

(4050) 微生物特性確定、鑑定與菌株分型

原料藥、賦形劑 (excipient)、製藥用水、製造環境、半成品 (intermediates) 與成品中若偵測到微生物，通常都會予以特性確定 (characterization)。特性確定可能包括適時進行鑑定與菌株分型，「術語彙編」附於本通則末。例行之微生物特性化，可能包括判定菌落型態、細胞型態 (桿菌、球菌、細胞分型、孢子形成模式等)、格蘭氏反應 (Gram reaction) 或其他鑑別染色 (differential staining) 技術，以及可用於診斷之關鍵生化反應 (例如：氧化酶、過氧化氫酶、凝固酶活性)。在非無菌製劑作業，以及某些無菌產品之製造環境中，這種程度的微生物特性確定，足以達到風險評估之目的。

某些情況下，微生物鑑定更明確的定義是能進行屬 (genus) 與種 (species) 層次之鑑定。除此之外，有些方法可用於菌株 (strain) 層次的鑑定，用於判定微生物來源時很實用。鑑定常用於以非典型之高速率回收微生物，或回收數量超過特定產品類別的建議值時。此外，微生物鑑定常用於無菌操作；滅菌試驗呈現陽性，以及無菌模擬流程失敗後，評估回收的微生物是否造成污染時 (如：培養基充填)，微生物鑑定更是必要。

微生物鑑定系統源自於不同的分析方法學，且可能受到方法本身及 / 或資料庫的限制。鑑定時將基因型及 / 或表現型特性，與標準 (參考) 菌種如標準菌株進行特性比對。資料庫未收錄某微生物時，便無法鑑定出該微生物；因此，製造商應檢視鑑定系統其資料庫的涵蓋範圍，並評估是否符合需求。使用者則應思考，何種微生物鑑定系統最符合需求。除了須謹記這些限制，以及所需之鑑定到哪個層次 (如屬、種、菌株)，使用者也須選擇適當技術，用於例行性微生物鑑定試驗。

非無菌產品微生物檢驗：特定微生物檢驗法 (通則 7007.2) 便特別引述了微生物鑑定之必要性。該通則指出，生長於選擇性培養基或診斷用培養基，且顯示明確形態特徵的菌種，皆須進行確認性之鑑定試驗。此外，從試驗中分離之微生物經過鑑定後，若可確知此種微生物菌種之生長，乃由無菌試驗程序中使用的材料及 / 或技術所致，則可根據無菌試驗法 (通則 7001)，判定試驗無效。可參考無菌操作環境的微生物管控與監測之相關文獻建議，微生物分離株在鑑定時，其鑑定率應能符合環境監測計畫。

一、純菌之分離

鑑定第一步，是分離分析用之純菌。一般而言，此步驟在合適的普通微生物固態培養基上，以象限圖樣對受試菌落進行連續劃線，而得到易於辨識之菌落即為純菌。這項技術可使得表現型的表現且生長足夠量之接種體，以利執行後續之鑑定程序。分析者應能辨識微生物表現型之表現 (如：細胞大小與形狀、孢子形成、細胞組成、抗原性、生化活性，以及對於抗

微生物劑的敏感性) 可能受分離株種來源、培養基選擇，與生長條件所影響 (見表一)。因此，用於鑑定之預備培養基，以及繼代培養代數，可能會影響表現型之鑑定方法所得的結果。

表一 用於微生物分類的表現型特性

類別	特性
培養 (Culture)	菌落形態、菌落顏色、形狀與大小、色素生成
形態學 (Morphological)	菌落形態、菌落大小、菌落形狀、鞭毛種類、儲藏物質、格蘭氏反應、孢子與耐酸染色、孢子形成模式
生理學 (Physiological)	耐氧性、pH 範圍、最適溫度及溫度範圍、耐鹽性
生化學 (Biochemical)	碳利用、碳水化合物的氧化或發酵、酵素型
抑制性 (Inhibition)	耐膽鹽性、抗生素敏感性、染料耐性
血清學 (Serological)	凝集、螢光抗體
化學分類 (Chemo-taxonomic)	脂肪酸圖譜、微生物毒素、全細胞組成
生態學 (Ecological)	菌種來源

相較之下，微生物的基因型通常保留性完好，且不受培養環境影響。因此，一旦純種單株菌落分離完成，分析微生物時便不須考量使用新鮮配製的生長培養基或分離株之生存力。可測定的基因型特性列舉如表二。

