



計畫編號：DOH91-DC-1034

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

院內感染帶有廣效性乙內醯氨酶
Serratia marcescens 之分子分型與危險
因子研究

研究報告

執行機構：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：余文良

研究人員：吳禮字、陳國東、林靜芳、王宜珮、鄒梅芬、

李桂珠、黃珍珍、莊麗鈴

執行期間： 91年 1月 1日至 91年 12月 31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

計畫編號：DOH91-DC-1034

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

院內感染帶有廣效性乙內醯氨酶
Serratia marcescens 之分子分型與危險
因子研究

研究報告

執行機構：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：余文良

研究人員：吳禮宇、陳國東、林靜芳、王宜珮、鄒梅芬、
李桂珠、黃珍珍、莊麗鈴

執行期間： 91年 1月 1日至 91年 12月 31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

目次

中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
前言	(5)
材料與方法	(7)
結果	(16)
討論	(22)
結論與建議	(24)
參考文獻	(25)

表次

表一	(29)
表二	(30)
表三	(31)
表四	(32)
表五	(33)
表六	(34)
表七	(35)
表八	(37)
表九-1	(38)
表九-2	(39)
表十、表十一、圖次	(40)

摘要

中文摘要

雖然黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)是國內常見的院內感染細菌，產生廣泛性乙內醯氨酶(extended-spectrum beta-lactamase，簡稱 ESBL)之黏質沙雷氏菌仍很少被報導。我們之前發現四株黏質沙雷氏菌對 cefotaxime 和 cefepime 產生抗藥性，對 imipenem 和 meropenem 呈敏感性，其 cefepime MIC 在 clavulanic acid 影響下會有意義之下降。本研究實驗包括等電點分析、質體接和、PCR、和 DNA 序列分析證實一可以轉移之 ESBL (pI 8.4, CTX-M-3)。

我們繼續監測 123 株非重複之黏質沙雷氏菌，發現 15 株 ESBL 陽性株 (12%)。這 15 株均呈 cefotaxime 抗藥型，但有 12 株 cefepime 為敏感型(抑制環 18-23 mm)。因為 CTX-M-3 有水解 cefepime 之潛力，使用表面上敏感性之 cefepime 治療產 CTX-M-3 之黏質沙雷氏菌，可能會造成治療失敗。利用 RAPD 之分子生物流行病學，這些產 CTX-M-3 之黏質沙雷氏菌並無群突發或 clone 傳播的證據。黏質沙雷氏菌獲得 CTX-M-3 基因之機轉與質體轉移或 integron 有關。

NCCLS 之 ESBL 鑑定與報告製指引目前只建議臨床微生物室需常規性檢測大腸桿菌及克雷伯示菌是否為產 ESBL 菌株。我們建議可針對 cefotaxime 抗藥型之黏質沙雷氏菌，如果其 cefepime 抑制環小於 24mm，進行常常規性篩選。如果證實為產 ESBL 菌株，醫院應對帶菌病患加強院內感控措施，包括洗手、隔離與抗生素管制等以防止此類多重抗藥菌之散佈。

關鍵詞：廣泛性乙內醯氨酶 (ESBL)，黏質沙雷氏菌，CTX-M-3

英文摘要

Although *Serratia marcescens* is a common cause of nosocomial infection in Taiwan, strains producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are rarely reported. We previously detected four clinical isolates of *S. marcescens* that exhibited resistance to cefotaxime and cefepime, but were susceptible to imipenem and meropenem. All four isolates had significant MIC reductions for cefepime in the presence of clavulanic acid, compatible with the presence of ESBL. Experiments including isoelectric focusing, plasmid conjugation, PCR and DNA sequencing revealed one major transferable β -lactamase (pI 8.4, CTX-M-3).

On the basis of these findings a large-scale surveillance effort for ESBL detection among 123 non-repetitive isolates of *S. marcescens* were undergone, of which 43% were non-susceptible to cefotaxime (CTX-R). CTX-M-3 was identified in all 15 ESBL-producers (12% of all, 28% of CTX-R isolates), 12 of which had cefepime zone size within susceptible range (18-23 mm). Since CTX-M-3 has well hydrolytic activity against cefepime, there is potential treatment failure if apparent susceptible cefepime were used to treat *S. marcescens* carrying CTX-M-3. There were no evidence of outbreak or clonal spreading of these CTX-M-3 producing isolates by molecular epidemiology using RAPD method.

NCCLS ESBL-reporting guidelines are currently issued for *Klebsiella* spp. And *E. coli* only, this study highlights the need to expand efforts to detect ESBL production among *S. marcescens*. We recommend routine screen for ESBL focusing on CTX-R *S. marcescens* with cefepime zone size less than 24 mm. After confirming the ESBL-producing isolates, enforced infection control practice including hand washing, isolation precaution and antibiotic control should be implemented to contain the highly resistant strains.

Key words:

extended-spectrum β -lactamase (ESBL), *Serratia marcescens*, CTX-M-3

本文

(1) 前言

黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)是國內院內感染常見的革蘭氏陰性桿菌，可以引起泌尿道感染、菌血症、肺炎和心內膜炎等，特別在加護病房或手術房常可因為開刀後感染而造成敗血症，嚴重者甚至造成病人的死亡(1-4)。偶而也因點滴或注射液的污染而造成住院病人群突發感染(5-6)。

黏質沙雷氏菌通常因其 chromosome DNA 帶有 *AmpC* 基因，接觸 Cephalosporins 後，會大量誘導 *AmpC* 酵素之產生，造成很高的抗藥性，包括所有第一、二、三代的 Cephalosporins 及 monobactam (aztreonam)均會被 *AmpC* 酵素水解，治療相當困難(7-9)。目前只有第四代 Cephalosporin(如 cefepime)及 carbapenem (如 imipenem 或 meropenem)對此種 *AmpC* 較為穩定，可做為治療的首選藥物(10)。

近年來，國外醫院陸續發現產生廣泛性乙內醯氨酶(extended-spectrum beta-lactamase，簡稱 ESBL)之黏質沙雷氏菌(表一，[11-23])。過去認為 ESBL 多發現於大腸桿菌(*Escherichia coli*)及肺炎克雷白氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)，由其質體上的 *bla* 基因所控制。因為質體上的基因容易在細菌間相互流傳，造成院內細菌抗藥性急劇增加。其次，ESBL 的基因在質體上可以主動量產酵素，不像 *AmpC* 需經抗生素誘導才會大量產生。另外一重要問題是 ESBL 也會水解所有 cephalosporins，包括第四代的 cefepime，故一旦黏質沙雷氏菌產生 ESBL，加上原先存在之 *AmpC*，將更加緊縮臨床用藥的選擇空間，使治療更加困難。如此將迫使原本最後線用藥之 carbapenem 類用量增加，可能進一步增加院內黴菌感染之機會，延伸更多院內感染之問題。

國內文獻上尚無有關 ESBL 產生型黏質沙雷氏菌之報導。但就吾人過去臨床的經驗，判定應有 ESBL 分泌之黏質沙雷氏菌之可能(1)。故吾人曾將國內 7 株黏質沙雷氏菌送往美國 Iowa 大學醫學中心實驗，確認有 ESBL 陽性反應(表

二)。進一步質體接合實驗証實，這些 ESBL 基因由質體所控制，其 ESBL 等電點可能為 pI 8.4 或 pI 7.9 之位置(表三)。甚至這些 ESBL 產生者，其 DNA 之 ribotyping 或 PFGE 基因型也相當類似(表二，三)。這些初步結果，証實國內確實有此問題，即有可能有相同基因型的黏質沙雷氏菌，除分泌 AmpC 外，其質體上也帶 ESBL 基因，大量製造 ESBL，而這些菌已在醫院內甚至醫院間相互流傳。

我們必需面對上述問題，思考與解決其對國內院內感染控制與醫療，所帶來之影響。故本研究將擴大調查範圍，預定研究 100-150 株院內感染黏質沙雷氏菌，重新檢定其 ESBL 之發生率與其分子分型之流行性。深入調查這些產生 ESBL 之黏質沙雷氏菌之感染危險因子，從而建立輔助其感染控制之參考或對策。

