

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學研究所

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥基因分型

Typing of Fusidic Acid Resistance Determinants
in *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates

張雅淳

Ya-Chun Chang

指導教授：鄧麗珍 教授

Advisor : Lee-Jene Teng, Professor

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

誌謝

碩班生活轉眼兩年一下就過去了，謝謝陪我一起走過的你們！

首先謝謝我的指導老師 鄧麗珍老師，提供給我一個很好的實驗環境，讓我可以無憂無慮的進行實驗，並且在我實驗遇到瓶頸的時候，沒有給我壓力，給予我建議和關心，讓我可以順利完成我的實驗；在實驗之外讓日本學生到我們實驗室當交換學生，讓我有與外國學生互相交流的機會，開拓我的視野，使我碩班兩年生活更多采多姿。也謝謝口試委員對我論文的建議與指正。

再來謝謝 R438 和 R440 的實驗室成員們，感謝 嵩斌學長、小然學姐、鈞鈞學姐和瑜姿給予我在實驗上的幫助與建議，教導我實驗的技巧；感謝蘋果學姐總是能像姐姐一樣的照顧我，陪我一起去學瑜珈，有好吃的總是不忘記留給我一份；感謝紅思、育婷、緯儒、柏煜一起帶實驗、一起騎腳踏車、打羽球、吃美食和玩樂。

謝謝我的所有朋友們，一起考上研究所的大學室友和國中同學、在台大工作的同學或是以前工作的同事們，總能在我心情不好的時候給我加油，讓我找到前進的力量。

最後要感謝我的媽媽，是我最有力的後盾，不管是大學畢業之後先去工作，或是工作之後再跑回來讀碩班，總是能支持我的決定，鼓勵我踏出每一步。

中文摘要

夫西地酸 (fusidic acid) 為類固醇類抗生素，藉由與 EF-G-GTP/GDP-ribosome 結合，使 EF-G/GDP 無法離開 ribosome，抑制細菌蛋白質的合成，臨床上主要用於治療葡萄球菌引起的皮膚感染和較為嚴重的全身性症狀。細菌可經由藥物作用的標的基因產生突變 (*fusA* 或 *rplF* 點突變) 或表現保護藥物作用標的之蛋白質 (FusB-protein family) 來產生抗藥性。之前研究發現表皮葡萄球菌的 *fusB* 位在 phage-related resistance island 中，被認為可能在葡萄球菌屬或是其他菌種間夫西地酸抗藥性傳播扮演重要角色，Chen 等人於 2011 年發表之報告中表皮葡萄球菌為隨機選自臺大醫院 2003~2007 年菌株，菌株數較為不足，因此本實驗室針對 2008 年菌株做一較完整分析。為長期追蹤菌株有無差異，繼續分析臺大醫院 2009 年所有表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥菌株。

本實驗針對 2009 年臺大醫院 136 株表皮葡萄球菌臨床菌株分析，40 株為夫西地酸抗藥 (29.4%)，大部分帶有 *fusB* (39/40, 97.5%)，其中 1 株為 *fusA* 點突變 (P404L)。*fusB* 大部分位於 *groEL* 下游 (33/39, 84.6%)，少數位在 *rpsR* 下游 (1/39, 2.6%)，剩餘 5 株菌株的 insertion site 仍未知。進一步分析 *fusB* 亞型，主要為第二型 *ajl*-LP-*fusB* (18/39, 46.1%) 和第三型 *ajl*-LP-*fusB* (15/39, 38.5%)，及 2 株第一型 *ajl*-LP-*fusB* (2/39, 5.1%)、4 株為未知型 (10.3%)。帶有第二型 *ajl*-LP-*fusB* 片段菌株的最小抑菌濃度 (MIC) 相較於帶有第三型 *ajl*-LP-*fusB* 菌株有較高的趨勢。

分析 *ajl*-LP-*fusB* 未知型 NTUH857 *fusB* 旁基因序列，Composite SeRI_{*fusB*-857} 基因結構包含 SeRI_{*fusB*-857} (*S. epidermidis* resistance island carrying *fusB* in NTUH857) 及 SeCI₈₅₇ (*S. epidermidis* chromosomal insertion in NTUH857)，SeRI_{*fusB*-857} 上帶有毒力因子 VirE 和抗藥基因 *fusB*，SeCI₈₅₇ 是跳動基因 ISSep1-like transposase 帶至 SeRI_{*fusB*-857} 後的基因序列，含有 terminase small subunit 和數個 hypothetical proteins。

Composite SeRI_{*fusB*-857} 位於 SsrA-binding protein 下游，Na⁺-transporting ATP synthase 的上游，*att_c* site 為 TCCCGCCGTCTCCAT，全長 21609 bp，由 28 個 ORFs

和 $\Delta aj3$ 組成，G+C content 為 30.48%。

利用脈衝式電泳分析夫西地酸抗藥菌株的 pulstypes，在 >80% 相似性的情形下，40 株菌株可以分成 18 群集 (clusters)，顯示表皮葡萄球菌造成的感染，並非單一菌株的傳播。

關鍵字：夫西地酸、*fusA* 點突變、*fusB*、表皮葡萄球菌、表皮葡萄球菌抗藥性島嶼



Abstract

Fusidic acid (FA) is a steroid antibiotic that inhibits bacteria protein synthesis by binding to a complex of elongation factor G (EF-G-GTP/GDP-ribosome), and thus inhibits the release of EF-G-GDP complex after translocation. Fusidic acid is an effective antibiotic for skin or severer systemic infection by staphylococci in clinical use. The understanding of fusidic acid resistance mechanisms can be related to alterations in EF-G structure (*fusA* or *rplF* point mutation) or to acquisition of the fusidic acid resistance genes (*fusB*, *fusC*, *fusD*). Previous studies demonstrated that *fusB* genes in *Staphylococcus epidermidis* were highly associated with phage-related resistance islands (RIs), may be responsible for the dissemination of fusidic acid resistance in *S. epidermidis* through horizontal gene transfer.

In this study, we collected 40 clinical strains of fusidic acid resistant *S. epidermidis* from National Taiwan University Hospital in 2009. The distribution of resistance genes is mainly *fusB* (39/40, 97.5%) and one of them is *fusA* point mutation P404L (1/40, 2.5%). Further identification of the genetic structures of *fusB* resistance islands among 39 isolates, the results indicated that 33 isolates were flanked by *groEL* (33/39, 84.6%), 1 was flanked by *rpsR* (1/39, 2.6%) and 5 isolates remained unknown. Subtyping of *ajl*-LP-*fusB* fragments for 39 isolates, revealed that 2 were type I, 18 type II, 15 type III and 4 were undetermined type. Isolates carrying type II *ajl*-LP-*fusB* fragments showed

relatively higher levels of fusidic acid resistance.

The *ajI*-LP-*fusB* undetermined strain NTUH857 is located on phage-related resistance island (RI). Composite SeRI_{*fusB*-857} was composed of 28 ORFs and $\Delta aj3$. The gene organization of composite SeRI_{*fusB*-857} can be divided into two distinct regions. SeRI_{*fusB*-857} (*S. epidermidis* resistance island carrying *fusB* in NTUH857) contained virulence factor VirE and resistance gene *fusB*, and SeCI₈₅₇ (*S. epidermidis* chromosomal insertion in NTUH857) contained transposase and several hypothetical proteins. Composite SeRI_{*fusB*-857} island is downstream of SsrA-binding protein and upstream of Na⁺-transporting ATP synthase, *att_c* site was TCCCGCCGTCTCCAT, size of composite SeRI_{*fusB*-857} was 21609 bp and G+C content was 30.48%.

The pulsotypes of fusidic acid resistant *S. epidermidis* were heterogenous and not single clone expansion.

keywords : fusidic acid, *fusA* point mutation, *fusB*, Staphylococcus epidermidis, SeRI

目錄

口試委員會審定書.....	#
誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
目錄.....	vi
圖表目錄.....	viii
第一章 緒論.....	1
1.1 表皮葡萄球菌.....	1
1.2 夫西地酸.....	1
1.3 致病性島嶼 (pathogenicity island ; PI).....	3
1.4 表皮葡萄球菌的抗藥性島嶼 (resistance island ; RI).....	4
第二章 實驗目的與實驗設計.....	6
2.1 實驗目的.....	6
2.2 實驗設計.....	6
第三章 實驗材料與方法.....	7
3.1 菌株培養及保存.....	7
3.2 實驗方法.....	8
第四章 實驗結果.....	26
4.1 夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌盛行率.....	26
4.2 夫西地酸抗藥菌株 <i>mecA</i> 和 <i>icaAB</i> 分析.....	26
4.3 夫西地酸抗藥基因分佈 (<i>fusA</i> 、 <i>fusB</i> 、 <i>fusC</i> 、 <i>fusD</i>).....	26
4.4 分析 <i>fusB</i> 抗藥基因.....	27
4.5 夫西地酸最小抑菌濃度(Minimum Inhibitory Concentration).....	27

4.6 脈衝式電泳分型.....	28
4.7 <i>ajl</i> -LP- <i>fusB</i> 未知型 NTUH857 <i>fusB</i> 旁基因結構.....	28
第五章 實驗討論	30
5.1 夫西地酸抗藥菌株流行病學.....	30
5.2 抗藥基因與最小抑菌濃度 (MIC)關係.....	31
5.3 表皮葡萄球菌 <i>fusA</i> 點突變.....	32
5.4 <i>ajl</i> -LP- <i>fusB</i> 未知型 NTUH-857 <i>fusB</i> 旁基因序列.....	32
5.5 其他未知型的 <i>fusB</i> insertion site 及基因結構.....	35
5.6 脈衝式電泳分型.....	36
實驗圖表	37
參考文獻	56



圖表目錄

圖一、 <i>ajl</i> -LP- <i>fusB</i> 結構.....	37
圖二、 南方墨點法偵測 <i>fusB</i>	38
圖三、 2009 年夫西地酸表皮葡萄球菌基因分型 (genotypes).....	39
圖四、 Composite SeRI _{<i>fusB</i>-857} 基因結構及其限制酶切位圖.....	40
圖五、 Composite SeRI _{<i>fusB</i>-857} 基因結構比較圖.....	41
圖六、 金黃色葡萄球菌基因序列 PI <i>att</i> _c site 位置圖.....	44
表一、 2009 年表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥基因與 MIC 之關係.....	45
表二、 2009 年表皮葡萄球菌 <i>fusB</i> insertion site.....	45
表三、 2009 年夫西地酸抗藥菌株 <i>mecA</i> 和 <i>icaAB</i> 分析.....	46
表四、 ORFs of <i>ajl</i> -LP- <i>fusB</i> undetermined strain <i>S. epidermidis</i> NTUH857.....	46
表五、 2008~2009 年表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥基因與 MIC 之關係.....	49
表六、 2008~2009 年表皮葡萄球菌抗藥基因整理.....	50
表七、 2009 年表皮葡萄球菌臨床菌株列表.....	51
表八、 核酸引子列表.....	53

第一章 緒論

1.1 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)

表皮葡萄球菌屬於葡萄球菌屬，為兼性厭氧 (facultative anaerobic)、過氧化氫酶陽性 (catalase-positive)、凝固酶陰性 (coagulase-negative; CoNS) 的革蘭氏陽性菌，是皮膚和黏膜上主要的正常菌叢，但常對免疫力低下的病人造成伺機性感染(41)，近年來，在醫院的院內感染造成嚴重的問題(51)。表皮葡萄球菌不像金黃色葡萄球菌能產生多種毒力因子，對宿主組織造成破壞(16)，其主要的致病機制是在醫療器材置入物(導管、人工關節等)形成生物膜造成感染(52)，生物膜對於抗生素具有較強的抗性也較能抵抗宿主免疫系統的攻擊，因此造成治療上的困難(21)。

之前的研究發現，葡萄球菌屬的細菌可以互相傳遞抗藥性的基因，而表皮葡萄球菌也被認為是抗藥性基因的儲存所 (reservoir)，可能將抗藥基因傳給較具毒性的金黃色葡萄球菌(3)。

1.2 夫西地酸 (fusidic acid)

夫西地酸為類固醇類的抗生素，是真菌 *Fusidium coccineum* 的產物，1960 年代開始應用於臨床治療，臨床上夫西地酸用藥方式可以為靜脈注射 (intravenous)、口服、局部用藥 (皮膚或是眼部)或是全身性用藥(20)，被用來治療葡萄球菌屬造成的感染，可治療局部皮膚感染或較嚴重的全身性感染，常會合併其他種類的抗生素，如：rifampicin，來避免抗藥性的產生(13, 20)，在臺大醫院通常會合併 vancomycin、teicoplanin 和 linezolid 對較嚴重的葡萄球菌屬感染如骨髓炎、關節炎、心內膜炎做治療。

1.2.1 夫西地酸藥物作用機制

夫西地酸藥物會影響細菌轉譯作用蛋白質的合成。細菌轉譯作用過程中，elongation factor Tu (EF-Tu)會和 GTP 將 aminoacyl-tRNA 帶至核糖體 A 位，GTP 水解後 EF-Tu/GDP 複合物會離開核糖體，此時 peptide bond 形成，接著 EF-G/GTP

和核糖體結合，使 peptidyl-tRNA 從 A 位移動到 P 位，水解後變成 EF-G/GDP 離開核糖體(2)。

夫西地酸會和細菌的 elongation factor G (EF-G)作用，使 EF-G/GDP complex 無法離開 ribosome，進而抑制細菌蛋白質的合成(12)。

1.2.2 夫西地酸抗藥機制

目前研究發現夫西地酸的抗藥機制主要可以分成兩種：

(一) 藥物作用標的基因產生突變 (*fusA* 和 *rplF*) (6, 32)

fusA 是轉譯出 EF-G 的基因，目前至少 42 個 *fusA* 的點突變位點在金黃色葡萄球菌的 EF-G 結晶結構被找到(12)，在夫西地酸存在下，*fusA* 點突變可能促進 EF-G 和 ribosome 解離，或防止夫西地酸和藥物作用標的的結合，使藥物失去作用(25)。

FusA 點突變主要在 EF-G 的第三區域 (residue 404-483)，此區突變的菌株通常菌落大小和生長情況是正常的，稱為 FusA-class resistant (25)；點突變在 EF-G 的第五區域(residue 606-693)的 fusidic acid-resistant small colony variant (SCV)，細菌菌落會長得較小，對 aminoglycosides 感受性降低且可能具有某些營養缺陷，如：hemin，稱為 FusA-SCV(33)。

點突變在 *rplF* 造成的夫西地酸抗藥，稱為 FusE-class(45)，*rplF* 負責轉譯出 ribosome protein L6，protein L6 被認為是 EF-G 和核糖體交互作用的位置(5)，FusE-class 也具有 SCV 的 phenotype。

(二) 產生 FusB family 蛋白質(FusB，FusC 和 FusD)，保護藥物作用的標的

葡萄球菌屬細菌被發現可以水平 (horizontal)獲得外來基因 *fusB*、*fusC* 和 *fusD*(30)。*fusB* 最早在金黃色葡萄球菌質體 pUB101 中的 transposon-like element 發現(36)，之後也在和葡萄球菌屬的致病性島嶼 (pathogenicity island)中找到(38, 40)，*fusB* 會轉譯出 25-kDa 蛋白質，結合到夫西地酸藥物的作用標的 (EF-G)，保護細菌的轉譯作用不受夫西地酸影響(37)。FusC 和 FusD 是 FusB 的類似物 (homologues)，葡萄球菌屬細菌可獲得這些抗藥性基因，來對夫西地酸產生抗藥性，其中 *fusB* 和 *fusC* 在金黃色葡萄球菌和凝固酶陰性的葡萄球菌發現，*fusD* 則是

S. saprophyticus 的 intrinsic factor(39)。

1.2.3 夫西地酸的抗藥判讀標準

目前在 Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI)中，並沒有針對夫西地酸的抗藥 breakpoint 定義，一般認為對夫西地酸具有感受性 (susceptible)是指 MIC ≤ 0.25 或 0.5 mg/L，對夫西地酸具有抗性是指 MIC ≥ 2 mg/L(42)，而根據 CLSI 紙錠感受性法 (disc susceptibility method)，在夫西地酸抗生素紙錠 ($2.5 \mu\text{g}$)情形下，對夫西地酸具有感受性 (susceptible)是指 zone ≥ 22 mm，對夫西地酸具有抗性是指 zone ≤ 17 mm，而 zone = 18-21 mm 為 intermediate。

