

以分子分型技術分析院內感染 ESBL 菌株之應用

以分子分型技術分析院內感染 ESBL 菌株之應用

詹明錦¹ 劉明經⁴ 彭成立³ 范承國⁵ 彭銘業^{1,2}

三軍總醫院¹ 感染管制室² 內科部感染科³ 臨床病理科

⁴花蓮慈濟醫學中心 檢驗科 ⁵國軍桃園總醫院 內科部

前 言

廣效性乙內醯胺西每(extended-spectrum β -lactamases; ESBLs)是由一些革蘭氏陰性桿菌所產生，並可造成廣泛的 cephalosporins 與 aztreonam 類抗生素抗藥性的形成[1,2,3]。藉由 ESBL 抗藥性質體在腸內桿菌各菌屬間轉移的方式可導致抗藥普遍性，目前已然成為全球棘手的醫療問題。在 1980 年代中期，由質體攜帶之廣效性乙內醯胺西每首先被報導[4]，而由 ESBL 所造成的感染病原菌中，又以 *Klebsiella pneumoniae* 與 *Escherichia coli* 最為常見，且其 ESBLs 大多是由 TEM-1 與 SHV-1 基因型所表現的。但早在 1950 年代，*Serratia marcescens* 就已是院內感染的重要伺機性致病源，特別對新生兒病患、手術患者與加護病房患者，都能造成諸如肺炎、敗血症、腦膜炎等感染症。近年來，由於 *S. marcescens* 可輕易獲得如 extended-spectrum β -lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones 與 co-trimoxazole 抗藥性，使感染愈加難以治療已造成全球多數醫院的院內感染，與一般腸內菌一樣，對較新的 β -lactams 類抗生素產生的抗藥機轉通常亦是由 β -lactamase 所媒介[6]，最主要是導因於 AmpC 的去除抑制作用(derepression)與

ESBL 的產生。另外，經由帶菌的手(hand carriage)在患者間傳播已成為極重要的傳播途徑，而經由醫療器具的污染而導致群突發亦多有文獻記載[11,12]。

分子流行病學多用於描述院內或病房內菌株群突發與擴散(clonal outbreaks and dissemination)和優勢菌株持續存在的現象(persistence of predominant strain)[7,8,9]。分子分型技術(molecular typing)在分子流行病學中扮演重要角色，可提供群突發 監測與追蹤院內感染病原的重要科學依據。近年來，脈衝場電泳(pulse-field gel electrophoresis; PFGE)分型法已被多數實驗室採用並普遍認定是許多細菌分型的黃金標準(gold standard)[10]，在本文中將簡介如何利用以分子分型技術來監測 ESBL 之院內感染。

菌株收集與表現型分析

1. 菌株收集 (isolates collection)：分離自同一患者的菌株若其藥敏程度呈現顯著的差異時，則均應該收集。
2. 表現型別(phenotyping)分析：選取適當之抗生素(如：piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, amikacin, netilmicin, gentamicin, ciprofloxacin)測定 MIC 值，選用 *E. coli* ATCC 25922 與 *P. aeruginosa* ATCC 27853 作為對照株，並依照 NCCLS 規範操作瓊脂稀釋試驗(agar dilution method)。
3. ESBL 的偵測(detection of ESBL producers)：選取 amoxicillin-clavulanate, cefotaxime, ceftazidime 與 cefepime，進行雙紙錠協同試驗(double-disk synergy test, DDST)以篩選 ESBL 菌株，亦可以 Etest ESBL(AB Biodisk, Solna, Sweden)操作。或者，可針對特定已知的 ESBL 基因，以 PCR 偵測與篩選。

ESBL 基因型分析

ESBL 編碼基因之 PCR 增幅反應與定序(PCR amplification and sequencing of ESBL-encoding genes)：製造 TEM-type β -lactamases 之基因(bla-TEM genes)可以 TEM-A 與 TEM-B 引子加以增幅[13]；製造 SHV-type β -lactamases 之基因(blaSHV genes)可以 SHV-D 與 SHV-H 引子加以增幅[14]；製造 CTX-M β -lactamases 之基因(blaCTX-M genes)可以 P1C 與 P2D 引子加以增幅[15]。

PFGE 分型方法

1. 電泳分析與型別判斷：將細菌固定在洋菜膠內進行核酸純化，再取適當之限制西每(如 Xba I)分解菌株 genomic DNA 後，利用 CHEF Mapper (Bio-Rad, Hercules, Calif.)進行電泳分析，各菌株電泳後的指印樣式(fingerprinting patterns)需以適當之標準加以分析與解釋，當菌株間之 PFGE 型別完全相同時，則判定為無法區分，當型別相差 2-3 個 bands 時，則判定為密切相關，當型別相差 4-6 個 bands 時，則判定為可能相似，當菌株型別相差 7 個 bands(含)以上時，則判定為不同菌株[16]。

