

北台灣一家醫學中心 *Klebsiella pneumoniae* 菌株中 具有 ESBL 的盛行率

鐘佩雯¹ 黃玉成¹ 郭安靜²

¹ 長庚兒童醫院感染科 ² 臨床病理科

在過去的 20 年中，因微生物對抗生素感受性不斷的改變，讓我們警覺到抗藥性問題的增加及其重要性。自從大量使用廣效性頭芽孢子類抗生素 (broad-spectrum cephalosporin) 之後，能產生 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)，即有抗藥性之腸道細菌越來越多，其中又以 *Klebsiella pneumoniae* 最常見。因此我們希望能偵測本院的 *K. pneumoniae* 菌株產生 ESBL 的情況，及其在院內的盛行率。

在 1999 年 5 月 21 日至 1999 年 6 月 17 日之間，我們共收集了 215 株 *K. pneumoniae*，分別來自血液、尿液、痰液、中央靜脈導管及其他來自病人的檢體所做的培養。抗生素敏感性試驗所採用的藥片試劑包括 ceftriaxone (CRO, 30 μ g)，ceftazidime (CAZ, 30 μ g)，aztreonam (ATM, 30 μ g) 及 amoxicillin-clavulanate (AMC, 30 μ g-15 μ g)。ESBL 的偵測採用 double-disk test 及 three-dimensional test 兩種方法，均是利用上述藥片來做測試。以 double-disk test 之結果發現，呈陽性反應者共有 30 株。以 three-dimensional test 之結果發現，呈陽性反應者共有 22 株。在所使用的三種抗生素中，又以 CRO 之偵測效果最好。無論是用 double-disk test 或 three-dimensional test，在 215 株 *K. pneumoniae* 中，均可偵測出 30 株能產生 ESBL 之 *K. pneumoniae*，因此在本院可能產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 的盛行率是 14%。推測院內 ESBL 盛行率並不低，應更進一步偵測血液培養中能產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 的比率，期有助於選用適當的抗生素，不但能增加治療效果，也減少醫療資源的浪費。(感控雜誌 2000; 10: 21-7)

關鍵詞： *K. pneumoniae*, ESBL (extended-spectrum β -lactamase)

民國 88 年 11 月 13 日受理
民國 88 年 11 月 17 日修正
民國 88 年 11 月 26 日接受刊載
聯絡人：鐘佩雯

聯絡地址：桃園縣龜山鄉復興街 5 號
聯絡電話：(03)3281200

前言

在過去 20 年中，因微生物對抗生素感受性不斷在改變，讓我們警覺到抗藥性問題的增加及其重要性。細菌產生抗藥性的機轉，包括細菌產生可分解抗生素之酵素，改變抗生素進入細胞的通透性，抗生素之目標物發生突變避免與抗生素結合，主動將抗生素排出細胞外等 [1,2]。針對產生酵素而言， β -lactamase 是細菌對 β -lactam 類抗生素產生抗藥性最常見的因素。就 β -lactamase 而言，可依其水解抗生素的種類，對抑制劑的感受力，或是經由染色體或質體遺傳來分類，如 Bush 分類法是依生物特性，即對不同 β -lactam 類抗生素之分解能力及對抑制劑 clavulanate 之感受力來分類，而 Ambler 分類法則依氨基酸結構序列不同來分類。然而無論革蘭氏陽性或陰性菌，厭氧或嗜氧菌甚至真菌都可產生 β -lactamase 而產生抗藥性 [1-3]。

自從大量使用廣效性頭芽孢子類抗生素 (broad-spectrum cephalosporin) 之後，能產生 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)，即有抗藥性之腸道菌越來越多，其中又以 *Klebsiella pneumoniae* 最常見 [4,5-10]。ESBL 是一些經由質體傳導 (plasmid-mediated) 之舊的 TEM 和 SHV β -lactamases 突變而來，因對 cefotaxime, ceftazidime 及 ceftriaxone 等 oxyimino-cephalosporins 及 monobactam 如 aztreonam 有抗藥性而稱之 ESBL [3,8]。就