1.2.4 夫西地酸抗藥性葡萄球菌之流行病學

夫西地酸抗藥葡萄球菌盛行率，不同地區有很大的差異(53)，金黃色葡萄球菌抗藥菌株盛行率 0.3%~52.5%，CoNS 抗藥菌株盛行率 7.2%~50.0%(8)，在沒有使用夫西地酸當作臨床藥物的國家如：美國，盛行率明顯比其他國家低。臺大醫院的表皮葡萄球菌株夫西地酸抗藥盛行率約為 39%~46%，高於金黃色葡萄球菌的 3%~6%(10)。

夫西地酸抗藥性葡萄球菌的流行病學研究，大部分將其研究族群分成金黃色葡萄球菌和 CoNS，單獨研究夫西地酸抗藥之表皮葡萄球菌流行病學較少，在 2008 年 McLaws et al.分析了來自 Leed General 醫院和歐洲的表皮葡萄球菌株 50 株 (30 株來自英國；20 株來自歐洲)，共有 23 株 (46%)為夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌，其中主要的抗藥基因為 *fusB* (18/23, 78%)，其餘分別為 *fusC* (2/23, 8.3%)和 *fusA* 點突變 (3/23, 13%) (30)。2010 年 Castanheira et al.研究結果顯示，在北美洲、澳洲及歐洲，CoNS 主要藉由獲得夫西地酸抗藥基因來對此藥物產生抗藥性(8)。

1.3 致病性島嶼 (pathogenicity island ; PI)

Mobile genetic element (MEGs)包含質體 (plasmid)、跳動子 (transposons)和致病性島嶼 (pathogenicity islands ; PIs)等，其中 PIs 是一種基因島嶼 (genomic islands , GIs) 可以在細菌間水平基因轉移(24)，在細菌的演化及致病過程 (pathogenesis)扮

演重要的角色(17)。大部分的致病性島嶼含有大約 10-200kb 的基因區域，G+C content 和整個基因體 DNA 有所差異，暗示細菌可能是經由水平基因轉移獲得致病性島嶼的基因區域。

致病性島嶼通常帶有嗜菌體相關的嵌合酶 (phage-related integrase)，顯示致病性島嶼的切割、複製和嵌入和嗜菌體相關，在致病性島嶼的兩側含有 direct repeat (DR)，和嗜菌體嵌合酶辨認的 attachment site (*att_c* site)相似(17)，大部分 PI 有類似的基因結構，由左至右，最左邊的 *int* 轉譯出嵌合酶使此段致病性島嶼嵌入基因體中，接著分別為 *cro* 和 *cI* (transcriptional regulators)、*xis* (excisionase)、replication module (*pri* : primase, *rep* : replication initiator)、replication origin、opron (含有決定 capsid 大小的基因)、*terS* (terminase small subunit)(34)。

1.3.1 表皮葡萄球菌的致病性島嶼

研究發現金黃色葡萄球菌大部分的毒素和毒力基因是由其致病性島嶼 (SaPIs) 所轉譯出來的，在金黃色葡萄球菌發表的致病性島嶼包含 SaPI1- SaPI4(26)、SaPn1- SaPI3(23)和 SaPbov1- SaPbov1(50)，致病性島嶼多含有 *tst* 基因(46)，轉譯出 TSST-1 和其他毒素。之前在 CoNS 中發現會產生 TSST-1 和其他超級抗原 (superantigens) 毒素，卻沒有致病性島嶼被發表。2011 年在表皮葡萄球菌臨床菌株 FRI909 中發現複合表皮葡萄球菌致病性島嶼 (composite *S. epidermidis* pathogenicity island, SePI)，此段致病性島嶼帶有兩個毒力基因 staphylococcal enterotoxin C3 (SEC3)和 staphylococcal enterotoxin-like toxin L (SEIL)，全長約 20.5 kb，除了 SePI 的 DR 序列外，在 transposase 旁另外帶有不同的 DR 序列和來自金黃色葡萄球菌的蛋白質基因，顯示這段基因島嶼可能經過不只一次的 insertion(28)。

1.4 表皮葡萄球菌的抗藥性島嶼 (resistance island ; RI)

抗藥性島嶼是帶有抗藥基因的基因島嶼，含有 *fusB* 的抗藥性島嶼 SaRI_{*fusB*} 在 epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone (EEEFIC)中被發現(38)。表皮葡萄球菌的 *fusB* 在 PI-like 的基因序列，在已發表的 4 株帶有 *fusB* 的表皮葡萄球菌

中發現 *fusB* 皆位在 phage-related resistance island，這些抗藥性島嶼中，依據不同的 *ajl* 長度，至少可分成 3 種 *ajl*-leader peptide (LP)-*fusB*，第一型 *ajl*-LP-*fusB* 具有全長的 *ajl*，第二型 *ajl*-LP-*fusB* 的 *ajl* 的 93-421 核苷酸被 truncated 掉，第三型 *ajl*-LP-*fusB* 只剩下游 37 核苷酸 (圖一) (11)。

表皮葡萄球菌的抗藥性島嶼全長大小約為 15 kb~17.5 kb，G+C content 約為 29.3%~30.2%，在抗藥性島嶼的兩側含有 direct repeat (DR) 並且帶有 conserved core gene，包含 integrase 和其他葡萄球菌抗藥性島嶼相關的蛋白質(11)，Mobile genetic element (MEGs) 被認為是抗藥性或毒力基因 mobile carrier，因此表皮葡萄球菌中夫西地酸的抗藥性島嶼可能在葡萄球菌屬或是其他菌種間抗藥性的傳播扮演重要角色。



第二章 實驗目的及實驗設計

2.1 實驗目的

夫西地酸 (fusidic acid) 在臨床上主要用於治療葡萄球菌引起的皮膚感染和較為嚴重的全身性症狀，夫西地酸抗藥菌株的產生會限制其在臨床的使用。

分析臺大醫院夫西地酸抗藥性菌株，表皮葡萄球菌的盛行率，每年約為 39%~46%，高於金黃色葡萄球菌盛行率 3%~6%(10)，Chen 等人於 2011 年發表之報告中表皮葡萄球菌為隨機選自臺大醫院 2003~2007 年菌株，菌株數較為不足，因此本實驗室已針對 2008 年菌株做一較完整分析(54)。為長期追蹤菌株有無差異，繼續分析臺大醫院 2009 年所有表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥菌株

2.2 實驗設計

本實驗主要分析 2009 年臺大醫院表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥基因分布，首先利用特異性 PCR、PCR-RFLP、16S rRNA 定序、瓊脂圓盤擴散法 (disk diffusion test) 和瓊脂稀釋法 (agar dilution method) 鑑定確認夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌，接著以 PCR 分析 *fusB*、*fusC*、*fusD* 基因；定序分析 *fusA* 點突變位點，進一步對含有 *fusB* 基因菌株做 *ajl*-LP-*fusB* PCR 分型，南方墨點法偵測 *fusB* 基因，觀察 3 種 *ajl*-LP-*fusB* 亞型與未知型不同的大小片段，夫西地酸最小抑菌濃度 (Minimum Inhibitory Concentration) 與抗藥基因間的關聯性。利用已知表皮葡萄菌抗藥性島嶼基因序列，設計 8 對核酸引子分析抗藥菌株 *fusB* 的 insertion site (*groEL* 或 *rpsR*)，最後利用脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis) 分析夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌菌株間的差異，並分析 *ajl*-LP-*fusB* 未知型菌株抗藥性島嶼結構。

第三章 實驗方法與材料

3.1 菌株培養及保存

實驗所用菌株：

3.1.1 臨床菌株

臺大醫院 2009 年表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)之臨床分離菌株共 143 株，其中 53 株經細菌室鑑定為夫西地酸抗藥，刪除 6 株重複檢體後，分離 47 株夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌進一步利用 PCR-RFLP(18)、表皮葡萄球菌特異性 PCR 鑑定菌種(27)和藥敏試驗，確認共有 40 株 (29.4%)為對夫西地酸抗藥之表皮葡萄球菌，其中 39 株含有 *fusB*。

40 株夫西地酸抗藥之表皮葡萄球菌臨床菌株，其中 1 株來自腦脊髓液 (CSF)，其餘 39 株皆從血液分離出來 (表七)。

3.1.2 參考菌株

參考菌株 (ATCC, American Type Culture Collection)

Staphylococcus aureus 25923

Staphylococcus aureus 29213

Staphylococcus epidermidis 35984

3.1.3 菌種培養及保存

在 5% CO₂、37°C 環境下，以 LB 瓊脂培養基 (BBL, Cockeysville, Maryland, USA)隔夜培養。收集純種菌株於含有 17%甘油(Glycerol, WAKO)的 BHI (Brain Heart infusion broth)中，保存於-70°C。

3.2 實驗方法

3.2.1 染色體核酸 (chromosomal DNA) 萃取

1 材料

- (1) 菌株：2009 年臺大醫院夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌臨床菌株
- (2) Cell suspension solution pH=7.5, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA
- (3) Cell lysis solution pH=8.5, 200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 35 mM SDS
- (4) Protein precipitation solution 10 mM NH₄OAC
- (5) Lysozyme (Bio Basic Inc., Markham Ontario, Canada) : 100 mg/ml
- (6) Lysostaphin (Sigma, Deisenhofen, Germany) : 5 mg/ml
- (7) RNase A solution (Clontech, Palo Alto, CA, USA) : 1 mg/ml
- (8) 100% isopropanol (Echo Chem. Co., Miaoli, Taiwan)
- (9) 70% cold ethanol (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

2 設備

- (1) 冷凍乾燥機 (Heto Drywinner, Copenhagen, Denmark)
- (2) 離心機 (Kubota 1920 centrifuge, Kubota, Tokyo, Japan)

3 方法

吸取 1.5 ml 隔夜培養之細菌懸浮液至 1.7 ml eppendorf，14000 rpm 離心 2 分鐘；去除上清液後加入 600 μ l cell suspension solution，vortex 震盪使其懸浮均勻，並加入 10 μ l lysozyme 和 0.5 μ l lysostaphin，上下搖晃使之混勻，置於 37°C 反應 1.5 小時後，14000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液並加入 600 μ l cell lysis solution，置於 80°C 反應 20 分鐘，降至室溫後加入 5 μ l RNase A 於 37°C 反應 30 分鐘，再加入 200 μ l protein precipitation solution，混勻後離心 14000 rpm 20 分鐘；吸取上清液至另一 eppendorf 並加入 600 μ l isopropanol，於 -20°C 反應 1 小時，以 14000 rpm 離心 10 分鐘；去上清液，加入 600 μ l 70% cold ethanol，14000 rpm 離心 1 分鐘，最後以冷凍乾燥機離心抽乾，加入 30 μ l ddH₂O 於室溫隔夜回溶，保存於 4°C。

3.2.2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction ; PCR)

1 材料

- (1) 菌株：表皮葡萄球菌 DNA
- (2) Recombinant TaqDNA polymerase (TakaRa, Tokyo, Japan)
- (3) LE agarose (Seakem, FMC Bioproducts Rockland, ME, USA)
- (4) DNA marker：100 bp ladder (Invitrogen, Paisley, UK)
- (5) 0.5× TBE buffer (Amereso Inc., Solon, Ohio, USA)
- (6) Loading dye (MBI fermentas)
- (7) Ethidium bromide (Amresco Inc., Solon, Ohio, USA)
- (8) Primers (Mission Biotech) (表八)

2 設備

- (1) PCR 反應機器：PTC-100TM programmable Thermal Controller (MJ Research, Watertown, MA, USA)
- (2) 電泳裝置：Mupid-2 plus submarine electrophoresis system (Advance, Tokyo, Japan)
- (3) 電泳膠影像分析系統：UV-transilluminator (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France)

3 方法

- (1) 混合下列試劑於無菌 0.2 ml 試管

項目	總體積(μl)
無菌二次水	20.5
10× PCR buffer	2.5
dNTP 混合液	0.5
Primer (F)	0.5
Primer (R)	0.5
Taq DNA polymerase	0.1
Template DNA	0.5
總體積	25

(2) 將 0.2 ml 試管置於 PCR 機器中進行反應

94°C 7 分鐘 → $\left[\begin{array}{ll} 94^{\circ}\text{C} & 30 \text{ 秒} \\ ^{\text{a}}50^{\circ}\text{C} & 30 \text{ 秒} \\ 72^{\circ}\text{C} & ^{\text{b}}30 \text{ 秒} \end{array} \right]$ 30 次循環 → 72°C 10 分鐘 → 4°C 保存

^a根據 primer 條件，annealing 溫度會有所變動

^b根據 PCR 產物大小，extension 時間會有所變動

(3) 反應後之 PCR 產物以 1% 或 1.2% 瓊脂凝膠電泳進行分析

3.2.3 純化 PCR 產物

1 材料

(1) Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taoyuan, Taiwan)

2 設備

(1) 離心機 (Kubota 1920 centrifuge, Kubota, Tokyo, Japan)

(2) 電泳膠影像分析系統：UV-transilluminator (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France)

(3) 乾熱器 (Gen-probe, San Diego, CA, USA)

3 方法

(1) Gene clean up

加入 DF buffer (PCR 產物五倍體積) 至 PCR 產物中，混合均勻後，加入已架置 collection tube 上的 DF column 中，14000 rpm 離心 2 分鐘，去除廢液，加入 600 μl wash buffer 至 DF column 中，14000 rpm 離心 1 分鐘，去除廢液；再以 14000 rpm 離心 10 分鐘，去除殘餘酒精，之後將 DF column 移置新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 50°C 預熱過之 20 μl 二次水。室溫靜置 10 分鐘後，14000 rpm 離心 10 分鐘，純化後產物保存於 2-8°C。

(2) Gel extraction

在電泳膠影像分析系統以刀片切下特定大小片段的 DNA 片段，放入 1.5 ml

微量離心管中，加入 500 μ l DF buffer 至於 65°C 乾熱器上，每隔 2 分鐘上下反轉使其均勻混合，待電泳膠完全溶解後，加入已架置 collection tube 上的 DF column 中，14000 rpm 離心 2 分鐘，去除廢液，加入 600 μ l wash buffer 至 DF column 中，14000 rpm 離心 1 分鐘，去除廢液；再以 14000 rpm 離心 10 分鐘，去除殘餘酒精，之後將 DF column 移置新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 50°C 預熱過之 20 μ l 二次水。室溫靜置 10 分鐘後，14000 rpm 離心 10 分鐘，純化後產物保存於 2-8°C。

3.2.4 核酸定序

將 PCR 純化後產物溶於 ddH₂O，濃度約為 1~2 ng/100bp，置於 200 μ l 微量離心管中，分別加入 1 μ l forward 或 reverse primer (10 pmol)，送至臺大醫院醫學研究部第二共同研究室定序。定序結果再以 DNAMAN、SeqSanner 軟體進行分析。

3.2.5 PCR-RFLP

1 材料

- (1) 菌株：表皮葡萄球菌 DNA
- (2) Recombinant TaqDNA polymerase (TakaRa, Tokyo, Japan) : TaqDNA polymerase, 10 \times PCR buffer, dNTP mixture
- (3) LE agarose (Seakem, FMC Bioproducts Rockland, ME, USA)
- (4) DNA marker : 100 bp ladder (Invitrogen, Paisley, UK)
- (5) 0.5 \times TBE buffer (Amereso Inc., Solon, Ohio, USA)
- (6) Loading dye (MBI fermentas)
- (7) Ethidium bromide (Amresco Inc., Solon, Ohio, USA)
- (8) Primers (Mission Biotech) (表八)
- (9) 限制酵素 Apal (New England BioLabs, Beverly, MA, USA)

2 設備

- (1) PCR 反應機器 : PTC-100TM programmable Thermal Controller (MJ Research,

Watertown, MA, USA)

(2) 電泳裝置：Mupid-2 plus submarine electrophoresis system (Advance, Tokyo, Japan)

(3) 電泳膠影像分析系統：UV-transilluminator (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France)

