 型鏈球菌菌株之基因型，並將基因分型結果，建構成可用電腦比對、分析之基因型資料庫。

## 材料與方法

**菌株來源與病例相關流病資料：**1996年8月至1999年台灣中部六縣市醫療院所送驗之菌株或送驗檢體經本實驗室(疾病管制局第三分局)分離之菌株，以生化與血清鑑定確認，再於15% glycerol 溶液中製成懸浮菌液，長期貯存於-75°C超低溫冷凍櫃內，以供研究之用，此菌株在此冷凍條件下能貯存至少3年。菌株寄主之基本流病資料來自通報醫療院所填寫之「傳染病個案(含疑似病例)報告單」，與當地衛生所人員填寫之「防疫檢驗檢體送驗單」；資料包括病人之姓名、性別、出生年月日、居住地、發病日期、採檢日期、臨床症狀，這些資料輸入電腦Excel做成流病資料庫，供後續流病分析之用。

**快速 A 型鏈球菌之脈衝式電泳方法(包埋、酵素處理與清洗)：**依據美國疾病管制局之 *Listeria monocytogenes* 之 PFGE 標準操作方法(Graves, et al., 2001)，進行 A 型鏈球菌之包埋、酵素處理與清洗。其過程簡述如下：挑取單一菌落以劃線法接種於 Tryptic Soy Agar with 5% sheep red blood (Blood Agar Plate)，置於 37°C 之二氧化碳恆溫箱(5% CO<sub>2</sub>)中培養 16 小時；第二天以棉棒刮取菌體，於 TE buffer (10 mM TrisCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)中做成懸浮液，以濁度計(Turbidity Meter, Dade Microscan™)測量，調整菌液濃度至 0.78 – 0.82 (in Falcon 2054 tubes)，取 240 µl 菌液至 1.5 ml Eppendorf

管，加 60  $\mu$ l lysozyme (10 mg/ml)，以 micropipette 抽放三次混合後放置於 37°C 水浴器中 10 min，再加入 300  $\mu$ l 融化後回溫至 56°C 的 1.2% SeaKem Gold agarose/1% SDS，快速以 micropipette 抽放三次混合均勻後注入模具中，放置於室溫 15 min 或 4°C 中 5 min 使充份凝固，再將膠片自模具中推入 5 ml Cell Lysis Buffer (50 mM Tris; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% Sarcosine; 0.15 mg/ml proteinase K)，置於 54°C 水浴器振盪 2 h；膠塊經酵素處理後，加入 15 ml 預熱至 54°C 的 ddH<sub>2</sub>O，置水浴器振盪 15 min，重覆 ddH<sub>2</sub>O 清洗一次，再以 15 ml 預熱至 54°C 的 TE buffer (10 mM TrisCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 清洗四次，膠塊最後保存於 5 ml 的 TE 中，置於 4°C 冷藏，以供 PFGE 電泳分析使用。

**PFGE 電泳分析：**以刀片切取約 2-mm 寬含 chromosome DNA 的膠薄片 (slice)，膠薄片先置入 200  $\mu$ l 的 *Sma*I 限制酵素緩衝液，室溫下放置 5 min，以 micropipette 吸出緩衝液，再注入 200  $\mu$ l 含 5 units 的 *Sma*I 限制酵素之緩衝液，置於 25°C 下放置 2 h，以 micropipette 吸出緩衝液再注入 200  $\mu$ l 的 0.5X TBE buffer (89 mM Tris borate, 2 mM EDTA)，放置 5 min 後，將膠薄片取出，用吸水紙儘量吸乾附著於膠薄片之緩衝液，再將膠薄片依序平貼於孔梳 (comb) 上，15 孔之膠片於第 1、5、10、15 孔位置，10 孔之膠片於第 1、5、10 孔位置放置以 *Xba*I 切割之內部參考 *S. enterica* serovar *Braenderap* H9812，之後將孔梳放置於鑄膠台上，倒入融化回溫至 56°C 的 1 % SeaKem

Gold agarose，放置室溫 20-30 min，待瓊膠凝固後，即可進行電泳。PFGE 電泳使用 Bio-Rad CHEF Mapper 脈衝式電泳儀(Bio-Rad Laboratories Inc.)，跑膠條件為 pulse time 4 s → 40 s, angle 120° ,voltage 200 V, 跑 19 小時，跑膠完成後，膠片以 0.5 µg/ml 的 ethidium bromide 染色 15 min，再以 ddH<sub>2</sub>O 退染 2 h (過程更換水 3-4 次)，DNA 圖譜影像再以數位影像處理系統 AlphaEase™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) 拍照貯存成數位檔案，再以 BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 分析軟體將圖譜常態化、建檔，並與菌株之流病資料連結，做成可應用電腦比對型式之資料與資料庫。

**測試最低限制酵素使用量：**PFGE 標準操作方法建議之限制酵素量 *Sma*I 為 40 單位。先測試 40、30、20、10、5 單位，再測試 5、2.5、1.25、0.625、0.3125 單位的酵素用量，確定最低酵素使用量，以減少酵素使用量，降低 PFGE 之成本。

**脈衝式電泳法圖譜解讀：**依照美國疾病管制局 PulseNet 實驗室的經驗，菌株間任何一 DNA 片斷的差異皆可能具有流行病學上的意義，本實驗依據美國疾病管制局的經驗，菌株 PFGE 圖譜只要與既有之圖譜擁有一 DNA 片斷的差異，即視為不同的 PFGE 圖譜，給與 PFGE 圖譜編號。PFGE 圖譜編號將依據美國疾病管制局 PulseNet 實驗室的命名原則編號，在編號前加入

台灣之代號 TW-，例如 TW-SPYS16.0025，代表 *Streptococcus pyogenes* (SPY)，使用 *Sma*I (S16)限制酵素切割處理之第 25 個 PFGE 圖譜(.0025)；美國 PulseNet 使用之限制酵素編號表見附錄 B。

**Vir 分型：**依據 Gardiner, et al. (1995)方法進行菌株 Vir regulon-RFLP 的分析。將菌株劃線培養於 Blood Agar Plate，置於 5%之 CO<sub>2</sub> 培養箱中隔夜培養，第二天以接種環刮取一環菌體，於 96-well microtiter tray (round-bottomed)內含 50 µl 的溶液(10 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl)製成懸浮液，再加入 50 µl 融化的 2% low-melting-point agarose，置於冰上 10 min，使膠塊凝固，取出膠塊，置於 0.5 ml 的 EC lysis buffer (6 mM Tris pH 7.6, 1M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.5% Brig-58, 0.2% deoxycholate, 0.5% N-lauroylsarcosine)，加 1 mg/ml 的 lysozyme 與 20 µg/ml 的 RNase A，37°C 下振盪 2 h，lysis buffer 再以 0.5 ml 的 proteinase K 溶液(1 mg/ml proteinase K, 0.5 M EDTA, pH8.0, 1% N-lauroylsarcosine)，放置於 50°C 反應 2 h，以 TE buffer (10 mM Tris pH7.6, 0.1 mM EDTA)沖洗，再將膠塊放置於 1 ml 的 TE buffer，放置於 4°C 以備使用。使用前，取出膠塊，加入 500 µl 的 TE buffer，放置於 65°C 中 15 min，使膠塊溶解。PCR 反應乃取 5 µl 上述備製之 DNA，加入 0.5 µM 的 VUF (5'-AAACCGTATCTTTGACGCACTCGAGGACAATTTGCGAGATTAG-3')與 SBR (5'-AGACATGAGCTCAATGGCAAGTTTATCAAATGGTAATTTTTG-3')的 primers，以 TaKaRa L-PCR 套組(TaKaRa Ex Taq™,