最近的一些研究顯示，法國在 1988 到 1990 年間，在所有造成院內感染之 *K. pneumoniae* 有 13% 會產生 ESBL，在其他國家，如英國，會產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 有 16%，一些在法國、土耳其、葡萄牙的醫院，其能產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 甚至可高達 40% [4,5]。由於 ESBL 會對廣效的抗生素產生抗藥性，且因其鑲嵌在質體中，會隨著質體的複製及進入其他菌株中，使此菌株亦演變成會產生 ESBL 之抗藥性菌株 [4,10]。然而許多這些抗藥性菌株在一般的感受性測試中，並不會表現出對廣效性頭芽孢子類抗生素或 aztreonam 有抗藥性的表現，使得除了泌尿道感染之外，其他的感染用這些藥物治療往往都會失敗。此外，因無適當的方法偵測出這些會產生 ESBL 之菌株，很容易使其在院內，甚至醫院間造成大流行 [3,7]。因此我們希望能偵測本院的 *K. pneumoniae* 菌株產生 ESBL 的情況，及其在院內的盛行率。

材料與方法

菌株

1999 年 5 月 21 日至 1999 年 6 月 17 日在本院共收集了 215 株 *K. pneumoniae*，分別來自血液、尿液、痰液、中央靜脈導管及其他來自病人的檢體所做的培養。所採用的抗生素藥片試劑包括 ceftriaxone (CRO, 30 μ g)，ceftazidime (CAZ, 30 μ g)，aztreonam (ATM, 30 μ g) 及 amoxicillin-

clavulanate (AMC, $30\mu\text{g}$ - $15\mu\text{g}$)。Double-disk test 及 three-dimensional test 均是利用上述藥片來做測試。

抗藥性測試

無論是 double-disk test 或 three-dimensional test 均是在 Mueller-Hinton II agar plate 做藥物測試，以便偵測出會產生 ESBL 之菌株。首先將待測試之菌株接種在 TSB broth 中，在 35°C 培養至相當於 0.5 McFarland turbidity standard 的濃度，再將上述之菌液用棉棒均勻塗抹接種至 Mueller-Hinton II agar plate 上，將 AMC 藥片置於中央，將其餘藥片 (CRO, CAZ, ATM) 置於與 AMC 相距 30mm 處 (藥片中央至中央之距離)，此即為 double-disk test 之做法。而 three-dimensional test 則是除了上述方法外，還要在抗生素藥片外側 (除 AMC 之外) 距離 2mm 處打一個圓柱形的洞 (直徑 4mm)，其中注滿與 double-disk test 相同之菌株的菌液 0.5mL (其濃度需達 McFarland No.5 turbidity standard)，將上述之 plate 置於 35°C 的培養箱中培養 24 小時再觀察結果 [8]。

判讀

Double-disk test 中，在 β -lactam 抗生素周圍有明顯抑制圈 ($21\text{mm} \leq \text{CRO} \leq 25\text{mm}$, $18\text{mm} \leq \text{CAZ} \leq 22\text{mm}$, $22\text{mm} \leq \text{ATM} \leq 27\text{mm}$)，且抗生素之抑制圈與 AMC 藥片所產生之抑制圈中間有加成的作用 ($\geq 5\text{mm}$) 則認為有 ESBL 存在。Three-dimensional test 中，觀察所測試之抗生素藥

片之抑制圈，如果自接種菌液之洞緣起，有細菌生長且向外延伸出去而使抑制圈變成心臟形，此即有 ESBL 產生。有時抑制圈過小或根本沒出現時，則採用間接方式來做 three-dimensional test，此即將對任何藥物均有感受性之 *Escherichia coli* 先接種在 plate 上，而在洞中注入想測試之菌株高濃度菌液 0.5mL (其濃度需達 McFarland No.5 turbidity standard)，來觀察是否有心臟形之抑制圈形成，以便判斷是否有 ESBL 產生 [8]。