表二 可用於微生物分類之基因型/親緣關係特性

類別	特性
基因型 (Genotypic)	DNA 鹼基比 (G+C 含量)、限制性片段類型及 DNA 探針
系譜 (Phylogenetic)	DNA-DNA 雜交、16S 與 23S rRNA 序列

據《伯吉氏系統細菌學手冊》(簡稱「伯吉氏手冊」[註 1]) 描述，當前之細菌分類學，乃藉由遺傳物質的比較分析建立。比較未知菌種 DNA 與已知菌種 DNA，即可判定兩者之親緣度。基因型鑑定 (表二) 需 DNA 雜交、比較限制性片段類型，以及 / 或使用 DNA 探針。例如，DNA-DNA 雜交呈現 70% 以上之親緣度時，表示受試之菌種為同種。在系譜分析中 (表二)，細菌分析一般會比較部分 16S 核糖體 RNA 基因 (16S rRNA) 鹼基序列，真菌分析則比較部分 23S 核糖體 RNA (23S rRNA) 基因鹼基序列。聚合酶鏈鎖反應用來擴增

這些基因，接著以電泳法或雙脫氧鏈終止法，分離擴增區域並進行鹼基定序。此時可使用經過確效之專有資料庫或公開資料庫進行比較【注意：公開資料庫可能未經確效】。

〔註1〕《伯吉氏系統細菌學手冊》(Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*) 第二版，2003。

二、初篩及特性

從製藥成分、製藥用水、製造環境、半成品與成品等檢品中利用藥典記載之培養基將微生物分離出來，該微生物可能在生理上受到壓力。因為這些微生物將由適合生存於不良環境條件下之代謝狀態，轉移到更營養與有最適培養溫度的培養環境，謹慎處理分離株，便可管控這個轉變過程。準備鑑定時，初步分離培養基上取得之個別代表菌落，可如上所述，在固態培養基上進行劃線以取得單株菌落。第一步為測定分離株之格蘭氏反應與細胞形態，某些情況下會再測定具診斷之生化反應。對許多表現型鑑定計畫而言，這是關鍵步驟，若誤判分離株特性，可能會在後續檢測中，使用錯誤的微生物鑑定套組，導致不正確結果。以下說明若干常見之初步篩選試驗。

(1) 格蘭氏染色

格蘭氏染色法包括四步驟：結晶紫（初染劑）、碘（媒染劑）、酒精或酒精-丙酮（脫色劑），與番紅（複染劑）。而在三步驟的方法是將脫色與複染步驟合併。在最適條件下，格蘭氏陽性菌保留結晶紫染劑，呈現藍紫色。格蘭氏陰性菌則失去結晶紫染劑，因此只含複染劑之番紅，故呈現紅色。某些細菌可能顯示格蘭氏易變性（Gram-variable）。此法常見缺點為，熱固定可能導致格蘭氏陽性細胞染成格蘭氏陰性，及培養生長較久可能產生格蘭氏易變反應。此外，使用過多脫色劑，可能導致偽陰性結果，而使用脫色劑不足時，則可能呈現偽陽性結果。另種作法是捨棄熱固定法，以甲醇固定細菌抹片，這在某些情況下具有優勢。某些情況下，酒精固定法得出的格蘭氏染色結果，可能較一致。不論採用哪種方法，皆應納入格蘭氏陽性與陰性控制組，以識別染色誤差。由於格蘭氏染色反應必須以顯微鏡判讀，因此可同時確認細胞形態。

(2) 孢子染色

孢子染色可用孔雀石綠染劑染色細菌孢子。應納入陽性控制組，以識別孢子染色誤差。

(3) 生化篩選

關鍵的生化篩選試驗包括(1)以氧化酶試驗將格蘭氏陰性桿菌區分為非發酵菌（氧化酶陽性）與腸內菌（氧化酶陰性）；(2)以過氧化氫酶試驗區分葡萄球菌（過氧化氫酶陽性）及鏈球菌（過氧化氫酶陰性）；以及(3)以凝固酶試驗將葡萄球菌區分為凝固酶陰性（推測為非致病性）與凝固酶陽性（較可

能致病）之葡萄球菌。在多種研究中與例行調查製造環境負荷菌（bioburden）時，這些少數試驗就可提供持續評估的充足資訊。然而，在需要更深入評估之情況時，屬、種、菌株層次的鑑定，可對環境負荷菌性質與來源，產生寶貴而深入之了解。此外，在評估與降低微生物污染的風險上，菌種與甚至菌株層次之微生物鑑定，可能是關鍵。