(2) 材料與方法

(一) 實驗菌株的保存

1. 實驗菌株的來源

收集中國醫藥學院附設醫院黏質沙雷氏菌；這些菌株先經過一般細菌室生化檢驗 API-20E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) 等方法鑑定。所有收集菌種再經 VITEK 系統檢視。

2. 菌種的培養與保存

菌種之保存是將由單一菌落接種於 3ml Luria-Bertani(LB)培養液中於 37°C 以 250 rpm 震盪培養隔夜後，取 0.9ml 的菌液加入 0.3ml 的甘油(glycerol)，使菌液與甘油的比例是 3:1，直接置於-70°C 冷氣櫃中保存。欲培養細菌時，從-70°C 冷凍櫃中直接取出保存的菌株，將其接種在 LB 培養盤上，37°C 培養箱中培養隔夜後，將長出的菌落次培養於 LB 培養液中做新鮮培養(fresh culture)。

(二) 抗生素敏感感受性試驗

1. 抗生素稀釋試驗

單一菌落取得的細菌先以 3ml LB 培養液培養隔夜後，取適當 PBS 溶液 (PBS:137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂PO₄) 加以稀釋，以 spectrophotometer (Beekman) 於 OD_{600nm} 測量數值為 0.3，即為標準濃度。每一組試驗準備 6 支的 3ml LB 培養液，依序配置 8、16、32、64、128 和 256 mg/L 不同的抗生素濃度。最後於每根試管中加入 200 μl 的標準菌液於抗生素溶液中，混合均勻後置於 37°C 培養箱，16-20 小時後觀察記錄結果。

2. 瓊脂稀釋試驗:

將 LB 培養基滅菌後，放於 55°C 水浴鍋(Kansin onstrument)中，待溫度平衡，加入適量上述不同濃度的抗生素混合均勻後，倒入培養皿中待冷卻成型。最後將欲篩檢之菌株接種於培養皿上，待隔日觀察。

3.E-test

首先取菌落接種於 3ml LB 培養液中，隔夜後將菌液利用 PBS 溶液將菌液濃度調整至 OD_{600nm} 為 0.3。以無菌棉花棒沾濕標準細菌懸浮液，將棉花棒於液面上方的試管壁內輕輕擠壓轉動，以除去過多的接種原。沾濕的棉棒均勻塗抹在 Mueller-Hinton(M-H)培養基(DIFCO)上，將所需的 E strip(AB BIODISK)貼於培養基的表面即可。E strip 是一條含累進性抗生素濃度的紙條，可利用來偵測抗生素對細菌的 MIC。一般 Estrip 可分為兩種，一是兩頭都含有抗生素主要用來偵測超廣效性乙內醯胺酶，另一種是含單一抗生素只要用來做一般 MIC 的偵測(NCCLS, 2000)。Control strains 包括 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas arruginosa* (ATCC 27853), 與 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)。

4.Double-disc synergy test

首先塗菌於 M-H 培養基上，方法如上述 E-test，最後將所需的抗生素紙錠貼於瓊脂培養基表面，此實驗是利用兩種不同紙錠的抑菌圈相互比較判斷是否產生超廣效性乙內醯胺酶。一種紙錠為 cefotaxime，另種紙錠則同時含有 cefotaxime 和乙內醯胺酶抑制劑 clavulanic acid。

(三) 質體 DNA 的分析

1. 純化質體的方法

首先將細菌於 3ml LB 培養液中培養隔夜後，取 1.5ml 菌液以 12,000 rpm 離心(Beckman Coulter Microfuge18 centrifuge) 5 分鐘，倒棄上清液。加入 100 μ l solution I (50mM Glucose, 10 mM EDTA, 2mg/ml lysozyme) 使菌體懸浮，再加入 200 μ l 鮮配置的 solution II (0.2 mM NaOH, 1% SDS)，緩和混合均勻後，冰上靜置 10 分鐘，再加入 150 μ l solution III (3M Sodium acetate [pH4.8])，冰上置 5 分鐘。反應結束後，以 12,000rpm 離心 15 分鐘，將細胞碎裂物和 DNA 沉澱下來。取出上清液(約 400 μ l)移至乾淨的微離心管中。加入等量比例混合的 phenol/chloroform (MERCK)(大約 900 μ l)，以 12,000rpm 離心 10 分鐘，取出上層液體(400 μ l)到新的微離心管中。萃取至界面澄清後，加入等體積的 95%酒精 (MERCK)(-20°C 預冷)，冰上 10 分鐘。以 12,00rpm 離心 15 分鐘，使質體沉澱下來。將質體以真空乾燥，最後加入 20 μ l 的 TE 緩衝液 (10 mM Tris-Hcl, [PH8.0], 1 mM EDTA) 溶解 DNA，存放 -20°C 備用。質體 DNA 的吸光值以 spectrophotometer (Beekman)於 OD260nm 測量。

2. 限制? 切割質體 DNA

取適量純化好的質體 DNA 於 1.5ml 的微離心管中，加入 1 μ l 的 10 倍酵素反應緩衝液(TaKaRa)和 1ul 的 EcoRI 酵素(TaKaRa)後，補水至 10 μ l。置於 37°C 下經隔夜反應後，即可做電泳分析，觀察並拍照紀錄。

3. 質體 DNA 的電泳分析

以 λ /Hind III DNA ladder (Sigma)，為 DNA 片段大小的對照標準。將欲分析的

DNA 樣品以 20 μ l 混合 4 μ l 的 6X 膠體裝載緩衝液(0.25%Bromophenol blue,30%glycerol)，混合均勻後吸取至已凝固的的洋菜膠體(Pierce)樣品褶中，將電壓調為 100v/cm，進行電泳(Mini Gel Migration)。電泳後的膠體以 EtBr(10 μ g/ml, sigma) 溶液染色，然後以 UV 光激發並拍照紀錄。

(四) 細菌接合生殖試驗(conjugation)

細菌在 37°C 於 LB 培養液中培養隔夜後，取適量的給予菌株(donor cell)及接受菌株(recipient cell, E.coli J53^r resistant to sodium azide)，將兩者加在一起均勻混合後，以 12000rpm 離心 10 分鐘，去掉上清液。另外取出無菌過濾膜貼在 LB 培養皿上，將上述離心後的沉澱物取出放於過濾膜上。在 37°C 下培養 6 小時後，將整個過濾膜放入 LB 培養液中，在 37°C 震盪培養半小時。最後取適量菌液塗於含抗生素 cefotaxime 和 sodium azide 的選擇培養基中，於 37°C 培養約 16 小時取得接合轉型株(transconjugants)。

(五) 聚合？連鎖反應(Polymerase chain reaction; PCR)

我們依據先前發表的期刊使用的兩組引子來進行 PCR，其序列分別如下：

SHV-1: 5'-TGGTTATGCGTTATATTCGCC-3'

SHV-2: 5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCTf-3'

TEM-1: 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3'

TEM-2: 5'-GAGAGTTACCAATGCTTAATC-3'

其它如 CTX-M primers:

CTX-M-3: 5'-TGTTGTTAGGAAGTGTGCCGC-3' and TCGTTGGTGGTGCCATAGTC-3'

CTX-M-14: 5'-GCTTTATGCGCAGACGAGTG-3'and 5'-TCATTGGTGGTGCCGTAGTC-3')

首先取 1 μ l 的質體 DNA，加入 5 μ l 的 5 倍 Taq DNA 聚合？酶緩衝液，2 μ l MgCl (25mM)，2 μ l 的 dNTP (2.5mM)，各 1 μ l (50umole) 的適當引子(如 SHV-1