TaKaRa Shuzo Co., Japan)增幅 Vir regulon 之 DNA 片斷(大小約 5-8-kb),PCR 增幅條件為：94°C, 30 sec → 25 cycles (94°C, 10 sec → 60°C, 2 min → 68°C, 6 min)。取 5 µl 的 PCR 增幅 DNA，以 10 units 的 *HaeIII* 或 *HinfI* 限制酶於 37°C 下作用 1 h，再以 2% Agarose 瓊膠分析 DNA 片斷，膠片以 0.5 µg/ml 的 ethidium bromide 染色 15 min，Vir 圖譜以 AlphaEase™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA)拍照，貯存為 TIFF 影像檔，以供後續分析比對之用。Vir 型別命名以 VT 開頭，接 *HaeIII* 的型別順序，再接 *HinfI* 型別，例如 VT4.3 即 *HaeIII* 的第 4 個型別，同時在相同 *HaeIII* 型別中之第 3 個不同 *HinfI* 型別。

***emm* 基因定序分析：**以 Beall 等人(1996)發表之方法與步驟進行 *emm* 基因定序分析。以 Primer 1 & Primer2 進行 PCR 增幅 *emm* 基因片斷，該 PCR 產物送至民間廠商(例如明欣有限公司，台北)進行定序工作，再將所得之 *emm* 序列送入美國疾病管制局 Beall 等人所架設網站之 *emm* 基因序列資料庫(<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.html>)比對，鑑定其 *emm* 型別。

## 研究成果與討論

**A 型鏈球菌快速 PFGE 方法：**參照 Graves 等人(2001)所發展的 *Listeria monocytogenes* 標準 PFGE 操作方法，我們成功應用到 A 型鏈球菌的 PFGE 分析，所得到的 PFGE 圖譜相當清晰(圖一)。在自行組裝的膠塊清洗機(圖二)協助下，可大量處理菌株的包埋、酵素處理、膠塊清洗的工作，可節省清洗時間，應用此快速方法，每人每天處理 30-60 株菌株，只需 6 小時即能完成，第二天可得到 PFGE 圖譜。快速 PFGE 方法，因操作過程簡化，失敗率低，而傳統方法需 3-4 天才能完成 DNA 的製備工作，時間太長，操作繁鎖極費心力，失敗率高。

**降低限制酵素之使用量：**先測試 40、30、20、10、5 單位的 *SmaI* 限制酵素使用量，結果用 5 *SmaI* 切割的 DNA 圖譜與 40 單位 *SmaI* 切割的 DNA 圖譜沒有明顯差別，再由 5 單位開始進行 2 倍稀釋，測試更低的使用量，結果使用 0.3125 單位 *SmaI* 切割所得的 DNA 圖譜與 5 單位 *SmaI* 切割的 DNA 圖譜沒有明顯不同(圖三)。此試驗說明在有高品質 DNA 的前提下，很少量的限制酵素即足夠，目前我們實驗室例行性使用量是 5 單位 *SmaI*，為原先 40 單位用量的 1/8。

***emm* 基因分型：**以 PCR 增幅 182 株菌株 *emm* 基因之前段片段進行序列分析，並決定其 *emm* 基因種類，有 181 株菌株出現 PCR 增幅之 DNA 產

物，1 菌株(Sp9414)未出現增幅之 DNA 片段。增幅之 DNA 送至民間公司進行定序，序列送至「*Streptococcus pyogenes emm* sequence database」(<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.html>)進行比對，而比對出 10 種不同 *emm* 基因，即 *emm1* (14 株)、*emm4* (83 株)、*emm6* (2 株)、*emm12* (64 株)、*emm22* (13 株)、*emm33* (1 株)、*emm74* (1 株)、st11014 (1 株)、st2267 (1 株)、stck249 (1 株)，其中 st11014 為全世界新發現之 *emm* 基因型。因此 1996-1999 年中部地區引發猩紅熱之菌株的 *emm* 基因型以 *emm4* 與 *emm12* 最多，*emm1* 與 *emm22* 次之，其它 6 個 *emm* 基因型各只有 1 或 2 株菌株。

**Vir 分型：**以 long-PCR 增幅 182 株 Vir regulon 區域之 DNA，再分別使用 *HaeIII* 切割 DNA，得到 19 種圖譜(圖四)，以 *HinfI* 切割 DNA 得到 18 種圖譜(圖五)，結合兩種酵素所得之結果，共得到 20 個 VT 型別。*HaeIII* 所得之圖譜較單純，比對容易，*HinfI* 切割之 DNA 片段雖然較多，但很難使用瓊膠將 DNA 片斷加以分開，造成比對困難。20 個 VT 型別中，以 VT4 (70 株)和 VT6 (61 株)最多，VT1 (12 株)和 VT22 (13 株)次之，VT3 有 7 株，其它 VT 型別只有 1-2 株(表一)。Vir 分型比 *emm* 基因分型更能區分菌株的變化，如 *emm1* 型別又能區分出 3 種 VT 型(VT1、VT1.2、VT2)，*emm4* 區分出 6 種 VT 型(VT3、VT3.2、VT4、VT4.2、VT4.3、VT4.4)，*emm12* 具有 4 種 VT 型(VT6、VT6.2、VT7、VT8、VT9)；*emm* 基因為 Vir regulon 區域的



一部份，相對上整個序列較長的 Vir regulon 會比 *emm* 基因容易顯現出變化會，擁有較多菌株的 *emm1*、*emm4*、*emm12* 基因型，出現數種 VT 型，但 13 株 *emm22* 菌株皆為同一 VT 型(VT9)；*emm1*、*emm4*、*emm12* 雖各出現數個不同 VT 型別菌株，但都有一主要 VT 型別，如 VT1 是 *emm1* 主要型別，VT4 為 *emm4*、VT6 為 *emm12* 之主要型別，次要 VT 型別的菌株除了 *emm4*-VT3 擁有 7 株菌株外，次要 VT 型別菌株大多只有 1-2 株菌株，未來這些次要型別菌株會消失不見，或是會成為未來主要的流行菌株，則需要長時間的觀測。

**PFGE 分型：**182 株菌株中有 173 株能進行 PFGE-*SmaI* 分析，其它 9 株菌株之基因體不被 *SmaI* 作用，因此另外使用 *SfiI* 進行分析。173 株菌株以 *SmaI* 進行分析，得到 27 種 PFGE 圖譜。PFGE 圖譜參照美國疾病管制局 PulseNet (食因性細菌疾病分子分型即時監測網)的規則進行命名，例如 SPYS16.0001 代表 *Streptococcus pyogenes* (SPY)使用 *SmaI* (S16)進行分析之第 1 個(.0001)PFGE 圖譜，PFGE 圖譜利用電腦軟體 BioNumerics 加以分析，常態化後貯存為圖譜資料庫，並輸入菌株的流病基本資料，以利流行病學的研究。圖譜中以 SPYS16.0006 有 70 株菌株最多，SPYS16.0020 (21 株)、SPYS16.0013 (16 株)、SPYS16.0013 (13 株)、SPYS16.0025 (13 株)次之，具 SPYS16.009 圖譜者有 7 株菌株，其它圖譜分別有 1-4 株菌株(圖六)。不同

*emm* 基因型菌株具有不同 PFGE-*Sma*I 圖譜(圖六)；有些具有相同 *emm* 基因的菌株具有不同 PFGE 和不同 VT 型別；有些相同 VT 型別菌株可再區分為數個不同 PFGE-*Sma*I 圖譜(表一、圖六)，例如 *emm*4-VT4 型別菌株中存有 4 種 PFGE-*Sma*I 圖譜(SPYS16.0006, SPYS16.0007, SPYS16.0008, SPYS16.0009)和 1 個 PFGE-*Sfi*I 圖譜(SPYS13.0004)；而有些相同 PFGE-*Sma*I 圖譜菌株則為不同 VT 型別(表一、圖六)，例如 SPYS16.0006 即有 5 種 VT 型別(VT3、VT4、VT4.2、VT4.4、VT15)，指出 PFGE 之分型效力雖優於 Vir 分型，但 Vir 分型能偵測到小區域的 Vir regulon (5-8 kb)所發生的變化，可彌補 PFGE 只能偵測到基因體大片段 DNA 改變的缺點；173 株菌株被區分成 27 種 PFGE-*Sma*I 型別，18 種 VT 型別，若結合 PFGE 與 Vir 分型可得到 37 種分子型別(圖六)，因此結合兩種分型法，可增強對 A 型鏈球菌之基因型分型能力。

