

臺灣鮑氏不動桿菌和克雷白氏肺炎菌的多重抗藥性機轉之研究

馬靈 黃麗日 蕭樑基

國家衛生研究院 感染症研究組

前 言

細菌產生抗藥性目前已經是一個全球性的問題。多重抗藥性細菌在全球的傳播已經不是一個罕見的現象。例如 CTX-M 型的廣效性乙內醯胺酶基因，10 年來在全球不同細菌的廣泛傳播，另外在帶 CTX-M 基因的一個質體上還被發現帶有多種性藥物的抗藥基因，造成多重抗藥。本文將介紹兩個在臨床上重要的致病菌（鮑氏不動桿菌和克雷白氏肺炎菌）在臺灣的致病機制和抗藥情形，讓醫護人員了解多重抗藥基因之機轉，更重要的是希望引起醫界的警惕和預防。

臺灣含有第一型嵌入子的多重抗藥性鮑氏不動桿菌之傳播研究

鮑氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*) 為一日漸重要的院內感染致病源，院內感染患者常具有高死亡率；此菌具有在短期內迅速發展成多重抗藥性的特性，而使臨床治療上變

得非常困難 [1]。而細菌抗藥性基因的獲得機制多半與移動性基因 (mobile genetic element)，如：質體、轉位子 (transposon)、插入序列 (insertion sequence, IS) 及嵌入子 (integron) 等有關 [2]。目前對鮑氏不動桿菌的研究中，第一型嵌入子 (class 1 integron) 被發現廣泛存在於該菌而且臺灣對以嵌入子方式獲得抗藥性基因的研究仍為少數且範圍僅局限於單家醫院 [3,4]。故本團隊針對臺灣各區所收集之多重抗藥性鮑氏不動桿菌進行嵌入子對抗藥性基因傳播的研究，其結果已發表於 [5] 的論文。

由於鮑氏不動桿菌與同屬之 *A. calcoaceticus*、genospecies 3 及 genospecies 13TU 在種緣上過於相近而無法在臨床鑑定上以外表型來明確區分，因此此四種菌種被分類學家歸類為 *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex (Acb complex)，由於 Acb complex 中只有 *A. calcoaceticus* 不具致病性，其餘三

者皆為不動桿菌屬中最常見的致病菌種。由於這三種 genomic species 在臨床上的表現並不相同，但因為無法明確鑑定出單一菌種，而可能造成相關臨床研究的誤判 [1]。因此，該研究於 1996 到 2004 年由臺灣座落於北中南區的三家教學醫院收集多重抗藥性 Acb complex 血液感染分離株，以單管多引子聚合酶鏈的方法鑑定出 283 株鮑氏不動桿菌進行研究 [5]。首先以 PCR 方法偵測所收集之多重抗藥性鮑氏不動桿菌 (Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*; MDR-Ab) 菌株是否存在嵌入子，發現有 202 株含有第一型嵌入子，而第二、三型嵌入子在所有菌株都未發現。抗生素藥敏試驗結果顯示，除氨基酸單胺菌素 (aztreonam) 與 氯黴素 (chloramphenicol) 外，含有第一型嵌入子的菌株皆比未含有者對所有測試的抗生素較為抗藥。將含有第一型嵌入子的 MDR-Ab 嵌入子基因卡匣進一步定序分析鑑定出 7 種卡匣：type 1 (菌株數目 n=4)，*aacC1-orfX-orfX'-aadDA1* (基因卡匣長度 2542 bp)；type 2 (n=3)，*bla^{IMP-8}-aac(6')-II-addA4* (2,507 bp)；type 3 (n=145)，*aacA4-cat8-aadA1* (2,381 bp)；type 4 (n=34)，*dhfrXII-orfF-aadA2* (1,873 bp)；type 5 (n=1)，*arr-3-accA4* (1,395 bp)；type 6 (n=13)，*dfrA1-orfC* (1,242 bp)；及 type 7 (n=2)，*bla_{VIM-11}* (1,062 bp)，其中新發現為 type 2 與 type 7，而基因卡匣所攜帶的大多數為胺基配醣體類 (aminoglycoside) 抗

生素的抗藥基因，包含 *aacA4*、*aacC1*、*aac(6')-II*、*aadA1*、*aadA2*、*aadA4* 及 *aadDA1*，與世界其他地區的鮑氏不動桿菌所發現的情形並不相同。一般認為，嵌入子為菌體在有環境篩選壓力 (如：抗生素) 時，以種間傳遞 (horizontal gene transfer) 方式獲取抗性基因的一種重要工具 [6]。如：本研究所鑑定的 type 4 基因卡匣，不但在革蘭氏陰性菌中廣泛出現，在中國也在陽性菌 *Staphylococcus aureus* 與 *Enterococcus faecalis* 被發現 [7]，間接證實嵌入子為臺灣 MDR-Ab 獲取外來抗性基因發展為全抗藥性菌株的重要途徑。