和 SHV-2 各 1 μ l), 2 μ l TagDNA 聚合酶 酶素(K.S.T), 最後補水至 50 μ l。將上述材料放入超微量離心管中, 混合均勻後, 置於 Perkin-Elmer (model 2400, Norwalk, Connecticut, U.S.A) 中進行反應。反應條件 94°C 5 分鐘 1 個循環, 94°C 5 分鐘、55°C 1.1 分鐘、72°C 1.2 分鐘共 5 個循環, 接著 94°C 2 分鐘、55°C 1 分鐘、72°C 3 分鐘共 25 個循環, 最後 72°C 3 分鐘。反應後的產物取 5 μ l 做電泳分析, 並在紫外線照射下觀察及照相。

(六) DNA 核酸之定序

1. 回收膠體上的 DNA 片段

將電泳膠體上所欲分離的 DNA 片段切下, 置於微量離心管中, 以 Gel Extraction Miniprep Kit (Viogene) 藉由親和性層析法回收。首先將膠體於微量離心管中壓碎, 加入 500 μ l Buffer GEX 於 60°C 作用 10 分鐘使膠體完全溶解, 全部吸取至 700 μ l column 中, 將整根 column 置於乾淨 2ml 微量離心管中, 以 13000 rpm 離心 1 分鐘, 使 DNA 滯留於 column 中的樹脂(resin)。

去除下面離心管中的液體, 再加入 500 μ L wash I 到 column 中, 重複上述離心步驟。再加入 500 μ l wash II 到 column 中, 重複上述離心步驟。將 column 放置於新的微離心管, 置於室溫 2 分鐘使 wash II 中酒精完全揮發, 再加入 20 至 50 μ l TE 緩衝液於 column 中, 置於室溫 2 分鐘使 DNA 溶解, 以 12,000 rpm 離心 2 分鐘, 離心後所得液體即為回收的 DNA。

2. 定序前的聚合? 連鎖反應

首先取適量回收的 DNA(200-500ng)，加入 4 μ l 的 5X sequencing buffer (PE Biosystems Foster City)，3.2 μ l (1 pmole) 的適當引子，4 μ l terminator ready reaction mix (PE Biosystems Foster City)，最後補水到 20 μ l。將上述材料放入超微量離心管中，混合均勻後，置於 Perkin-Elmer (model 2400, Norwalk, Connecticut, U.S.A) 中進行反應。96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分鐘共 25 個循環。準備將 PCR 完產物回收。

3. PCR 產物回收

PCR 產物的回收最主要是把引子去掉。將欲回收的 PCR 產物，置於微量離心管中，以 PCR Clean up Purification Kit (Viogene)藉由親和性層析法回收。首先加入 500 μ l Buffer PX 於放有 PCR 產物的微量離心管中，待完全混合均勻後吸取放入 700 μ l column 中，將整根 column 置於乾淨 2ml 微量離心管中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，使 DNA 留於 column 中的樹脂(resin)。去除下面離心管中的液體，再加入 500 μ l wash I 到 column 中，重複上述離心步驟。再加入 500 μ l wash II 到 column 中，重複上述離心步驟。將 column 放置於新的微離心管，置於室溫 2 分鐘使 wash II 中酒精完全揮發，再加入 20 至 50 μ l TE 緩衝液於 column，置於室溫 2 分鐘使 DNA 溶解，以 12,000 rpm 離心 2 分鐘，離心後下面液體即為回收的 PCR 產物。

4. DNA 定序

將回收的 PCR 產物，利用真空抽取乾燥後，由 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer 進行 DNA 定序。

(七) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 試驗

在此我們取兩個同源性接近的任意二個引子來進行 PCR (Soto et al—1999):

ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence ,

腸內細菌內生性重複保存序列, Liu et al., 1995):

5'-GTGAATCCCCAGGAGCTTACAT-3'

VC5 (Vibro Cholerae , 霍亂弧菌的重複序列):

5'-GGACGCCTTACCCTACTATGC3'

首先取 1 μ l 的質體 DNA , 加入 5 μ l 的 5 倍 Tag DNA 聚合酶 酵素緩衝液 , 2 μ l MgCl (25mM), 2 μ l 的 dNTP (2.5mM), 1 μ l (50umole) 的適當引子 , 2 μ l Taq DNA 聚合酶 (K..S.T) , 最後補水到 50 μ l 。將上述材料放入微量離心管中 , 混合均勻後 , 置於 Perkin-Elmer (model 2400, Norwalk, Connecticut, U.S.A) 中進行反應。反應條件 94 $^{\circ}$ C 4 分鐘、35 $^{\circ}$ C 2 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘共 2 個循環, 接著 94 $^{\circ}$ C 30 秒、35 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘共 35 個循環, 最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。反應後的產物取 5 μ l 做電泳分析, 並在紫外線照射下觀察及照相。

(八) 脈衝電泳法 (PFGE)

Size marker 和限制酵素反應染色體之塊狀以 0.5 倍 TBE 緩衝液清洗三、四次, 使之和電泳緩衝液達平衡, 放入 agarose gel 樣品槽再以 1%LMP agarose 將之填滿置於 4 $^{\circ}$ C 十分鐘。另一方面把適量 0.5xTBE 緩衝液注入電泳槽中並與冷卻系統連接使緩衝液保持 15 $^{\circ}$ C 把 agarose gel 放入電泳槽中設定電壓 running time 和 puls time 後啟動電源電泳完畢以 EtBr 染色後 UV 燈觀察並拍照。

(九) 等電點聚焦試驗

1. 乙內醯胺的粗萃取液製備

取一個菌落至 5ml 的 LR 培養液 37°C 培養生長隔夜後全部倒入 1.5ml 微量離心管中，12000 rpm 離心 5 分鐘，丟棄上清液保留沉澱菌體。加入 1 ml 的 0.01X PBS 打散沉澱菌體，以 12000 rpm 離心 5 分鐘。重複清洗步驟一次。最後將以 500 μ l 的 0.01X PBS 打散沉澱菌體即為菌體懸浮液。將菌體懸浮液置放冰上，並以 14 μ m 超音波震盪器將細菌打碎後，4°C 以 12000 rpm 離心 30 分鐘(himac CF15D Hitachi)，為將破碎菌體沉澱下來，取上層液體即為乙內醯胺的粗萃取懸浮液。

2. 等電點電泳(isoelectric focusing, IEF)

一開始先預冷電泳槽(Pharmacia Biotech Multiphor II) 16°C 10 分鐘，在電泳槽中央鋪上適量的礦物油，將已製備好的 Ampholine PAG plate gels (pH 3.5 to 9.5; Pharmacia Biotech Asia Pacific, Hong Kong, China) 放於鋪有礦物油的部分，使膠片和電泳槽能完全結合無氣泡存在。將 52 孔的樣品條置中平整鋪於膠片中間，並於膠片上下兩端各放置陰陽極電極條(陰極電極條是以 1M NaOH 沾濕，陽極電極條以 1M H₃PO₄ 沾濕)。取 5 到 10 μ l 製備好的乙內醯胺懸浮液滴於樣品孔中，最後架上電極放於電極條上，打開電源供應器(Pharmacia Biotech)調整到 1500 伏特、50 安培和 25 瓦的條件下，進行電泳 1.5 小時。(Matthew et al, 1979)

3. 呈色反應

利用 nitrocefin 受質來呈色，首先將 0.5mM nitrocefin (Oxoid Limited,

Basingstoke, Hampshire, England) 溶液先滴於試鏡紙上，攤開試鏡紙後使其平鋪於 IEF 膠片上，待一段時間後觀察粉紅色片段的位置。利用一些已知 pI 點的乙內醯胺酶來作為標準值，利用位置上的不同區分不同的 pI 點。實驗中使用帶有已知乙內醯胺酶的質體為標準分別如下：TEM-1 (RI, pI 5.4)，TEM-3 (pCFF04, pI 6.3)，TEM-4 (pUD16, pI 5.9)，SHV-2 (pMG22, pI 7.6) 和 SHV-5 (pAFF2, pI 8.2)，以上菌株由 Hyunjoo 實驗室提供。

