

甲氧苯青黴素抗藥性金黃色葡萄球菌的快速檢測

Rapid Identification and Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

曾嵩斌、鄧麗珍

Sung-Pin Tseng, Lee-Jene Teng

近年來由於甲氧苯青黴素抗藥型金黃色葡萄球菌的感染增加，造成院內感染比例增加以及治療的困難，此趨勢迫使研究人員專注於快速鑑定進而發展了許多方法。如特殊培養基偵測甲氧苯青黴素抗藥性 (BBL CHROMagar、MRSA ID、MRSA Select 與 BacLite™ Rapid MRSA test)、粒子凝集反應檢測法 (particle agglutination assays) 與許多不同的分子生物學的方法 (multiplex and real-time qPCR)。這些方法大幅縮短了鑑定的時間並提供臨床上治療及感染管制的依據，在未來微生物檢測上，應是重要且具有潛力的項目。

Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is very important in clinical medicine. Several rapid diagnostic methods have been developed with no longer incubation or much shorter incubation time compared to conventional methods. These methods include culture-base method, such as BBL CHROMagar, MRSA ID, MRSA Select and BacLite™ Rapid MRSA test, and molecular methods, such as multiplex and real-time qPCR. In general, the rapid tests can reduce turn-around time in laboratories. In the future, rapid diagnosis might become a trend in microbiology laboratories.

一、金黃色葡萄球菌及甲氧苯青黴素抗藥問題

金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 屬於革蘭氏陽性球菌，是人與動物常見的病原菌，約有 20–30% 的感染者不會有任何的臨床症狀。但引起的感染可從輕微的皮膚感染到嚴重的全身性感染，例如心內膜炎 (endocarditis)、敗血症 (septicemia) 與骨髓炎 (osteomyelitis)^(1, 2) 等。

在醫療院所，金黃色葡萄球菌是重要的院內感染 (nosocomial infection) 常見細菌之一。嚴重的金黃色葡萄球菌亦常見於慢性感染，像是慢性鼻竇炎 (rhinosinusitis)⁽³⁾、骨髓炎⁽¹⁾ 與耳炎 (otitis)⁽⁴⁾。這些慢性感染長期施予抗生素治療，使得金黃色葡萄球菌對抗生素耐受性增加，造成細菌難以根除且易造成復發^(5, 6)。

由許多文獻報告可知金黃色葡萄球菌可經由獲得外來抗藥基因或是細菌生理上的快速調節來適應

環境的各種變化。1961 年英國首次報導金黃色葡萄球菌對甲氧苯青黴素 (methicillin) 產生抗藥性，病人在施予抗生素治療數月後金黃色葡萄球菌即對甲氧苯青黴素具有抗藥性⁽⁷⁾。之後各國也陸續出現區域性 (endemic) 的 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)，目前已是全球性的問題⁽⁸⁾。

由於實施詳盡和昂貴的感染控制相當困難，也因為這樣造成 MRSA 散佈的情形日趨嚴重^(9, 10)。目前推測全世界約有 5 千 3 百萬的人是 MRSA 的帶原者⁽¹¹⁾，在醫院 MRSA 感染會造成美金 27,000 – 34,000 元多餘的支出⁽¹²⁾。截至今日，具有高傳染力的特定型金黃色葡萄球菌 (像是 EMRSA-15 和 EMRSA-16) 在不同國家皆有出現且造成院內感染形成一個嚴重的問題⁽¹³⁻¹⁵⁾。

在臺灣，MRSA 造成院內感染的比例從 1998 年的 75% 逐年攀升到 2000 年的 84%⁽¹⁶⁾。在臺大醫院長時間追蹤亦顯示類似的結果：從 1986 年的 26.3% 逐年增加到 2001 年的 77%⁽¹⁷⁾。在醫院中 MRSA 的傳遞可藉由健康工作者的手經由醫療而傳染給其他人，交叉感染的比例在醫院的評估高達 70%，顯見我們必須重視此問題^(18, 19)。有學者建議在 MRSA 感染的高度危險病人上進行 MRSA 的篩檢 (screening)，將有助於降低 MRSA 在醫院的散播⁽²⁰⁾。