三、表現型微生物鑑定法

表現型方法（Phenotypic methods）為利用微生物表現的基因產物，區分不同微生物。一般而言，這些方法需要大量相對純種、單株菌落之細胞。用於微生物計數與鑑定的回收與生長方法受到培養時間限制，事實上環境中許多菌種並非可生長在一般培養基來進行回收，也是限制因素。此外，從初步回收剛分離、受壓之微生物進行繼代培養，可能無法充分表現表現型特徵。但是，基於碳源利用與生化反應方法、利用氣液相層析法（gas-liquid chromatography）分析脂肪酸圖譜，以及以基質輔助雷射脫附離子化飛行時間（MALDI-TOF）質譜法分析全細胞組成，都是以接種體（inocula）所發展的一個特殊鑑定系統。這些系統仰賴特定培養基與培養條件，以能達成鑑定一致性。表現型微生物鑑定方法，可成功應用於食物、水、臨床及製藥之微生物分析實驗室中使用。〔註2〕表現型微生物鑑定提供之資訊，使微生物學家能針對產品風險做出明智決策，並鑑識出環境中菌相變化。許多品質管制的研究，單以表現型鑑定就已足夠，科學家便可進行徹底調查，並依需求建議適當的矯正措施。

〔註2〕O'Hara、C.M.、M.P. Weinstein 與 J.M. Miller。〈微生物檢測與鑑定的手動與自動系統〉（Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms）。《ASM 臨床微生物學手冊》（ASM *Manual of Clinical Microbiology*）第八版，2003。

四、基因型微生物鑑定法

理論上，由於核酸序列在多數微生物菌種中保留度高，因此基因型微生物鑑定法較為可靠。適用之基因型方法包括，DNA-DNA 雜交、PCR、16S 與 23S rRNA 定序、多重基因座序列分型、焦磷酸定序（pyrosequencing）、DNA 探針，以及核糖分型分析。在操作上，這些方法對微生物學家而言可能較具挑戰，須要昂貴的分析設備與耗材，因此這些分析通常交由合約實驗室、政府實驗室、大學、研究機構，或企業內部專門實驗室執行。因此，基因型鑑定法多半受限於關鍵之微生物調查（諸如：產品不合格之調查）。此外，在調查過程中進行菌株層次鑑定時，必須確保選用方法之適當性。16S rRNA 序列前 500 鹼基對（base pair）之 DNA 定序，有利於執行菌種層次的鑑定，但未必足以區辨相近菌種或同種菌株。反

之，以限制性核酸內切酶分解片段之南方雜交法效力很強大，且能有效顯示兩種菌株差別。若兩個菌種的片段型看來相似，也僅代表限制性核酸內切酶在該區域有類似切割位。如要證明兩種菌種為相同，應納入兩種以上不同限制性核酸內切酶，使各分解片段在有興趣之區域產生條帶。此二菌種產生的所有條帶須完全相同。

相較於微生物鑑定，以核酸為基礎之方法可用來篩選特定微生物。這項方法步驟為檢品收集、核酸萃取、標的擴增、雜交，以及偵測。無法從非存活之細菌細胞擴增 DNA，可使用反轉錄技術，將過渡型且因而與生存力相關 rRNA 轉換為 DNA，以進行 PCR 擴增。其中須注意事項包括：檢測微生物變種、偵測極限、基質效應、陽性臨界值驗證、儀器與系統殘留物、診斷準確性，以及再現性。

五、微生物鑑定法之驗證

微生物鑑定試驗包括血清學試驗、化學試劑、參考菌種，以及儀器設備。鑑定試驗系統之驗證，可能用下列其中一種方式進行：(1)從例行檢測中取得微生物分離株，並使用現有系統進行平行測試，其中受試分離株數量可能高達 50 株，任何鑑定發生差異時，可用仲裁法 (referee method) 進行裁定；(2)從不同的常見分離菌種中，取 12~15 個已知且具代表性保存菌種，對其進行共 50 次試驗；或(3)確認 20~50 次之菌種鑑定結果 (其中包括 15~20 個不同菌種) 與分割檢品之對照實驗室檢測結果一致。在上述各情況中，須依據供應商與藥典之建議，採用合適品質管控之菌種，且皆包括在驗證過程中。