(十) 危險因子分析與環境調查

1. 將個案數分為 ESBL (+) 與 ESBL (-) 兩組，分析其病人之病歷，調查感染之危險因子，包括之前(2 週或 4 週內)各種抗生素(以 beta-lactam 為主)之使用情形與使用天數，動脈導管，呼吸器；導尿管，中央靜脈導管等之置放，病房分佈，共同輸液，留置特定病房天數，照顧之醫護人員等。
2. 統計方法：分類變項使用卡方檢定，需要時使用 Fisher's exact test. 連續變項以平均值±標準誤差表示並作 Student's *t*-test 檢定. 分析感染 ESBL (+) *Serratia marcescens* 之危險因子以 SPSS 8.0 版做單變項與多變項邏輯迴歸分析, $p < 0.05$ 具統計意義.
3. 若統計結果發現某特定病房本身為有意義之危險因子，將進一步做環境調查.
4. 針對可能群突發之 *Serratia marcescens* 再做分子生物分型 (RAPD & PFGE)。

(3) 結果: 依吾人所制定之表與圖說明如下:

表四, 從民國九十年七月至九十一年一月共收集本院 135 臨床株 *S. marcescens*。排除重複之病人與檢體, 在每一人只選一個檢體一株菌之條件下, 總共 123 株加以分析。其中檢體來源以氣管肺泡灌洗液(24 件), 膿液(24 件), 及導尿液(21 件)最多。抗生素紙錠敏感試驗總體而言敏感率以 imipenem (99.2%), cefepime (88.6%), flomoxef (79.7%), amikacin (76.4) 為最高。其餘均低於 60%, 如 cefotaxime (56.9%) 和 ciprofloxacin (53.7%)。重新增加檢測 ceftazidime 有 98.4% 敏感率。故本院 *S. marcescens* 抗生素敏感性之特徵以 ceftazidime 大於 cefotaxime 為主, cephamycin 類之 flomoxef 也多呈敏感性, 符合本研究先前觀察到有 ESBL 存在之可能, 且以 CTX-M (cefotaxime-mase) 為主。而 ciprofloxacin 敏感率偏低也是隱憂, 本院會面臨無適當口服抗生素以治療 *S. marcescens* 之窘境。

表五, 123 株 *S. marcescens* 中, ESBL 之陽性率為 12% (15/123)。確認 ESBL 之方法主要以雙紙錠協同試驗(double disc synergy test, DSST)與最小抑菌濃度(MIC)。只要 clavulanic acid 能有效擴大 cefotaxime, ceftazidime 或 cefepime 之抑制環(如 ≥ 5 mm); 或 clavulanic acid 能有效降低其 MIC ($\geq 3 \log_2$ 稀釋倍), 即判定 ESBL 陽性。結果詳細說明如下:

1. DSST with CTX and CTX/CLA: 15 株 *S. marcescens* 之 CTX/CLA 抑制環均比 CTX 大 5 mm 以上。如圖一。
2. DSST with CAZ (ceftazidime) and CAZ/CLA (未列表內): 均無法發現 ESBL 陽性株。如圖一。

3. DSST with FEP and AMC (中心距離 2 cm): 14 株 *S. marcescens* 之 FEP 抑制環擴大 3 mm 以上(含)，其中僅 9 株擴大效應 \geq 5 mm。如圖二。
4. DSST with FEP and AMC (中心距離 3 cm): 1 株 *S. marcescens* 之 FEP 抑制環擴大 3 mm 以上 (即 5 mm)。如圖二。
5. Etest MIC with TZ and TZL: 均無法發現 ESBL 陽性株。如圖三。
6. Etest ESBL Screen with TZ/TZL: 均無法發現 ESBL 陽性株。如圖三。
7. Etest ESBL Screen with CT/CTL: 5 株 *S. marcescens* 之 cefotaxime-clavulanic acid MIC 低於 cefotaxime MIC 達 8 倍以上。其餘因 MIC 超過 ESBL Screen 試劑紙 MIC 原來設定範圍而無法判讀。如圖三。
8. Etest MIC with CT and CTL: 因 CTL 仍缺貨，無法進一步實驗，等試劑紙到即可完成。可測試 CT/CTL MIC 超過範圍($> 16 / > 1$ mg/L)之真正 MIC 值，完成 ESBL 之判讀。如圖四。
9. Etest MIC with PM (cefepime) and LPM (cefepime-clavulanic acid): 因 LPM 仍缺貨，無法進一步實驗，等試劑紙到即可完成。如圖五。
10. 有 14 株 ESBL 陽性株之 cefepime 抑制環小於 24 mm。但只有 2 株真正達抗藥性(抑制環 \leq 14 mm)。有 12 株仍落在敏感性範圍(抑制環 \geq 18 mm)。

表六，列出部份 ESBL 陰性株之實驗結果。除原本 cefepime 耐受性(抑制環 \leq 14 mm)之菌株外，其餘 ESBL 陰性株之 cefepime

抑制環均 ≥ 24 mm。部份菌株受 clavulanic acid 影響後，其 ceftazidime, cefotaxime 或 cefepime 之抑制環反而變小或其 MIC 反而增加，可見其 AmpC β -lactamase 受 clavulanic acid 誘導而產量增加。這個現象在 ESBL 陽性株並不明顯(表五)，可見只要有 ESBL 產生之 *S. marcescens*，其 AmpC β -lactamase 不太會再受 clavulanic acid 誘導。

表七，淬取 ESBL 陽性株之 β -lactamase 後，進一步實驗等電點分析(isoelectric focusing)，得到 β -lactamase 之 pI (isoelectric point) 值。如圖六。另外純化 ESBL 陽性株之質體(plasmid)，以質體 DNA 為模版，分別以 TEM, SHV, CTX-M 共同引子(primers)操做 PCR，再將 PCR 產物純化後分析其 DNA 序列，上網與基因庫資料比對，證實所有 15 株 *S. marcescens* 之 ESBL 均為 pI 8.4 之 CTX-M-3 (圖七)。其他 β -lactamase 包括 pI 5.4 (TEM-1)，pI 7.9 (non-TEM, non-SHV, non-OXA)，pI 8.2 (non-SHV)，pI 8.6 (可能是 AmpC 類)，和 pI 9.0 (可能是 AmpC 類)等。

表八，列出部份 ESBL 陰性株之等電點實驗結果。其 β -lactamase 包括 pI 7.8, pI 8.3, pI 8.6, pI 8.8, 和 pI >9.0 等，可能是 AmpC 類酵素。例如其 TZL(ceftazidime-clavulanic acid) MIC \geq TZ (ceftazidime)，CT 與 CTL 也有類似情形，此即為有 AmpC 受到 clavulanic acid 誘導現象。因 AmpC 並非本研究計劃之重點，且 *S. marcescens* 生產 AmpC 早已為醫學與微生物界所熟知，故吾人未進一步以分子生物方法確認之。

表九，質體接合實驗(conjugation)證實控制 pI 8.4 (CTX-M-3)，pI 5.4 (TEM-1)和 pI 7.9 (未知酵素)的基因均可成功地由 *S. marcescens* 轉移(接合)到 *E. coli* J53-2。MIC 試驗亦顯示 *E. coli* J53-2 在接受質體後由原本 cefotaxime 敏感性(S)轉變為抗藥性(R)，而此抗藥性又可受 clavulanic acid 之影響轉為敏感性(MIC 64 μ g/ml \rightarrow 0.5 μ g/ml)。證實了控制 CTX-M-3 的基因位於在質體上。而 4 株成功轉移株(E-74, E-78, E-80, E-86)也證實為 ESBL 生產者。