PFGE-*Sma*I 無法分析的 9 株菌株，可用 *Sfi*I 進行分析，共得到 6 種 PFGE-*Sfi*I 圖譜，6 株 *emm*12-VT6 菌株分為 3 個型別，3 株不同 *emm*-VT 型別菌株，也各有其 PFGE-*Sfi*I 圖譜(圖七)。Cocuzza 等人(1997)曾報告有 A 型鏈球菌之 DNA 不受 *Sma*I 切割的情形，這些菌株同時與 tetracycline 的抗藥性性狀連鎖，推測 *Sma*I 的甲基化酵素(methylase)基因與 tetracycline 抗藥性基因共同存在噬菌體(phage)或質體(plasmid)上，被引入菌體內，造成 *Sma*I

切割點的甲基化。這些菌株是否為流行菌株被攜有 *SmaI* methylase 的噬菌體或質體感染而來，或另有演化來源，有待進一步加以探討。

**菌株親緣關係：**以 173 株 PFGE-*SmaI* 圖譜建構了菌株親緣關係圖，以 60% 相同度為切點值 (cut off value)，形成六個群組 (clusters)，即群組 A-F (見圖六)。組成群組之菌株與 *emm* 基因型有關，群組 A 有 14 株菌株，皆為 *emm22* 菌株；群組 B 有 83 株菌株，包括 82 株 *emm4* 菌株與 1 株無 *emm* 基因之菌株 (Sp9414)，此群組有 6 種 VT 型別 (VT3, VT3.2, VT4, VT4.2, VT4.4, VT15)；群組 C 有 21 株 *emm12* 菌株，皆屬 VT6；群組 D 有 37 株 *emm12* 菌株，有 4 種 VT 型別 (VT6, VT6.2, VT7, VT8)；群組 E 有 2 株 *emm6* 菌株；群組 F 有 14 株 *emm1* 菌株，3 種 VT 型別 (VT1, VT1, VT2)。此菌株親緣關係圖指出，相同 *emm* 家族之菌株大多位於同一群組內，例如 *emm22* (群組 A)、*emm4* (群組 B)、*emm1* (群組 F)，但 *emm12* 菌株則存在兩個群組中 (群組 C 與 D)，而稀有的 *emm* 菌株則各自獨立於這些群組之外，不同 *emm* 菌株間最高相同度只有 50% (*emm74* vs. *stck249*)；*emm12* 菌株分佈於兩個群組，兩群組間相同度只有 37%，推測兩 *emm12* 群組有不同演化來源。

PFGE 偵測細菌整個基因體結構的變化，細菌基因體 DNA 序列排列順序的變化相當快，所以 PFGE 是目前研究細菌短期演化最好的分子分型工具。本研究以 PFGE-*SmaI* 圖譜建構了菌株親緣關係圖，發現相同 *emm* 菌株

間的親緣關係皆比其它不同 *emm* 菌株密切，菌株數目較多的 *emm1*、*emm4*、*emm12* 和 *emm22* 菌株，基因體皆顯現相當程度的演化，有些相同 *emm* 菌株間的差異已達 40% (圖六)，顯示這些族群已在這個地區存在一段時間了。PFGE 分型資料比 VT 資料更能表現菌株演化的程度，除了理論上 PFGE 偵測到的是整個基因體結構上的變化，而 Vir 分型得到的只是 5-8 kb 大小的 DNA 片段的變化外，*emm22* 菌株只存在一種 VT 型，但有 6 種 PFGE 圖譜，更支持 PFGE 在菌株親緣性分析上較 Vir 分型好，但因 Vir 分型可分析 A 型鏈球菌多變的 Vir regulon 的變化，可增強 A 型鏈球菌基因分型的能力，所以 Vir 分型與 PFGE 一樣，在 A 型鏈球菌的分子流行病學研究上，皆有很大應用價值。

## 結論與建議

本研究使用 PFGE、*emm* 基因分型與 Vir 分型分析引發中部地區猩紅熱之 A 型鏈球菌，建構菌株基因型別及其圖譜資料庫，所建立的分子分型方法與所貯存之圖譜資料，可用於研究 A 型鏈球菌分子流行病學，也能用建立分子分型監測網，用於監測 A 型鏈球菌的即時流行動態，特別是自 2000 年開始，疾病管制局(本局)接獲通報的猩紅熱案例增加了 2 倍，至 2002 年底，通報的案例持續增加，2002 年各地醫院醫師也反應侵襲性 A 型鏈球菌感染的重症案件增加非常多，相當多案例引發中毒性休克(toxic shock syndrome)死亡，也常有非中毒性休克而死亡的案例，因此建議本局要加以嚴密監測。疾病的形成，是寄主(host)、病原(pathogen)、與環境(environment)相互作用的結果，而對病原進行分析，探討病原在疾病形成中所扮演的角色，是本局的責任。本計畫所建立的方法可應用於監測 A 型鏈球菌之流行動態，探討疾病增加的原因，建議本局以本計畫所發展之快速 PFGE、*emm* 基因定序、Vir 分型方法，分析 2000-2002 年引發猩紅熱之 A 型鏈球菌，探討猩紅熱病例增加之可能原因，並對侵襲性 A 型鏈球菌感染的案件加以監控，收集菌株進行基因型別分析，並成立超抗原毒素(superantigen)檢驗實驗室，檢驗病人血液中毒素，追查造成嚴重案件之原因。

PFGE 經十數年來的應用，證明是研究細菌性疾病流行病學很有用的工具，然而 PFGE 的操作費時、費人力、且成本花費高，許多實驗室在操作

PFGE 時，經常遭受挫折，特別是革蘭氏菌的 PFGE，更被視為畏途。今經研究者的努力，已發展出快速的 A 型鏈球菌 PFGE 標準操作方法，並組裝清洗膠塊的半自動化機器，可加快操作時間，減輕人力負擔，增強快速處理大量樣品的能力。因此，此標準化的 A 型鏈球菌 PFGE 方法，可以成為實驗室例行性分析 A 型鏈球菌的工具。本局明年(2004 年)開始，將建立「台灣細菌病原實驗室分子分型即時監測網—PulseNet Taiwan」，對 *Shigella sonnei*、*Neisseria meningitidis* 等病原進行即時性的監控，由於 A 型鏈球菌 PFGE 技術的突破，此監測網可加入 A 型鏈球菌，針對侵襲性 A 型鏈球菌感染重症，進行即時性的分析，串連病例間的流病關係，因此建議本局將侵襲性 A 型鏈球菌感染重症所分離之菌株列入 2004 年開始之「台灣細菌病原實驗室分子分型即時監測網」監測項目，以進行專業化的疾病監測。

PFGE 圖譜必須依賴電腦軟體進行分析與比對，並與菌株流病背景資料結合，建立菌株 DNA 指紋圖譜資料庫。在 PFGE 的操作上，已有標準化的方法，一般人經過幾個月的訓練即能熟練此技術，但圖譜的分析則必需有電腦專業人員與專門負責某一菌株圖譜分析的人共同的合作，累積經驗，本局在 1999 年成立後，負責實驗室的部門嚴重萎縮，人力不足，加上高級專業人才晉用管道已被封閉，所建立的任何專業化防疫系統很難有效運作與維持，本局有必要突破人才晉用法令，補充實驗室之專業人才，才能應