3 方法

(1)混合下列試劑於無菌 0.2 ml 試管

項目	總體積(μl)
無菌二次水	20.5
10× PCR buffer	2.5
dNTP 混合液	0.5
Primer (F)	0.5
Primer (R)	0.5
Taq DNA polymerase	0.1
Template DNA	0.5
總體積	25

(2) 將 0.2 ml 試管置於 PCR 機器中進行反應

94°C 3 分鐘 → $\left[\begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ 秒} \\ 45^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ 秒} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 60 \text{ 秒} \end{array} \right]$ 5 次循環 → $\left[\begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ 秒} \\ 50^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ 秒} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 60 \text{ 秒} \end{array} \right]$ 30 次循環

→72°C 3 分鐘 →4°C 保存

1% 瓊脂凝膠電泳確認結果

(3) 限制酵素切割作用

混合下列試劑於 1.7 ml 離心管：

項目	總體積 (μl)
PCR 產物	8
Apal	1
10× buffer	1
總體積	10

置於 50°C 反應 3 小時，最後以 2% 瓊脂凝膠電泳確認限制酵素作用切割的不同片段。

3.2.6 瓊脂圓盤擴散法 (disk diffusion test)

1 材料

- (1) 菌株：2009 年臺大醫院表皮葡萄球菌臨床菌株
- (2) 標準菌株：*Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- (3) BHI broth (Brain heart infusion, Difco)
- (4) MHA (Mueller-Hinton agar, Difco)
- (5) Fusidic acid disc

2 方法

將表皮葡萄球菌接種於 LB 瓊脂培養基 (BBL, Cockeysville, Maryland, USA)，37°C CO₂ 隔夜培養，隔日以棉棒挑取適當菌落懸浮於 BHI (Brain heart infusion)，濃度調整至 0.5 McFarland 後，以三向畫法均勻塗抹菌液於 MHA 上，以滅菌後的鏤子將藥錠平貼於塗抹菌液後的 MHA 上。35°C 培養 16-18 小時後，測量抑制圈大小。

3.2.7 瓊脂稀釋法 (agar dilution method)

1 材料

- (1) 菌株：2009 年臺大醫院表皮葡萄球菌臨床菌株
- (2) 標準菌株：*Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- (3) BHI broth (Brain heart infusion, Difco)
- (4) MHA (Mueller-Hinton agar, Difco)
- (5) Fusidic acid (Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Denmark)

2 設備

- (1) 36 孔蓋菌盤

(2) 自動多點接種機 (AQS Manufacturing, West Sussex, UK)

3 方法

(1) 藥物 stock 稀釋：

夫西地酸粉末 (10240 µg/ml, purity : 99.7%)，秤取 0.05135 g Fusidic acid 粉末溶解在 5 ml 95% 酒精，混勻後用 0.2 µm 過濾器過濾，分裝儲存在 -20°C。

(2) 培養基

配置 Mueller-Hinton agar (MHA)，滅菌後放置 50°C 水浴槽。

(3) 夫西地酸溶液序列稀釋與培養基製備

空管滅菌烘乾後，將 10240 µg/ml 的夫西地酸 stock 溶液在空管中兩倍序列稀成 0.3-1280 µg/ml。取 1.5 ml 不同濃度夫西地酸溶液至培養皿中，加入 13.5 ml 的 MHA 混合均勻。

(4) 接種

細菌經 37°C 5% CO₂ 隔夜培養後，隔日以棉棒挑取適當菌落懸浮於 BHI (Brain heart infusion)，濃度調整至 0.5 McFarland (菌量約 1.5×10^8 CFU/ml)。36 孔蓋菌盤 (接種針接種體積約 0.3 µl；菌量約 1.55×10^4 /SPOT) 烘乾後，用 dropper 將調好的 0.5 McFarland 菌液吸到接種盤中。接種順序為：生長對照組 (不含抗生素)；13 片抗生素濃度由低而高的 MHA 培養基，待培養基上菌液乾後倒置，在無 CO₂ 培養箱 35°C 培養 16-20 小時。

3.2.8 南方墨點法 (southern blot)

1 材料

(1) 細菌染色體核酸 DNA

(2) 限制酵素 BamHI、EcoRI、HindIII、SalI、PstI、XbaI (New England BioLabs, Beverly, MA, USA)

(3) 瓊脂凝膠：LE agarose (Seakem, FMC Bioproducts Rockland, ME, USA)

(4) 0.5× TBE buffer (Amersco Inc., Solon, Ohio, USA)

- (5) DIG Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
- (6) 6× loading dye (MBI fermentas)
- (7) Ethidium bromide (Amresco Inc., Solon, Ohio, USA)
- (8) 尼龍膜 Nylon membrane : HyboundTM-N⁺ (Amersham, Buckinghamshire, English)
- (9) Depurination solution : 0.25 M HCl
- (10) Denaturation solution : 1.5 M NaCl, 0.5M NaOH
- (11) Neutralizing solution : pH=7.5, 1.0 M Tris, 1.5 M NaCl
- (11) 20× SSC : 3.0 M NaCl, 0.5 M Sodium citrate
- (12) DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
- (13) PCR Dig Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
- (14) Primers (Mission Biotech) (表八)
- (15) Recombinant TaqDNA polymerase (TakaRa, Tokyo, Japan) : TaqDNA polymerase, 10× PCR buffer, dNTP mixture
- (16) 100 bp ladder (Invitrogen, Paisley, UK)
- (17) Gel/PCR DNA fragment extraction kit (Geneaid, Taoyuan, Taiwan)
- (18) High salt solution : 2× SSC, 0.1% SDS
- (19) Low salt solution : 0.1× SSC, 0.1% SDS
- (20) Maleic acid buffer : pH=7.5, 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl
- (21) Blocking solution (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
- (22) Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) : 用 1× blocking solution 以 1 : 10000 稀釋
- (23) Wash buffer : pH=7.5, 0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween 20
- (24) Detection buffer : pH=9.5, 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl
- (25) CSPD (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) : 用 1× detection buffer 以

1 : 100 稀釋

2 設備

- (1) 水浴槽 (shaking bath, TKS, Taipei, Taiwan)
- (2) 電泳裝置 Mupid-2 plus submarine electrophoresis system (Advance, Tokyo, Japan)
- (3) Vacuum Blotting System (VacuGene XL, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)
- (4) UV crosslinker (UVC500, Hoefer, San Francisco, CA, USA)
- (5) PCR machine : PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Watertown, MA, USA)
- (6) UV-transilluminator (Vilber Lourmat, ,Marne La Vallee, France)
- (7) Centrifuge (Kubota 1920 centrifuge, Kubota, Tokyo, Japan)
- (8) Cassette (Kodak, New York, USA)
- (9) Falcon tube (greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)
- (10) Hybridization incubator model 1000 (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA)
- (11) 冷光偵測儀

3 方法

- (1) 限制酵素切割反應 (restriction enzyme digestion)

用分光光度計定量染色體核酸 DNA 濃度，並將下列試劑混合於無菌 1.7 ml 離心管，混合均勻後置於 37°C 反應 1.5 小時。

項目	體積量(μl)
染色體核酸 DNA	1 μg
限制酵素	1
10× 限制酵素緩衝液	2
二次水	0-16
總體積	20

- (2) 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis)

製備兩片 1% 瓊脂凝膠，將限制酵素反應完後的產物與 loading dye 混合均

勻，分別取 15 μl 與 5 μl 置於瓊脂凝膠上，以 100 伏特電壓分離染色體核酸 DNA。將含有 5 μl 限制酵素產物之 1% 瓊脂凝膠以 Ethidium bromide 染色，確認限制酵素切割完全，之後將含有 15 μl 限制酵素切割後產物之瓊脂凝膠製備雜交轉移膜。

(3) 置備雜交轉移膜 (hybridization transfer membrane)

將電泳完之瓊脂凝膠至於保鮮盒中，加入 Depurination solution 反應作用至 dye 的顏色從藍色變黃色，約 5 分鐘，此步驟使染色體核酸 DNA 更易於瓊脂凝膠轉移至尼龍膜上，倒掉 Depurination solution 後，加入 Denaturation solution，使染色體核酸 DNA 雙股打開成單股，反應作用至 dye 的顏色從黃色變藍色，約 15 分鐘，倒掉 Denaturation solution 後，加入 Neutralizing solution，作用 15 分鐘。利用 Vacuum Blotting System 抽氣一小時，將瓊脂凝膠上的染色體核酸 DNA 轉移至尼龍膜，接著進行 UV crosslinkage。將 UV crosslink 完的尼龍膜放入含有 5 ml DIG Hyb Falcon tube 中，於 Hybridization incubator 42°C 隔夜反應。

(4) 探針置備與純化 (probe)

將下列試劑混合於無菌 0.2 ml 薄壁試管

項目	體積量(μl)
二次水	38
10 \times PCR buffer	5
PCR DIG-dNTP 混合液	3
Primer (F)	1.5
Primer (R)	1.5
Taq DNA polymerase	0.2
Template DNA	1.5
總體積	50

將試管置於 PCR 機器，進行反應：

94°C 7 分鐘 \rightarrow $\left[\begin{array}{l} 94^\circ\text{C} \quad 30 \text{ 秒} \\ 50^\circ\text{C} \quad 30 \text{ 秒} \\ 72^\circ\text{C} \quad 30 \text{ 秒} \end{array} \right]$ 30 次循環 \rightarrow 72°C 10 分鐘 \rightarrow 4°C 保存

反應後之 PCR 產物以 1.2% 瓊脂凝膠電泳分析，之後將 PCR 產物進行純化。

(5) 南方雜交 (southern hybridization)

PCR 純化後產物，以 94°C 反應 10 分鐘，使探針成單股狀態，之後置於冰上 10 分鐘，避免探針回復成雙股，將純化處理好之 probe 加入 DIG Easy Hyb 混合均勻，和尼龍膜 42°C 隔夜反應。

(6) 測定 (hybridization detection)

將尼龍膜和 High salt solution 室溫下反應來移去多餘探針，重複此步驟 2 次，每次約 5 分鐘，倒掉 High salt solution 後，加入 low salt solution 於水浴槽 68°C 反應，移去非特異性結合之探針，重複此步驟兩次，每次約 20 分鐘。之後加入 blocking buffer 室溫作用 1 小時，反應完後加入 anti-Digoxigenin-AP 室溫作用 1 小時。加入 wash buffer 反應 15 分鐘 2 次後，加入 detection buffer 作用 2-3 分鐘。在尼龍膜上加上 CSPD，37°C 避光作用 20 分鐘，最後利用冷光偵測儀進行偵測。

3.2.9 脈衝式電泳 (pulsed field gel electrophoresis)

1 材料

- (1) 菌株：2009 年臺大醫院表皮葡萄球菌臨床菌株
- (2) PIV buffer：pH=8, 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl
- (3) EC buffer：pH=8, 6 mM Tris, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sarkosyl
- (4) ES buffer：pH=9, 0.5 mM EDTA, 1% sarkosyl
- (5) TE buffer：pH=8, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
- (6) 1.6% low melting agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- (7) SmaI (20000 U/ml, New England BioLabs, Beverly, MA, USA)
- (8) LB 瓊脂培養基 (BBL, Cockeysville, Maryland, USA)
- (9) Low-melting agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- (10) Lysostaphin (Sigma, Deisenhofen, Germany)：5 mg/ml
- (11) Lysozyme (Bio Basic Inc., Markham Ontario, Canada)：100 mg/ml

(12) Proteinase K (BioNo Vas, Toronto, Canada) : 20 mg/ml

(13) Bacteriophage lambda DNA marker (New English BioLabs, Beverly, MA, USA)

2 設備

(1) CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems (Bio-Rad Laboratoireis, Hercules, CA, USA)

(2) 乾熱器 (Gen-probe, San Diego, CA, USA)

(3) BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)

(4) UV-transilluminator (Vilber Lourmat, ,Marne La Vallee, France)

3 方法

(1) 凝膠塊 (plug)製備

將 LB 瓊脂培養基上隔夜培養菌落刮下懸浮於 1 ml PIV buffer 中，離心 8000 rpm 後去除上清液，重複此步驟兩次，吸去上清液後以適當體積之 PIV buffer 懸浮菌體，使菌液濃度為 $OD_{600}=3$ ，取 100 ml 菌液和等體積 1.6% low melting gel 均勻混合，加入鑄膠模板 (plug molds)，置於 4°C 10 分鐘。待膠塊 (plug)凝固後，放入 1.7 ml 離心管，加入 500 μ l EC buffer、10 μ l lysozyme 及 1 μ l lysostaphin，置於 37°C 水浴槽隔夜反應。

(2)去除蛋白質

去除隔夜反應完後的液體，每一管各加入 25 μ l proteinase K 和 500 μ l ES buffer，置於 50°C 水浴槽隔夜反應。

(3) 清洗凝膠塊

取出凝膠塊放置於小培養皿中，用 TE buffer 清洗凝膠塊，100 rpm，每次 30 分鐘，重複 4 次，清洗後之凝膠塊 4°C 保存於 TE buffer 中。

(4) 限制酶切割反應

將凝膠塊切成適當大小 (寬度約 1mm)，放入 1.7 ml 離心管，並加入下列試劑：

項目	體積量(μl)
二次水	133.5
10 × buffer	15
Restriction enzyme (SmaI)	1.5
總體積	150

置於 25°C 下隔夜反應。

(5)脈衝式電泳

去除隔夜反應完後的限制酵素溶液，加入 1 ml TE buffer 在 37°C 反應 1 小時，製備

1% PFGE agarose gel，電泳條件如下：

Switch time: 5~60 sec

Time ramp: 20 hr

Pulse angle: 120°

Vol: 6 V/cm

Temperature: 14°C

電泳完成後以 EtBr 染色，在 UV-transilluminator 照相觀察，並以 BioNumerics software 分析結果。



3.2.10 LA PCR

1 材料

- (1) 細菌染色體核酸 DNA
- (2) 限制酵素 XbaI (New England BioLabs, Beverly, MA, USA)
- (3) Ethanol (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)
- (4) 70% cold ethanol (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)
- (5) Primers (Mission Biotech) (表八)

第一次 PCR 反應

引子名稱	序列 (5'→3')	位置
fusB 389-361R	TTC CGA TTT GAT GCA AGT TCA TTC CAT CC	上游 1
fusB 282-253R	AAG TTT TTG CGG ACT AGG TAG TTC AAAAGG	下游 2
fusB 437-467F	GAG AAA TTT CTAATC AGG TTG TAA AGG GG	下游 1
fusB 531-559F	CGG ATG GTC AAT ATG TAA AAA AAG GTG AC	下游 2

第二次 PCR 反應

引子名稱	序列 (5'→3')	位置
fusB 554-581F	GGT GAC TAT ATA TGT CGA GAT AGC ATT C	上游
fusB 222-193R	GCT TCA ATT TCT TTG TTT GAT AAT CTG ATG	下游

(6) LA PCR in vitro Cloning Kit (Takara, Shuzo Co. Ltd, Japan)

(7) 瓊脂凝膠：LE agarose (Seakem, FMC Bioproducts Rockland, ME, USA)

(8) 0.5× TBE buffer (Amersco Inc., Solon, Ohio, USA)

(4) 1000 bp ladder (Invitrogen, Paisley, UK)

(5) 6× loading dye (MBI fermentas)

(6) Ethidium bromide (Amresco Inc., Solon, Ohio, USA)

2 設備

(1) Digital cooler (Genepure technology, Taipei, Taiwan)

(2) PCR machine：PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Watertown, MA, USA)

(3) 電泳裝置：Mupid-2 plus submarine electrophoresis system (Advance, Tokyo, Japan)

(4) 電泳膠影像分析系統：UV-transilluminator (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France)

(5) Centrifuge (Kubota 1920 centrifuge, Kubota, Tokyo, Japan)

3 方法

(1) 限制酵素切割

以分光光度計定量染色體核酸 DNA 吸光值，計算其濃度及所需加入的量，混合下列試劑於 1.7 ml 離心管：

項目	體積量 (μl)
二次水	至體積 50 μl
10 × buffer	5
Restriction enzyme (50U)	2.5 μl
Chromosomal DNA	5 μg
總體積	50

37°C 作用 1.5 小時後，加入 2.5 倍體積 (125 μl) 99% 無水酒精，混合均勻後放置 -20°C 1 小時，再以 14000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 125 μl 70% 酒精，以 14000 rpm 離心 1 分鐘，接著以冷凍乾燥機離心抽乾，加入 10 μl ddH₂O，放置室溫回溶。