表十，產生 ESBL 之 *S. marcescens* 其病人之臨床資料。15 菌株之檢體包括血液(5 個)、尿液(5 個，導尿 4 + 自解尿 1)、腹水(2 個)、和痰、支氣管肺泡灌液、中央靜脈導管尖端各 1 個。因 15 位病人有兩位病歷號碼登錄有誤，以至於無法調閱病歷，故僅有 13 位病人資料得以進一步分析。男女比為 5:8。年齡分佈 36 至 88 歲，平均 69 歲。病患感染日定義為陽性檢體收集日。院內感染者有十位，其中有二位直接由外院經急診室轉入。其餘七位於本院院內感染者僅有二位(病患-10 和病患-14)其感染發生在相同病房(呼吸加護病房)。基本上本院應無此菌引起群突發(outbreak)之狀況，故本研究未持續進行調查工作，如環境調查等。但病患-10 和病患-14 感染日相差 28 天，仍無法排除交叉感染之可能。三位社區性感染者中僅一位(病患-4)確實於本次住院前無因病住院記錄，病患-1 於一年前因腎結石與前列腺肥大於本院住院開刀，病患-2 亦因慢性阻塞性肺病於一年內多次於本院反覆住院過。

產生 ESBL 之 *S. marcescens* 引起感染之臨床疾病範圍(spectrum)包括發熱性尿路感染(3 例)、無熱性膿尿症(2 例)、肺

炎(2例)、繼發性菌血症(2例)、自發性腹膜炎(2例)、繼發性腹膜炎(1例)和原發性血流感染(1例)。臨床治療與預後，一位(病患-10)感染日即快速死亡，故使用抗生素未滿1天。其餘12位有6位接受有效抗生素均滿三天以上，結果三人於一個月內死亡，其中1人(病患-12)判定死於嚴重腦溢血，2人死亡時感染仍未控制好。存活者有三人，二位感染控制後並出院，一位(病患-1)變成持續ESBL-*S. marcescens*菌尿症達一年以上，無法根除。另一方面有6位使用不適當抗生素滿三天以上，一位死亡，5人成功出院，包括二位是繼發性菌血症，二位是導尿管相關之感染，一位肺炎(病患-9)同時有*Pseudomonas aeruginosa*感染，以piperacillin治療雖對*S. marcescens*無效卻對*P. aeruginosa*相當適合，可見*S. marcescens*在此肺炎之角色並非主要病原菌。整體死亡率為38.5% (5/13)，死亡個案均為嚴重原在疾病者。

危險因子分析，本研究計劃原欲比對*S. marcescens*得到ESBL基因之危險因子。由產生ESBL之*S. marcescens*初步分析，院內感染者雖確實之前有接觸各類抗生素，但能分析之個案僅13位，且無群突發事件，預期難以有令人信服之統計意義，故吾人暫保留相關統計研究，待持續收集更多個案再做統計分析。

對於*S. marcescens*得到ESBL基因之機轉，除了帶有ESBL基因之質體在不同菌株間或不同菌種間相互傳遞外，也可能與質體上帶有integron有關，使得該質體更容易捕捉到ESBL基因。本研究初步發現產生ESBL(CTX-M-3)之*S. marcescens*其質體上均帶有class I integron(圖八)，吾人將於未來計劃持續探討此integron與CTX-M-3之關係。

表十一，Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 試驗。
前述病患-10 和病患-14 其感染發生在呼吸加護病房。二人感染
日相差 28 天，仍無法排除交叉感染之可能。故進一步以 RAPD
分析 *S. marcescens* 基因型，同時與其他三人感染於本院特殊病
房單位之分離之菌株比較。結果證實五株均為不同 RAPD 基因
型，故排除了交叉感染之可能。(圖九)

(4) 討論。

本研究計劃分析 123 株非重複分離之 *S. marcescens* 臨床菌株，證實 15 株(12%)為 ESBL (CTX-M-3)生產者，為質體基因所控制，其間無明顯群突發。

CTX-M-3 屬於 CTX-M 係列之 ESBL，其造成之抗藥譜 (antibiogram) 以抗 cefotaxime 為主，而很少抗 ceftazidime。這種特徵與其他類之 ESBL 如 SHV 或 TEM 類並不相同(以抗 ceftazidime 為主)。產 CTX-M-3 之 *S. marcescens* 到目前僅發現於 Poland (24)，該文獻發表於本研究計劃實施之後，吾人之初步報告也被某 SCI 雜誌接受(25)。為何台灣與 Poland 同時有產 CTX-M-3 之 *S. marcescens* 是耐人尋味之問題。

這 123 株 *S. marcescens* 的抗生素敏感性以 imipenem (99.2%) 為最高，其次分別為 ceftazidime (98.4%)、cefepime (88.6%)、和 flomoxef (79.7%) 較為理想。臨床上使用 ceftazidime 和 flomoxef 治療 *S. marcescens* 感染會誘導 AmpC 生產，造成治療失敗；使用 cefepime 雖較不會誘導 AmpC，也對 AmpC 相當穩定，一直被認為適當選擇(10)。本研究顯示使用 cefepime 前需排除 ESBL (CTX-M-3)生產者，因為 CTX-M-3 很有潛力水解 cefepime，造成治療失敗。

醫院臨床微生物室要證實 *S. marcescens* 是否產生 ESBL 最簡易且最敏感之方法是使用 cefotaxime 和 cefotaxime-clavulanic acid 雙紙錠法，可偵測所有 ESBL 生產者。這個方法的可能缺點是 clavulanic acid 會誘導 AmpC，反而干擾到 clavulanic acid 抑制 ESBL 之效應，使得 cefotaxime 抑制環無擴大現象，因而看不出有 ESBL 存在。但本研究並未出現這樣狀況，可能是 ESBL 產量遠比受誘

導之 AmpC 還多，故 clavulanic acid 仍能充分發揮其抑制 ESBL 之效應，使得 cefotaxime-clavulanic acid 抑制環有明顯擴大現象(≥ 5 mm)。如果原本 AmpC 產量就很多者，可使用 cefepime 和 amoxicillin-clavulanic acid 雙紙錠法 (目前無商業用之 cefepime-clavulanic acid 紙錠)，因為 cefepime 較不受 Amp 影響。cefepime 和 amoxicillin-clavulanic acid 中心需距離 2cm 才能充分發揮 clavulanic acid 抑制 ESBL 之效應，使得 cefepime 抑制環有明顯擴大現象。本研究認為 cefepime 抑制環擴大 ≥ 3 mm 即可判讀 ESBL 陽性。主要原因是 ESBL 生產者之 cefotaxime 抑制環均 ≤ 14 mm，有較多之擴大空間；cefepime 之抑制環大多 < 24 mm，其擴大空間較有限。也因此有 12 株 ESBL 生產者仍被判讀 S (≥ 18 mm)，因為這些 ESBL 是 CTX-M-3，使用 cefepime 去治療會促進 CTX-M-3 增產造成治療失敗。因此對於表面上 cefepime 呈敏感(S)之 *S. marcescens*，其抑制環如果小於 24 mm，應確認是否有 ESBL 存在，不能冒然使用 cefepime 治療。

產生 ESBL 之 *S. marcescens* 引起感染之臨床疾病範圍 (spectrum) 包括發熱性尿路感染(3 例)、無熱性膿尿症(2 例)、肺炎(2 例)、繼發性菌血症(2 例)、自發性腹膜炎(2 例)、繼發性腹膜炎(1 例)和原發性血流感染(1 例)。其臨床表現為兩極化，可以是暫時性菌血症，也可能快速至死。存活者不一使用適當抗生素治療。故臨床意義仍需持續觀察。整體死亡率為 38.5% (5/13)，死亡個案均為嚴重原在疾病者。有四位使用 imipenem 者，仍發生 3 人死亡。另有兩位於菌種鑑定完成前已「不治」死亡。對於嚴重病患感染 *S. marcescens*，醫師應優先使用 carbapenem 類，並需通知臨床微生物室繼續鑑定是否產生 ESBL。