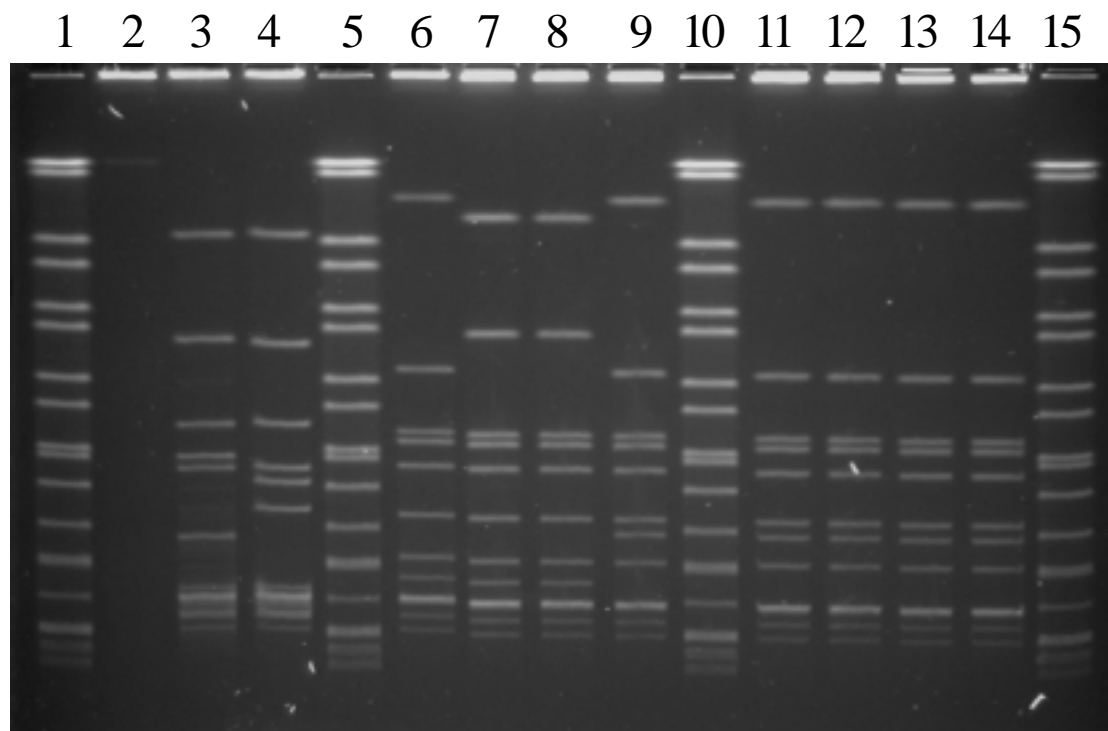
付日漸複雜的傳染病防治工作。

## 參考文獻

1. Beall B, Facklam R, Thompson T: Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34:953-8.
2. Chiou CS, Hsu SY, Chiu SI: *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as the cause of the unusually high incidence of foodborne disease outbreaks in Taiwan, 1996-1999. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4621-5.
3. Cocuzza CE, Mattina R, Mazzariol A: High incidence of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Monza (North Italy) in untreated children with symptoms of acute pharyngo-tonsillitis: an epidemiological and molecular study. *Microb Drug Resist* 1997; 3:371-8.
4. Gardiner DL, Hartas J, Currie B: Vir typing: a long-PCR typing method for group A streptococci. *PCR Methods Applications* 1995; 4:288-93.
5. Graves LM, Swaminathan B: PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 2001; 65:55-62.
6. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K: Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1889-94.
7. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB: PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:382-9.
8. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.



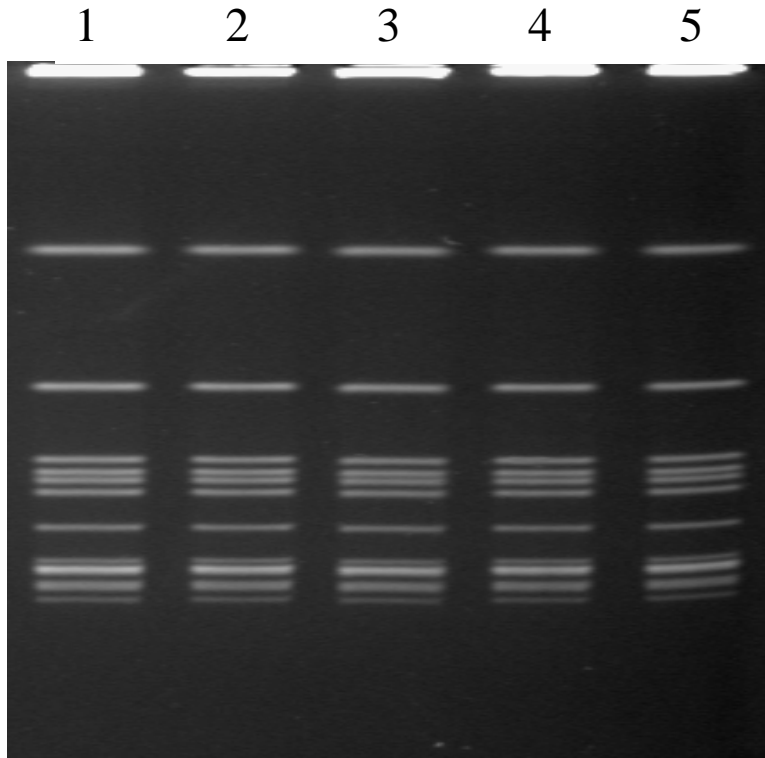
## 圖表



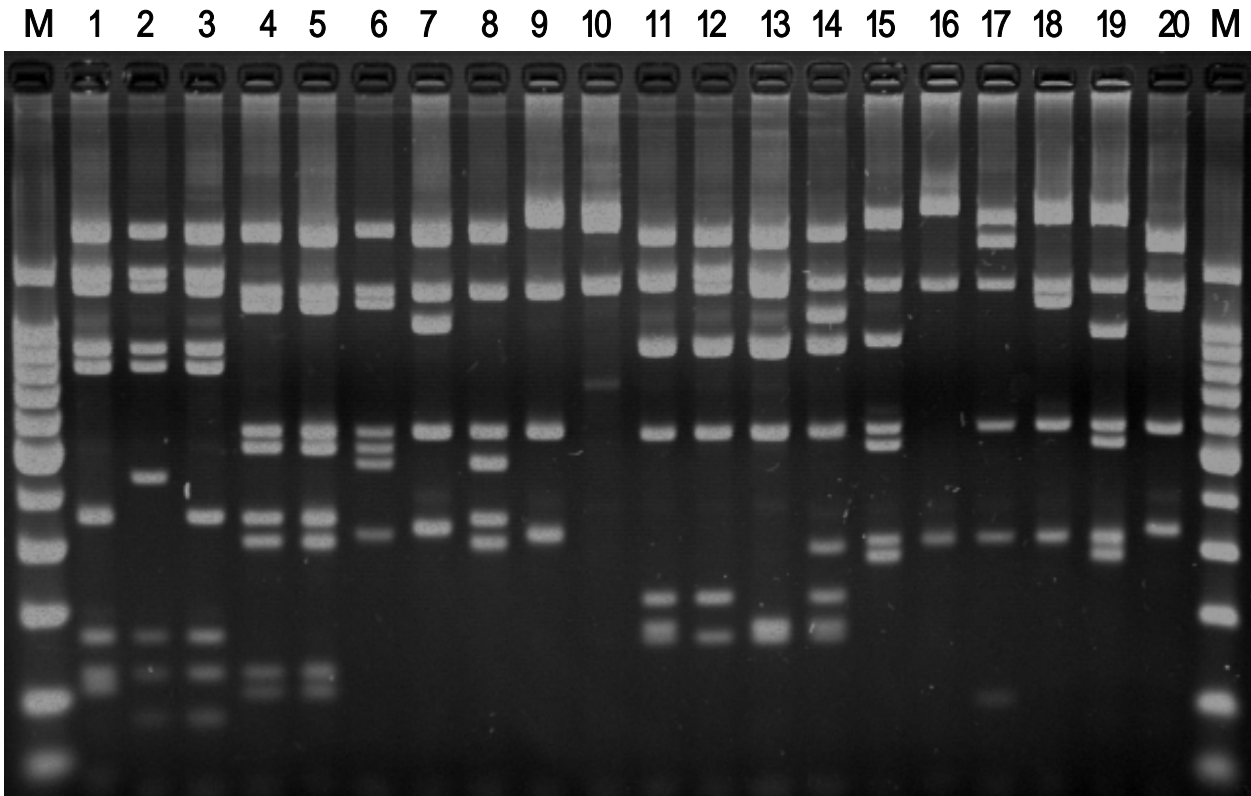
圖一：*Streptococcus pyogenes* 之 PFGE 圖譜，係使用標準化 *Listeria monocytogenes* PFGE 操作方法進行分析，Bio-Rad CHEF Mapper 脈衝式電泳儀，pulse time 4 s → 40 s, angle 120° ; voltage 200 V, 19 小時為跑膠條件。第 1、5、10、15 行為標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割 DNA 之圖譜，其餘為分離自台灣中部地區猩紅熱病人之 *S. pyogenes* 菌株，以 *Sma*I 酵素切割，第 2 行菌株之 DNA 不受 *Sma*I 酵素切割。