2. 指印資料庫之建立：選用適當之電腦軟體(ex：BioNumerics)進行指印資料之存取與比對。

3. 操作 PFGE 時之重點：

(1) 選取適當之參考菌株為標準菌株，所謂適當，表示此參考菌株經由特定限制西每切割後，應具備已知片段大小，且範圍大小應涵蓋測試菌株欲測定片段之最大與最小片段。由於洋菜膠體兩側及中間部分之電泳速度會有些微差異，因此參考菌株最好能 loading 在兩側及中間部分(圖一)。

(2) 選用適當之限制西每切割測試菌株，所謂適當，表示此限制西每應能切割菌體之染色體達 10 個片段以上，且片段間能明確區分。

(3) 所得之菌株分子樣式宜以適當電腦軟體(如 BioNumerics)加以累積儲存為指印資料庫，並可用不同參數分析菌株之親源性(clonal relationship) (圖二)。

(4) 以 PFGE 推論菌株之親源性與流病關聯時，應注意以下之判定標準[16]：

a. 以 PFGE 評估院內感染時，通常對於短期的群聚感染較具效力，評估之菌株數通常應在 30 株以內。

b. 菌株來源應分離自特定時間與標定明確之區域內的環境或患者中，換言之，細菌間應確認具有流行病學之關聯後，方可以 PFGE 推論菌株可能來自相同來源。

c. 以 PFGE 推論菌株可能來自相同來源時，其 PFGE 樣式間之結果應為無法區分，而即可判定菌株間為基因關聯性菌株。

d. 若所觀察之菌株均具基因關聯性，且所觀察菌株相對應之患者總數超過該地區在同一時間的發生率，即表示該地區由該致病菌所導致的傳染病群突發。

e. 導致傳染病群突發之菌株因具有基因關聯性與流病關聯性，則可稱為群突發菌株。

f. 群突發菌株若分離自相同時期，且具有相同表現型與基因型，則可被推論為同源關聯(clonally related)菌株。

g. 同源關聯菌株若在特定健康照護機構或社區中，經常自病患檢體中分離出，且利用分子分型法(如 PFGE)證實菌株彼此間之樣式結果為無法區分或密切相關，但無直接證據證實其流行病學之關聯時，則可被推論為地方流行株。其菌株與群突發菌株間之共同來源在時間上可能較為遙遠。

MLST 分型方法

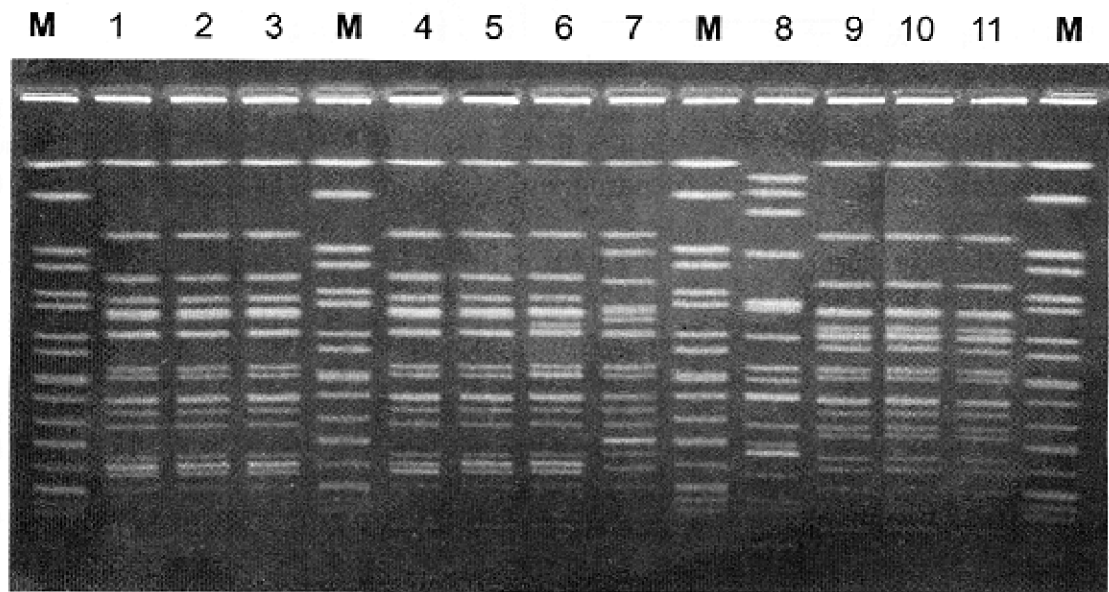
PFGE 分型法目前雖是許多細菌分型的黃金標準，但新近研發出的 DNA 分子指印技術--多重基因座序列分型法(multilocus sequence typing; MLST)，此以 DNA 序列為基礎的(DNA-based)MLST 分型法所得之實驗結果因可提供更細緻的序列訊息以解開菌株的演化過程，更易於解釋菌株與流行病學間的相關性，亦容易在不同實驗室間作分析比對，甚至在某些情況下比 PFGE 更具鑑別力[5]。

