

陳惠恩¹ 余文良² 莊銀清³

奇美醫學中心¹ 醫學研究部² 加護醫學部³ 內科部

前 言

一個抗生素的研發成功耗時約 20 年，但細菌只需區區數年便演化出對抗策略。本文之廣效性乙內醯胺西每(Extended-spectrum β -lactamases; ESBL)的產生就是 細菌在歐美成功的研發第三代頭孢菌素(3rd generation cephalosporins)之後，產生酵素來破壞具有活性之藥物的一種抵禦方式。隨著廣效性頭孢菌素的大量使用，一開始只在少數區域出現它的蹤跡，但目前已成爲一個全球性的問題。同時能產生 ESBL 的細菌也就越多。以往 ESBL 主要存在於常見腸內菌如：克雷伯氏菌(*Klebsiella* spp.)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)，但現在連沙門(氏)菌(*Salmonella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、檸檬酸桿菌(*Citrobacter* spp.)、摩根氏桿菌(*Morganella morganii*)、黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、赤痢志賀氏桿菌(*Shigella dysenteriae*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 及不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*)也都有發現 [1]。此外，這些細菌不只具有一個 ESBL 基因，有時同一菌株具有數個 ESBL 基因也已經見怪不怪，使得鑑定步驟與治療方式漸趨複雜。

ESBL 的分類命名及歷史回顧

ESBL 是一種由突變的基因(*bla*)，位於質體(plasmid)上，所媒介的新一類乙內醯胺西每(β -lactamase)。這些酵素經由一或多個氨基酸的改變，就能水解更多 cephalosporin 類抗生素、penicillins 及 aztreonam[1,2]。但 ESBL 會被乙內醯胺西每抑制劑，如：clavulanic acid 所抑制，是實驗室確立 ESBL 菌株的重要方法。

目前 ESBL 被分爲 9 類：TEM(源自一個小女孩的名字 Temoniera)，SHV (sulphydryl variable)，OXA (ox-acillinase)，CTX-M(對 cefotaximes 水解能力很強)，PER(在 *P. aeruginosa* 發現)，VEB(源自人名 Vietnam，又名 CEF)，GES，TLA，BES。而大部分的 ESBL 皆爲 TEM 或 SHV 的衍生物[1-3]，根據它們的胺基酸序列 TEM 型有多達 90 種，SHV 型則至少 25 種之多。

ESBL 的發現最早始於 1983 年由 Knothe 等人提出[4]。他們發現這種能水解 cefotaxime 的酵素，它的胺基酸序列異於早期發表的 SHV-1 乙內醯胺西每，並命名爲 SHV-2。稍後 1985 年，法國發現另一種可水解 cefotaxime 的酵素的新型乙內醯胺西每，爲 TEM-1 的衍生物，並命名爲 TEM-3。往後陸續發現其他類型 ESBL 如：1986 年發現 TEM-4、SHV3，1987 年發現 TEM-6、TEM-9、SHV4、SHV5... 等。截至目前爲止已有超過 150 種 ESBL 被發表[1-3]。

ESBL 菌株的篩選與鑑定

由於這些 ESBLs 的基因是由質體所攜帶的，故而這些基因可在不同種細菌之間傳播。加上 ESBL 的菌株所引起的院內感染已有增加的趨勢，使其偵測工作益行重要。那要如何偵測呢？當細菌對相關抗生素的感受

性降低，尤其是對第三代 cephalosporin 藥物，如 cefotaxime、ceftriaxone、ceftazidime 或 aztreonam 的感受性下降，就有可能是 ESBLs。不過要確定 還需透過合併乙內醯胺西每抑制劑一起觀察。而確定為 ESBLs 的方法有很多，目前較常用的有：雙紙錠協同測試法 (double disc synergy test; DDST)、最小抑菌濃度(MIC) 測試、等電點聚焦 (isoelectric focusing; IEF)和分子生物 方法(如：聚合西每連鎖反應 polymerase chain reaction; PCR)…等[5]。

1.雙紙錠協同測試法：把含有 cefotaxime、ceftazidime、cefotaxime + clavulanic acid 和 ceftazidime + clavulanic acid 四片紙錠放在塗有待測菌的瓊脂培養基。當加上 clavulanic acid 的紙錠比沒加 clavulanic acid 的抑制環增加 5mm 以上，即判斷為 ESBL 菌株。如圖一所示。