結 果

在 215 株來自病人各種部位培養所得之 *K. pneumoniae* 中，其 ESBL 偵測的結果如表一。在 double-disk test 之結果發現，用 ATM 有 27 株呈陽性反應，用 CAZ 有 23 株呈陽性反應，用 CRO 有 28 株呈陽性反應，用上述三者中任何一種藥物測試呈陽性反應者，共有 30 株。而在 three-dimensional test 之結果發現，用 ATM 只有 5 株呈陽性反應，用 CAZ 只有 3 株呈陽性反應，用 CRO 可偵測出 21 株，但其中有 18 株是用間接 three-dimensional test 之方法才做得出來的，用上述三者中任何一種藥物測試呈陽性反應者只有 22 株。然而無論是用 double-disk test 或 three-dimensional test，在 215 株 *K. pneumoniae* 中可偵測出 30 株產生 ESBL 之 *K. pneumoniae*，因此在本院可能產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 的盛行率是 14%。又在本次實驗

表一 *Klebsiella pneumoniae* 菌株中具有 ESBL 的盛行率

	Double-disk test				Three-dimensional test				Both methods	Either method
	ATM*	CAZ*	CRO*	Any disk	ATM*	CAZ*	CRO*	Any disk	Any disk	Any disk
陽性菌株數	27	23	28	30	5	3	21	22	22	30
(百分比)	(12.6)	(10.7)	(13)	(14)	(2.3)	(1.4)	(9.8)	(10.2)	(10.2)	(14)

*ATM=Aztreonam, CAZ=Ceftazidime, CRO=Ceftriaxone

結果發現，在偵測產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 時，double-disk test 似乎比 three-dimensional test 較為靈敏，而在所使用的三種抗生素中，又以 CRO 之偵測效果最好。

討 論

在革蘭氏陰性桿菌中，至少有超過 75 種 plasmid-mediated β -lactamase 被發現，其中在腸道細菌最常見的是 TEM-1。大部份 ESBL 均是 TEM-1, TEM-2 及 SHV-1 之突變，至目前為止至少有 25 種以上被發現 [1,3]。而腸道細菌最常發生 ESBL 的就是 *K. pneumoniae*，其原因可能是因交互傳染，基因在菌株間傳播，及 *K. pneumoniae* 比其他革蘭氏陰性桿菌在皮膚上存活更久，此外 *K. pneumoniae* 是質體的良好傳播工具，且比其他腸道細菌更易產生 ESBL 基因突變之故，再者其亦是院內感染的重要病源 [3]，故選此細菌做更進一步分析。

ESBL 與一般之 β -lactamase 最大的不同在於可分解廣效性頭芽孢子類

抗生素及 monobactam，但 carbapenem 及 cephamycin 加上 inhibitor 之結合物並不會被分解，故可用以治療產生 ESBL 之細菌引起的疾病，然而 cephamycin 加上 inhibitor 之結合物的療效則尚無定論 [3]。不同 ESBL 對抗各種不同抗生素之抗藥性程度，仍有個別的差異，如一些在美國發現的 TEM-10 及 TEM-26 對 ceftazidime 有很強的抗藥性 ($MIC \geq 128 \mu\text{g/mL}$)，但對 cefotaxime, ceftriaxone, cefpirome 及 ceftizoxime 之 MIC 卻只有 0.5-4 $\mu\text{g/mL}$ ，另外有些 ESBL 對廣效性頭芽孢子類抗生素之抗藥性比非 ESBL 之抗藥性高上 100 倍，但其 MIC 卻仍在國際臨床實驗室標準委員會 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 設定之感受性界值內 (8-16 $\mu\text{g/mL}$)，這往往造成判斷及治療上之誤差，使得除了泌尿道感染之外，其餘的疾病，特別是血液感染，均治療失敗，因此需有其他的篩選方法來偵測會產生 ESBL 的菌株 [3]。

一般常用的方法有 double-disk test, three-dimensional test, Vitek card 及 E test 等 [3,5-8]。前兩種方法較被廣泛使用，本次實驗亦採用這兩種方式來做，其中又以 double-disk test 偵測較為靈敏。用以偵測 ESBL 之抗生素，有些研究發現以 CAZ 最好 [3,5]，但本次實驗發現在本院用 CRO 偵測效果最好。在本次實驗發現本院 ESBL 之 *K. pneumoniae* 可能的盛行率高達 14%，但因並未做基因的分析，故本院 ESBL 真正的盛行率目前仍不是很清楚；此外推測院內 ESBL 盛行率並不低，更應進一步偵測血液培養中產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 的比率有多少，因其與選用適當的抗生素來治療疾病、對病人的預後有很大的影響，這部份有待更進一步的研究。