(5) 結論與建議。

1. *S. marcescens* 產生 ESBL 之發生率為 12%，在台灣並不輸於 *Klebsiella pneumoniae* 之 ESBL 之發生率 (9-33%)。雖然 NCCLS 建議與國內醫院臨床微生物室現行規定僅常規性篩檢 *E. coli* 和 *Klebsiella* spp.，吾人建議台灣有需要考慮常規性篩檢 *S. marcescens* 是否產生 ESBL。或因應醫師臨床需要而開放特定案例加做篩檢。
2. 確認 *S. marcescens* 是否產生 ESBL 最簡易且最敏感之方法是使用 cefotaxime 和 cefotaxime-clavulanic acid 雙紙錠法。篩選對象可縮小為 cefepime 抑制環 < 24 mm 之 *S. marcescens*。如果因 AmpC 受誘導而懷疑假 ESBL 陰性結果，可加做 cefepime 和 amoxicillin-clavulanic acid 雙紙錠法。
3. *S. marcescens* 產生 ESBL 類別為 CTX-M-3。其酵素水解特性以 cefotaxime 為主，也會快速水解 cefepime。但現行抗生素紙錠敏感試驗無法偵測 cefepime 之抗藥性，多數抑制環為 18-23 mm (S)。故使用 cefepime 治療 *S. marcescens* 感染症，應先確認有無 CTX-M-3 存在。建議對於 cefepime 治療反應不佳者、嚴重原在疾病者、和嚴重感染症者，優先使用 carbapenem 類。
4. 產生 ESBL 之 *S. marcescens* 感染症，其臨床範籌兩極化，可能加會速病危者之死亡，也可能無需特別治療也會痊癒。其臨床意義有待持續追蹤觀察。
5. *S. marcescens* 得到 ESBL 基因之機轉與質體傳遞有關。如果放任這些菌株存在，猶如 ESBL 基因之隱藏窩，隨時蓄勢待發，不時散佈 ESBL 基因，造成抗藥性上升。建議加強 ESBL

之監測、院內感染管控措施(如洗手與隔離)、和抗生素管制。

(6)參考文獻：

1. Yu WL, Lin CW, Wang DY: *Serratia marcescens* bacteremia: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *J Microbiol Immunol Infect* 1998;31:171-9.
2. Wong WW, Wang LS, Cheng DL, Lin SJ, Chin TDY, Hinthorn DR, O'Connor MC, Huang WK. *Serratia marcescens* bacteremia. *J Formosan Med Assoc* 1991;90:88-93.
3. Yang CH, Young TG, Peng MY, Hsu GJ: *Serratia marcescens* bacteremia: a retrospective five-year analysis of 102 episodes in 90 patients in general medicine. *J Inf. Dis Soc ROC* 1994;5:91-8.
4. Yu WL, Wang HH. Suppurative thrombophlebitis caused by *Serratia marcescens*: case report. *J Infect Dis Soc ROC* 1996;7:147-50.
5. 余文良，李桂珠，黃珍珍： *Serratia marcescens* 血流感染群發之調查。感控通訊 1995;5:239-44.
6. Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, et al: use of PCR to study epidemiology of *Serratia marcescens* isolates in nosocomial infection. *J Clin Microbiol* 1994;32:1935-8.
7. Matsumura N, Minami S, Mitsuhashi S: Sequences of homologous beta-lactamases from clinical isolates of *Serratia marcescens* with different substrate specificities. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(1):176-9.
8. Nomura K, Yoshida T: Nucleotide sequence of the *Serratia marcescens* SR50 chromosomal ampC beta-lactamase gene. *EMS Microbiol Lett* 1990, 58(3):295-9.

9. Hechler U, van den Weghe M, Martin HH, Frere JM. Overproduced beta-lactamase and the outer-membrane barrier as resistance factors in *Serratia marcescens* highly resistant to beta-lactamase-stable beta-lactam antibiotics. *Gen Microbiol* 1989 May;135:1275-1290.
10. Jones RN: Important and emerging β -lactamase-mediated resistance in hospital-based pathogens: the AmpC enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31:461-6.
11. Petit A, Gerbaud G, Sirot D, Courvalin P, Sirot J. Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:219-24.
12. de Champs C, Sirot D, Chanal C, Poupart MC, Dumas MP, Sirot J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum beta-lactamases among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. *J Antimicrob Chemother* 1991;27:441-57.
13. Payne DJ, Marriott MS, Amyes SG. Plasmid mediated ceftazidime resistance identified in a strain of *Serratia marcescens* isolated in Belgium.
14. Pagani L, Luzzaro F, Ronza P, Rossi A, Micheletti P, Porta F, Romero E. Outbreak of extended- spectrum beta-lactamase producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;10:39-46
15. Gianneli D, Tzelepi E, Tzouvelekis LS, Mentis AF, Nikolopoulou C. Dissemination of cephalosporin-resistant *Serratia marcescens* strains producing a plasmidic SHV type beta- lactamase in Greek hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:764-7
16. Luzzaro F, Pagani L, Porta F, Romero E. Extended-spectrum beta-

- lactamases conferring resistance to monobactams and oxyimino-cephalosporins in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J Chemother* 1995;7:175-8.
17. Kunugita C, Higashitani F, Hyodo A, Unemi N, Inoue M. Characterization of a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Serratia marcescens*. *J Antibiot (Tokyo)* 1995;48:1453-9.
18. Prinarakis EE, Tzelepi E, Gazouli M, Mentis AF, Tzouveleki LS. Characterization of a novel SHV beta-lactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 139:229-34.
19. Perilli M, Felici A, Franceschini N, De Santis A, Pagani L, Luzzaro F, Oratore A, Rossolini GM, Knox JR, Amicosante G. Characterization of a new TEM-derived beta-lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2374-82.
20. Luzzaro F, Perilli M, Migliavacca R, Lombardi G, Micheletti P, Agodi A, Stefani S, Amicosante G, Pagani L. Repeated epidemics caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998 ;17:629-36.
21. Nagy E, Pragai Z, Koczian Z, Hajdu E, Fodor E. Investigation of the presence of different broad-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1998;45:433-46
22. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:489-99.

23. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, Labia R, Sirot J: A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3061-8.
24. Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, et al: Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46,151-9.
25. Yu WI, Wu LT, Pfaller MA, et al: Confirmation of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens*---preliminary report in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003 (in press).

(7)圖、表

表一.已發表產生 ESBL 之 *Serratia marcescens* 的文獻報告

No	References	pI	Enzyme	First Author
1	(11)	6.3	TEM-3	Petit A
2	(12)	6.3	TEM-3,	de Camps C
		6.5	TEM-24	
3	(13)	5.6	TEM-E4	Payne DJ
4	(14)	5.5	ESBL	Pagani L
5	(15)	8.2	SHV-5	Gianneli D
6	(16)	5.5	ESBL	Luzzaro F
7	(17)	8.2	CKH-1	Kunugita C
8	(18)		SHV-5a	Prinarakis EE
9	(19)	5.5	TEM-AQ	Perilli M
10	(20)	8.2	SHV-5	Luzzaro F
11	(21)		SHV-2	Nagy E
12	(22)	8.2	SHV-5	Szabo D
13	(23)	7.5	BES-1	Bonnet R

表二. *Serratia marcescens* 之對不同抗生素之最小抑菌濃度(mg/L), 等

電點(pI)與基因型

Isolates	Ribotype/ PFGE	pI	CT/ CTL	TZ/TZL	FEP/PML	FOX	IMP	Comment
6620	113.3/I	8.4 7.9 7.6 5.4	>256/8	8/4	>256/4	256	1	ESBL (+)
5809	113.3/NT	8.4 7.9 7.6 5.4	>256/2	16/4	>256/1.0	>256	0.25	ESBL (+)
6644	46.7/II	8.4 7.9 7.6 5.4 8.8	>256/64	4/4	32/2	96	1	ESBL (+)
6424	46.7/II	8.4 7.9 7.6 5.4 8.8	>256/32	4/2	24/1	16	1	ESBL (+)
5851	46.7/III-1	8.8 8.4	32/64	1/2	0.75/0.75	32	1	ESBL (-)
6524	46.7/III-2	8.8 8.4	16/16	1/2	0.5/1.0	24	1	ESBL (-)
13	46.7/III-3	-	>256/32	>256/ >256	1/1	16	1	ESBL (-)

CT: cefotaxime; CTL: cefotaxime-clavulanate; TZ: ceftazidime, TZL: ceftazidime-clavulanate; FEP: cefepime, PML: cefepime-clavulanate, FOX: ceftazidime; IMP: imipenem