(2) 接合反應 (ligation reaction)

混合下列試劑於 0.2 ml 離心管中

項目	體積量 (μl)
經限制酵素切割後樣品	5
cassatte	2.5
Ligation solution I	15
Ligation solution II	7.5
總體積	30

置於 16°C，隔夜進行接合反應。隔天加入 2.5 倍體積 (75 μl) 99% 無水酒精，置於 -20°C 1 小時後，以 14000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 75 μl 70% 酒精，以 14000 rpm 離心 1 分鐘，接著以冷凍乾燥機離心抽乾，加入 5 μl ddH₂O，放置室溫回溶，以此樣品進行第一次 PCR 反應。

(3) 第一次 PCR 反應

取 0.5 μl 經接合反應完成的樣品與 14.5 μl 無菌二次水混合，在 94°C 下作用 15 分鐘，混合下列試劑於無菌 0.2 ml 薄壁試管：

項目	體積量 (μl)
接合反應完成的樣品	14.5
10× LA PCR buffer	2.5
dNTP	4
無菌水	3
Primer C1	0.5
Primer S1	0.5
Takara LA Taq	0.25
總體積	25

將 0.2 ml 薄壁試管置入 PCR 反應機器中進行反應：

94°C 7 分鐘 → $\left[\begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 20 \text{ 秒} \\ 50^{\circ}\text{C} \quad 2 \text{ 分鐘} \\ 68^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ 分鐘} \end{array} \right]$ 30 次循環 → 68°C 10 分鐘 → 4°C 保存

PCR 反應結束後以瓊脂凝膠電泳分析。

(4) 第二次 PCR 反應

將第一次 PCR 反應後產物作 10^{-2} - 10^{-5} 稀釋，混合下列試劑於無菌 0.2 ml 薄壁試管：

項目	體積量 (μl)
不同稀釋倍率 PCR 產物	0.5
10× LA PCR buffer	2.5
dNTP	4
無菌水	3
Primer C2	0.5
Primer S2	0.5
Takara LA Taq	0.25
總體積	25

將 0.2 ml 薄壁試管置入 PCR 反應機器中進行反應：

94°C 7 分鐘 → $\left[\begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 20 \text{ 秒} \\ 50^{\circ}\text{C} \quad 2 \text{ 分鐘} \\ 68^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ 分鐘} \end{array} \right]$ 30 次循環 → 68°C 10 分鐘 → 4°C 保存

PCR 反應結束後以瓊脂凝膠電泳分析，確定其為正確產物，可做切膠 (gel

extraction)送定序做進一步分析。

3.2.11 Inverse PCR

1 材料

- (1) 細菌染色體核酸 DNA
- (2) 限制酵素 XbaI、SpeI、HindIII、PacI、BclI (New England BioLabs, Beverly, MA, USA)
- (3) Primers (Mission Biotech) (表八)
- (4) T₄ DNA ligase

2 設備

- (1) PCR 反應機器：PTC-100TM programmable Thermal Controller (MJ Research, Watertown, MA, USA)
- (2) 電泳裝置：Mupid-2 plus submarine electrophoresis system (Advance, Tokyo, Japan)
- (3) 電泳膠影像分析系統：UV-transilluminator (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France)

3 方法

(1) 限制酵素切割

根據 southern blot 的實驗結果選取適當限制酵素，將下列試劑混合進行反應：

項目	體積量 (μl)
染色體 DNA	2.5 μg
限制酵素	2
10× buffer	4
無菌水	0-33
總體積	40

(2) self-ligation

取限制酵素反應之產物，分別稀釋 1 倍、10 倍、100 倍及 1000 倍，和下列試劑混

合，16°C反應 16 小時：

項目	體積量 (μl)
限制酵素反應完產物	17
T ₄ DNA ligase	1
10× buffer	2
總體積	20

(3) 反向聚合酵素連鎖反應

根據已知序列，向兩端向外設計一對反向的核酸引子，將下列試劑混合於 0.2 ml 微量離心管，進行 PCR 反應：

項目	體積量 (μl)
Ligation product	1
ddH ₂ O	16
10× PCR buffer	2.5
dNTP	4
primer F	0.5
primer R	0.5
LA Taq	0.25
總體積	25

94°C 7 分鐘 → $\left[\begin{array}{ll} 94^\circ\text{C} & 30 \text{ 秒} \\ 53^\circ\text{C} & 2 \text{ 分鐘} \\ 68^\circ\text{C} & 2 \text{ 分鐘} \end{array} \right]$ 30 次循環 → 68°C 10 分鐘 → 4°C 保存

(4) 電泳分析

以 1%瓊指電泳膠進行電泳分析後，定序分析其序列。

第四章 實驗結果

4.1 夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌盛行率

臺大醫院 2009 年表皮葡萄球菌臨床菌株共 143 株，其中 53 株經細菌室鑑定為夫西地酸抗藥。刪除 6 株重複檢體後，進一步利用 PCR-RFLP(18, 44)、表皮葡萄球菌特异性 PCR (27)和 16S rRNA 定序(47)鑑定菌種，其中 1 株為 *S. capitis subsp. urealyticus*，接著利用藥敏試驗：瓊脂圓盤擴散法 (disk diffusion test)及瓊脂稀釋法 (agar dilution method)，確認共有 40 株 (40/136, 29.4%)對夫西地酸抗藥之表皮葡萄球菌。

4.2 夫西地酸抗藥菌株 *mecA* 和 *icaAB* 分析

研究不同檢體來源 (contaminating strains、sepsis-related strains、catheter strains 和 saprophytic strains) 的表皮葡萄球菌毒力基因，發現來自手部和健康自願者的表皮葡萄球菌 (contaminating strains)和其他具有臨床意義的檢體來源菌株相比，含有毒力基因 (*mecA* 和 *icaAB*)的比率較小(14)，*mecA* 基因和 methicillin 抗藥性的產生有關(31)，而 *icaAB* 基因則會影響細菌形成生物膜，細胞聚集的能力(19)。利用毒力基因：*mecA* 和 *icaAB* 可用來區分菌株為較具侵略性 (invasive)的菌株或是汙染 (contaminating)的菌株。分析 2009 年臺大醫院 40 株夫西地酸抗藥臨床菌株 *mecA* 和 *icaAB* 基因，含有 *mecA* 基因 (40/40, 100%)及 *icaAB* 基因 (34/40, 85%)，而來自健康者手部表皮葡萄球菌株 *mecA* 基因 (5/16, 12.5%)及 *icaAB* 基因 (2/16, 31.25%) (表三)，顯示本實驗操作之臨床菌株是具有臨床意義的表皮葡萄球菌。

4.3 夫西地酸抗藥基因分布 (*fusA*、*fusB*、*fusC*、*fusD*)

40 株夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌株，利用 PCR 及定序分析其抗藥基因，表皮葡萄球菌抗藥基因主要以 *fusB* 為主，39 株含有 *fusB* (97.5%)，1 株含有 *fusA* (2.5%)點突變 P404L (表一)，無菌株含 *fusC* 或 *fusD*。

4.4 分析 *fusB* 抗藥基因

1. *ajl*-LP-*fusB* PCR 分型 (type I、type II、type III)

表皮葡萄球菌 *fusB* 旁基因序列可依照不同的 *ajl* 片段大小分成 3 種亞型，第一型 *ajl*-LP-*fusB* 為全長的 *ajl*，第二型 *ajl*-LP-*fusB* 為 *ajl* 93 到 421 核苷酸 truncated 掉，但是能夠轉譯較小的蛋白質，第三型 *ajl*-LP-*fusB* 的 *ajl* 只剩下游的 37 個核苷酸(11) (圖一)。39 株含有 *fusB* 基因之表皮葡萄球菌株，其中 2 株為第一型 *ajl*-LP-*fusB* (5.1%)，18 株為第二型 *ajl*-LP-*fusB* (46.1%)，15 株為第三型 *ajl*-LP-*fusB* (38.5%)，4 株為未知型 (10.3%) (表一)。

2. 南方墨點法偵測 *fusB* 基因

為確認含有 *fusB* 基因的表皮葡萄球菌菌株是否含有類似結構，因此利用限制酵素 (HindIII) 切割，*fusB* 基因作為探針來偵測。2 株第一型 *ajl*-LP-*fusB* 的片段大小分布大約 2~4 kb；18 株第二型 *ajl*-LP-*fusB* 的片段大小約為 4 kb 左右；15 株第三型 *ajl*-LP-*fusB* 的片段大小 > 23 kb；4 株 *ajl*-LP-*fusB* 未知型的片段大小分布在 6~23 kb 之間，其中 1 株介於 9~23 kb，其餘 3 株介於 6~9 kb (圖二)。

3. *fusB* 的 insertion site (*groEL* 或 *rpsR*)

利用已知表皮葡萄球菌之抗藥性島嶼序列，設計 8 對核酸引子 (表八)，分別設計引子黏接 RI 上游基因 *groEL* 或 *rpsR* 與嵌和酶 *int* (upstream PCR)、嵌合酶基因 (integrase PCR)、*fusB* 和下游基因 (downstream PCR) 和上游和下游基因 (chromosome PCR)，以 PCR 偵測 *fusB* 基因的 insertion site(11)，39 株含有 *fusB* 基因的表皮葡萄球菌，*fusB* 基因大部分位於 *groEL* 下游 (33/39，84.6%)，有 1 株第二型 *ajl*-LP-*fusB* 表皮葡萄球菌位於 *rpsR* 下游 (1/39，2.6%)，剩下 5 株表皮葡萄球菌的 insertion site 未知，其中 1 株為第一型 *ajl*-LP-*fusB*，4 株為 *ajl*-LP-*fusB* 未知型菌株 (表二)。

4.5 夫西地酸最小抑菌濃度 (Minimum Inhibitory Concentration)

利用瓊脂稀釋法 (agar dilution method) 分析 40 株夫西地酸抗藥菌株的最小抑

菌濃度，其中帶有 *fusB* 基因的菌株 MIC 範圍介於 2~16 $\mu\text{g/ml}$ 之間，帶有 *fusA* 點突變的菌株 MIC 為 16 $\mu\text{g/ml}$ 。

分析 *ajl-LP-fusB* 亞型和 MIC 之間的關連性，第一型 *ajl-LP-fusB* MIC 主要為 8 $\mu\text{g/ml}$ (2/2, 100%); 第二型 *ajl-LP-fusB* MIC 介於 8~16 $\mu\text{g/ml}$ ，其中 5 株為 8 $\mu\text{g/ml}$ (6/19, 31.6%)，13 株為 16 $\mu\text{g/ml}$ (13/19, 68.4%); 第三型 *ajl-LP-fusB* MIC 介於 2~16 $\mu\text{g/ml}$ ，其中 1 株為 2 $\mu\text{g/ml}$ (1/14, 7.1%)，1 株為 4 $\mu\text{g/ml}$ (1/14, 7.1%)，8 株為 8 $\mu\text{g/ml}$ (7/14, 50%)，5 株為 16 $\mu\text{g/ml}$ (5/14, 35.7%) (表一)。

4.6 脈衝式電泳分型

利用脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis) 分析臺大醫院 2009 年表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥菌株的菌株間差異，並以 BioNumerics software 分析菌株的 pulsotypes，以 UPGMA 演算法 (based on Dice similarity index)，在 >80% 相似性的情形下，40 株菌株可以分成 18 群集 (clusters)，結果顯示，沒有最主要的一種 pulsotype，且不同的 *ajl-LP-fusB* 亞型和 insertion site 皆在不同的 pulsotypes，顯示表皮葡萄球菌的感染並非單一菌株傳播 (圖三)。

4.7 *ajl-LP-fusB* 未知型 NTUH857 *fusB* 旁基因結構

在 40 株夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌中，有 4 株為 *ajl-LP-fusB* 未知型，同時其 insertion site 也未知，顯示 *ajl-LP-fusB* 未知型抗藥性島嶼基因結構可能和已發表的 4 株表皮葡萄球菌抗藥性島嶼不相似，利用 LA PCR 及 inverse PCR 分析其中一株未知型菌株 NTUH857 *fusB* 旁基因序列。

Composite $\text{SeRI}_{\text{fusB-857}}$ (*S. epidermidis* resistance island carrying *fusB* in NTUH857) 全長為 21609 bp，由 28 個 putative ORFs 和 $\Delta aj3$ 組成，G+C content 為 30.48%，位於 *smpB* 下游，*smpB* 會轉譯出 SsrA-binding protein，是 RNA-binding protein，在 SsrA quality-control system 中和 tmRNA (SsrA) 結合，對 SsrA 的結構穩定性和活性扮演重要角色(1, 43)，另一端染色體上的基因為 Na^+ -transporting ATP synthase。嵌

和酶 (integrase) 會辨認細菌染色體上的特定的 *att_c* site 使致病性島嶼 (PIs) 插入染色體中，Composite SeRI_{*fusB-857*} 的 *att_c* site 為 TCCCGCCGTCTCCAT，位在金黃色葡萄球菌全部基因序列 18 分鐘的位置 (圖六)。

Composite SeRI_{*fusB-857*} 的基因結構主要可以分成兩個區域 (圖四): (i) SeRI_{*fusB-857*} 是由 integrase 嵌入的基因序列，兩端為 15 bp 的 *att_c* site，SeRI_{*fusB-857*} 長度約為 15 kb，包含 19 個 ORFs 和 1 個 $\Delta aj3$ ，其中致病性島嶼常見基因結構，由左至右為 integrase、2 個 transcriptional regulators、primase、terminase small subunit。此外 SeRI_{*fusB-857*} 上帶有毒力因子 virulence-associated protein E 和抗藥基因 *fusB*。(ii) SeCI₈₅₇ (*S. epidermidis* chromosomal insertion in NTUH857) 是指在 transposase 後的基因序列，SeCI₈₅₇ 前有 37 bp 的 invert repeat (IR): CATACTAAGATTAGCTATG AAGAAATCTATGACGATA，SeCI₈₅₇ 長度約為 5 kb，共有 8 個 ORFs，包含 terminase small subunit 及 7 個 hypothetical proteins。Composite SeRI_{*fusB-857*} 帶有 *att_c* site 和 transposase，顯示其經過不只一次的 DNA insertion，形成複合式基因島嶼 (composite genomic island)。

和已發表的 4 株 SeRI_{*fusB*} 相比，SeRI_{*fusB-857*} 缺少 *ri17*、*ri18* 及 *aj1* 基因，其中 SeRI_{*fusB-857*} 的 LP-*fusB-aj2*- $\Delta aj3$ 區域和 SeRI_{*fusB-704*} 較為相似，LP 與 *aj2* 基因序列和 SeRI_{*fusB-704*} 100% 相同， $\Delta aj3$ 基因序列相似程度約 76%，除了 LP-*fusB-aj2*- $\Delta aj3$ 區域相似程度較高外，其他區域的基因相似程度小於 50% (圖五)。和其他已發表的 SePI 相比，SeRI_{*fusB-857*} 的 *fusB* 上游和 *Staphylococcus epidermidis* 14.1.R1.SE ctg1131387704528 (GeneBank accession no. AGUC01000114) 相似程度較高，基因結構皆有 integrase、2 個 replication regulators、primase 和 terminase，此外也都含有 virulence-associated protein E (圖五)。SeCI₈₅₇ 和 *Staphylococcus epidermidis* FRI909 (GeneBank accession no. AENR01000001 & no. AENR01000008) 較相似，帶有 terminase 和數個 hypothetical proteins，但 SeCI₈₅₇ 的基因長度較短，和 *Staphylococcus epidermidis* FRI909 相比基因長度大約少 3kb，*Staphylococcus epidermidis* FRI909 帶有 2 個 transposase 及其相對應的 direct repeat，可能經過不只一次的 insertion。