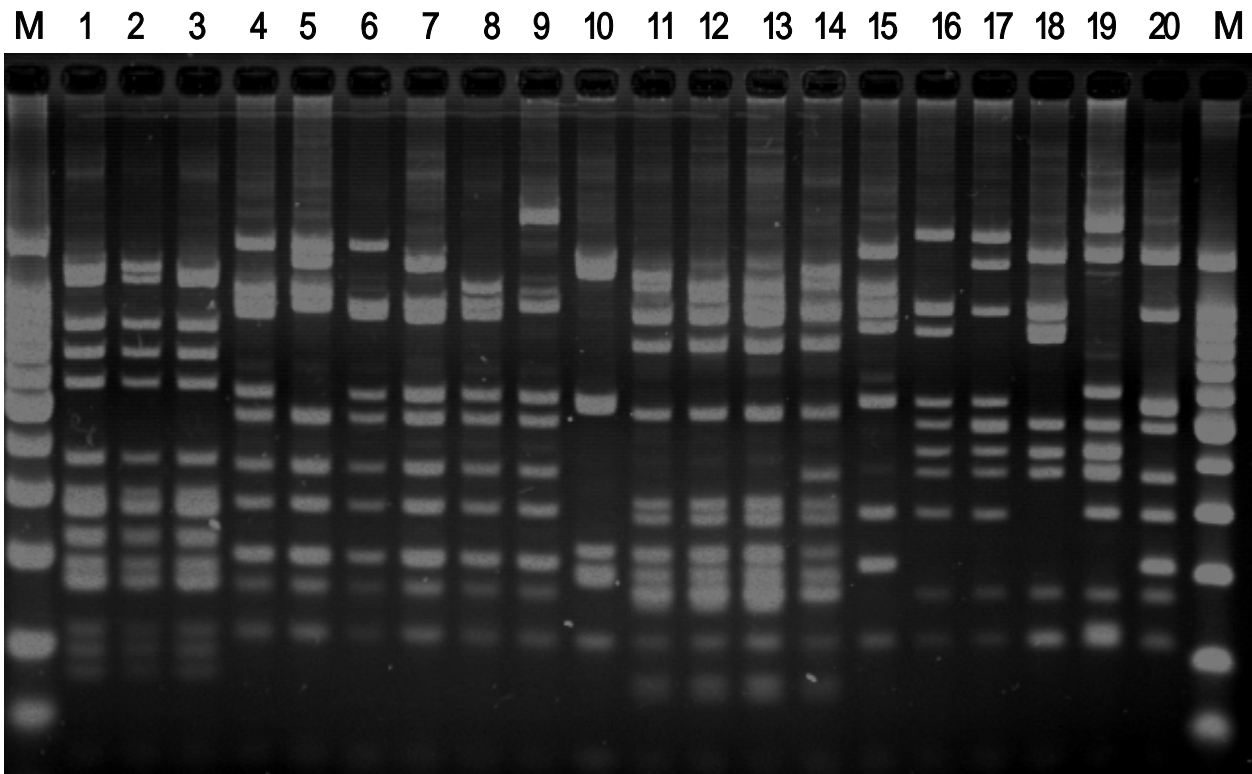
圖二：Lewis Taiwan No. 1 膠塊清洗機，由實驗室自行組製，一次可清洗 30 個以上樣本，清洗時間由原需 4 小時縮短至 1 小時，也增加處理樣本數的能力，得到之 DNA 品質優於手工方法清洗者。



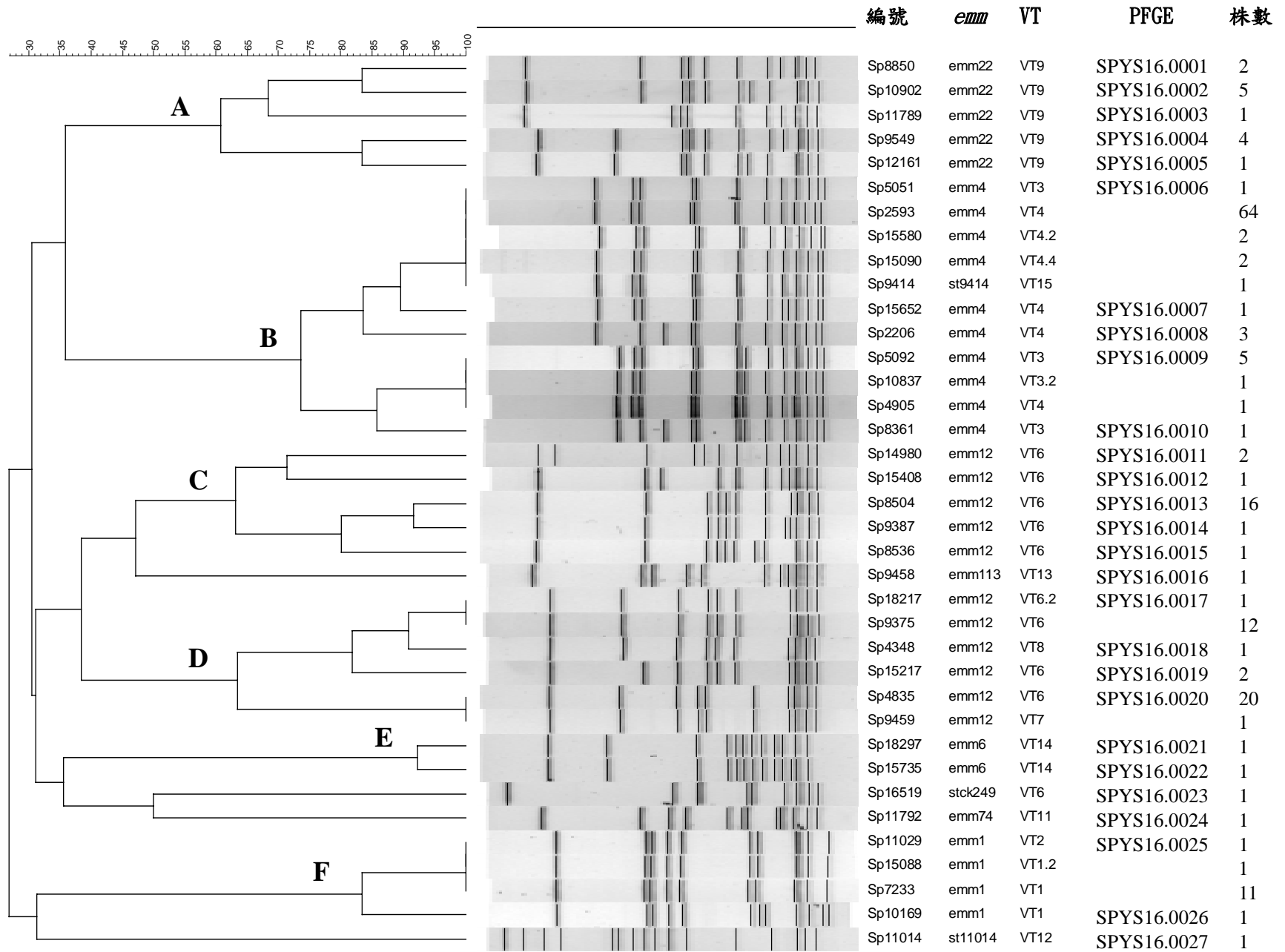
圖三：限制酵素使用量測試，第 1-5 行是 *Streptococcus pyogenes* SP10282 分別以 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 單位 *Sma*I 切割之 PFGE 圖譜，此測試證明若 DNA 品質好，低至 0.3125 單位的酵素即足夠。