2003 年，由愛爾蘭皇家學院學者所發表的研究指出[17]，MLST 分型法具備的最大優點，即是具有良好的鑑別力並可獲知核酸序列的分析結果，可進行實驗室間快速的資料庫比對，不但能針對境內菌株進行長期的疫情監控，亦可作為全球性的流行病學研究。但近年來由於核酸序列分析技術的長足進步，以自動化核酸序列分析儀分析 MLST 分型法中的標的序列"多重管家基因"(multiple housekeeping genes)變得非常耗時，再加上昂貴的自動化核酸序列分析設備與化學冷光標定之定序套組(fluorescently labeled dideoxynucleotide sequencing kit)，整體分型設備的經費相當昂貴，且為了達到經濟且有效率，每次的分析必須收集分析儀所能負載的最大量，研究人員有時候需等待一週或數週後，才能收集到一定數目之菌株進行集體分析，所以只有在大型臨床實驗室或國家級參考實驗室才可能擁有這種高產量(high throughput)與高效率的實驗方法 [18,19]。

綜觀整個 MLST 分型法之流程，一個常態化的標準實驗室若沒有專業的定序操作人員與機械化的設備，要操作完大量檢體中，每個菌株的七個基因座的定序工作是相當昂貴且耗時費力的。多基因座限制性分型法(multilocus restriction typing; MLRT)係針對 MLST 的缺點所設計的分型法，為一種簡單、快速、再現性高的多基因座分型法。此法首先針對 housekeeping genes 內的七個基因座，分別為 abcZ (putative ABC transporter)、adk (adenylate kinase)、aroE(shikimate dehydrogenase)、fumC (fumarate hydratase)、gdh (glucose-6-phosphate dehydrogenase)、pdhC (pyruvate dehydrogenase subunit)與 pgm(phosphoglucomutase)進行 PCR 增幅，再以限制片段長度多型性分析法(restriction fragment length polymorphism analysis; RFLP)分析上述 PCR 產物，即可得到不同的限制樣式(restriction pattern; alleles)，七種基因座上的限制樣式組合成一種限制型(restriction type; RT, 亦可稱為 allelic profile)，由愛爾蘭學者對 MLRT 分型法所作的評估結果顯示[17]，此法具有簡單、高效率、高再現性、且相較於 MLST 經濟的優點，且與血清群、血清型和血清次型均有高度相關，但目前 MLRT 分型法仍在評估階段是一種替代 MLST 的分析方法；或在進行 MLST 分型法前，可先利用 MLRT 進行不同菌株的初步分型。

結 論

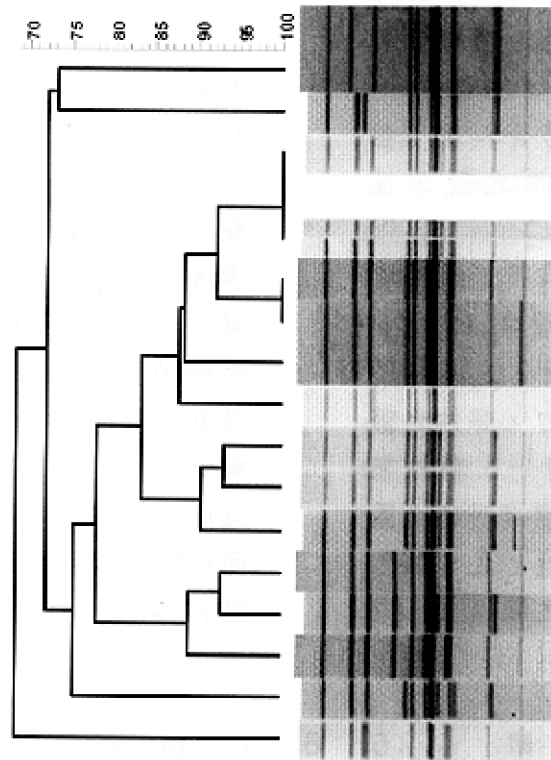
總之，MLST 在較長期間的感染源追蹤效果上確實較 PFGE 為佳，且序列資訊可作為長期資料庫，並更有利於實驗室間精確的菌株親源性比對，就資料庫的長遠實用性而言，MLST 似乎是首選工具，但在實務上，MLRT 技術的開發確可發揮簡單、經濟的功能，並似乎為 MLST 的首選取代法；而 PFGE 在較短期之病源菌分型上，仍可發揮優越的效能，合併流病資料、公認的圖譜判別標準與適當之儲存分析軟體，對於院內短期內群聚感染的病源菌證實與追蹤上，PFGE 仍是相當實用的分型工具。



M : marker and reference strain. 1~11 : strains tested.