2.最小抑菌濃度測試(以瓊脂稀釋法為例)：將菌株點在含有不同濃度抗生素的瓊脂培養基上，隔夜培養。隔天判斷抑制細菌生長的最小抗生素濃度。當沒有添加 clavulanic acid 的瓊脂培養基比添加 clavulanic acid 瓊脂培養基的最小 抑菌濃 度>3 個 2 倍連續稀釋倍數(3log₂)，即判斷為 ESBL 菌株。如表一 [6,7,8,9] 所示。

3.等電點聚焦：抽取細菌之乙內醯胺西每進行電泳，電泳結束後再利用 nitrocefin 為受質來呈色，並量測距離。最後根據一些已知 pI 值(等電點)的 乙內醯胺西每為標準值，畫出回歸曲線，求得新測距離之對應 pI 值。再根據 www.lahey.org/studies/webt.htm 所列之各個乙內醯胺西每 pI 值(表二)，判斷可能的乙內醯胺西每種類。等電點聚焦結果如圖二所示。因為酵素在膠片上電泳時可能受到干擾，移動的位置或回歸曲線計算結果會有誤差，因此等電點值只能供參考。前述三種皆根據其表現型加以測試，而遺傳物質之確認 需靠聚合西每連鎖反應與 DNA 定序。4.聚合西每連鎖反應：根據已發表之 ESBL 基因序列，設計引子，抽取細菌之質體 DNA，偵測是否帶有 ESBL 基因。反應之產物可再送 DNA 定序，做更進一步的鑑定。

流行病學調查

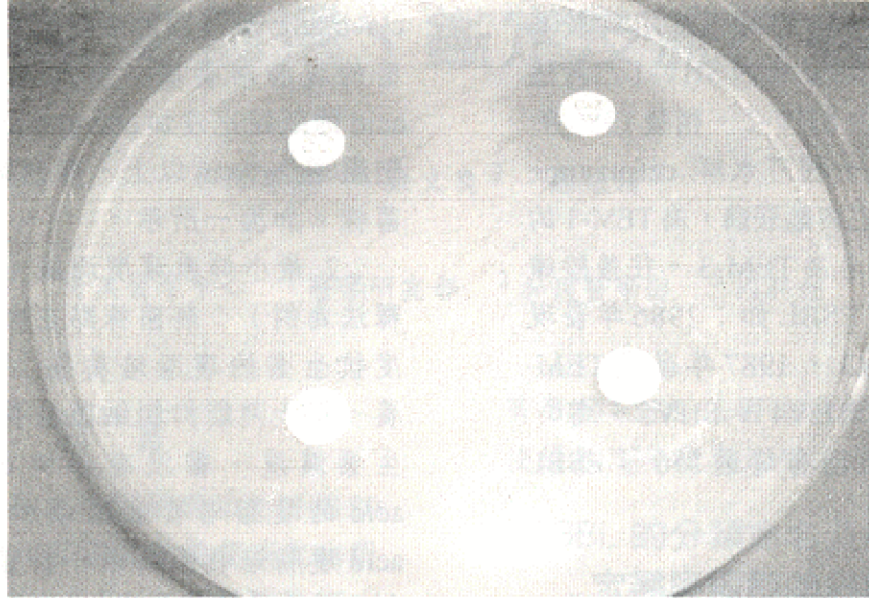
ESBL 菌株的分佈

根據不同地區發表的文獻得知，一種 ESBL 不只局限在同一地區，可藉由宿主的四處移動而散佈至不同地區及國家。且每個國家常見的 ESBL 型有所不同。目前許多國家對其分佈之 ESBL 有不同報告[10,11,12]，如：美國(主要是 TEM-10、TEM-12 及 TEM-26)、法國(TEM-3 及 TEM-24)、韓國(TEM-52、SHV-12 和 SHV-2a)、西班牙(CTX-M-10、TEM-24、TEM-27)、義大利(TEM-52、CTX-M-15、CTX-M-2、CTX-M-1)、希臘(SHV-5)、中國(SHV-12、CTX-M-14 和 CTX-M-3)、南美洲(CTX-M-2)…等。台灣以 CTX-M-3、CTX-M-14、SHV-5 及 SHV-12 較為常見。若利用自動化 ribotyping 和脈衝式電泳(pulsed field gel electrophoresis)將其遺傳分子加以分型，亦有不少群突發或相同基因型 散播(clone dissemination)之報告[12,13,15,16]。