因此金黃色葡萄球菌快速鑑定及抗藥性快速偵測的主要對象有二，一為已經感染的病人，另一為沒有生病卻是身上帶有細菌者 (carrier)。對於已經感染的病人，快速檢測有助於感染的正確診斷，且將有助於醫師選擇使用最適當的抗生素 (治療 MRSA 的 glycopeptides 和 oxazolidinones)⁽²¹⁾。若可以迅速檢測出帶有細菌者，將可減低院內 MRSA 的感染率，並降低醫院抗生素的使用量⁽²¹⁾。

二、甲氧苯青黴素的抗藥機轉以及 SCCmec 的基因結構

Methicillin 與 oxacillin 屬於 β -lactam 類藥物，其結構類似肽聚醣 (peptidoglycan) 前驅物質 D-alanyl-D-alanine，會和細菌中合成細胞壁肽聚醣的 penicillin-binding protein 2 (PBP2) 產生不可逆

結合，進而阻斷細胞壁合成並造成細菌死亡。金黃色葡萄球菌對這類藥物的抗藥性，主要原因是細菌具有外來 *mecA* 基因所致，*mecA* 基因可表現出 78-kDa 的 penicillin-binding protein 2a (PBP2a)，相較於 PBP2，PBP2a 對 β -lactam 類藥物親和力較低，功能不易受到藥物抑制，進而使菌體對大多數 β -lactam 類藥物產生抗性^(22, 23)。而且 MRSA 也經常伴隨對其他種類抗生素的抗藥，導致治療上的許多問題。目前已知 *mecA* 抗藥基因座落在一段外來 DNA (foreign DNA) (大小約 21 to 67 kb) 移動性的基因片段 SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) 上⁽²⁴⁾。

分析葡萄球菌各菌種中之 SCCmec，如圖 1 所示，均包含兩大基因結構，分別為「*mec* complex」及「*ccr* complex」。Mec complex 主要包含抗藥基因 *mecA*、調控 *mecA* 表現的 *mecI*、*mecR1* 及插入 *mecA* 上下游的 insertion sequence，依其基因結構及 insertion sequence 的排列組合可分為 A-E 五個 major classes，其中以 classes A-C 較常見。另一部分 *ccr* complex 中則有 *cassette chromosome recombinases (ccr)* 之基因，可表現出 invertase/resolvase class 的 recombinase，協助 SCCmec 的移動，*ccr* 可專一性辨認位於 *orfX* 3' 端的 SCCmec attachment site (*attB_{sc}*)，但尚不清楚 *orfX* 之功能，*ccr* complex 依序列差異可分為 6 個 *ccr* allotypes。

目前在金黃色葡萄球菌之 SCCmec 依不同種類的 *mec* complex 及 *ccr* allotypes 組合，可分為五種主要基因型以及三種尚未確定分型的基因型，長度從 20.9 到 67.9 kb 不等，如表 1 所列，各基因型再依 *mec* complex 及 *ccr* complex 以外的 junkyard region 序列差異區分為不同亞型⁽²⁵⁾。在五個主要基因型中，SCCmec type II 及 type III 因質體或跳躍子 (transposon) 插入 SCCmec 結構中，而具備有其他抗菌物質之抗藥性。不同 SCCmec 型往往代表不同細菌特性與臨床意義，也常會攜帶不同的毒性因子。目前許多報告顯示 type I、II 及 III 的 MRSA 主要為造成院內感染，type IV 及 V 則在社區感染的 MRSA 中占多數⁽²⁶⁾。

因此，分析 SCCmec 基因型的分布有助於分

表 1.

MRSA 中常見之五種 SCCmec 分型。

SCCmec type	I	II	III	IV	V
<i>mec</i> complex	B	A	A	B	C
<i>ccr</i> allotype	A1/B1	A2/B2	A3/B3 及 C	A2/B2	C
Size (kb)	34.3	53	67.9	20.9–24.3	28

析及比較各地的 MRSA 細菌演化關係及感染流行病學。在臺灣，臺大醫院從 1999 年到 2005 年的流行病學分析發現與醫院照顧有關之 MRSA 感染 SCCmec 分型從 type III 慢慢演變出 type IV 和 V，而這兩型則與社區感染的 MRSA 較有關。脈衝式電泳的分析也推測這樣的菌叢是同一個來源；這樣的結果顯示臺灣社區感染的特殊菌叢開始散佈至醫院內慢慢改變醫院內 MRSA 的生態，對於此細菌的治療更需要多加關注⁽²⁷⁾。