使用鑑定系統時，驗證相同的菌種應評估，並考量一致性。一般而言，使用適合鑑定系統之微生物檢品，可達到大於 90% 的一致程度。適當時，可將難以鑑定之菌種 (例如：非發酵菌、棒狀桿菌、凝固酶陰性葡萄球菌) 納入驗證過程，但得到的一致性程度可能較低。

微生物鑑定誤差造成衝擊，嚴重程度從大至小依序為：(1)菌屬層次鑑定失誤、(2)菌種層次鑑定失誤、(3)無法鑑定。鑑定失誤可能導致不適當的矯正與預防行動，及不適當的成品處理。

微生物鑑定系統可能無法鑑定出分離株，因為該菌種未收錄於資料庫中、系統參數不全而無法對其進行鑑定、分離株在此系統中可能無反應，或該菌種可能尚未以分類學方法描述。這些分離株可送交微生物鑑定系統供應商做進一步研究，並適時將之納入資料庫。另一方面，可進行基因型鑑定試驗，且鑑定之菌種可加入內部資料庫。鑑定失誤較難判定，但所有微生物鑑定法都應合理審查微生物的形態、生理要求、分離來源等方面。通常在鑑定菌種時，只鑑定到菌屬層次，常發生在一些非致病性葡萄球菌、棒狀桿菌 (及

其他小型多形格蘭氏陽性桿菌)，與微球菌等。

最重要的驗證試驗是準確性及再現性。這些測量可定義如下：

$$\text{準確性 (\%)} = (\text{正確結果數} / \text{總結果數}) \times 100$$

$$\text{再現性 (\%)} = (\text{呈現一致之正確結果數} / \text{總結果數}) \times 100$$

使用者應考量方法效能，建立適當之準確性與再現性允收標準其他量測為靈敏度、專一性、陰性及陽性預測值。這些量測最適合以下述例子說明：曾有臨床微生物學實驗室將 DNA 雜交探針分離頻率結果，與以性行為傳播的淋病雙球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 培養法結果相比較。〔註 3〕根據文獻，臨床檢品陽性分離率為 10%。實驗室對 100 個分割檢品進行實驗，結果如表三。

〔註 3〕Cumitech 31。《臨床微生物實驗室中程序確認與驗證》(Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory)。Elder、B.L.、S.A. Hansen、J.A. Kellogg、F.J. Marsik 及 R.J. Zabransky，ASM，1997 二月。

表三 DNA探針與培養法之陰性及陽性結果分布比較

DNA探針結果	培養結果	
	陽性	陰性
陽性	9	2
陰性	1	88

$$\text{靈敏度} = [9/(9+1)] \times 100 = 90\%$$

$$\text{專一性} = [88/(88+2)] \times 100 = 97.7\%$$

$$\text{陽性預測值} = [9/(9+2)] \times 100 = 81.8\%$$

$$\text{陰性預測值} = [88/(88+1)] \times 100 = 98.9\%$$

需注意陽性預測值並非試驗本身的設定，也取決於微生物在臨床檢品中的盛行率。陽性預測值與疾病或病症盛行率成正比。本例中，若受試群體中感染人數比例較高，那麼陽性預測值可能偏高，陰性預測值偏低。若群體中所有人皆感染淋病雙球菌，那麼陽性預測值為 100%，陰性預測值為 0%。這些函數之數學導算如表四所示。

表四 對照培養法與另類之PCR檢測法之雙行雙欄列聯表 (依照ISO 5725-1 與5725-2 2004) *

培養物	PCR		
	陽性	陰性	總和
陽性	a 真陽性	b 偽陰性	a + b
陰性	c 偽陽性	d 真陰性	c + d
總和	a + c	b + d	

* ISO 5725-1:1994測量方法與結果準確性（正確性與精準度）第一部：通則與定義，以及ISO 5725-2：1994測量方法與結果準確性（正確性與精準度）第二部：標準測量方法之重複性與再現性的基本測定方法。