為瞭解含有第一型嵌入子的 MDR-Ab 菌株間的流行病學關係，我們以核糖體分型法 (ribotyping) 進行分子族譜分析，顯示其具有 16 種不同的核糖體分群，分析結果發現有一分群 R5 (n=131) 散佈範圍為全島，而另一分群 R6 (n=24) 則在北部；R5 分群也被確認與之前在北部另一家教學醫院流行的 R-25 分群具有相同的核糖體分型 (ribopattern) [4]。再選取 R5 與 R6 代表菌株進行脈衝電場膠體電泳 (pulsed field gel electrophoresis; PFGE) 確認出兩分型的純系性 (clonality)。R5 菌株 (99.2%，130/131) 幾乎都帶有 type 3 嵌入子基因卡匣。將對不同核糖體分型菌株的抗生素藥敏試驗結果統計分析後發現，在頭孢吡肟 (cefepime) ($P < 0.001$) 及 氨苄青黴素-舒巴克坦 (ampicillin-sulbactam) ($P = 0.011$)，全國傳佈

分群 (R5) 比單院傳佈分群 (R6) 抗性較強。另外，由於乙內醯胺類 (beta-lactam)，特別是碳青黴烯類 (carbapenem) 為治療 MDR-Ab 的重要抗生素，為瞭解其抗藥基因的分佈，我們對所有 MDR-Ab 以針對廣效性乙內醯胺酶 (Extended-spectrum beta-lactamases, ESBL) 與碳青黴烯酶 (carbapenemase) 的專一引子以 PCR 偵測發現有一株含有 VEB-3 的 ESBL；而在 18 株具有碳青黴烯類抗生素抗性的菌株中，發現有一株為兩種碳青黴烯類抗生素抗性基因 *blaVIM-11* and *blaOXA-58* 並存。

歸結而言，由臺灣北中南區三家教學醫院所收集之多重抗藥性鮑氏不動桿菌菌株進行抗生素敏感性測試、抗藥基因偵測及分子親緣分析後發現臺灣帶有第一型嵌入子的 MDR-Ab 的菌株抗藥性較高且多屬於特定的核糖體分型 R5，此研究結果提供國內 MDR-Ab 的抗藥性研究可聚焦於 R5 的分子抗藥機制；而本研究另鑑定出兩種碳青黴烯酶 (VIM-與 OXA 型) 並存與臺灣首次出現的 VEB 型 ESBL 基因之 MDR-Ab，顯示國內 MDR-Ab 已有逐漸獲得各類抗藥基因發展為全抗藥性的趨勢而必須在感染控制上特別留心。

臺灣產生 ESBL 之克雷白氏肺炎菌中對胺基配醣體類藥物具抗藥性的 *armA* 和 *rmtB* 基因的廣泛傳播

胺基配醣體類包括 amikacin 和 tobramycin 仍是一個有潛力的治療抗

藥性陰性桿菌的一類重要藥物。它的作用機制是以 16S 核糖體為作用標的 (16S-rRNA 是 30S-rRNA 的一部分)，與其結合而達到抑制細菌蛋白質的合成。但是從它們開始用於臨床後不久，對其產生抗藥性的細菌就開始被報導，當初對胺基配醣體類最常見的主要的抗藥機制是細菌產生酵素修飾藥物使其失活，細菌產生酵素有 acetyltransferases、adenyltransferases 和 phosphotransferases，在胺基配醣體類藥物只要加上任何一種支鏈藥物便失去活性 [8]；而它們的傳播與嵌入子有關 [9,10]。但是近年來出現存在於質體的 16SrRNA 甲基化基因，例如：*armA*、*rmtA*、*rmtB* 基因通過保護細菌的 16SrRNA 而保護了胺基配醣體類藥物的作用標的使藥物失去作用標的而產生抗藥性 [11]。

乙內醯胺類藥物是臨床上作為治療陰性菌引起感染的常用藥物。但是隨著全球 ESBL (一種能水解第三、四代乙內醯胺類藥物的酵素而造成抗藥) 產生菌的不斷增加和擴散，單一的使用乙內醯胺類藥物已經有它的缺陷。聯合用藥也就是結合使用兩種不同類型的藥物即成為一種選擇。例如：乙內醯胺類藥物能妨害細菌細胞壁的合成而胺基配醣體藥物能妨害細菌蛋白質的合成，兩者的聯合用藥被用於產生 ESBL 的克雷白氏肺炎菌引起的菌血症的治療。此外，當藥物敏感試驗的結果尚未出來之前，兩者的聯合用藥也是感染治療的一種替代選擇 [12]