三、實驗室快速偵測甲氧苯青黴素抗藥性的方法

1. 以培養方式偵測甲氧苯青黴素抗藥性

傳統培養方法為依照臨床實驗室標準手冊 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2009) 以最小抑菌濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的方法測定甲氧苯青黴素的敏感性。以 Muller-Hinton 培養基附加 2% 氯化鈉

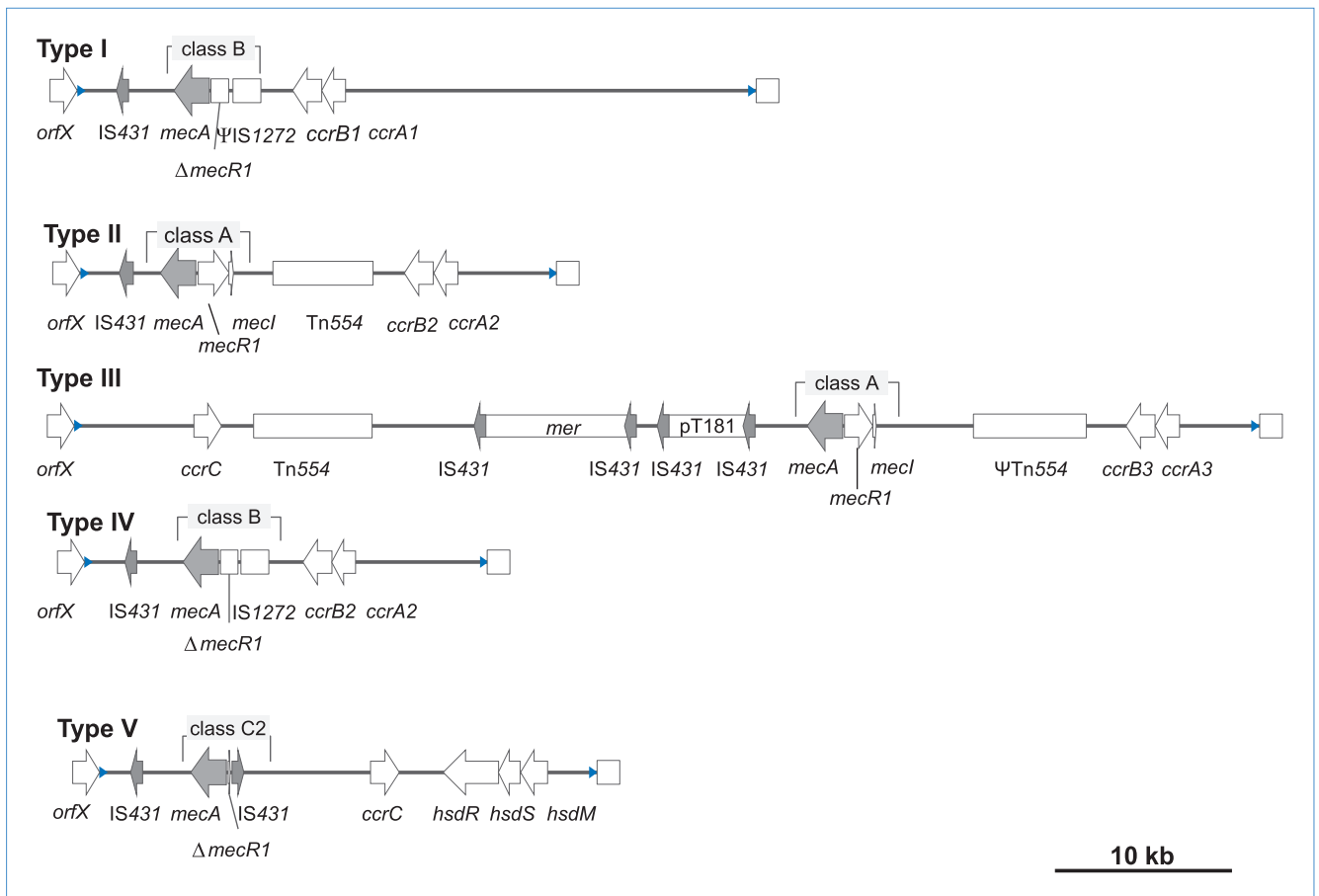


圖 1. SCCmec 基因結構圖，Type I：GenBank 序列 AB033763.2、Type II：AJ810120.1、Type III：AB037671.1、Type IV：AB425824.1、Type V：AB121219.1，藍色的小箭頭為 direct repeat (DR)。