包容性 (%) = $[a/(a+b)] \times 100$

排斥性 (%) = $[d/(c+d)] \times 100$

陽性預測值 (%) = $[a/(a+c)] \times 100$

陰性預測值 (%) = $[d/(b+d)] \times 100$

分析準確性 (%) = $[(a+d)/(a+b+c+d)] \times 100$

卡帕指數 (Kappa Index) = $2(ad-bc)/[(a+c) \times (c+d) + (a+b) \times (b+d)]$

(1)系譜考量

《伯吉氏手冊》第二版不僅與第一版之間存在重大差別，也與第八與第九版《鑑定細菌學手冊》大不相同。《伯吉氏手冊》之內容結構乃依循系譜架構，基於核糖體小型次單元 16S RNA 核苷酸序列分析，而非表現型結構分析。

系譜樹或樹狀圖是呈現遺傳學上最親近的物種。這項技術應用，導致分類學的修正，以及某些熟知物種重新命名。例如，真菌黑麴菌 (*A. niger*) ATCC 16404 重新命名為巴西蘑菇菌 (*A. brasiliensis*)。一般將親緣性等於或小於 97% 的物種，視為不同屬；親緣性等於或低於 99% 者，則視為不同種，〔註 4〕但是此歸納方式存在許多例外。

基因型與表現型不同的情況較罕見，例如，表現型不同之微生物具相同或非常相似的基因型、表現型相似但基因型不同，以及基因型上過於疏遠而不能稱為同種或同屬微生物。多相分類學〔註 5〕之概念，即組合並使用多層次資訊（例如：微生物的特性確定、表現型與基因型資料，以及微生物來源等），可成功應用於微生物鑑定。當考量微生物特性、檢測紀錄、分離來源時，此方法可避免僅使用不合理之基因型資料即下結論。

〔註 4〕J.E. Claridge III。〈細菌鑑定中 16S rRNA 基因定序分析對臨床微生物學與傳染病的影響〉(The Impact of 16S rRNA Gene Sequencing Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases)。《臨床微生物學評論》(Clinical Microbiology Review) 17 (2), P840-862, 2004。

〔註 5〕Gillis M.、P. Vandamme、P. De Vos、J. Swings 與 K. Kersters。〈多相分類學〉(Polyphasic Taxonomy)。《伯吉氏系統細菌學手冊第二版，2003 年》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, 2003.)。

六、術語彙編

微生物分類 (Microbial classification)：依據微生物之相似處與關係，將之歸入不同分類群。

微生物鑑定 (Microbial identification)：對實驗室分離株進行鑑定，判定該分離株屬於那一廣義群組（例如：細菌、酵母、黴菌）或那一狹義群組（例如：屬與 / 或種）。

微生物特性確定 (Microbial characterization)：使用菌落生長、細胞形態、鑑定染色，與關鍵診斷特徵，來特性化實驗室分離株，並藉此進行趨勢分析與研究，而沒有採用鑑定法（例如：非致病葡萄球菌）。

GC 莫耳百分比 (Mol %GC)：染色體 DNA 中，鳥嘌呤 - 胞嘧啶範圍之分子百分比【注意：%GC + %AT = 100%】。

系譜種 (Phylogenetic species)：由許多菌株組成的菌種，在這些菌株中，某類型菌株至少有 70% 總基因體 DNA-DNA 雜交相同，且 ΔT_m (雜合物熔點差異) 低於 5°。

多相分類學 (Polyphasic taxonomy)：此種分類組合並同化多層次之資訊包括分子、生理學、形態、血清學、生態學等來源歸類一個微生物。

親緣性 (Relatedness)：兩個 (或以上) 菌種在親緣關係樹或樹狀圖中，彼此間之關係或相似程度。

rRNA 序列 (rRNA sequence)：對用於蛋白質合成之 rRNA 編碼的 DNA 序列，在祖先同源之微生物之間具高保存度。這種 DNA 序列用來測定菌種之間親緣關係的距離，並有助於微生物分類與鑑定。

菌株 (Strain)：即某菌種特定分離株，純菌培養，並經過特性確定。其標準菌株可代表該菌種，其餘其分離歷史，特性確定並寄存在被認可之菌種保存中心，可做為該菌種參考品。

菌株分型 (Strain typing)：在臨床與公共衛生微生物學中，菌株分型是流行病學調查不可或缺的一部分。若要證明微生物種是否為同菌株或來自同源，有多種方法可使用，包括脈衝場膠體電泳法 (pulsed-field gel electrophoresis)、核糖指紋 (ribotyping)、任意引子聚合鏈鎖反應 (arbitrarily primed polymerized chain reaction)，以及全基因體排序之限制酶圖譜 (restriction mapping) 或光學圖譜 (optical mapping)。