結 論

過去 20 年來，有鑒於微生物因應第三代頭孢菌素，ESBL 基因不斷地突變，讓我們警覺到抗藥性問題的嚴重性。不同的 ESBL 型對各種抗生素之影響可能存在很大的差異。如果細菌偵測到為 ESBL 菌株，則所有的 cephalosporins、penicillins 及 aztreonam 都應報告為抗藥性，即使某些藥物試驗結果仍呈敏感性。嚴重 ESBL 菌株感染者，宜用 carbapenem 來治療[14]。同時應加強感染管制，減少細菌抗藥性的一再演化。為了避免

進一步的感染突發，對 ESBLs 的偵測能力就特別重要。目前細菌室已常規性篩選 *E. coli* 和 *K. pneumoniae* 之 ESBL。對於 *E. coli* 和 *K. pneumoniae* 以外的腸內菌也會產生 ESBLs 者，也應進行 臨床上治療 與預後的 分析，以提供篩選策略之制定。



圖一 左上 (ceftazidime + clavulanic acid); 右上 (ceftazidime);
右下 (cefotaxime + clavulanic acid); 左下 (cefotaxime);
菌株為 *Serratia marcescens* (產生 CTX-M-3 之 ESBL)。

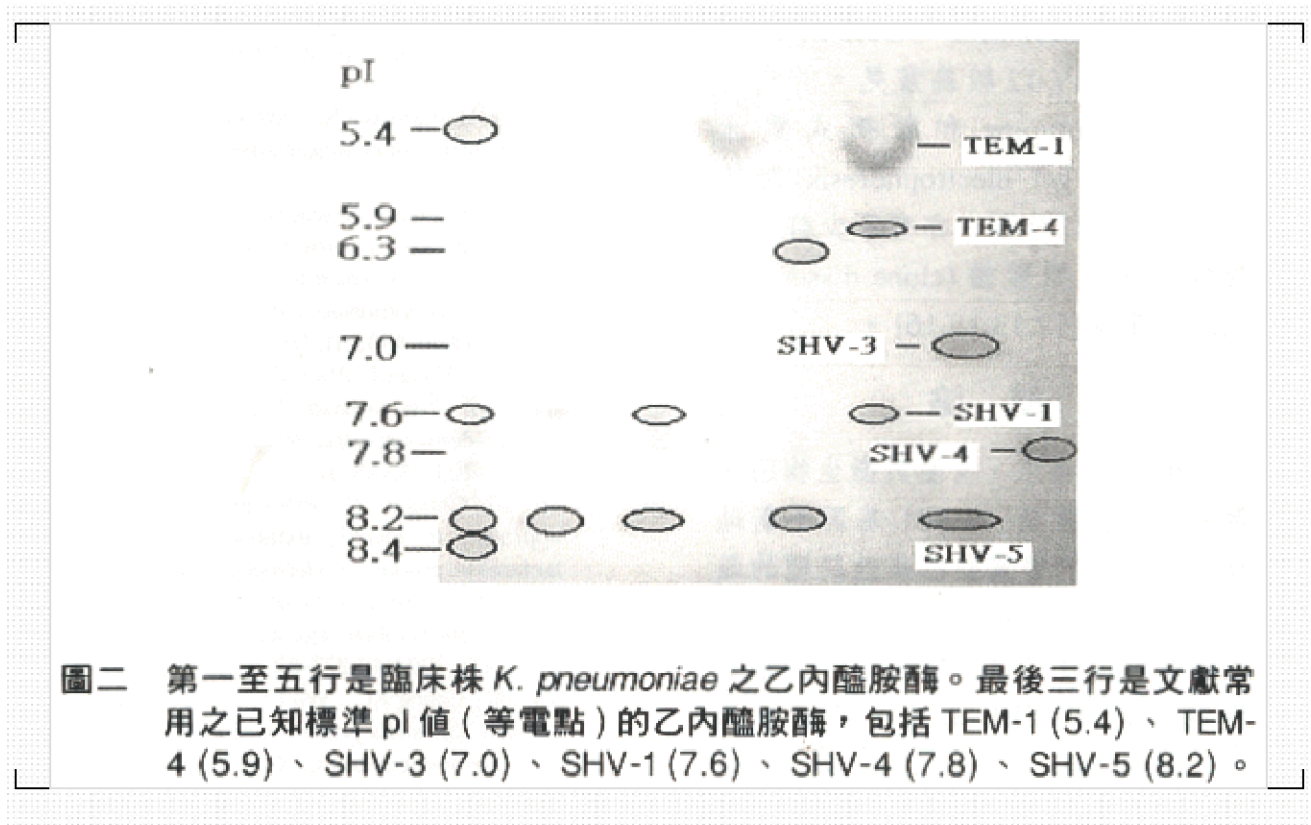
表一 以最小抑菌濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 之測試確認 ESBL 之表現型 (phenotype)