可用來篩選 oxacillin 與甲氧苯青黴素的抗藥性。方法是以生理食鹽水將細菌懸浮液製成濃度 0.5 McFarland (約 10^8 cells/mL)，接著以多點接種器將菌液點在含有不同濃度抗生素的 Muller-Hinton 培養基，置於 35 °C 培養 24 小時後判讀最小抑菌濃度結果。

Oxacillin 抗藥性的判讀標準為最小抑菌濃度 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ，敏感性則為 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ 。目前為了方便臨床偵測甲氧苯青黴素抗藥性，發展了數種呈色方法如 BBL CHROMagar (BD Diagnostics, Sparks, MD)、MRSA ID (bioMérieux, France) 與 MRSA Select (Bio-Rad, Hercules, USA) ⁽²⁸⁻³¹⁾。在 2006 年有報導比較此三種方法，在 16–18 小時培養後，其結果專一性皆相當好，為 99–100%，但敏感性則較差，BBL CHROMagar 為 59%、MRSA ID 為 51% 與 MRSA select 為 65% ⁽³¹⁾。顯示這樣的方法雖然簡單、方便，但其敏感性仍有很大的提升空間。

2. 新穎的培養技術

一新穎培養技術 BacLite™ Rapid MRSA test (3M Healthcare, Berkshire, United Kingdom) 之主要偵測原理是利用生物冷光 (bioluminescence) 偵測腺苷酸激酶 (adenylate kinase) 的活性。此法結合選擇性培養液 (selective broth enrichment)，培養液中含抗生素 cefoxitin、ciprofloxacin 及 colistin 以讓 MRSA 增生，再利用磁珠微粒分離及 lysostaphin 裂解金黃色葡萄球菌等過程後，偵測腺苷酸激酶的活性。其分析已可自動化，五小時內即可得到結果。

在以鼻拭子 (nasal swab) 為檢體來源的實驗中得到不錯的成果：靈敏度為 90.4%、特異性為 95.7% 與偽陰性為 98.7% ⁽³²⁾。此方法所需的價格約為 9.5 至 12 美元，比許多分子生物學的方法來得便宜許多，但仍需要更多的測試以驗證其實際應用性。

3. 粒子凝集反應檢測法 (Particle Agglutination Assays)

除了培養的方法之外，利用抗體偵測 PBP2a 的方法亦能節省培養的時間進而達到快速鑑定 MRSA 的目的。目前的方法可分為直接或間接

粒子凝集反應檢測法 (direct or indirect particle agglutination assays) 如 MRSA-screen (Denka Seiken, Tokyo, Japan) 和 Oxoid Penicillin Binding Protein (PBP2a) latex agglutination kit (Oxoid Limited, Hampshire, United Kingdom) ⁽³³⁻³⁵⁾。這兩個方法皆是利用帶有 PBP2a 抗體的乳膠小珠來快速檢測金黃色葡萄球菌是否帶有此蛋白。但此法仍需要有細菌培養，得到菌落後才能操作，因此仍然不夠快速。

四、以分子生物學方法偵測甲氧苯青黴素抗藥性

1. 多基因聚合酶鏈鎖反應偵測法 (Multiplex PCR)

對嚴重感染金黃色葡萄球菌的病人，臨床實驗室標準手則亦建議偵測 *mecA* 基因或 PBP2a 來作為進一步確認的方式。若是培養的方式為敏感型，但分子生物學方式偵測到此基因，則仍判定此菌為甲氧苯青黴素抗藥性。