第五章 實驗討論

5.1 夫西地酸抗藥菌株流行病學

臨床用夫西地酸來治療葡萄球菌感染，因為用藥的情形差別，不同區域夫西地酸抗藥比率差異非常大(53)，早期對夫西地酸抗藥的流行病學主要針對金黃色葡萄球菌，近年來在表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌等其他 CoNS 也開始出現對夫西地酸抗藥的報導(8)，之前的研究發現臺大醫院夫西地酸抗藥比例，表皮葡萄球菌(3~6%)比金黃色葡萄球菌(39~46%)高許多(10)，表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥比率較高的原因目前未知，臺大醫院夫西地酸抗藥的使用通常會合併其他如 vancomycin、teicoplanin 或 linezolid 對葡萄球菌引起的深層感染如心內膜炎、骨髓炎等做治療。

夫西地酸抗藥基因分布在金黃色葡萄球菌和表皮葡萄球菌有明顯的差異，之前研究發現臺大醫院 MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) 抗藥基因分布為 *fusA* mutation (84%) 及 *fusC* (16%)，不含有 *fusB*；MSSA (methicillin-susceptible *S. aureus*) 為 *fusB* (58%)、*fusC* (31%) 及 *fusA* mutation (12%)(10)，而在表皮葡萄球菌以 *fusB* (92%) 占大多數，僅有少數的菌株含有 *fusC* 或同時含有 *fusB* 和 *fusC* (10)。Chen 等人於 2011 年發表之報告中表皮葡萄球菌為隨機選自臺大醫院 2003~2007 年菌株，菌株數較為不足，因此本實驗室已針對 2008 年菌株做一較完整分析(54)。本實驗室為長期追蹤菌株有無差異，因此繼續分析臺大醫院 2009 年所有表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥菌株，結果顯示其最主要的夫西地酸抗藥基因為 *fusB* (97.5%)，少數 *fusA* (2.5%)。比較本實驗與 2008 年資料(54)，2008 年夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌抗藥基因分布，主要仍為 *fusB* (97%)，少數 *fusC* (3%) (表六)。與國外結果相比，英國及歐洲夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌(30)，雖然其主要抗藥基因皆為 *fusB*，但占有較高比率之 *fusC* (8.3%) 及 *fusA* mutation (13%)。

比較夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌 *fusB* insertion site 和 *ajl*-LP-*fusB* 亞型，2009 年夫西地酸抗藥菌株最主要為第二型 (46.1%)，其次為第三型 (38.5%)，大部分位於

groEL 下游 (84.6%)，而 2008 年夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌基因分布最主要則為第三型 (38%)，其次為第二型 (36.5%)，*fusB* insertion site 同樣以位於 *groEL* 下游 (79.4%) 占大多數 (表六)。

5.2 抗藥基因與最小抑菌濃度 (MIC) 關係

在金黃色葡萄球菌中，*fusA* 點突變通常會造成較高的 MIC ($\geq 128 \mu\text{g/ml}$)，*fusB* 與 *fusC* 的 MIC 則較低 ($\leq 32 \mu\text{g/ml}$)(10)，而在表皮葡萄球菌中，研究分析來自歐洲及英國 50 株菌株也發現 *fusA* 點突變 (L461K) 有較高的 MIC ($\geq 256 \mu\text{g/ml}$)(30)；本實驗中的 *fusA* (P404L) 沒有造成較高的 MIC，*fusA* (P404L) 在之前 MRSA 及 MSSA 也曾被報導過，MIC 分別為 8 和 16 $\mu\text{g/ml}$ (10)，和本篇 *fusA* 的點突變菌株 MIC 16 $\mu\text{g/ml}$ 相似。本篇分析臺大醫院 2008~2009 年夫西地酸表皮葡萄球菌抗藥基因與 MIC 的關係 (表五)，102 株含有 *fusB* 的菌株 MIC 介於 2~16 $\mu\text{g/ml}$ ，2 株含有 *fusC* 的菌株 MIC 分別為 16 和 32 $\mu\text{g/ml}$ 。

金黃色葡萄球菌中不同的 *ajl* 片段會造成夫西地酸抗藥程度的不同，較長的 *ajl* 片段會有較高的 MIC(37)，本實驗利用 *ajl*-LP-*fusB* PCR 將菌株依據不同的 *ajl* 長度分成三種亞型，在 2009 年表皮葡萄球菌 *fusB* 亞型最主要為第二型 (48.7%) 和第三型 (35.9%)，*ajl* 片段較長的第二型和第三型相比，MIC 有較高的趨勢；而統計 2008~2009 年夫西地酸抗藥之表皮葡萄球菌菌株資料，能發現相同的趨勢 (表五)。第二型 MIC 介於 8~16 $\mu\text{g/ml}$ ，第三型 MIC 介於 2~16 $\mu\text{g/ml}$ ，第三型 MIC 分布較廣，其中 NTUH9232 的 MIC 較低 (2 $\mu\text{g/ml}$)，其在 MHA 上生長情形不好，可能有營養上的缺陷，*fusA* point mutation 可能會影響生長速度或造成其營養缺陷在之前曾報導過(32)，但在 *fusB* 中並沒有發現這種情形，而定序 NTUH9232 *ajl* 至 *fusB* 區域基因，和已發表的 SeRI_{*fusB*-5907} (*ajl*-LP-*fusB* 第三型)100% 相似，造成 NTUH9232 MIC 較低的原因目前未知。

之前研究發現，只要有 *fusB* 基因，就能對夫西地酸產生抗藥性(37)，同時本篇利用 LA PCR 及 inverse PCR 分析一株未知型夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌

NTUH-857 (MIC=8 $\mu\text{g/ml}$)，發現其缺少 *ajl* 基因，還是能夠對夫西地酸產生抗藥性，*ajl* 在夫西地酸抗藥所扮演的角色還未知。

5.3 表皮葡萄球菌 *fusA* 點突變

目前至少 42 個 *fusA* 點突變位點在金黃色葡萄球菌的 EF-G 結晶結構中被找到 (12)，但在表皮葡萄球菌 *fusA* 點突變研究較少，*fusA* 點突變相較於 *fusB* 可能造成較高的 MIC(30)，在 2008 年分析來自英國及歐洲 50 株菌株發現 3 株 *fusA* 點突變 (L461K)，同時也發現 L461K 會有較高的 MIC ($\geq 256 \mu\text{g/ml}$)(30)，本篇分析 2009 年臺大醫院西地酸抗藥表皮葡萄球菌，發現 1 株 *fusA* 的點突變菌株，和 fusidic acid-susceptible 表皮葡萄球標準菌株 RP62A 相比，在第 404 胺基酸序列上，proline 變成 Leucine (CCA \rightarrow CTA)，P404L 點突變在金黃色葡萄球菌中，會影響 EF-G domain II 和 III 的 linker region，進而去影響鉸鏈區 (hinge region)而使 EF-G 的構型改變(12)，P404L 點突變位點在 MRSA 和 MSSA 都有被報導過，MIC 分別為 8 和 16 $\mu\text{g/ml}$ (10)，和本篇 *fusA* 的點突變菌株 MIC 16 $\mu\text{g/ml}$ 相似。

根據之前的研究標準，本實驗只針對夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌 *fusB*、*fusC* 和 *fusD* PCR 陰性菌株，才對其 *fusA* 進行 sequence，雖然之前研究認為臨床菌株中不會有 *fusA* 點突變和 FusB-family 抗藥基因同時存在的情形(37)，但最近已發現有 *fusA* 和 *fusC* 同時存在的金黃色葡萄球菌臨床菌株(9)，而目前還沒有發現 *fusA* 和 *fusB* 同時存在的情形。

5.4 *ajl*-LP-*fusB* 未知型 NTUH-857 *fusB* 旁基因序列

2009 年 40 株夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌中，有 4 株為 *ajl*-LP-*fusB* 未知型，同時其 insertion site 也未知，PCR 確認此 4 株未知型菌株 *fusB* 不位於質體上，推測 *ajl*-LP-*fusB* 未知型 *fusB* 旁基因結構和已發表的 4 株 SeRI_{fusB} 較不相似。

5.4.1 $\text{SeRI}_{fusB-857}$ 的 *att_c* site

$\text{SeRI}_{fusB-857}$ 位於 *smpB* 的下游，*att_c* site 為 TCCCGCCGTCTCCAT，在金黃色葡

萄球菌全部基因序列 18 分鐘的位置，之前發表之 SeRI_{fusB} insertion site 分別位在 *groEL* (44 分鐘)或 *rpsR* (8 分鐘)的下游 (圖六)，位在 *groEL* 下游的 SeRI_{fusB-2793}、SeRI_{fusB-704} 和 SeRI_{fusB-5907} *att_c* sites 為 ATGCCAGGTATGATGTAAAAA 或 ATGCCAGG(T/A) ATGATGTAAATA;位在 *rpsR* 下游的 SeRI_{fusB-7778} 的 *att_c* sites 前 18 nt 為 AAAGAAGAACAATAATAT。

本篇是第一個發現 SeRI_{fusB} 位在 *smpB* 的下游。之前也曾報導過表皮葡萄球菌的致病性島嶼位在 *smpB* 的下游，和 SeRI_{fusB} 基因序列較相似的包含 *S. epidermidis* FRI909 (GeneBank accession no. AENR01000001& AENR01000008)(28) 及 *Staphylococcus epidermidis* 14.1.R1.SE ctg1131387704528 (GeneBank accession no. AGUC01000114)，*att_c* site 皆為 TCCCGCCGTCTCCAT，和 SeRI_{fusB-857} 相同。*S. epidermidis* FRI909 是複合表皮葡萄球菌致病性島嶼 (composite *S. epidermidis* pathogenicity island, SePI)，全長約 20.5 kb，含有 2 個毒力基因 staphylococcal enterotoxin C3 (SEC3) 和 staphylococcal enterotoxin-like toxin L (SEIL)(28)。*Staphylococcus epidermidis* 14.1.R1.SE ctg1131387704528 (GeneBank accession no. AGUC01000114)，則帶有毒力基因 virulence-associated protein E。

金黃色葡萄球菌位在 *smpB* 下游的致病性島嶼，目前發現有 SaPI_{m4} 和 SaPI_{mw2}，SaPI_{m4} 長度為 14.4 kb，含有毒力基因 *fhuD*，SaPI_{mw2} 長度為 14.4 kb，含有毒力基因 *ear*、*se21*、*sec4*(4, 35)。

5.4.2 Composite SeRI_{fusB-857} 基因結構

Composite SeRI_{fusB-857} 全長為 21609 bp，由 28 個 putative ORFs 和 $\Delta aj3$ 組成，基因結構包含 SeRI_{fusB-857} (*S. epidermidis* resistance island carrying *fusB* in NTUH857) 及 SeCI₈₅₇ (*S. epidermidis* chromosomal insertion in NTUH857) (圖四)，是目前發現最長的 SeRI_{fusB}，之前報導過之 SeRI_{fusB} 長度介於 15-17.5 kb，SeRI_{fusB-2793} (16913 bp，24 ORFs)、SeRI_{fusB-704} (17554 bp，23 ORFs and $\Delta aj1$ 、 $\Delta aj3$)、SeRI_{fusB-5907} (16695 bp，23 ORFs and $\Delta aj1$)和 SeRI_{fusB-7778} (15307 bp，19 ORFs and $\Delta aj1$)(11)，G+C content 分別為 Composite SeRI_{fusB-857} (30.48%)、SeRI_{fusB-2793} (29.9%)、SeRI_{fusB-704} (29.3

%)、SeRI_{fusB-5907} (30.2%)和 SeRI_{fusB-7778} (29.5%)(11)。

SeRI_{fusB-857} 的 LP-*fusB-aj2-△aj3* 區域和 SeRI_{fusB-704} 較為相似外，其餘基因序列和已發表的 4 株 SeRI_{fusB} 差異很大，相似度皆小於 50%，在 SeRI_{fusB-857} 中也缺少之前認為較保守的基因區域 ri17, ri18，除此之外 SeRI_{fusB-857} 中也缺少 *ajl* 基因，因 *ajl*-LP-*fusB* PCR 的引子設計在 ri17 或 *ajl* 基因上，所以無法利用 PCR 分別其 *ajl*-LP-*fusB* 亞型。Composite SeRI_{fusB-857} 和之前報導之 4 株 SeRI_{fusB} 都具有致病性島嶼上重要基因結構：integrase、2 個 transcriptional regulators、primase 和 terminase small subunit。和之前發表之 SeRI 不同的是 Composite SeRI_{fusB-857} 還帶有毒力因子 virulence-associated protein E (VirE)和跳動基因 ISSep1-like transposase。

Virulence-associated protein E (VirE)曾在金黃色葡萄球菌的致病性島嶼上發現，功能目前未知(22)。VirE 最早在 *Dichelobacter nodosus* (舊名：*Bacteroides nodosus*) 中被發現，*D. nodosus* 是革蘭氏陽性絕對厭氧菌，會使綿羊的羊蹄潰爛，讓綿羊生病及羊毛產量下降，造成農業上的損失。依據羊蹄潰爛疾病嚴重程度的不同，可將 *D. nodosus* 分成 virulent、intermediate 和 benign 菌株，研究發現 98%的 virulent 菌株都具有 *Vap* regions (virulence-associated protein regions)，但在 70%benign 菌株都缺少此區域基因，暗示 *Vap* regions 可能和毒力有關(7, 15, 29)，但因 *D. nodosus* 缺少 transformation system，所以並沒有直接去證明 *Vap* regions 和毒力間的關係；*Vap* regions 包含許多 virulence-associated genes，包括 *vapA*、*vapB*、*vapC*、*vapD*、*vapE* 和 integrase，被認為是一段外來嵌入的基因(15)。

Composite SeRI_{fusB-857} 的跳動基因 ISSep1-like transposase 後帶有基因列 SeCI₈₅₇，SeCI₈₅₇ 基因序列長度約為 5 kb，共有 8 個 ORFs，包含 terminase 及 7 個 hypothetical proteins。在 ISSep1-like transposase 前有 37 bp 的 invert repeat (IR)：CATACTAAGATTAGCTATGAAGAAATCTATGACGATA 和 *S. epidermidis* RP62A 的 ISSep1-like transposase IR-Left 序列完全相同，ISSep1-like transposase，是屬於 IS110 family，長度約 1200-1550 bp，在 IS 的尾端終點通常不帶有 IR 或是帶有較短的 IR，且一般不會有 direct repeat，和 *Staphylococcus epidermidis* FRI909 相比，

雖然在 $\text{SeRI}_{fusB-857}$ 的 ISSep1-like transposase 後基因序列有和其相似的 direct repeat (DR) : (A/C)GAGGCTGGGACATAATTCCTAGCAAATAGCCAGTAAATGAGTTT TT(T/C)ATAAATTCATTTACTGGATTATTT，但沒有找到另一端相似的 DR 基因序列，分析其基因序列發現在 Composite $\text{SeRI}_{fusB-857}$ (ORF23-ORF24)和 *Staphylococcus epidermidis* FRI909 尾端的基因序列 174 bp 完全相似 (圖五)，從 *Staphylococcus epidermidis* FRI909 的 DR 基因序列才開始不同，Composite $\text{SeRI}_{fusB-857}$ 的 ORF23-ORF24 間基因序列和 *Staphylococcus epidermidis* FRI909 相比，少了 6 個 ORFs，之前研究發現某些 ISs 缺少 DR，可能是因為兩段 IS 區域 intermolecular 或是 intramolecular recombination 所造成(49)。

Composite $\text{SeRI}_{fusB-857}$ 的基因結構和之前發表的 4 株 SeRI_{fusB} 差異很大，除了 insertion site 不同外，還帶有毒力因子 VirE，此外在其致病性島嶼後帶有 ISSep1-like transposase 跳動基因所帶入的基因序列。

5.5 其他未知型的 *fusB* insertion site 及基因結構

2009 年夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌共有 4 株為 *aj1-LP-fusB* 未知型，1 株 *aj1-LP-fusB* 第一型，*fusB* 的 insertion site 皆為未知，分析其中 1 株 $\text{SeRI}_{fusB-857}$ 序列後，利用 $\text{SeRI}_{fusB-857}$ 已知序列設計核酸引子 (表八)，預測剩餘 4 株 insertion site 未知之 SeRI_{fusB} 是否位於 *smpB* 下游，分別設計引子黏接 RI 上游基因 *smpB* 與嵌和酶 *int* (upstream PCR)、嵌合酶基因 (integrase PCR)、*fusB* 和下游基因(downstream PCR)和上游和下游基因 (chromosome PCR)，結果顯示 4 株 insertion site 未知之菌株 (3 株 *aj1-LP-fusB* 未知型菌株和 1 株 *aj1-LP-fusB* 第一型菌株)， SeRI_{fusB} 可能都位在 *smpB* 下游，且由 downstream PCR 都可以偵測到長片段的產物 (> 6kb)，推測在其下游可能都帶有 transposase 和其帶的基因序列，但因無法預測其產物大小，仍須進一步證明。而利用 $\text{SeRI}_{fusB-857}$ *aj3* 上基因序列設計引子，和 *fusB* 上黏接的引子進行 PCR 反應，*aj1-LP-fusB* 未知型菌株皆可以偵測到相同大小之 PCR 產物 (約 1.3K)，推測位在 *smpB* 下游的 *aj1-LP-fusB* 未知型菌株 SeRI_{fusB} ，可能 *fusB* 到 *aj3*