菌 株	CTX	CTX+CLA	CAZ	CAZ+CLA	ESBL(等電點)
KP-51[6]	32	1	4	2	CTX-M-3(8.4)
KP-103[6]	>256	2	2	1	CTX-M-14(7.9)
KP-154[7]	>256	0.5	>256	2	CTX-M-15(8.8) SHV-5(8.2)
SM-6620[8]	>256	8	8	4	CTX-M-3(8.4)
SM-06[9]	128	0.06	64	0.5	CTX-M-3(8.4) SHV-5(8.2)

註：CTX=cefotaxime, CLA=clavulanic acid, CAZ=ceftazidime,
KP=*Klebsiella pneumoniae*, SM=*Serratia marcescens*

表二 常見 pI 值 (等電點) 的各種乙內醯胺酶

pI	乙內醯胺酶
5.4	TEM-1, TEM-7, TEM-19, TEM-20, TEM-29
5.9	TEM-4, TEM-6, TEM-8, TEM-27
6.3	TEM-3, TEM-16, TEM-22
7.0	SHV-3
7.6	SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-6, SHV-7, SHV-8
7.8	SHV-4
7.9-8.0	CTX-M-2, CTX-M-14
8.2	SHV-5, SHV-9, SHV-12
8.4	CTX-M-3, CTX-M-4, CTX-M-6, CTX-M-7
8.8	CTX-M-5, CTX-M-15



參考文獻

1. Bradford PA: Extended-spectrum β -lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-51.
2. Jacoby GA, Sutton L: Properties of plasmids responsible for extended β -lactamase production. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:164-9.
3. Larson LL, Ramphal R: Extended-spectrum β -lactamases. Semin Respir Infect 2002;17:189-94.
4. Knothe H, Shah P, Kremery V, et al: Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983;11:315-7.
5. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, et al: Extended-spectrum β -lactamase (ESBL): characterization, epidemiology and detection. Crit Rev Microbiol 2004;30:25-32.
6. Yu WL, Chuang YC, Jones RN: A pragmatic approach to identify extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: in vitro activity of newer and established antimicrobial agents. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;48:277-82.
7. Yu WL, Cheng KC, Wu LT, et al: Emergence of two *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring plasmid-mediated CTX-M-15 β -lactamase in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:362-3.
8. Yu WL, Wu LT, Pfaller MA, et al: Confirmation of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens*: preliminary report from Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;45:221-4.
9. Wu LT, Tsou MF, Wu HJ, et al: Survey of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) among cefotaxime-resistant *Serratia marcescens* at a medical center in middle Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis

2004;49:125-9.

10. Pagani L, Amico ED, Migliavacca R, et al: Multiple CTX-M-Type Extended - spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:4264-9.

11. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, et al: Investigation of extended-spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. *Lett Appl Microbiol* 2004;39:41-7.

12. Yu WL, Winokur PL, Von Stein DL, et al: First description of *Klebsiella pneumoniae* harboring CTX-M β -lactamases (CTX-M-14 and CTX-M-3) in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1098-100.

13. Yu WL, Jones RN, Hollis RJ, et al: Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing, fluoroquinolone-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002;40:4666-9.

14. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al: Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001;39:2206-12.

15. Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, et al: Epidemiological study by pulse-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J Clin Microbiol* 1994;32:301-5.

16. Liu PYF, Tung JC, Ke SC, et al: Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 1998;36:2759-62.