將偵測金黃色葡萄球菌內 *mecA* 基因作為標準方法 (gold standard) 始於 1991 ⁽³⁶⁾，隨著分子生物學的快速發展，偵測的方式也發展出化學冷光探針 (chemiluminescent probe) ⁽³⁷⁾、循環式探針偵測 (cycling probe) ⁽³⁸⁾ 等方法。這些方式對於 *mecA* 基因偵測的靈敏度有顯著的提高，但若只是偵測 *mecA* 基因，除了 MRSA 之外，由於葡萄球菌其他的菌種 CoNS (coagulase-negative *Staphylococcus*) 也常帶有此基因，因此也會被偵測出來。

有鑑於此，後來發展的分子檢測方式，除了偵測 *mecA* 基因之外，也會加入一些金黃色葡萄球菌特有的基因，像是 *femA*、*nuc* 和 *clfA* 等基因標的，以雙重聚合酶鏈鎖反應 (duplex PCR) 偵測 *mecA* 與 *fermA* 基因的方法來偵測 MRSA ^(39, 40)，或三重聚合酶鏈鎖反應 (triplex PCR) 偵測 rRNA、*mecA* 與 *fermA* 基因 ^(41, 42) 以及 *clfA* 基因 ⁽⁴³⁾。

但這些方法若是培養的菌株中混雜有甲氧苯青黴素抗藥型 CoNS 與甲氧苯青黴素敏感型金黃色葡萄球菌同時存在時，則會有假陽性的問題產生。為了解決這個問題，研究人員設計了一組核酸引子在 *orfX* (金黃色葡萄球菌上保留區域) 與 SCC*mec* 上，

如此即可降低假陽性的問題⁽⁴⁴⁾。綜上所述，這些聚合酶鏈鎖反應的方法雖然可以提供準確的鑑定結果，但是首先檢體必須是單一金黃色葡萄球菌且無其他細菌污染。這樣的首要條件顯然並不足以滿足現今對於快速篩選 MRSA 的需求。

2. 多重且及時定量的聚合酶鏈鎖反應 (Multiplex and Real-Time qPCR)

將聚合酶鏈鎖反應的產物以螢光標記既可提高準確率也可提高靈敏度，靈敏度可以接近在一份檢體內偵測一個基因量⁽⁴⁵⁾。隨著技術的進步，許多研究人員發表了快速且大量鑑定不同的微生物應用⁽⁴⁵⁻⁵⁰⁾。使用螢光的偵測方式較優於傳統上聚合酶鏈鎖反應的偵測方式並提供了快速、靈敏以及避免使用有毒的丙烯醯胺凝膠 (acrylamide gel)。在金黃色葡萄球菌的鑑定上 Fang 等人使用 *mecA* 與 *nuc* 基因來作為快速鑑定的標靶物，MRSA 快速篩選的結果顯示靈敏度 (93.3%) 與特異性 (89.6%) 都相當好而且節省大量的時間⁽⁵¹⁾。

Francois 等人發展了免疫定量聚合酶鏈鎖反應法 (immuno-qPCR)，從混合多種細菌的檢體中鑑定出 MRSA⁽⁵²⁾。該團隊以免疫磁性小珠取得檢體中的細菌，再配合三重定量聚合酶鏈鎖反應法偵測金黃色葡萄球菌的 *femA* 基因、表皮葡萄球菌的 *femA* 基因以及 *mecA* 基因，將偵測時間縮短至六小時以內。該團隊再將此方法應用在加護病房 (intensive care unit)，與傳統培養方法比較，其偵測時間可從 93.1 小時縮短至 22.2 小時，並且有效減少了 70% MRSA 的感染率⁽¹⁸⁾。這樣的結果顯示快速鑑定 MRSA 可以有效的減少加護病房內 MRSA 感染的比率以及傳播的速度。

3. 已通過美國食品及藥物管理局批准的偵測方法

BD GeneOhm™ MRSA assay (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) 是一個已經商品化的試劑套組，且此方法在 2008 年已被美國食品及藥物管理局批准可應用於臨床檢驗的方法。首先先以鼻拭子收集鼻腔內檢體，接著將細胞懸浮液轉移至黃色頭小管 (內含細菌裂解液)，以 14,000 g 離心後去除上