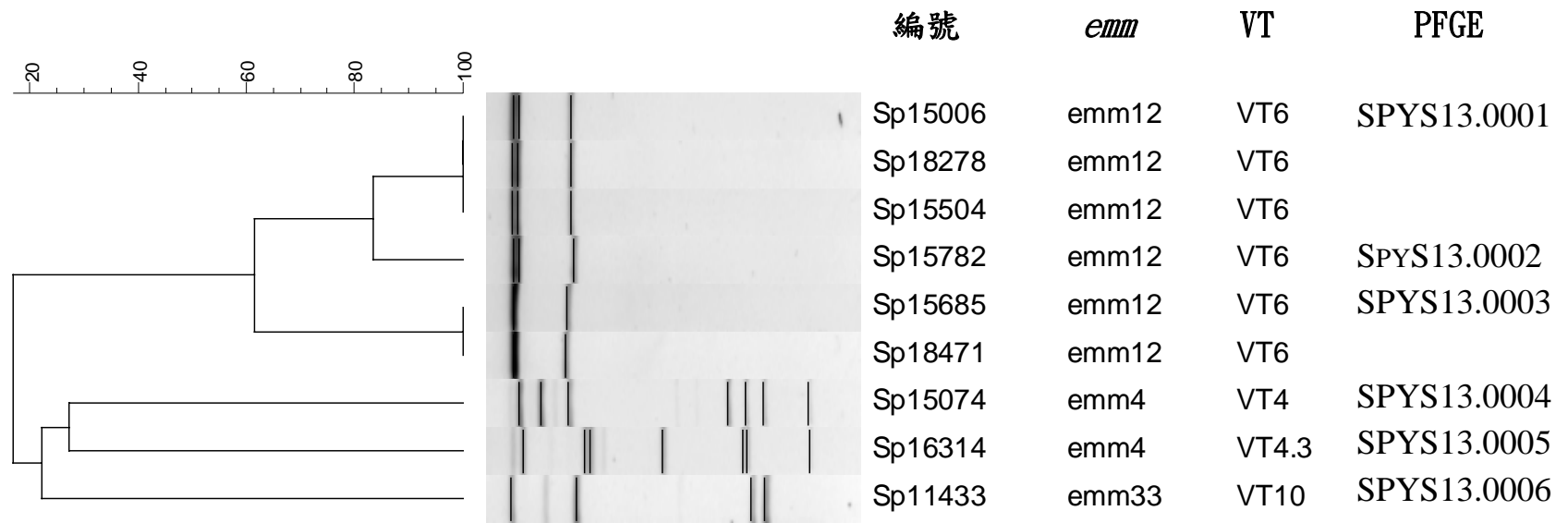
四、VT-*HaeIII* 圖譜。Vir regulon 區域之 DNA 以 long-PCR 增幅，再經 *HaeIII* 限制酵素作用後，以 2% 瓊膠分離 DNA 片斷，所得之圖譜。M 為 100-bp ladders，圖譜分別來自菌株 1, Sp7233 (VT1, *emm1*); 2, Sp15088 (VT1.2, *emm1*); 3, Sp11029 (VT2, *emm1*); 4, Sp5051 (VT3, *emm4*); 5, Sp10837 (VT3.2, *emm4*); 6, Sp15066 (VT4, *emm4*); 7, Sp15580 (VT4.2, *emm4*); 8, Sp16314 (VT4.3, *emm4*); 9, Sp15581 (VT4.4, *emm4*); 10, Sp15735 (VT14, *emm6*); 11, Sp15459 (VT6, *emm12*); 12, Sp18217 (VT6.2, *emm12*); 13, Sp9459 (VT7, *emm12*); 14, Sp4348 (VT8, *emm12*); 15, Sp8850 (VT9 *emm22*); 16, Sp11433 (VT10, *emm33*); 17, Sp11792 (VT11, *emm74*); 18, Sp11014 (VT12, *st11014*); 19, Sp9458 (VT13, *emm113*); 20, Sp9414 (VT15; -)。



圖五、VT-*HinfI* 圖譜。Vir regulon 區域之 DNA 以 long-PCR 增幅，再經 *HinfI* 限制酶作用後，以 2.5% 瓊膠分離 DNA 片斷，所得之圖譜。M 為 100-bp ladders，圖譜分別來自菌株 1, Sp7233 (VT1, *emm1*); 2, Sp15088 (VT1.2, *emm1*); 3, Sp11029 (VT2, *emm1*); 4, Sp5051 (VT3, *emm4*); 5, Sp10837 (VT3.2, *emm4*); 6, Sp15066 (VT4, *emm4*); 7, Sp15580 (VT4.2, *emm4*); 8, Sp16314 (VT4.3, *emm4*); 9, Sp15581 (VT4.4, *emm4*); 10, Sp15735 (VT14, *emm6*); 11, Sp15459 (VT6, *emm12*); 12, Sp18217 (VT6.2, *emm12*); 13, Sp9459 (VT7, *emm12*); 14, Sp4348 (VT8, *emm12*); 15, Sp8850 (VT9 *emm22*); 16, Sp11433 (VT10, *emm33*); 17, Sp11792 (VT11, *emm74*); 18, Sp11014 (VT12, *st11014*); 19, Sp9458 (VT13, *emm113*); 20, Sp9414 (VT15; -)。



圖六、根據 PFGE-*Sma*I 圖譜建構之 A 型鏈球菌親緣關係圖(dendrogram)，圖後為代表菌株編號，*emm*、VT、PFGE 型別與此分子型別之菌株數。親緣關係圖系以 Jaccard's similarity matrix 方法計算 DNA 條帶(bands)之相同率，以 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)演算法建構關係圖。



圖七、根據 PFGE-*Sfi*I 圖譜建構之 9 株 A 型鏈球菌親緣關係圖(dendrogram)，圖後為代表菌株編號，*emm*、VT、PFGE 型別。此 9 株菌株 DNA 不受 *Sma*I 切割 PFGE-*Sma*I 分析。親緣關係圖系以 Jaccard's similarity matrix 方法計算 DNA 條帶(band)之相同率，以 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)演算法建構關係圖。



表一：emm、VT 與 PFGE 型別，與其分子型別之菌株數。

emm 型別	VT 型別	PFGE 型別	菌株數	
emm1	VT1	<u>SPYS16.0025</u> <sup>a</sup> , SPYS16.0026	12	
	VT1.2	SPYS16.0025 <sup>a</sup>	1	
	VT2	SPYS16.0025 <sup>a</sup>	1	
emm4	VT3	<u>SPYS16.0006</u> <sup>b</sup> , <u>SPYS16.0009</u> <sup>c</sup> , SPYS16.0010	7	
	VT3.2	SPYS16.0009 <sup>c</sup>	1	
	VT4	<u>SPYS16.0006</u> <sup>b</sup> , SPYS16.0007, SPYS16.0008, <u>SPYS16.0009</u> <sup>c</sup> , SPYS13.0004	70	
	VT4.2	SPYS16.0006 <sup>b</sup>	2	
	VT4.3	SPYS13.0005	1	
	VT4.4	SPYS16.0006 <sup>b</sup>	2	
	emm6	VT14	SPYS16.0021, SPYS16.0022	2
emm12	VT6	SPYS16.0011, SPYS16.0012, SPYS16.0013, SPYS16.0014, SPYS16.0015, <u>SPYS16.0017</u> <sup>d</sup> , SPYS16.0019, <u>SPYS16.0020</u> <sup>e</sup> , SPYS13.0001, SPYS13.0002, SPYS13.0003	61	
	VT6.2	<u>SPYS16.0017</u> <sup>d</sup>	1	
	VT7	<u>SPYS16.0020</u> <sup>e</sup>	1	
	VT8	SPYS16.0018	1	
	emm22	VT9	SPYS16.0001, SPYS16.0002, SPYS16.0003, SPYS16.0004, SPYS16.0005	13
		VT10	SPYS13.0003	1
emm74	VT11	SPYS16.0024	1	
emm113	VT13	SPYS16.0016	1	
st11014	VT12	SPYS16.0027	1	
stck249	VT6	SPYS16.0023	1	
-	VT15	<u>SPYS16.0006</u> <sup>b</sup>	1	