目前發現 ESBL 的產生與大量廣泛使用廣效性頭芽孢子類抗生素有關，加上產生 ESBL 之 *K. pneumoniae* 基因是由質體來傳播及複製，且質體可在不同的菌株傳播，使得不能產生 ESBL 之腸道細菌亦變成會產生 ESBL，進而形成院內甚至院外或社區感染的重要病源 [4,6,9,10]。若能產生 ESBL 之細菌沒被適當偵測出來，加上細菌易傳播及突變和不適當的治療，很容易造成院內感染大流行及治療失敗的結果，因此使用適當偵測產生 ESBL 細菌的方式，加上適當控制廣效性頭芽孢子類抗生素的使用，是避免治療失敗及院內感染大流行的重要關鍵。

參考文獻

1. Sanders C: β -lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. Clin Infect Dis 1992; 14: 1089-99.
2. Alpuche-Aranda C: β -lactamase production and the role of ampicillin/sulbactam. Pediatr Infect Dis J 1998; 17: 58-11.
3. Ivermore, DM: β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-84.
4. Gniadkowski M, Palucha A, Grzesiowski P, et al: Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 3079-85.
5. Podschun R, Ullmann U: *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 589-603.
6. Pena C, Pujol M, Ardanuy C, et al: Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 53-8.
7. Sanders C, Barry A, Washington J, et al: Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with the Vitek ESBL test. J Clin Microbiol 1996; 34: 2997-3001.
8. Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, et al: Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. J Clin Microbiol 1997; 35: 2191-7.
9. Piroth L, Aube H, Doise J, et al: Spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Are β -lactamase inhibitors of therapeutic value? Clin Infect Dis 1998; 27: 76-80.
10. Jacoby G: Editorial response: Epidemiology of extended-spectrum β -lactamases. Clin Infect Dis 1998; 27: 81-3.

The prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in Northern Taiwan

Pei-Wen Chung¹, Yhu-Chering Huang¹, An-Jing Kuo²

¹ Division of Pediatric Infectious Disease, Chang Gung Children's Hospital,

² Department of Clinical Pathology, Lin-Kou Medical Center, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

After the widespread use of the broad-spectrum cephalosporins, strains of *Klebsiella pneumoniae* resistant to these antimicrobial agents began to appear. *K. pneumoniae* has been prominent among the gram-negative bacilli causing nosocomial infections and an important source of transferable antibiotic resistance. We were concerned about the prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *K. pneumoniae* in our hospital and thus conducted this study.

Totally 215 strains of *K. pneumoniae* isolated from various sites of patients in our hospital between 21 May and 17 June 1999 were included in this study. A double-disk synergy test and a three-dimensional test (both were performed with ceftriaxone, ceftazidime and aztreonam) were used to detect ESBL-producing *K. pneumoniae*. By the double-disk test, positive results were detected in 30 of the 215 strains. By the three-dimensional test, positive results were found in only 22 strains. Ceftriaxone is the best indicator among the three antibiotics screened in both methods. Positive results were found in 30 of the 215 strains tested by either double disk test or three-dimensional test, and the possible prevalence of ESBL-producing *K. pneumoniae* was estimated as 14% (30/215) in our hospital.

The results showed that 14% of all *K. pneumoniae* isolates in our hospital are likely to produce ESBL although the DNA sequence has not yet been analyzed in this study. This suggests that treatment fail-

ure is likely to occur if a third generation cephalosporin was used to treat these organisms although the exact incidence of bacteremia caused by ESBL-producing *K. pneumoniae* is yet to be confirmed in our hospital. We conclude that the double-disk test is a more sensitive screening test for ESBL-producing strains in our hospital, but the use of a combination of both methods makes it easier for the investigator to interpret test results. This also help to prevent the infected patients to have dire consequences due to the delay in detection of the ESBL-producing pathogens. (Nosocom Infect Control J 2000; 10: 21-7)

Key words: *K. pneumoniae*, extended-spectrum β -lactamase (ESBL)