之前的一些研究已經證實了有對乙內醯胺類藥物和胺基配醣體類藥物同時抗藥的現象的存在。如前所述，通常胺基配醣體類藥物的抗藥性是由修飾酵素所造成，它的傳佈可能與嵌入子有關。16SrRNA 甲基化基因是最近幾年被發現和引起注目的抗性機制，它的傳播與質體有關。我們從一個臺灣的抗藥性細菌調查計劃收集的235株ESBL產生克雷白氏肺炎菌中發現：有102株(43.4%)細菌對amikacin具抗藥性，其中的92株(90.2%)單獨帶有CTX-M型的乙內醯胺酶或同時帶有SHV型或CMY-2型乙內醯胺酶。在這92株裏面分別偵測到44株帶有16SrRNA甲基化基因*armA*，37株帶有*rmtB*基因。有一株同時帶有*armA*和*rmtB*基因。有3株細菌同時帶有修飾酵素*aac(6')-II*和*mtB*基因。在所有的帶有*armA*或*rmtB*基因的菌株中都帶有CTX-M型的ESBL，它們不是屬於第一組(CTX-M-3和CTX-M-15)，就是屬於第九組(CTX-M-14)，除了一株*armA*基因是與第一組的CTX-M型的ESBL共存，其餘的*armA*基因都是與第九組的CTX-M型的ESBL共存。相反的大部分的*rmtB*基因與第九組的CTX-M型的ESBL共存(62.2%)(表一)。分子分型的結果發現這些amikacin抗藥的產生ESBL的克雷白氏肺炎菌在流行病學上並無大的關連。在*armA*陽性的44株菌株裏面，只有4群菌株分別

有小規模的純系傳播(clonal spreading)。第一個cluster包括了5株細菌；第二個cluster包括了2株細菌，這兩個cluster都來自於西部地區的同一家醫院；第三個cluster包括了3株細菌，來自於南部的兩家醫院；第四個cluster包括了2株細菌來自於南部同一家醫院。其餘的32株菌株都無親緣關係。在37株*rmtB*陽性的菌株裏面，有34株可以用PFGE進行分型，有3株分型失敗。有4株菌株分別有小規模的clonal spreading。第一個cluster和第二個cluster分別包括了2株細菌分別來自於北部的不同兩家醫院；第三個cluster包括了5株細菌；第四個cluster包括了2株細菌；第三個和第四個cluster均來自於西部地區的同一家醫院；餘下的23株都有不同的PFGE分型。這些分子分型的結果提示了*armA*和*rmtB*基因的高度流行並不是由clonal spreading引起的。通過質體接合實驗，我們發現*armA*或*rmtB*甲基化基因與CTX-M型的ESBL基因是位於同一個大的可傳播的質體上，也就是說兩類藥物的共用並沒有起到互補的作用而是同時抗藥並且可能造成四處擴散。為了進一步瞭解是否有質體的傳播，我們隨機選擇了22株同時帶有*armA*甲基化基因與CTX-M型的ESBL基因和19株同時帶有*rmtB*甲基化基因與CTX-M型的ESBL基因的質體並用限制酶EcoRI進行裁切，結果發現它們中的絕大部分在被限制酶裁切後的圖譜是不一樣的，這

表一 在 102 株臺灣的產生 ESBL 之克雷白氏肺炎菌中所帶有的 amikacin 抗性基因和共存的 ESBL 基因之地理分布

抗性基因 (菌株數)	共存的 ESBL, (s) 基因	台灣各地區分離出的菌株數			
		北部 (6) ^a	西部 (5)	南部 (5)	東部 (1)
<i>armA</i> (44)	CTX-M-3	8	15	10	1
	CTX-M-3+ SHV-5	2	1	5	0
	CTX-M-14+ SHV-12	1	0	0	0
	CTX-M-15	0	1	0	0
	CTX-M-3	7	4	0	0
<i>rmtB</i> (37)	CTX-M-3+ SHV-12	0	2	1	0
	CTX-M-14	7	14	0	0
	CTX-M-14+ SHV-12	2	0	0	0
	CTX-M-3	0	1	0	0
<i>armA+rmtB</i> (1)	CTX-M-3	0	1	0	0
<i>rmtB+aac(6')=II</i> (3)	CTX-M-3+ SHV-12	0	2	0	0
	CTX-M-14+ CMY-2	0	1	0	0
	CTX-M-14	0	1	0	0
<i>aac(6')-II</i> (6)	CTX-M-14+ SHV-12	2	0	0	0
	CTX-M-3+ SHV-12	1	0	0	0
	SHV-12	1	0	1	0
	SHV-12	1	0	1	0