清液；加入緩衝液後震盪加熱去除潛在抑制劑；將聚合酶鏈鎖反應的混合物與細胞懸浮液混合後加入反應管內；反應管置於儀器內反應約 1 小時後即可得知結果。此方法將核酸引子設計在在 *orfX* (金黃色葡萄球菌上保留區域) 與 *SCCmec* 上，可以有效提高反應的靈敏度 (93%) 與專一性 (96%)。這個方法在鼻腔檢體的靈敏度 (90.6%) 高於其他身體來源的檢體 (76.5%； $p < 0.01$)⁽⁵³⁾；因此有許多研究利用此方法來快速偵測 MRSA 的存在。

在臨床實驗中，鼻拭子的快速偵測可以在兩個小時內迅速偵測 MRSA，具有很高的靈敏度和專一性^(54, 55)。在 1305 個病人中使用 BD GeneOhm™ MRSA 偵測法可以快速偵測 MRSA 的感染，相對於傳統培養的方法有效降低約 65% 的感染率 (13.9 transmissions/1000 病人，培養方法；4.9 transmissions/1000 病人，BD GeneOhm™)⁽⁵⁶⁾。在某一間醫院的研究中，四個不同偵測時間早期篩選 MRSA 的結果發現，在加護病房中降低 75% MRSA 引起的菌血症以及有助於降低整間醫院 67% 的 MRSA 菌血症⁽⁵⁷⁾。

此外，也有一些特殊的狀況被報導出來；Donnio 等人描述了某些 MSSA 會帶有部分的 *SCCmec* 卡匣，使得 BD GeneOhm™ MRSA 偵測法會得到假陽性的結果⁽⁵⁸⁾。Holden 等人發現了某些 SCC 卡匣並沒有帶有 *mecA* 基因，但會造成此偵測法的假陽性⁽⁵⁹⁾。

另一個通過美國食品及藥物管理局批准可應用於臨床檢驗的方法為 GeneXpert MRSA (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)。此方法較為昂貴，需約美金 35–55 元，但此方法整體僅需 75 分鐘，且手動操作的時間更縮短至 2 分鐘。此方法將偵測探針設計在 *orfX* (金黃色葡萄球菌上保留區域) 與 *SCCmec* 上，可以有效提高反應的靈敏度 (88%) 與專一性 (92%)⁽⁶⁰⁾。

五、結論

金黃色葡萄球菌的快速鑑定一直是相當重要的，早期利用選擇性培養基可以作為快速鑑定的依據；然而這樣的方法仍需要培養的時間，無法

在一天內得知結果。隨著分子生物學的發展，利用 DNA 作為鑑定目標的方法不斷的被報導出來。特別是「及時定量的聚合酶鏈鎖反應」被研發出來後，有效減少偵測時間至兩小時，對於病人的治療有相當大的幫助。而金黃色葡萄球菌的快速鑑定對於醫院也是相當重要的，除了可以減少臨床篩檢的時間外，亦可減少實驗室鑑定的時間。在臨床實驗中僅需花費 10 至 40 美元即可有效在第一線鑑定是否為 MRSA^(18, 54, 55)，對於醫院感染控制具有正面的幫助。

雖然分子生物學的快速鑑定相當的便捷，但是更進一步分析多種藥物的敏感性測試與流行病學的分析，在目前仍需要做細菌的培養，顯見目前培養的方法仍是不可取代的。在未來，快速鑑定的方法仍有很大的進步空間；目前偵測方法的主流皆是利用放大反應來偵測，但這樣的方法會有偽陽性的問題產生。因此發展雜交反應 (hybridization technique) 的方法進而可以廣泛的偵測不同細菌可做為未來努力的目標。此外，在未來快速的偵測細菌抗藥性以及毒性因子亦會是一個重點發展的方向，值得我們深入去研究。