表三 *Serratia marcescens* (6644, 6424) 與其接合轉型株

(transconjugants E6644, E6424)之對不同抗生素之最小抑菌濃度

(mg/L)

Isolates	Genotype	pI	CT/ CTL	TZ/ TZL	FEP/ PML	FOX	IMP	Comment
6644	46.7/II	8.8	>256/64	4.0/4.0	32/2	96	1	8.8 = AmpC?
		8.4						8.4 = ESBL?
		7.9						7.9 = ESBL?
		7.6						7.6 = SHV-1?
		5.4						5.4 = TEM-1?
E6644		8.4	128/0.38	4.0/1.0	32/0.19			
		7.9						
		7.6						
		5.4						
6424	46.7/II	8.8	>256/32	4.0/2.0	32/1.0	16	1	
		8.4						
		7.9						
		7.6						
		5.4						
E6424		8.4	64/0.5	4.0/2.0	16/0.125			
		7.9						
		7.6						
		5.4						

Genotype (ribotype/PFGE); CT: cefotaxime;

CTL: cefotaxime-clavulanate; TZ: ceftazidime,

TZL: ceftazidime-clavulanate; FEP: cefepime,

PML: cefepime-clavulanate, FOX: cefoxitine;

IMP: imipenem

表四 各種檢體之 *Serratia marcescens* 對各種抗生素紙錠之感受性

Samples (N=123)	Antibiotics											
	GM	AM	CZ	Amc	AN	CTX	IPM	CIP	FLO	SXT	PIP	FEP
Um (5)	2	0	0	0	2	1	5	2	3	1	1	5
Uc (21)	8	0	1	1	11	7	21	12	13	6	6	17
Pus (24)	20	2	0	3	24	18	24	21	24	20	20	23
Blood (13)	2	0	0	0	10	2	13	8	7	1	3	10
Tip (11)	1	0	0	2	5	1	11	6	6	2	1	10
SP (1)	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
Spet (3)	2	0	0	0	3	3	3	2	3	2	2	3
BAL (24)	21	1	1	7	24	21	23	7	21	21	22	22
PL (2)	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2
CSF (2)	2	0	0	0	2	1	2	1	2	1	2	2
B.F (17)	11	1	0	1	11	14	17	6	16	12	12	14
Total	72	4	2	14	94	70	122	66	98	68	71	109
S (%)	58.5	3.3	1.6	11.4	76.4	56.9	99.2	53.7	79.7	55.3	57.7	88.6

GM: gentamicin, AM: Ampicillin; CZ: cefazolin

Amc: amoxicillin/clavunlanic acid AN: amikacin

CTX: cefotaxime, IPM: imipenem, CIP: ciprofloxacin

FLO: flomoxef, SXT: trimethoprim/Sulfamethoxazole

PIP: piperacillin, FEP: cefepime

Um: Urine of midstream, Uc: Urine of catheter, SP: Sputum

SPet: Sputum of endotracheal tube, BAL: Bronchoalveolar lavage

PL: Pleural effusion, CSF: Cerebrospinal fluid

B.F: Body fluid: ascites, joint fluid, etc.

表五 Etest ESBL Screen 與 Double disk test 呈陽性反應之結果

Strain	MIC				FEP	FEP-AMC		CTX/ CLA	CTX
	TZ	TZL	TZ/TZL	CT/CTL		2cm	3cm		
2	0.38	0.094	<0.5 / 0.094	>16/>1	22	24+6	23	28	10
6	0.5	0.19	<0.5 / 0.094	>16/>1	20	20+5	20	23	0
7	0.125	0.125	<0.5 / 0.125	>16/>1	19	20+5	20	25	10
8	0.25	0.19	<0.5 / 0.19	>16/>1	20	20+5	21	17	0
12	12	3	12 / > 4	>16/>1	9	9+3	9	17	0
63	2	2	2 / 1	>16/>1	17	17+5	17	13	0
74	0.5	0.094	0.5 / 0.094	>16/>1	18	20+6	20	22	0
78	2	0.5	2 / 0.5	>16/>1	7	19+8	19	24	0
80	0.5	0.38	<0.5 / 0.38	>16/0.75	23	25+4	25+5	24	11
86	0.5	0.125	0.5 / 0.125	>16/>1	19	20+4	20	24	0
87	0.5	1.5	<0.5 / 0.15	>16/>1	35	29	29	9	0
92	0.5	0.125	0.5 / 0.125	>16/0.5	21	18+7	18	24	0
97	0.5	0.19	0.5 / 0.19	>16/0.75	22	20+4	20	25	13
103	0.75	1.9	0.75 / 0.39	>16/0.75	19	18+6	18	25	14
116	0.5	0.064	0.5 / 0/064	>16/0.38	22	22+3	22	24	13

Etest strps including: TZ: ceftazidime; TZL: ceftazidime-clavulanate;

TZ/TZL: ESBL screen strip with TZ and TZL on two ends;

CT: cefotaxime; CTL: cefotaxime-clavulanate;

CT/CTL: ESBL screen strip with CT and CTL on two ends;

Disc methods including: FEP: cefepime; FEP-AMC: cefepime and amoxicillin-clavulanate with center to center by 2 cm and 3 cm; CTX-

CLA: cefotaxime and amoxicillin-clavulanate (3cm).

表六 Etest ESBL Screen 與 Double disk test 呈陰性反應之結果

Strain	MIC				FEP	FEP-AMC	
	TZ	TZL	TZ/TZL	CT/CTL		2cm	3cm
1	0.75	0.5	<0.5 / 0.38	>16/>1	28	29	29
3	0.064	0.19	<0.5 / 0.094	0.75 />1	28	30	30
4	0.25	0.5	<0.5 / 0.38	>16/>1	27	28	28
5	1.5	3	1.0 /> 4	>16/>1	26	26	27
14	1.5	3	1.0 />4	>16/>1	24	25	24
18	0.19	0.19	<0.5 / 0.19	<0.25 />1	32	34	34
19	0.125	0.19	<0.5 / 0.125	0.25 />1	32	34	34
25	1.5	3	1.5 /> 4	4 />1	24	26	24
28	1.0	4	1.0 />4	4 />1	25	25	26
29	0.19	0.5	<0.5 / 0.25	>16 />1	26	28	28
32	1.5	3	1.5 /> 4	4 />1	24	25	24
40	0.25	0.75	<0.5 / 0.75	>16/>1	27	28	28
52	0.25	0.5	<0.5 / 0.25	>16/>1	28	30	28
57	1.5	3	1.5 /> 4	>16/>1	25	25	25
58	0.25	0.75	<0.5 / 0.75	>16/>1	26	26	26
60	1.0	4	1.0 /> 4	>16 />1	26	24	26
62	2	3	1.5 /> 4	>16 />1	25	26	26
70	0.064	0.125	<0.5 / 0.064	<0.25 />1	34	35	35
77	0.5	0.38	1 / 0.75	0.38 />1	36	25	26
81	0.5	0.25	<0.5/0.38	0.25 />1	36	31	30
91	3	1.5	03/1.5	8 />1	23	20	20
102	4	6	4 />4	>16 />1	31	30	28
135	16	4	16 />4	>16 />1	12	13	12
128	8	16	8 />4	>16 />1	27	27	27
132	2	3	2 / 3	>16 />1	28	23	25
<i>S.aureus</i> 25923	8	4	12 /> 4	2 />1			
<i>E.coli</i> 25922	0.125	0.19	<0.5 / 0.094	<0.25 / 0.32	33	33	34
<i>P. arruginosa</i> 27853	0.75	1.5	1.0 / 2		27	28	28
<i>K. pneumoniae</i> 700603	24	1.0	24 / 0.5	2 / 0.25	24	25	26