^a 括弧內的數字是指該地區的醫院數

個結果提示了 *armA* 和 *rmtB* 基因的高度流行也不是由質粒傳播引起的。

在臺灣的產生 ESBL 之克雷白氏肺炎菌中的 16SrRNA 甲基化基因的高度流行既不是由 clonal spreading 引起，也不是由質體傳播引起的，它們

的傳播還有其它的機制。眾所周知，CTX-M 型的 ESBL 基因最近十年來以驚人的速度增長，目前是全球分佈最廣的而且是發生頻率最高的，它在腸內菌 (*Enterobacteriaceae*) 中高度流行，它的成因一直是個迷。有論文發

表了說插入序列 *ISEcp1* 與 CTX-M 型的 ESBL 基因的移動 (mobilization) 和表達 (expression) 有關。國外研究發現 CTX-M 基因的上游都有 *ISEcp1*，有的還有 IS26。我們發現的菌株也遵循這個規律，但是在 CTX-M 基因的上游沒有發現 IS26。而且我們發現在 *ISEcp1* 在 CTX-M 基因的上游的位置有規律性就是 *ISEcp1* 在 CTX-M-3 的上游而與 CTX-M-3 基因相距 127 個鹼基序列，*ISEcp1* 在 CTX-M-14 的上游與 CTX-M-14 基因相距 42 個鹼基序列。這個鹼基序列的長短與 CTX-M 基因表達的強弱是否有關姑且不論，但是已經知道插入序列也是一個與抗藥性基因移動有關的因子，在臺灣產生 ESBL 之克雷白氏肺炎菌中 16SrRNA 甲基化基因的高度流行正是由於在 *ISEcp1* 的帶動下造成 CTX-M 基因的全球廣泛傳播，正因為 16SrRNA 甲基化基因與 CTX-M 型的 ESBL 基因是在同一個大的可傳播的質體上，所以造成了 *armA* 和 *rmtB* 基因的高度流行。

本研究的結果提醒了醫界 16SrRNA 甲基化基因 *armA*、*rmtB* 與 CTX-M 型的 ESBL 基因是在同一個大的可傳播的質體上。質體和插入序列都是與抗藥性基因移動有關的因子，未來由 16SrRNA 甲基化基因引起的對 amikacin 的抗藥的增加可想而知，而且乙內醯胺類和胺基配醣體類藥物的聯合用藥也很可能導致治療失敗，必須引起警惕和重視。

結 論

鮑氏不動桿菌和克雷白氏肺炎菌是臨床上重要的院內感染致病菌。本文揭開了在臺灣在這兩種細菌中多重抗藥迅速傳播的原因為抗藥性基因藉由嵌入子或可移動的大的質體傳佈，並深入研究那些基因會存在於同一個質體或嵌入子上而造成對那些藥物的多重抗藥。本研究也提醒臨床醫師以往的某些經驗療法像以聯合用藥治療感染，很可能因為這些機制所引起的多重抗藥而導致治療的失敗。更值得注意的是這些傳播機制並不局限於上述兩種細菌，在其他的細菌亦會發生，而使抗藥基因迅速擴散廣泛傳播造成多重抗藥。

參考文獻

1. Bergogne-Berezin E, Towner KJ: *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996;9:148-65.
2. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, et al: Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev 2007;20:79-114.
3. Liu SY, Lin JY, Chu C, et al: Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. Int J Antimicrob Agents 2006;27:81-4.
4. Wu TL, Ma L, Chang JC, et al: Variable resistance patterns of integron-associated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a surgical intensive care unit. Microb Drug Resist 2004;10:292-9.
5. Chen TL, Siu LK, Wu RC, et al: Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter bau-*

- mannii*. Clin Microbiol Infect 2007;13:801-6.
6. Mazel D: Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol 2006;4:608-20.
 7. Shi L, Zheng M, Xiao Z, et al: Unnoticed spread of class 1 integrons in gram-positive clinical strains isolated in Guangzhou, China. Microbiol Immunol 2006;50:463-7.
 8. Shaw KJ, Rather PN, et al: Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev 1993;57:138-63.
 9. Gallego L, Tower KJ: Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. J Med Microbiol 2001;50:71-7.
 10. Nemeč A: Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J Med Microbiol 2004;53:1233-40.
 11. Galimand M: Plasmid-mediated highlevel resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1584-8.
 12. Paterson DL: Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis 2004;39:31-7.