圖一 以 PFGE 分型技術操作測試菌株，可得到菌株之基因型別
藉以比較各菌株間之親源關係 (clonal relationship)

Jaccard (Tol 1.0%-10%) (F0.0% S=0.0%) (00%-1000%)
 NotI, 2165417s, 19hr NotI, 216-54.17s, 19hr



1. Jaccard, Dice 等均為一種選擇性的係數 [Coefficients (SABs)]，可將欲比較的圖譜或其他可比較的值 (character, 如藥敏結果、定序結果…) 配對比較並產生相似值 (values of similarity)，結果會以樹狀圖 (dendrogram) 表示所選擇菌株間之親源性。相關的係數計算式如下：

The coefficient Jaccard (SJ) = $n_{AB} / n_{AB} + a + b$

The coefficient Dice (SD) = $2n_{AB} / 2n_{AB} + a + b$

S: Similarity, A: A strain, B: B stain, n_{AB} : bands of $A \cap B$

a: bands of $A(1)B(0)$, b: bands of $A(0)B(1)$

2. Not I 為所使用之限制酵素； 2.16-54.17 為所執行 PFGE 時設定的啓始轉換時間 (initial switch time) 與最終轉換時間 (final switch time)； 19h 為執行 PFGE 所需的時間。設定時，需注意所分析 (須認定) 的限制片段大小的範圍。
3. 分型的工具除必備解釋的準則 (interpretative criteria) 外，亦須有詳盡的流行病學資料作為比對的依據，兩者相輔相成，缺一不可。所得之菌株親源性樹狀圖須與流病資料合併分析，方可精確描述與推論所觀察之菌株是否為散發 (sporadic) 或群突發、本土或外源等菌株之相關流病特性。

圖二 菌株指印圖譜所建立之資料庫，藉由電腦軟體內之選擇性的係數而計算產生之菌株親源性樹狀圖 (dendrogram)

參考文獻

1. Bradford, PA: Extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-51.
2. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
3. Livermore DM: β -Lactamases in the clinical laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
4. Kliebe C, Nies BA, Meyer J F, et al: Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985;28:302-7.
5. Lucia LN, Mamuka K, Justine T, et al: Multilocus Sequence Typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates. J Clin Microbiol 2005;43:1776-81.
6. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, et al: Concurrent outbreaks of extended spectrum β -lactamase-producing organism of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. J Antimicrob Chemother 1999;44:489-99.
7. Parvaz P, Tille D, Meugnier H, et al: A rapid and easy PCR-RFLP method for genotyping Serratia marcescens strains isolated in different hospital outbreaks and patients environments in the Lyon area, France. J Hosp Infect 2002;51:96-105.
8. Patton TG, Katz S, Sobieski RJ, et al: Genotyping of clinical Serratia marcescens isolates: a comparison of PCR-based methods. FEMS Microbiol Lett 2001;194:19-25.
9. Peltroche-Llacsahuanga H, Lutticken R, Haase G: Temporally overlapping nosocomial outbreaks of Serratia marcescens infections: an unexpected result revealed by pulse-field gel electrophoresis. Infect Control Hosp Epidemiol 1999;20:387-8.
10. Arbeit RD: Manual of Clinical Microbiology ASM Press. 7th ed. Washington, DC: Laboratory Procedures for the Epidemiological Analysis of Microorganism. 1999:116-37.
11. Acar JF: Serratia marcescens infections. Infect Control 1986;7:273-8.
12. Berthelot P, Grattard F, Amerger C, et al: Investigation of a nosocomial outbreak due to Serratia marcescens in a maternity hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 1999;20:233-6.
13. Mabilat C, Goussard S: PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. In DH Persing 1995;553-7.

14. Fiett J, Palucha A, Miaczynska B, et al: A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing klebsiellae. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1499-505.
15. Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, et al: Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:151-9.
16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
17. Bennett DB, Cafferkey MT: Multilocus restriction typing: a tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. *J Med Microbiol* 2003;52: 781-7.
18. Clarke SC, et al: Semiautomation of multilocus sequence typing for the characterization of clinical isolates of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:3066-71.
19. Diggle MA, Clarke SC: What a load of old sequence! *J Clin Microbiol* 2002;40:2707.