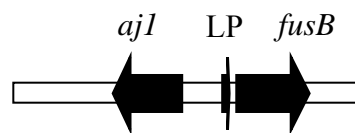
序列很相似。

5.6 脈衝式電泳分型

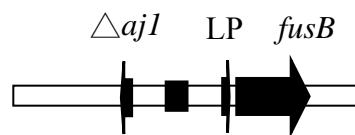
本篇利用脈衝式電泳分析夫西地酸抗藥菌株，在 >80% 相似性的情形下，40 株菌株可以分成 18 群集 (clusters)，顯示 2009 年夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌並非單一菌株傳播，而含有 *fusB* 的表皮葡萄球菌，雖然具有多種 pulsotypes，但大多可發現 $SeRI_{fusB}$ ， $SeRI_{fusB}$ 可能具有移動能力；金黃色葡萄球菌和表皮葡萄球菌具有一些相同的嵌合酶，可以辨認相同的 *att_c* site，暗示表皮葡萄球菌有可能會將夫西地酸抗藥基因傳給金黃色葡萄球菌，雖然目前對於表皮葡萄球菌中 $SeRI_{fusB}$ 是否具有移動能力還未知，但在金黃色葡萄球菌中 PIs 具有移動能力曾被報導過(48)。



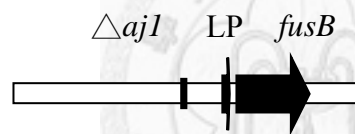
Type I



Type II



Type III



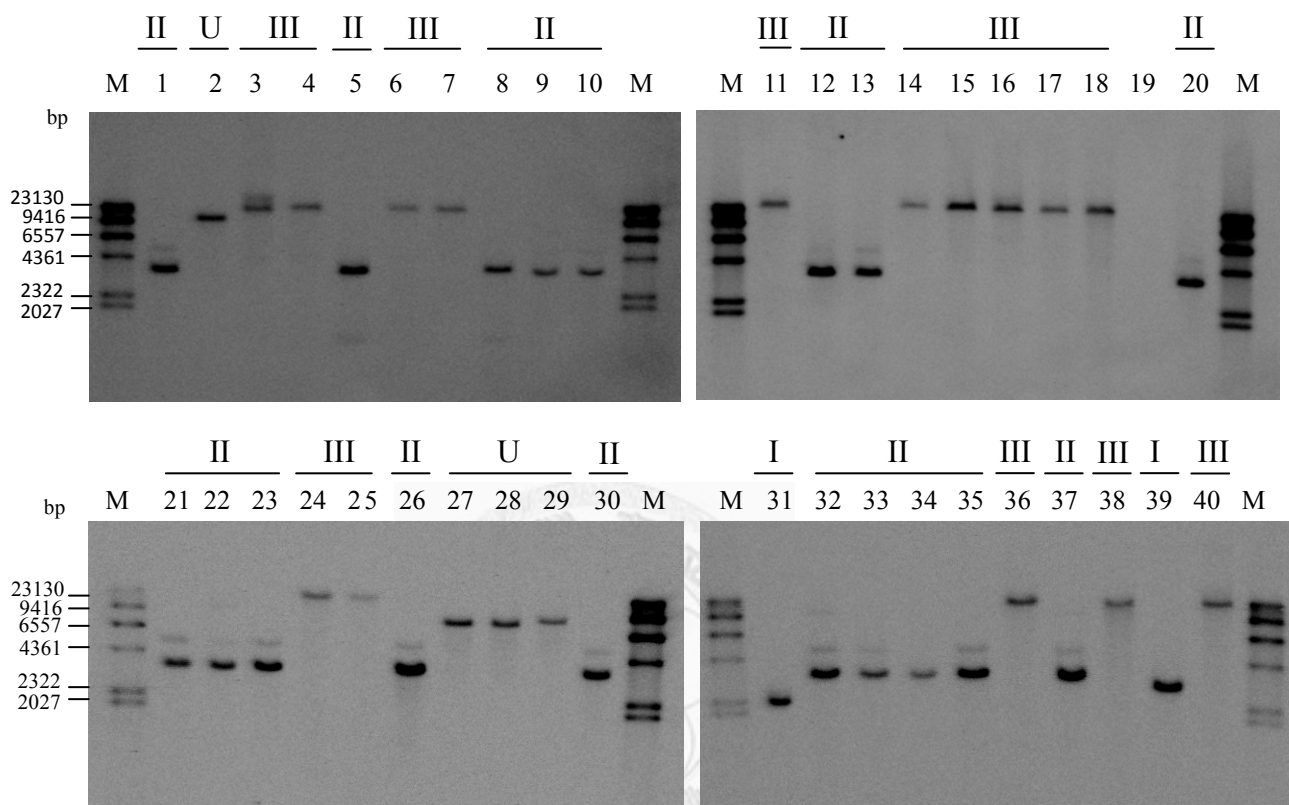
圖一、*ajl*-LP-*fusB* 結構 (11)

根據 *ajl* 片段大小可分成三種亞型

Type I：全長 *ajl*

Type II：*ajl* 93-421 個核苷酸 truncated，轉譯出較小的蛋白質

Type III：*ajl* 剩下游的 37 個核苷酸



圖二、南方墨點法偵測 *fusB*

限制酵素：HindIII；探針：*fusB*

M：digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker II

I-III：*ajl*-LP-*fusB* type I-III

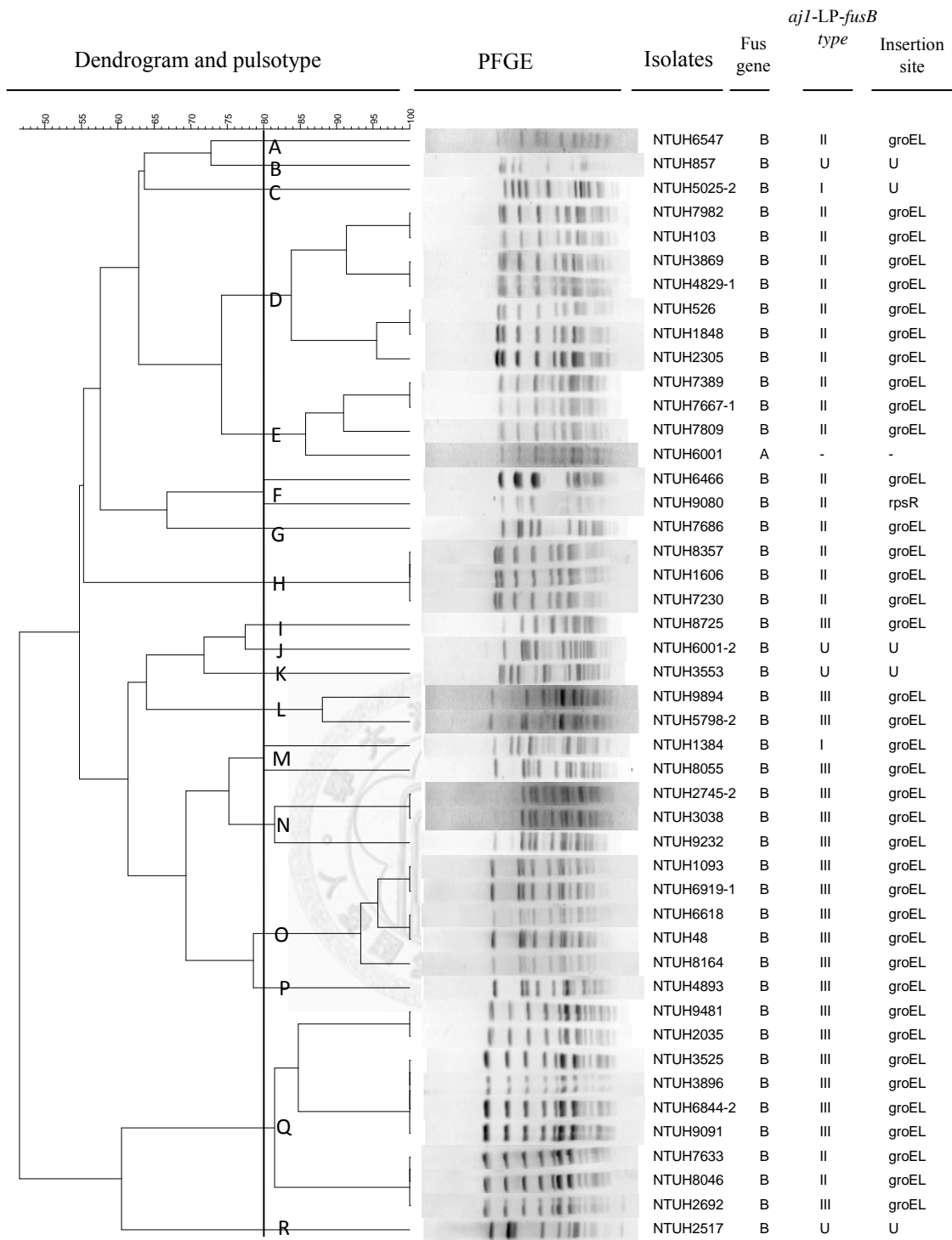
U：*ajl*-LP-*fusB* undetermined type

Lane 1-10：NTUH526、857、3896、4893、6466、6844-2、9091、9080、2305、1848

Lane 11-20：NTUH 3525、7389、7667-1、8725、9232、9894、2745-2、5798-2、6001、6547 (NTUH6001 為 *fusA* point mutation)

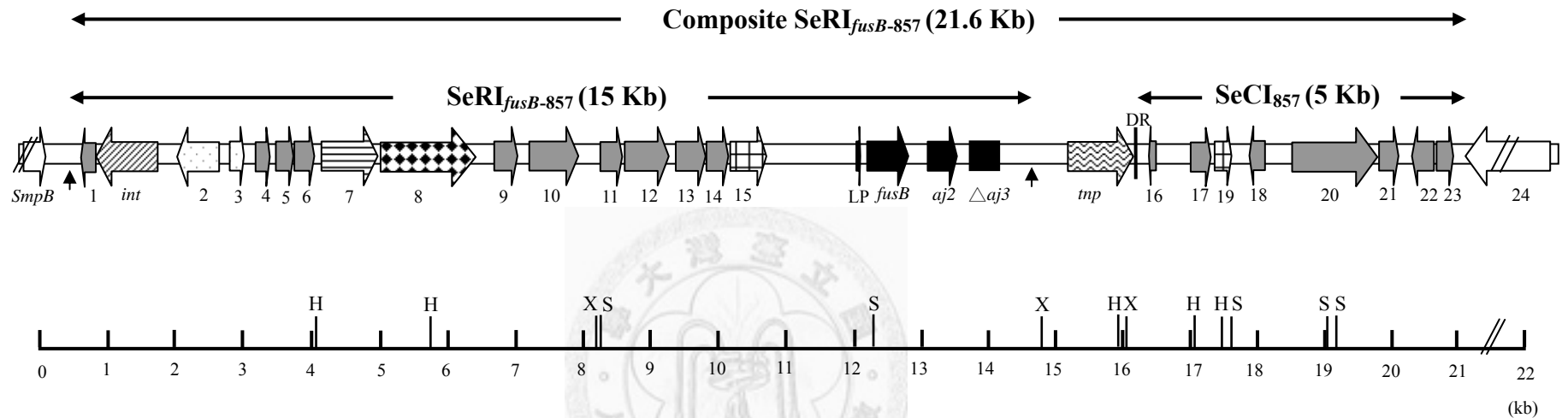
Lane 21-30：NTUH 7633、8357、1606、2692、1093、7230、2517、3553、6001-2、7809

Lane 31-40：NTUH 1384、3869、4829-1、7686、7982、9481、103、2035、5025-2、8055



圖三、2009 年夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌基因分型 (genotypes)

夫西地酸抗藥表皮葡萄球菌 DNA，以 SmaI 限制酶切割後，利用 PFGE 分析其 pulsotypes，用 BioNumerics 軟體以 UPGMA 演算法 (based on Dice similarity index)，在 >80% 相似性的情形下，畫出樹狀圖，40 株菌株可以分成 18 群集 (clusters)。U：underdetermined

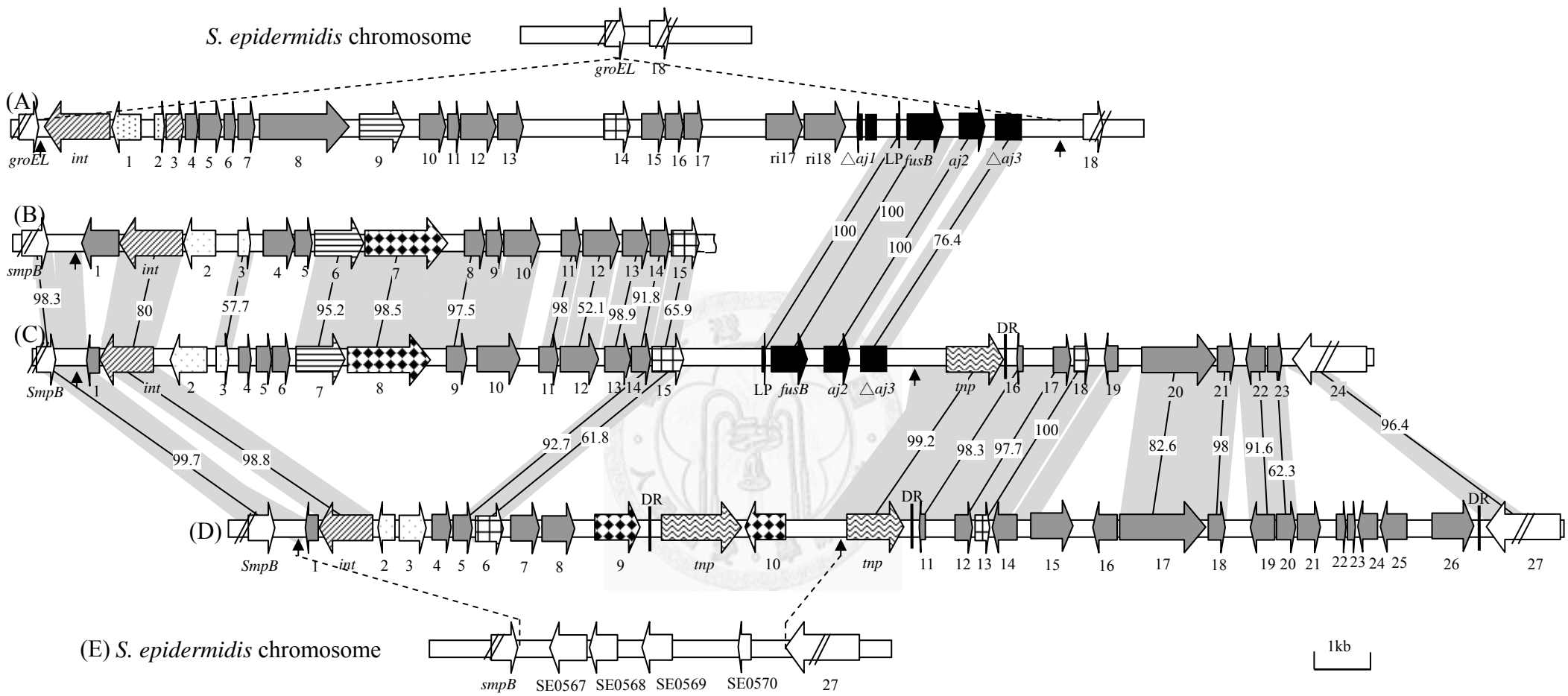


圖四、Composite SeRI_{fusB-857} 基因結構及其限制酶切位圖

Composite SeRI_{fusB-857} 基因結構主要可以分成兩個區域：

- (i) SeRI_{fusB-857} (*S. epidermidis* resistance island carrying *fusB* in NTUH857)：兩端為 15 bp 的 *att_c* site，長度約為 15kb，總共包含 19 個 ORFs 和 1 個 Δ *aj3*。
- (ii) SeCI₈₅₇ (*S. epidermidis* chromosomal insertion in NTUH857)：transposase 後的基因序列，長度約為 5 kb，共有 8 個 ORFs。