參考文獻

1. D. P. Lew and F. A. Waldvogel, *Lancet.*, **364**, 369 (2004).
2. F. D. Lowy, *N. Engl. J. Med.*, **339**, 520 (1998).
3. P. D. Gittelman, J. B. Jacobs, A. S. Lebowitz, and P. M. Tierno, Jr., *Laryngoscope*, **101**, 733 (1991).
4. I. Brook and S. M. Finegold, *JAMA*, **241**, 487 (1979).
5. C. A. Kauffman, M. S. Terpenning, X. He, L. T. Zarins, M. A. Ramsey, K. A. Jorgensen, W. S. Sottile, and S. F. Bradley, *Am. J. Med.*, **94**, 371 (1993).
6. K. A. Powers, M. S. Terpenning, R. A. Voice, and C. A. Kauffman, *Am. J. Med.*, **88**, 9N (1990).
7. M. Barber, *J. Clin. Pathol.*, **14**, 385 (1961).
8. W. Hryniewicz, *Infection.*, **27** Suppl. 2, S13 (1999).
9. L. A. Herwaldt, *Am. J. Med.*, **106**, 11S (1999).
10. D. Pittet, S. Hugonnet, S. Harbarth, P. Mourouga, V. Sauvan, S. Touveneau, and T. V. Perneger, *Lancet.*, **356**, 1307 (2000).
11. K. Okuma, K. Iwakawa, J. D. Turnidge, W. B. Grubb, J. M. Bell, F. G. O'Brien, G. W. Coombs, J. W. Pearman, F. C. Tenover, M. Kapi, C. Tiensasitorn, T. Ito, and K. Hiramatsu, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4289 (2002).
12. M. A. Abramson and D. J. Sexton, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, **20**, 408 (1999).
13. H. M. Aucken, M. Ganner, S. Murchan, B. D. Cookson, and A. P. Johnson, *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 171 (2002).
14. R. A. Cox, C. Conquest, C. Mallaghan, and R. R. Marples, *J. Hosp. Infect.*, **29**, 87 (1995).
15. J. F. Richardson and S. Reith, *J. Hosp. Infect.*, **25**, 45 (1993).
16. P. R. Hsueh, C. Y. Liu, and K. T. Luh, *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 132 (2002).
17. P. R. Hsueh, L. J. Teng, W. H. Chen, H. J. Pan, M. L. Chen, S. C. Chang, K. T. Luh, and F. Y. Lin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1361 (2004).
18. S. Harbarth, C. Masuet-Aumatell, J. Schrenzel, P. Francois, C. Akakpo, G. Renzi, J. Pugin, B. Ricou, and D. Pittet, *Crit. Care.*, **10**, R25 (2006).
19. C. A. Muto, J. A. Jernigan, B. E. Ostrowsky, H. M. Richet, W. R. Jarvis, J. M. Boyce, and B. M. Farr, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **24**, 362 (2003).
20. G. Papia, M. Louie, A. Tralla, C. Johnson, V. Collins, and A. E. Simor, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **20**, 473 (1999).
21. G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., C. Wennersten, L. Venkataraman, R. P. Novick, and H. S. Gold, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1492 (2002).
22. J. E. Sjostrom, S. Lofdahl, and L. Philipson, *J. Bacteriol.*, **123**, 905 (1975).
23. G. L. Archer and D. M. Niemeyer, *Trends Microbiol.*, **2**, 343 (1994).
24. Y. Katayama, T. Ito, and K. Hiramatsu, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 1549 (2000).
25. R. H. Deurenberg and E. E. Stobberingh, *Curr. Mol. Med.*, **9**, 100 (2009).
26. A. M. Hanssen and J. U. Ericson Sollid, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **46**, 8 (2006).
27. Y. H. Huang, S. P. Tseng, J. M. Hu, J. C. Tsai, P. R. Hsueh, and L. J. Teng, *Clin. Microbiol. Infect.*, **13**, 717 (2007).
28. B. Diederer, I. van Duijn, A. van Belkum, P. Willemse, P. van Keulen, and J. Kluytmans, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 1925 (2005).
29. D. Flayhart, J. F. Hindler, D. A. Bruckner, G. Hall, R. K. Shrestha, S. A. Vogel, S. S. Richter, W. Howard, R. Walther, and K. C. Carroll, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5536 (2005).
30. B. M. Diederer, M. L. van Leest, I. van Duijn, P. Willemse, P. H. van Keulen, and J. A. Kluytmans, *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 586 (2006).
31. I. Nahimana, P. Francioli, and D. S. Blanc, *Clin. Microbiol. Infect.*, **12**, 1168 (2006).
32. G. Johnson, M. R. Millar, S. Matthews, M. Skyrme, P. Marsh, E. Barringer, S. O'Hara, and M. Wilks, *BMC Microbiol.*, **6**, 83 (2006).
33. M. Cavassini, A. Wenger, K. Jaton, D. S. Blanc, and J. Bille, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1591 (1999).
34. K. C. Chapin and M. C. Musgnug, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1283 (2004).
35. Z. Hussain, L. Stoakes, S. Garrow, S. Longo, V. Fitzgerald, and R. Lannigan, *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2051 (2000).