a, b, c, d, e, f 各標示相同 PFGE 圖譜出現在不同 VT 型組內。

**附錄 A. PFGE Codes for Restriction Enzymes (A). **Bolded Entries** designate restriction enzymes currently used for PFGE subtyping of Foodborne bacterial pathogens. (Enzyme) indicates the isoschizomer (restriction enzyme that recognizes the same sequence).**

<i>Aat</i> I ( <i>Stu</i> I)	
<i>Aat</i> II	A01
<i>Acc</i> I	A02
<i>Acc</i> II ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Acc</i> III ( <i>Mro</i> I)	
<i>Acc</i> 65 I ( <i>Asp</i> 718)	
<i>Aci</i> I	A03
<i>Acs</i> I ( <i>Apo</i> I)	
<i>Acy</i> I	A04
<i>Afl</i> I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Afl</i> II ( <i>Bfr</i> I)	
<i>Afl</i> III	A05
<i>Age</i> I	A06
<i>Aha</i> II ( <i>Acy</i> I)	
<i>Aha</i> III ( <i>Dra</i> I)	
<i>Ahd</i> I	A07
<i>Alu</i> I	A08
<i>Alw</i> I	A09
<i>Alw</i> 26 I	A10
<i>Alw</i> 44 I ( <i>Apa</i> L I)	
<i>Alw</i> N I	A11
<i>Aoc</i> I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Aos</i> I ( <i>Avi</i> II)	
<i>Apa</i> I	A12
<i>Apa</i> L I	A13

<i>Apo</i> I	A14
<i>Apy</i> I	A15
<b><i>Asc</i> I</b>	A16
<i>Ase</i> I ( <i>Asn</i> I)	
<i>Asn</i> I	A17
<i>Asp</i> I	A18
<i>Asp</i> 700	A19
<i>Asp</i> 718	A20
<i>Asp</i> E I	A21
<i>Asp</i> H I	A22
<i>Asu</i> II ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Ava</i> I	A23
<i>Ava</i> II	A24
<i>Avi</i> II	A25
<i>Avr</i> II ( <i>Bln</i> I)	A26
<i>Axy</i> I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Bal</i> I	B01
<i>Bam</i> H I	B02
<i>Ban</i> I	B03
<i>Ban</i> II	B04
<i>Ban</i> III ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bbe</i> I ( <i>Nar</i> I)	
<i>Bbr</i> P I ( <i>Pml</i> I)	
<i>Bbs</i> I ( <i>Bpu</i> A I)	
<i>Bbu</i> I ( <i>Sph</i> I)	

<i>Bbv</i> I	B05
<i>Bcg</i> I	B06
<i>Bcl</i> I	B07
<i>Bcn</i> I ( <i>Nci</i> I)	
<i>Bco</i> I ( <i>Ava</i> I)	
<i>Bfa</i> I	B08
<i>Bfr</i> I	B09
<i>Bgl</i> I	B10
<i>Bgl</i> II	B11
<b><i>Bln</i> I</b> ( <i>Avr</i> II)	A26
<i>Blp</i> I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Bme</i> 18 I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Bmy</i> I	B12
<i>Bpm</i> I	B13
<i>Bpu</i> 1102 I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Bpu</i> A I	B14
<i>Bsa</i> I	B15
<i>Bsa</i> A I	B16
<i>Bsa</i> B I	B17
<i>Bsa</i> H I	B18
<i>Bsa</i> J I	B19
<i>Bsa</i> M I ( <i>Bsm</i> I)	
<i>Bsa</i> W I	B20
<i>Bsc</i> I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bse</i> A I ( <i>Mro</i> I)	

PFGE Codes for Restriction Enzymes (B)

<i>Bse</i> P I ( <i>Bss</i> H II)	
<i>Bse</i> R I	B21
<i>Bsg</i> I	B22
<i>Bsh</i> I ( <i>Hae</i> III)	
<i>Bsh</i> 1236 I ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Bsi</i> C I ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Bsi</i> E I	B23
<i>Bsi</i> HKAI	B24
<i>Bsi</i> L I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Bsi</i> M I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsi</i> W I	B25
<i>Bsi</i> X I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsi</i> Y I	B26
<i>Bsl</i> I	B27
<i>Bsm</i> I	B28
<i>Bsm</i> B I	B29
<i>Bsm</i> F I	B30
<i>Bso</i> B I	B31
<i>Bsp</i> 13 I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsp</i> 50 I ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Bsp</i> 106 I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsp</i> 120 I ( <i>Apa</i> I)	
<i>Bsp</i> 143 I ( <i>Hae</i> II)	
<i>Bsp</i> 1286 I ( <i>Bmy</i> I)	
<i>Bsp</i> 1407 I ( <i>Ssp</i> B I)	
<i>Bsp</i> 1720 I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Bsp</i> C I ( <i>Pvu</i> I)	
<i>Bsp</i> D I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsp</i> E I ( <i>Mro</i> I)	

<i>Bsp</i> H I	B32
<i>Bsp</i> LU 11 I	B33
<i>Bsp</i> M I	B34
<i>Bsp</i> M II ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsp</i> X I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsr</i> I	B35
<i>Bsr</i> B I	B36
<i>Bsr</i> D I	B37
<i>Bsr</i> F I	B38
<i>Bsr</i> G I	B39
<i>Bss</i> G I ( <i>Bst</i> X I)	
<i>Bss</i> H II	B40
<i>Bss</i> K I	B41
<i>Bss</i> S I	B42
<i>Bst</i> I ( <i>Bam</i> H I)	
<i>Bst</i> 1107 I	B43
<i>Bst</i> B I ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Bst</i> E II	B44
<i>Bst</i> N I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Bst</i> O I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Bst</i> P I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Bst</i> U I ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Bst</i> X I	B45
<i>Bst</i> Y I ( <i>Xho</i> II)	
<i>Bsu</i> 15 I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsu</i> 23 I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsu</i> 36 I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Bsu</i> R I ( <i>Hae</i> III)	
<i>Cac</i> 8 I	C01

<i>Cel</i> II	C02
<i>Cfo</i> I ( <i>Hha</i> I)	
<i>Cfr</i> I ( <i>Eae</i> I)	
<i>Cfr</i> 9 I ( <i>Sma</i> I)	
<i>Cfr</i> 10 I	C03
<i>Cla</i> I	C04
<i>Cpo</i> I ( <i>Rsr</i> II)	
<i>Csp</i> I ( <i>Rsr</i> II)	
<i>Csp</i> 6 I ( <i>Rsa</i> I)	
<i>Csp</i> 45 I ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Cvn</i> I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Dde</i> I	D01
<i>Dpn</i> I	D02
<i>Dpn</i> II ( <i>Sau</i> 3A I)	
<i>Dra</i> I	D03
<i>Dra</i> II	D04
<i>Dra</i> III	D05
<i>Drd</i> I	D06
<i>Dsa</i> I	D07
<i>Dsa</i> V ( <i>Scr</i> F I)	
<i>Eae</i> I	E01
<i>Eag</i> I	E02
<i>Eam</i> 1105 I ( <i>Asp</i> E I)	
<i>Ear</i> I	E03
<i>Ecl</i> 136 II ( <i>Sac</i> I)	
<i>Ecl</i> X I ( <i>Eag</i> I)	
<i>Eco</i> 47 I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Eco</i> 47 III	E04
<i>Eco</i> 57 I	E05