下圖表示 Composite SeRI_{fusB-857} 限制酶切位 (X：XbaI, S：SpeI, H：HindIII)



圖五、Composite SeRI_{fusB-857} 基因結構比較圖

- (A) SeRI_{fusB-704} (GeneBank accession no. JF808725)
- (B) *Staphylococcus epidermidis* 14.1.R1.SE ctg1131387704528 (GeneBank accession no. AGUC01000114)
- (C) Composite SeRI_{fusB-857}
- (D) *Staphylococcus epidermidis* FRI909





SePI 由 2 個 contigs 組成：(i) contig 00004 (GeneBank accession no. AENR01000001) 和(ii) contig 00011 (GeneBank accession no. AENR01000008), 以 Sanger sequencing 確認兩段 contig 相接區域 (ORF8)。





- (E) *Staphylococcus epidermidis* chromosome genes (*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228)


抗藥性島嶼 (RI) 嵌入 SsrA-binding protein (*smpB*) 下游，Na⁺-transporting ATP synthase 上游，原本位於 chromosome 上基因 SE0567- SE0570) 會消失。*smpB* 位於 *Staphylococcus epidermidis* RP62A 的基因位 SERP0451 上。

灰色區域比較核苷酸間的相似程度，僅顯示相似程度大於 50% 的區域，灰色區域的數字表示核苷酸相似程度百分比。

箭頭表示預測的 open reading frames，預測產物詳述於表四：

 Integrase and excisionase
 Transcriptional regulator
 Primase
 Terminase

 Virulence factor gene
 *ajI*-LP-*fusB* region
 Transposase
 Hypothetical protein

 Chromosome gene

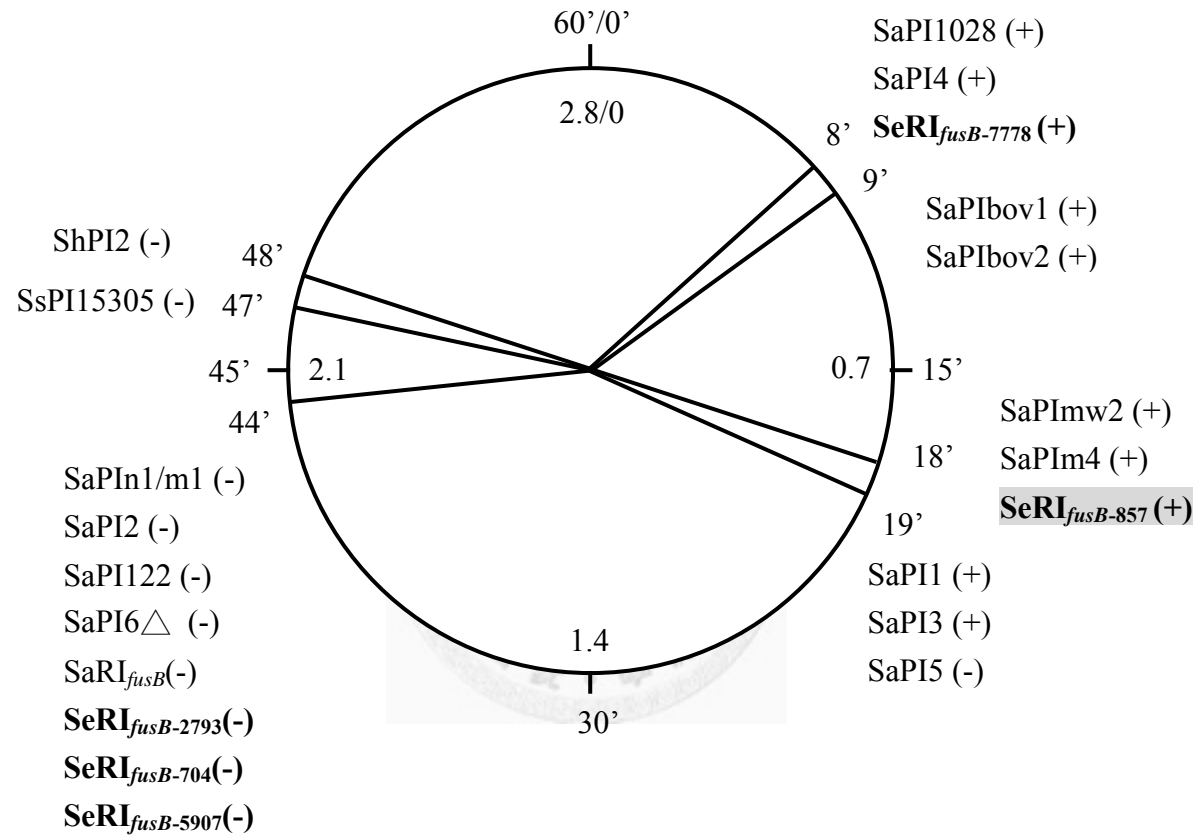
Direct repeat (DR)以(|)表示：

(A/C)GAGGCTGGGACATAATTCCTAGCAAATAGCCAGTAAATGAGITTTTT(T/C)ATAAATTCATTTACTGGA
TTATTT



att_c site 以(↑)表示：

SeRI_{*fusB*-704} 位於 *groEL* 下游 (44')，*att_c* site 為 ATGCCAGGTATGATGTAAAAA；SeRI_{*fusB*-857}、*Staphylococcus epidermidis* 14.1.R1.SE 和 *Staphylococcus epidermidis* FRI909 位在 *smpB* 下游 (18')，*att_c* site TCCCGCCGTCTCCAT。



圖六、金黃色葡萄球菌基因序列 PI *att_c* site 位置圖

將金黃色葡萄球菌基因序列 (2.8Mb)以分鐘表示，圓圈外圍表示 60 分鐘，圓圈內圍表示 2.8 M 基因長度，正號或負號表示 PI insertion orientation 順時針或逆時針方向，*SeRI_{fusB-857}* insertion 在 18 分鐘的位置。

表一、2009 年表皮葡萄球菌夫西地酸抗藥基因與 MIC 之關係

Resistant determinant	<i>ajI</i> -LP- <i>fusB</i> type	菌株個數	不同 MIC ($\mu\text{g/ml}$) 菌株數目			
			2	4	8	16
<i>fusB</i>	Type I	2	0	0	2	0
	Type II	18	0	0	5	13
	Type III	15	1	1	8	5
	Undetermined	4	0	0	2	2
<i>fusA</i>	-	1	0	0	0	1
總共		40	1	1	17	21

MIC : minimum inhibitory concentration

表二、2009 年表皮葡萄球菌 *fusB* insertion site

<i>fusB</i> insertion site	<i>ajI</i> -LP- <i>fusB</i> type				總共
	Type I	Type II	Type III	undetermined	
<i>groEL</i>	1	17	15	0	33
<i>rpsR</i>	0	1	0	0	1
undetermined	1	0	0	4	5
總共	2	18	15	4	39

表三、2009 年夫西地酸抗藥菌株 *mecA* 和 *icaAB* 分析

Origin of strains	No. of strains	% positive for	
		<i>icaAB</i>	<i>mecA</i>
Blood	39	33 (84.6)	39 (100)
CSF	1	1(100)	1 (100)
Hand	16	2 (12.5)	5 (31.25)

表四、ORFs of *ajI-LP-fusB* undetermined strain *S. epidermidis* NTUH857

Annotation	Location (bp)	Size of encoded product (aa)	Predicted product	Homologous protein [Source]	Accession No.
<i>smpB</i>	<1-342	-	SsrA-binding protein	SsrA-binding protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228]	NP_764121.1
1	903-1127	74 (complement)	Hypothetical protein	Hypothetical protein SEVCU128_1987 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> VCU128]	EHR95921.1
<i>int</i>	1139-2083	314 (complement)	Integrase	Phage integrase family protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> FRI909]	EFV89353.1
2	2357-3007	216 (complement)	Transcriptional regulator	Hypothetical protein HMPREF9981_07274 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM020]	EJE10045.1
3	3150-3368	72	Transcriptional regulator	Conserved hypothetical protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> BCM-HMP0060]	ZP_0482469 4.1

4	3532-3753	73	Hypothetical protein	Conserved hypothetical protein [<i>Staphylococcus warneri</i> L37603]	ZP_0467823 7.1
5	3844-4110	88	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> VCU144]	EGG60387.1
6	4114-4425	108	Hypothetical protein	Hypothetical protein HMPREF9983_11533 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM023]	EJE04513.1
7	4519-5391	290	Primase	Pathogenicity island protein, partial [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM053]	EJD99062.1
8	5404-6870	488	Virulence-associated protein E	Virulence-associated protein E [<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14.1.R1.SE]	EHM70944.1
9	7160-7522	120	Pathogenicity island protein	Pathogenicity island protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM023]	EJE05098.1
10	7687-8448	253	Hypothetical protein	Hypothetical protein SH2091 [<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435]	YP_254006.1
11	8796-9134	112	Pathogenicity island protein	Pathogenicity island family protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM057]	EJD90718.1
12	9161-9844	227	Hypothetical protein	Hypothetical protein HMPREF9989_12622 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM057]	EJD90719.1
13	9931-10389	152	Pathogenicity island protein	Pathogenicity island family protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14.1.R1.SE]	EHM70934.1
14	10392-10733	113	Hypothetical protein	Hypothetical protein HMPREF9988_12898 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM053]	EJD90479.1
15	10738-11292	184	Terminase small subunit	Phage terminase family protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM049]	EJD95503.1

LP	12661-12723	20	<i>fusB</i> leader peptide	SaRI _{<i>fusB</i>} <i>fusB</i> leader peptide [<i>Staphylococcus aureus</i> CS6-EEFIC]	CAL23837.1
<i>fusB</i>	12799-13440	213	FusB	SaRI _{<i>fusB</i>} <i>fusB</i> [<i>Staphylococcus aureus</i> CS6-EEFIC]	AAN07146.1
<i>aj2</i>	13705-14163	152	<i>aj2</i>	<i>S. aureus</i> pUB101	NP_932196
Δ <i>aj3</i>	14330-14795	-	Δ <i>aj3</i>	<i>S. aureus</i> pUB101	NP_932195
<i>tnp</i>	15831-16844	337	Transposase	ISSep1-like transposase [<i>Staphylococcus aureus</i>]	BAG84190.1
16	17075-17188	37 (complement)	Hypothetical protein	Hypothetical protein GSEF_0159 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> FRI909]	EFV90062.1
17	17680-17988	102	Hypothetical protein	Conserved hypothetical protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> FRI909]	EFV90061.1
18	18034-18294	86	Terminase small subunit	Conserved hypothetical protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> FRI909]	EFV90060.1
19	18548-18790	88 (complement)	Hypothetical protein	Conserved hypothetical protein [<i>Staphylococcus epidermidis</i> W23144]	ZP_0479660 2.1
20	19200-20522	440	Hypothetical protein	Hypothetical protein SEVCU071_0911 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> VCU071]	EHM66636.1
21	20534-20833	99	Hypothetical protein	Hypothetical protein HMPREF9989_10436 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIHLM057]	EJD91439.1
22	21051-21476	141 (complement)	Hypothetical protein	Hypothetical protein GSEF_0151 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> FRI909]	EFV90054.1
23	21515-21775	86	Hypothetical protein	Hypothetical protein HMPREF9956_0569 [<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14.1.R1.SE]	EHM73971.1

24	21970->22080	-	Na ⁺ -transporting ATP synthase	Na ⁺ -transporting ATP synthase [<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228]	NP_764126.1
----	--------------	---	--	--	-------------

表五、2008~2009 年表皮葡萄球菌 夫西地酸抗藥基因與 MIC 之關係

Resistant determinant	<i>ajl</i> -LP- <i>fusB</i> type	2008-2009 菌株個數	不同 MIC (µg/ml) 菌株數目				
			2	4	8	16	32
<i>fusB</i>	Type I	7	0	1	3	3	0
	Type II	41	0	0	8	33	0
	Type III	39	1	11	16	11	0
	Undetermined	15	0	1	8	6	0
<i>fusC</i>	-	2	0	0	0	1	1
<i>fusA</i>	-	1	0	0	0	1	0
總共		105	1	13	35	55	1

表六、2008~2009 年表皮葡萄球菌抗藥基因整理

抗藥基因	基因型	菌株數目 (百分比)	
		2008 年	2009 年
<i>fus fene</i>	<i>fusB</i>	63 (97%)	39 (97.5%)
	<i>fusC</i>	2 (3%)	0 (0%)
	<i>fusA</i> mutation	0 (0%)	1 (2.5%)
<i>ajl-LP-fusB</i> type	Type I	5 (7.9%)	2 (5.1%)
	Type II	23 (36.5%)	18 (46.1%)
	Type III	24 (38%)	15 (38.5%)
	undetermined	11 (17.5%)	4 (10.3%)
<i>fusB</i> insertion site	<i>groEL</i>	50 (79.4%)	33 (84.6%)
	<i>rpsR</i>	0 (0%)	1 (2.6%)
	undetermined	13 (20.6%)	5 (12.8%)

2008 年菌株資料來源(54)

表七、2009 年表皮葡萄球菌臨床菌株

NO.	菌株編號	檢體來源	<i>fus</i> gene	FA MIC	<i>mecA</i>	<i>icaAB</i>	CC	E	GEM	OX	SXT
1	NTUH526	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
2	NTUH857	血液	B	8	+	-	S	R	R	R	R
3	NTUH3896	血液	B	16	+	+	S	S	R	R	R
4	NTUH4893	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
5	NTUH6466	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
6	NTUH6844-2	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
7	NTUH9091	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
8	NTUH9080	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
9	NTUH2305	血液	B	16	+	+	S	S	R	R	R
10	NTUH1848	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
11	NTUH3525	血液	B	8	+	+	S	S	R	R	R
12	NTUH7389	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
13	NTUH7667-1	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
14	NTUH8725	血液	B	16	+	-	S	S	S	R	S
15	NTUH9232	血液	B	2	+	+	R	R	R	R	R
16	NTUH9894	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	S
17	NTUH2745-2	血液	B	8	+	+	S	I	R	R	R
18	NTUH5798-2	血液	B	8	+	+	S	S	R	R	R
19	NTUH6001	血液	A	16	+	-	S	R	R	R	S
20	NTUH6547	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R

21	NTUH7633	血液	B	16	+	+	S	S	R	R	S
22	NTUH8357	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
23	NTUH1606	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
24	NTUH2692	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
25	NTUH1093	腦脊髓液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
26	NTUH7230	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
27	NTUH2517	血液	B	16	+	-	R	R	S	R	R
28	NTUH3553	血液	B	16	+	-	S	R	R	R	R
29	NTUH6001-2	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
30	NTUH7809	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
31	NTUH1384	血液	B	8	+	-	S	R	R	R	R
32	NTUH3869	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
33	NTUH4829-1	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	S
34	NTUH7686	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
35	NTUH7982	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
36	NTUH9481	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
37	NTUH103	血液	B	16	+	+	R	R	R	R	R
38	NTUH2035	血液	B	8	+	+	R	R	R	R	R
39	NTUH5025-2	血液	B	8	+	-	S	S	S	R	R
40	NTUH8055	血液	B	4	+	+	R	R	R	R	R

FA : fusidic acid, CC : clindamycin, E : erythromycin, GEM : gemtamicin, OX : oxicillin, SXT : trimethoprim/sulfamethoxazole
 CC, E, GEM, OX, SXT 抗生素資料來自台大醫院細菌室