36. K. Murakami, W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe, *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2240 (1991).
37. G. R. Youmans, T. E. Davis, and D. D. Fuller, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **16**, 99 (1993).
38. S. Hamels, J. L. Gala, S. Dufour, P. Vannuffel, N. Zammattéo, and J. Remacle, *Biotechniques.*, **31**, 1364 (2001).
39. B. Berger-Bachi, L. Barberis-Maino, A. Strassle, and F. H. Kayser, *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 263 (1989).
40. R. L. Hurlimann-Dalel, C. Ryffel, F. H. Kayser, and B. Berger-Bachi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 2617 (1992).
41. L. Louie, J. Goodfellow, P. Mathieu, A. Glatt, M. Louie, and A. E. Simor, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2786 (2002).
42. N. Maes, J. Magdalena, S. Rottiers, Y. De Gheldre, and M. J. Struelens, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1514 (2002).
43. W. J. Mason, J. S. Blevins, K. Beenken, N. Wibowo, N. Ojha, and M. S. Smeltzer, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3332 (2001).
44. C. Cuny and W. Witte, *Clin. Microbiol. Infect.*, **11**, 834 (2005).
45. L. G. Lee, K. J. Livak, B. Mullah, R. J. Graham, R. S. Vinayak, and T. M. Woudenberg, *Biotechniques.*, **27**, 342 (1999).
46. F. Brancart, H. Rodriguez-Villalobos, P. A. Fonteyne, D. Peres-Bota, and C. Liesnard, *J. Microbiol. Methods.*, **61**, 381 (2005).
47. C. E. Corless, M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox, and E. B. Kaczmarek, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 1553 (2001).
48. J. W. He and S. Jiang, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2250 (2005).
49. I. M. Mackay, K. E. Arden, and A. Nitsche, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1292 (2002).
50. H. F. Svenstrup, J. S. Jensen, E. Bjornelius, P. Lidbrink, S. Birkelund, and G. Christiansen, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3121 (2005).
51. H. Fang and G. Hedin, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2894 (2003).
52. P. Francois, D. Pittet, M. Bento, B. Pepey, P. Vaudaux, D. Lew, and J. Schrenzel, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 254 (2003).
53. N. de San, O. Denis, M. F. Gasasira, R. De Mendonca, C. Nonhoff, and M. J. Struelens, *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1098 (2007).
54. A. Huletsky, P. Lebel, F. J. Picard, M. Bernier, M. Gagnon, N. Boucher, and M. G. Bergeron, *Clin. Infect. Dis.*, **40**, 976 (2005).
55. D. K. Warren, R. S. Liao, L. R. Merz, M. Eveland, and W. M. Dunne, Jr., *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5578 (2004).
56. R. Cunningham, P. Jenks, J. Northwood, M. Wallis, S. Ferguson, and S. Hunt, *J. Hosp. Infect.*, **65**, 24 (2007).
57. S. S. Huang, D. S. Yokoe, V. L. Hinrichsen, L. S. Spurchise, R. Datta, I. Miroshnik, and R. Platt, *Clin. Infect. Dis.*, **43**, 971 (2006).
58. P. Y. Donnio, D. C. Oliveira, N. A. Faria, N. Wilhelm, A. Le Coustumier, and H. de Lencastre, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4191 (2005).
59. M. T. Holden, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 9786 (2004).
60. A. S. Rossney, C. M. Herra, G. I. Brennan, P. M. Morgan, and B. O'Connell, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 3285 (2008).



曾嵩斌先生為國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術博士，現任國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系博士後研究員。

Sung-Pin Tseng received his Ph.D. in clinical laboratory sciences and medical biotechnology from National Taiwan University. He is currently a postdoc fellow in the Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology at the College of Medicine, National Taiwan University.



鄧麗珍女士為國立臺灣大學微生物學研究所碩士，現任臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系教授兼系主任。

Lee-Jene Teng received her M.S. in microbiology from National Taiwan University. She is currently a professor and chair in the Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology at the College of Medicine, National Taiwan University.