PFGE Codes for Restriction Enzymes (C)

<i>Eco</i> 81 I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Eco</i> 88 I ( <i>Ava</i> I)	
<i>Eco</i> 91 I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Eco</i> 130 I ( <i>Sty</i> I)	
<i>Eco</i> ICR I ( <i>Sac</i> I)	
<i>Eco</i> N I	E06
<i>Eco</i> O65 I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Eco</i> O109 I ( <i>Dra</i> II)	
<i>Eco</i> R I	E07
<i>Eco</i> R II ( <i>Apy</i> I)	
<i>Eco</i> R V	E08
<i>Eco</i> T14 I ( <i>Sty</i> I)	
<i>Eco</i> T22 I ( <i>Nsi</i> I)	
<i>Ehe</i> I ( <i>Nar</i> I)	
<i>Esp</i> I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Fdi</i> II ( <i>Avi</i> II)	
<i>Fnu</i> 4H I	F01
<i>Fnu</i> D II ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Fok</i> I	F02
<i>Fse</i> I	F03
<i>Fsp</i> I ( <i>Avi</i> II)	
<i>Fsp</i> II ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Hae</i> II	H01
<i>Hae</i> III	H02
<i>Hap</i> II ( <i>Hpa</i> II)	
<i>Hga</i> I	H03
<i>Hgi</i> A II ( <i>Asp</i> H I)	
<i>Hha</i> I	H04
<i>Hin</i> 6 I ( <i>Hha</i> I)	

<i>Hinc</i> II	H05
<i>Hind</i> II ( <i>Hinc</i> II)	
<i>Hind</i> III	H06
<i>Hinf</i> I	H07
<i>Hin</i> P1 I ( <i>Hha</i> I)	
<i>Hpa</i> I	H08
<i>Hpa</i> II	H09
<i>Hph</i> I	H10
<i>Ita</i> I ( <i>Fnu</i> 4H I)	
<i>Kas</i> I ( <i>Nar</i> I)	
<i>Kpn</i> I ( <i>Acc</i> 65 I)	K02
<i>Kpn</i> 2 I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Ksp</i> I ( <i>Sac</i> II)	
<i>Ksp</i> 632 I	K01
<i>Mae</i> I	M01
<i>Mae</i> II	M02
<i>Mae</i> III	M03
<i>Mam</i> I	M04
<i>Mbo</i> I ( <i>Sau</i> 3A I)	
<i>Mbo</i> II	M05
<i>Mfe</i> I ( <i>Mun</i> I)	
<i>Mfl</i> I ( <i>Xho</i> II)	
<i>Mlu</i> I	M06
<i>Mlu</i> N I ( <i>Bal</i> I)	
<i>Mnl</i> I	M07
<i>Mro</i> I	M08
<i>Msc</i> I ( <i>Bal</i> I)	
<i>Mse</i> I	M09
<i>Msl</i> I	M10

<i>Msp</i> I ( <i>Hpa</i> II)	
<i>Msp</i> A1 I	M11
<i>Mst</i> I ( <i>Avi</i> II)	
<i>Mst</i> II ( <i>Sau</i> I)	
<i>Mun</i> I	M12
<i>Mva</i> I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Mvn</i> I	M13
<i>Mwo</i> I	M14
<i>Nae</i> I	N01
<i>Nar</i> I	N02
<i>Nci</i> I	N03
<i>Nco</i> I	N04
<i>Nde</i> I	N05
<i>Nde</i> II ( <i>Sau</i> 3A I)	
<i>Ngo</i> A IV ( <i>Nae</i> I)	
<i>Ngo</i> M I ( <i>Nae</i> I)	
<i>Nhe</i> I	N06
<i>Nla</i> III	N07
<i>Nla</i> IV	N08
<i>Not</i> I	N09
<i>Nru</i> I	N10
<i>Nsi</i> I	N11
<i>Nsp</i> I	N12
<i>Nsp</i> II ( <i>Bmy</i> I)	
<i>Nsp</i> III ( <i>Ava</i> I)	
<i>Nsp</i> V ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Nsp</i> H I ( <i>Nsp</i> I)	
<i>Num</i> II ( <i>Nar</i> I)	
<i>Oxa</i> N I ( <i>Sau</i> I)	

PFGE Codes for Restriction Enzymes (D)

<i>Pac</i> I	P01
<i>Pae</i> R7 I	P02
<i>Pal</i> I ( <i>Hae</i> III)	
<i>Pfl</i> M I	P03
<i>Pin</i> A I ( <i>Age</i> I)	
<i>Ple</i> I	P04
<i>Pma</i> C I ( <i>Pml</i> I)	
<i>Pme</i> I	P05
<i>Pml</i> I	P06
<i>Ppu</i> 10 I ( <i>Nsi</i> I)	
<i>Ppu</i> M I	P07
<i>Psh</i> A I	P08
<i>Psp</i> 1406 I	P09
<i>Psp</i> A I ( <i>Sma</i> I)	
<i>Psp</i> E I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Pss</i> I ( <i>Dra</i> II)	
<i>Pst</i> I	P10
<i>Pvu</i> I	P11
<i>Pvu</i> II	P12
<i>Rca</i> I ( <i>Bsp</i> H I)	
<i>Rsa</i> I	R01
<i>Rsp</i> X I ( <i>Bsp</i> H I)	
<i>Rsr</i> II	R02
<i>Sac</i> I	S01
<i>Sac</i> II	S02
<i>Sal</i> I	S03
<i>Sap</i> I	S04
<i>Sau</i> I	S05
<i>Sau</i> 3A I	S06

<i>Sau</i> 96 I	S07
<i>Sca</i> I	S08
<i>Scr</i> F I	S09
<i>Sex</i> A I	S10
<i>Sfa</i> N I	S11
<i>Sfc</i> I	S12
<i>Sfi</i> I	S13
<i>Sfu</i> I	S14
<i>Sgr</i> A I	S15
<i>Sin</i> I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Sma</i> I	S16
<i>Sna</i> B I	S17
<i>Sno</i> I ( <i>Apa</i> L I)	
<i>Spe</i> I	S18
<i>Sph</i> I	S19
<i>Spl</i> I ( <i>Bsi</i> W I)	
<i>Spo</i> I ( <i>Nru</i> I)	
<i>Ssp</i> I	S20
<i>Ssp</i> B I	S21
<i>Sst</i> I ( <i>Sac</i> I)	
<i>Sst</i> II ( <i>Sac</i> II)	
<i>Stu</i> I	S22
<i>Sty</i> I	S23
<i>Sun</i> I ( <i>Bsi</i> W I)	
<i>Swa</i> I	S24
<i>Tai</i> I	T01
<i>Taq</i> I	T02
<i>Tfi</i> I	T03
<i>Tha</i> I ( <i>Mvn</i> I)	

<i>Tru</i> 91 I ( <i>Mse</i> I)	
<i>Tse</i> I	T04
<i>Tsp</i> 45 I	T05
<i>Tsp</i> 509 I	T06
<i>Tsp</i> R I	T07
<i>Tth</i> 111 I ( <i>Asp</i> I)	
<i>Tth</i> HB8 I ( <i>Taq</i> I)	
<i>Van</i> 91 I ( <i>Pfl</i> M I)	
<i>Vsp</i> I ( <i>Asn</i> I)	
<b><i>Xba</i> I</b>	X01
<i>Xcm</i> I	X02
<i>Xho</i> I	X03
<i>Xho</i> II	X04
<i>Xma</i> I ( <i>Sma</i> I)	
<i>Xma</i> III ( <i>Eag</i> I)	
<i>Xmn</i> I ( <i>Asp</i> 700)	
<i>Xor</i> II ( <i>Pvu</i> I)	