表八、核酸引子列表

Description	Primer name	Sequence (5'to 3')
Specific identification of <i>s.epidermidis</i>	serp0107F	TTG AGC TTG TCA TTG GTT CG
	serp0107R	TGT AGA GGT TGC ACG TCG AG
<i>dnaJ</i> degenerate for PCR-RFLP	SA-F	GCC AAA AGA GAC TAT TAT GA
	SA-R	ATT GYT TAC CYG TTT GTG TAC
<i>fusA</i> Point mutation detection	fusA 404-425	ACA AAA TGG ACA AAT TAG GTG C
	fusA 946-968	GTT ATG ACT GAC CCT TAT GTT GG
	fusA - 68 -- 49	CAT GCT TAG GGC ATC GCC A
	fusA Down 47-25	GCT CAM CYT GTA TTT TAA CCT AG
<i>fusB</i> detection and <i>fusB</i> specific probe	fusB-F	CCG TCA AAG TTA TTC AAT CG
	fusB-R	ACA ATG AAT GCT ATC TCG ACA
<i>fusC</i> detection	fusC 162-183F	GGA CTT TAT TAC ATC GAT TGA C
	fusC 572-550R	CTG TCA TAA CAA ATG TAA TCT CC
<i>fusD</i> detection	fusD 73-90F	AAT TCG GTC AAC GAT CCC
	fusD 537-520R	GCC ATC ATT GCC AGT ACG
<i>ajl-LP-fusB</i> typing	ri17 250-269F	GTT GCT AAA TCT CCT CAC GG
	fusB 283-254R	GGG TAA ATC CAG AGT TAA TCG
	<i>ajl</i> 85-102F	AAT GCT ATC GGC GCT TA
	<i>ajl</i> 491-474R	CGT TGG TGA CTT TCA TCG
Prediction <i>fusB</i> insertion site	Int(I) 109-128 F	CGT AAA TCA GAC GCT AAA CA
	Int(I)1139-1122R	CTA AAC TTG TGG GAA GGG
	S.epi groEL1582-1599F	GAA CAA CCT GGA ATG GGT
	185LA3R	CTC ACA GAG GTT CTA TAA TGT TGG
	Int(II) 541-565F	GCT AAA CGT AAT AAC TAT TTA GAA G
	Int 1061-1042	GTG TGA CGT AAT GTG TGC GT
	fusB 531-559F	CGG ATG GTC AAT ATG TAA AAA AAG GTG AC
	S.epi rpsR 6-24F	AGG TGG ACC AAG AAG AGG C
	fusB LA-2R	AAT ACT CCT GGA TGG CGT
	int (III) 30-49 (F)	TAC TAG GGT ACA AAT GAC CG
	int (III) 941-922 (R)	GAC GAG TTA GAG GGT ATT GG
	S.epi sodium transpoter140-162 (R)	TCT CAC TAT GGA TTT AAC TTC CG
	S.epi ssrA-binding protein (F)	AAG ATA CAA TTG AAG CGG GG
	<i>mecA</i> detection	<i>mecA</i> 375-392F

	mecA-1091	GGT GTG CTT ACA AGT GCT AA
icaAB detection	icaAB-F	TTA TCA ATG CCG CAG TTG TC
	icaAB-R	GTT TAA CGC GAG TGC GCT AT
LA PCR	fusB 531-559F	CGG ATG GTC AAT ATG TAA AAA AAG GTG AC
	fusB 437-467F	GAG AAA TTT CTA ATC AGG TTG TAA AGG GG
	fusB 389-361R	TTC CGA TTT GAT GCA AGT TCA TTC CAT CC
	fusB 282-253R	AAG TTT TTG CGG ACT AGG TAG TTC AAA AGG
	fusB 554-581F	GGT GAC TAT ATA TGT CGA GAT AGC ATT C
	fusB 222-193R	GCT TCA ATT TCT TTG TTT GAT AAT CTG ATG
Sequence of <i>fusB</i> and flanking region	s.epi 2821-2841(F)	GGG CTT TTT GTT TTT GGG TGC
	s.epi speI up 33-65(F)	TTG AGC CCT GAA TAT TAA TAG GG
	s.epi speI down 191-212(R)	GAC TAC AGA CTG AAG CTT GCC C
	S. epi inverse 21-1(R)	GTT TCA CTC ATC GCA ACA CAG
	S. epi inverse 1990-2007(F)	AGG TGC GAA GAT TGC AGG
	S. epi 857aj3 218-242(R)	CAT TTT CCT CAA CAT ATA GAA GTT C
	S.epi xbaI 383-407(F)	GAA CAT ACG TTC TTT TAT CGT GGT G
	S.epi xbaI 147-165(R)	CTG GAT TTG CAG ACC TCC C
	S.epi xbaI3(F)	CAT TGA TGA ACA ACA GAA ACC G
	S.epi xbaI3(R)	TAG ATA CAG TAA CTC TTT GGC TG
	s.epi HindIII-1(R)	CTG GTT CAT TAA TTC CAG TAG C
	s.epi HindIII-2(R)	TAT TAA ATG CAA CAG GCA ACC
	S.epi Hind-3(F)	TCG TTA ACT TTA TCC ACC CG
	S.epi Hind-4(R)	CTA CAT ACT TTG TCA CGC C
	S.epi BclI-1(R)	CAT TTT TTA GTC ACT TCA CGG
	S.epi BclI-1(F)	GGT ATC TAT TCA AGA GGT ATG G
	S.epi PacI-2(F)	ACC AAT TAA GCC AAG TGA CC
	S.epi PacI-3(R)	CAT CTT ATA TTC AAG ATC CAA TAG C
	S.epi BclI-2(R)	ATA CGT TGT GTG AAA TAC CC
	S.epi PacI-3(F)	CAT TTA TAT GGG CTA TGC TGG
	S.epi sodium transpoter 52-71 (R)	ATT AGT AGA GCG CTT GTT CC
	S.epi PacI-4(R)	GAC GCA TCT CTG TTA TGA CG
	S.epi ssra 407-429 (F)	TCA AGC ACT TAA AGA AAA AGC GG
	S.epi PacI-5(R)	GCA TAG CCC ATA TAA ATG TGA C
	s.epi 29(R)	TCA TCA ACA AAT ACC TGT CTG G
	S.epi up 30(R)	CCT AGT GAT GTA CAA CAT TGG
	S.epi up 32(F)	ATT TGA CTA ATG GCT TGT ATG C
	s. epi up 33(R)	AAC AAA ATC ATA TTT ATA AAC TCG
	s.epi down 34(F)	GGT TGA TGA TAC GAT AAG TGC

s.epi down 35(R)

CCC TAC AGA CCC TCC TTG TG

s.epi down 36(F)

GTC TTA TAA CAA TTT GAA AAG GG

s.epi down 37(F)

AGC AAA GTC TAC CCA TCA GC

S.epi down 40(F)

AAA AAA CTC CAA TGG GAA GC

Primer sequence used in this study. M : A + C



參考文獻

1. **A. Wali Karzai, Miriam M. Susskind, and Robert T. Sauer.** 1999. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J* **18**:3793-3799.
2. **Agirrezabala, X., and J. Frank.** 2009. Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Q Rev Biophys* **42**:159-200.
3. **Archer, G.L., and J.L. Johnston.** 1983. Self-transmissible plasmids in *Staphylococci* that encode resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**:70-77.
4. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K.-i. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet* **359**:1819-1827.
5. **Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, and T.A. Steitz.** 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**:905-920.
6. **Besier, S., A. Ludwig, V. Brade, and T.A. Wichelhaus.** 2003. Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **47**:463-469.
7. **Brian F. Cheetham, David B. Tattersall, Garry A. Bloomfield, Julian I. Rood, and Margaret E. Katz.** 1995. Identification of a gene encoding a bacteriophage-related integrase in a *vap* region of the *Dichelobacter nodosus* genome *Gene* **162**:53-58.
8. **Castanheira, M., A.A. Watters, J.M. Bell, J.D. Turnidge, and R.N. Jones.** 2010. Fusidic acid resistance rates and prevalence of resistance mechanisms among *Staphylococcus* spp. isolated in North America and Australia, 2007-2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:3614-3617.
9. **Chen, C.M., M. Huang, H.F. Chen, S.C. Ke, C.R. Li, J.H. Wang, and L.-T. Wu.** 2011. Fusidic acid resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital. *BMC Microbiology* **11**:98-106.
10. **Chen, H.J., W.C. Hung, S.P. Tseng, J.C. Tsai, P.R. Hsueh, and L.J. Teng.** 2010. Fusidic acid resistance determinants in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:4985-4991.
11. **Chen, H.J., J.C. Tsai, W.C. Hung, S.P. Tseng, P.R. Hsueh, and L.J. Teng.** 2011. Identification of *fusB*-mediated fusidic acid resistance islands in *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*

- 55:5842-5849.
12. **Chen, Y., R.K. Koripella, S. Sanyal, and M. Selmer.** 2010. *Staphylococcus aureus* elongation factor G-structure and analysis of a target for fusidic acid. The FEBS journal **277**:3789-3803.
 13. **Dobie, D., and J. Gray.** 2004. Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. Arch. Dis. Child. **89**:74-77.
 14. **Frebourg, N.B., S. Lefebvre, S. Baert, and J.F. Lemeland.** 2000. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J. Clin. Microbiol. **38**:877–880.
 15. **Garry A. Bloomfield, Gabrielle Whittle, Matthew B. McDonagh, Margaret E. Katz, and Brian F. Cheetharn.** 1997. Analysis of sequences flanking the *vap* regions of *Dichelobacter nodosus*: evidence for multiple integration events, a killer system, and a new genetic element. Microbiology **143**:553-562.
 16. **Graves, S.F., S.D. Kobayashi, and F.R. DeLeo.** 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. J Mol Med (Berl) **88**:109-114.
 17. **Hacker, J., and J.B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. **54**:641-679.
 18. **Hauschild, T., and S. Stepanovic´.** 2008. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *dnaJ* gene. J. Clin. Microbiol. **46**:3875-3879.
 19. **Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Gotz.** 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol. Microbiol. **20**:1083-1091.
 20. **Howden, B.P., and M.L. Grayson.** 2006. Dumb and dumber—the potential waste of a useful antistaphylococcal agent: emerging fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. **42**:394-400.
 21. **James P. O'Gara JP, and Hilary Humphreys H.** 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J Med Microbiol **50**:582-587.
 22. **Jodi A. Lindsay, Alexey Ruzin, Hope F. Ross, natasha Kurepina, and Richard P. Novick.** 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *S. aureus*. Mol Microbiol **29**:527-543.
 23. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K.-i. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R.i. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K.**

- Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**:1225-1240.
24. **Langille, M.G., W.W. Hsiao, and F.S. Brinkman.** 2010. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:373-382.
25. **Laurberg, M., O. Kristensen, K. Martemyanov, A.T. Gudkov, I. Nagaev, D. Hughes, and A. Liljas.** 2000. Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J. Mol Biol* **603**:593-603.
26. **Lindsay, J.A., A. Ruzin, H.F. Ross, N. Kurepina, and R.P. Novick.** 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **29**:527-543.
27. **Liu, D., E. Swiatlo, F.W. Austin, and M.L. Lawrence.** 2006. Use of a putative transcriptional regulator gene as target for specific identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Microbiol* **43**:325-330.
28. **Madhusoodanan, J., K.S. Seo, B. Remortel, J.Y. Park, S.Y. Hwang, L.K. Fox, Y.H. Park, C.F. Deobald, D. Wang, S. Liu, S.C. Daugherty, A.L. Gill, G.A. Bohach, and S.R. Gill.** 2011. An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **193**:1854-1862.
29. **Margaret E. katz, Pauline M. Howarth, Weng K. Yong, George G. Riffkin, Laurie J. Depiazz, and Julian I. Rood.** 1991. Identification of three gene regions associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*, the causative agent of ovine footrot. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2117-2124.
30. **McLaws, F., I. Chopra, and A.J. O' Neill.** 2008. High prevalence of resistance to fusidic acid in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:1040-1043.
31. **Mempel, M., H. Feucht, W. Ziebuhr, M. Endres, R. Laufs, and L. Gruter.** 1994. Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1251-1255.
32. **Nagaev, I., J. Björkman, D.I. Andersson, and D. Hughes.** 2001. Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **40**:433-439.
33. **Norstrom, T., J. Lannergard, and D. Hughes.** 2007. Genetic and phenotypic identification of fusidic acid-resistant mutants with the small-colony-variant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4438-4446.
34. **Novick, R.P., G.E. Christie, and J.R. Penades.** 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:541-551.
35. **Novick, R.P., and A. Subedi.** 2007. The SaPIs mobile pathogenicity islands of

- Staphylococcus*. Chem Immunol Allergy **93**:42-57.
36. **O' Brien, F.G., C. Price, W.B. Grubb, and J.E. Gustafson.** 2002. Genetic characterization of the fusidic acid and cadmium resistance determinants of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB101. J. Antimicrob. Chemother. **50**:313-321.
 37. **O' Neill, A.J., and I. Chopra.** 2006. Molecular basis of *fusB*-mediated resistance to fusidic acid in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **59**:664-676.
 38. **O'Neill, A.J., A.R. Larsen, R. Skov, Henriksen, A. S. , and I. Chopra.** 2007. Characterization of the epidemic european fusidic acid-resistant impetigo clone of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **45**:1505-1510.
 39. **O'Neill, A.J., F. McLaws, G. Kahlmeter, A.S. Henriksen, and I. Chopra.** 2007. Genetic basis of resistance to fusidic acid in Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:1737-1740.
 40. **O'Neill, A.J., A.R. Larsen, A.S. Henriksen, and I. Chopra.** 2004. A fusidic acid-resistant epidemic strain of *Staphylococcus aureus* carries the *fusB* determinant, whereas *fusA* Mutations are prevalent in other resistant isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:3594-3597.
 41. **Otto, M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. Nature Reviews Microbiology **7**:555-567.
 42. **P, C., and T. J.** 1999. Fusidic acid in vitro activity. Int J Antimicrob Agents **12(suppl 2)**:S45-58.
 43. **Ramrath, D.J., H. Yamamoto, K. Rother, D. Wittek, M. Pech, T. Mielke, J. Loerke, P. Scheerer, P. Ivanov, Y. Teraoka, O. Shpanchenko, K.H. Nierhaus, and C.M. Spahn.** 2012. The complex of tmRNA-SmpB and EF-G on translocating ribosomes. nature **485**:526-529.
 44. **Shah, M.M., H. Iihara, M. Noda, S.X. Song, P.H. Nhung, K. Ohkusu, Y. Kawamura, and T. Ezaki.** 2007. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. Int J Syst Evol Micr **57**:25-30.
 45. **Skold, S.E.** 1982. Chemical cross-linking of elongation factor G to both subunits of the 70-S ribosomes from *Escherichia coli*. Eur J Biochem **127**:225-229.
 46. **Subedi, A., C. Ubeda, R.P. Adhikari, J.R. Penadés, and R.P. Novick.** 2007. Sequence analysis reveals genetic exchanges and intraspecific spread of SaPI2, a pathogenicity island involved in menstrual toxic shock. Microbiology **158**:3235-3245.
 47. **Takahashi, T., I. Satoh, and N. Kikuchi.** 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. Int J Syst Bacteriol **49**:725-728.
 48. **Tormo-Mas, M.A., I. Mir, A. Shrestha, S.M. Tallent, S. Campoy, I. Lasa, J.**

- Barbe, R.P. Novick, G.E. Christie, and J.R. Penades.** 2010. Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature* **465**:779-782.
49. **Turlan, C., and M. Chandler.** 1995. IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replication deletions. *EMBO J* **14**:5410-5421.
50. **Ubeda, C., E. Maiques, E. Knecht, I. Lasa, R.P. Novick, and J.R. Penades.** 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol. Microbiol.* **56**:836-844.
51. **Vuong, C., and M. Otto.** 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* **4**:481-489.
52. **Worthington, T., P.A. Lambert, and T.S. Elliott.** 2000. Is hospital-acquired intravascular catheter-related sepsis associated with outbreak strains of coagulase-negative staphylococci? *J Hosp Infect* **46**:130-134.
53. **Zinn, C.S., H. Westh, and V.T. Rosdahl.** 2004. An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. *Microb Drug Resist* **10**:160-168.
54. 游尚捷。2011。表皮葡萄球菌對夫西地酸之抗藥基因及亞型分析。國立臺灣大學碩士論文