E. coli 25922 是 ESBL 陰性標準株

K. pneumoniae 700603 是 ESBL 陽性標準株

表七 產生 ESBL 之 *Serratia marcescens* 其等電點(pI)及 *bla* gene PCR

與 DNA 序列分析結果

Strain	pI	TEM	SHV	CTX-M	Others
2	8.4			CTX-M-3	
	8.2	-	-		?
6	8.6				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	8.2				SHV-5?
	7.9				?
	5.4	TEM-1			
7	8.4			CTX-M-3	
	8.2		-		?
	7.9				?
	5.4	TEM-1			
8	8.6				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	8.2		-		?
	7.9				?
	5.4	TEM-1			
12	8.4			CTX-M-3	
	8.2		-		?
	7.9				?
	5.4	TEM-1			
63	9.0				AmpC?
	8.6				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	8.2		-		?
	5.4	TEM-1			

表七 產生 ESBL 之 *Serratia marcescens* 其等電點(pI)及 *bla* gene PCR

與 DNA 序列分析結果(續)

Strain	pI	TEM	SHV	CTX-M	Others
74	9.0				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	7.9				?
78	9.0				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	7.9				?
	5.4	TEM-1			
80	9.0				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	7.9				?
	5.4	TEM-1			
86	9.0				AmpC?
	8.8				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	7.9				?
	7.6		?		
	5.4	TEM-1			
87	9.0				AmpC?
	8.4			CTX-M-3	
	7.9				?
	5.4	TEM-1			
92	9.0				AmpC?
97	8.4			CTX-M-3	
103	7.9				?
116	5.4	TEM-1			

Strain 92, 97, 103, 116 均含 pI 9.0, 8.4, 7.9, 5.4

表八 非產生 ESBL 之 *Serratia marcescens* 對不同抗生素之最小抑菌濃度(mg/L)及等電點(pI)

Isolates	pI	CT/CTL	TZ/TZL	FEP (mm)	Comment
3	8.6	0.75/>1	0.064/0.094	S (28)	AmpC?
	7.8				AmpC?
18	>9.0	<0.25/0.5	0.19/0.19	S (32)	AmpC?
19	8.8	0.25/0.5	0.125/0.19	S (32)	AmpC?
	8.6				AmpC?
	8.3				AmpC?
25	8.8	4/>1	1.5/4	S (24)	AmpC?
29	>9.0	>16/>1	0.19/0.25	S (26)	AmpC?
	8.6				AmpC?
52	8.8	>16/>1	0.25/0.25	S (28)	AmpC?
	8.6				AmpC?
	8.3				AmpC?

CT: cefotaxime; CTL: cefotaxime-clavulanate; TZ: ceftazidime, TZL: ceftazidime-clavulanate; FEP: cefepime

表九-1 *Serratia marcescens* 與其轉移株(E6644 and E6424)及接受株(*E. coli* J53-2)之對不同抗生素之最小抑菌濃度($\mu\text{g/L}$), 等電點(pI)與 *bla* 基因型

Strain	pI	MIC ^a ($\mu\text{g/ml}$)					β -Lactamase
		CTX/CTX-CLA	CAZ/CAZ-CLA	FEP/FEP-CLA	FOX	IPM/MEM	
6620	8.4	>256 / 8	8 / 4	>256 / 4	>256	1 / 0.25	CTX-M-3
	7.9						Undetermined
	5.4						TEM-1
5809	8.4	>256 / 2	16 / 4	>256 / 1	>256	0.25 / 0.12	CTX-M-3
	7.9						Undetermined
	5.4						TEM-1
6644	8.4	>256 / 64	4 / 4	32 / 2	96	1 / 0.03	CTX-M-3
	7.9						Undetermined
	5.4						TEM-1
	8.8						AmpC ^b
E6644	8.4	128 / 0.38	4 / 1	32 / 0.19	32	0.25 / 0.03	CTX-M-3
	7.9						Undetermined
	5.4						TEM-1
6424	8.4	>256 / 32	4 / 2	32 / 1	16	1 / 0.03	CTX-M-3
	7.9						Undetermined
	5.4						TEM-1
	8.8						AmpC ^b
E6424	8.4	64 / 0.5	4 / 2	16 / 0.125	16	0.25 / 0.03	CTX-M-3
	7.9						Undetermined
	5.4						TEM-1

E. coli 0.12/0.25 0.5/1 0.094/0.064 8 0.25 / 0.03
J53-2

^aCTX = cefotaxime; CLA = clavulanic acid; CAZ = ceftazidime; FEP = cefepime; FOX = ceftazidime; IPM = imipenem; MEM = meropenem.

^bAmpC is putative.

表九-2 *S. marcescens* 之 *E. coli* 轉移株(E-74, E-78, E-80, E-86) 其

double disk synergy test 呈 ESBL 陽性反應之結果

轉移株	AMC	FEP	FEP- AMC (2cm)	FEP- AMC (3cm)	CTX/CLA	CTX	CAZ/CLA	CAZ
E-74	13	16	+5	+3	28	10	27	23
E-78	13	18	+5	+3	27	11	27	22
E-80	13	17	+6	+2	27	12	25	22
E-86	13	17	+5	+4	29	11	27	24

AMC: amoxicillin-clavulanic acid, FEP: cefepime, CTX: cefotaxime,

CTX/CLA: cefotaxime-clavulanic acid, CAZ: ceftazidime,

CAZ/CLA: ceftazidime-clavulanic acid

表十

SM-Patient.doc

表十一 分離於本院特殊病房單位之五株產生 ESBL 之 *Serratia marcescens* 的 RAPD 分型

病患	菌株	檢體	病房	RAPD 型
10	86	腹水	RCU (呼吸加護病房)	I
9	80	肺泡灌液	RCC (呼吸照護病房)	II
5	12	導尿	SICU (外科加護病房)	III
14	103	導尿	RCU (呼吸加護病房)	IV
12	92	血液	RCW (一般呼吸病房)	無法分型

圖一至圖六和圖九:

Serratia marcescens 產 ESBL 之圖示.ppt

圖七、圖八: 圖七圖八.doc

表十 產生 ESBL 之 *Serratia marcescens* 其病人基本資料、臨床表癥、治療與預候

病患	菌株	年齡(歲) /性別	住院日 (日/月/年)	感染日 (日/月/年)	檢體	感染症	病房 (收檢體時)	原在疾病 ^a	合併感染 ^b	危險因 子。	治療 ^d	預候 (日/月/年)
1	02	71/M	門診	09/08/90	尿	無熱性 膿尿症	門診	BPH 腎結石			CIP (S)	長期菌尿症
2	06	88/F	31/07/90	31/07/90	痰	肺炎	急診室	COPD			Unasyn (R) CTX (R)	死亡 06/08/90
3	07	52/F	04/07/90	27/07/90	血	自發性 腹膜炎	18C (腎臟科)	肝硬化 尿毒症	尿路感染	CHD	IPM (S)	死亡 07/08/90
4	08	66/F	29/07/90	29/07/90	血	膽管炎	急診室	12 指腸 憩室			CHD (R) GM (R)	出院 06/08/90
5	12	36/F	16/08/90	20/08/90	導尿	尿路感染 (發熱性)	外科加護	腦溢血		Foley CHD	IPM (S)	死亡 07/09/90
6	63	83/M	18/09/90	18/09/90	血	褥瘡感染	急診室 (他院轉診)	陳舊性中風	足部感染	CHD LMF	PIP-TAZ (R)	出院 15/08/90
7	74	69/M	11/10/90	27/12/90	腹水	腹膜炎	11C (一般外科)	膽管癌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CHD PIP-TAZ IPM	CIP (S)	死亡 04/01/91
8	78	72/F	24/12/90	24/12/90	導尿	尿路感染 (發熱性)	急診室 (他院加護 病房轉診)	脊椎傷害 肺炎		Foley	PIP-TAZ (S)	出院 11/01/91
9	80	77/F	04/12/90	26/12/90	肺泡 灌液	肺炎	RCC (呼吸照護)	腦癱呆	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	呼吸器 Unasyn	PIP (R)	出院 07/01/91
10	86	84/F	02/12/90	20/12/90	腹水	自發性 腹膜炎	RCU (呼吸加護)	肝硬化 糖尿病	肺炎 菌血症	CHD CVC		死亡 20/12/90

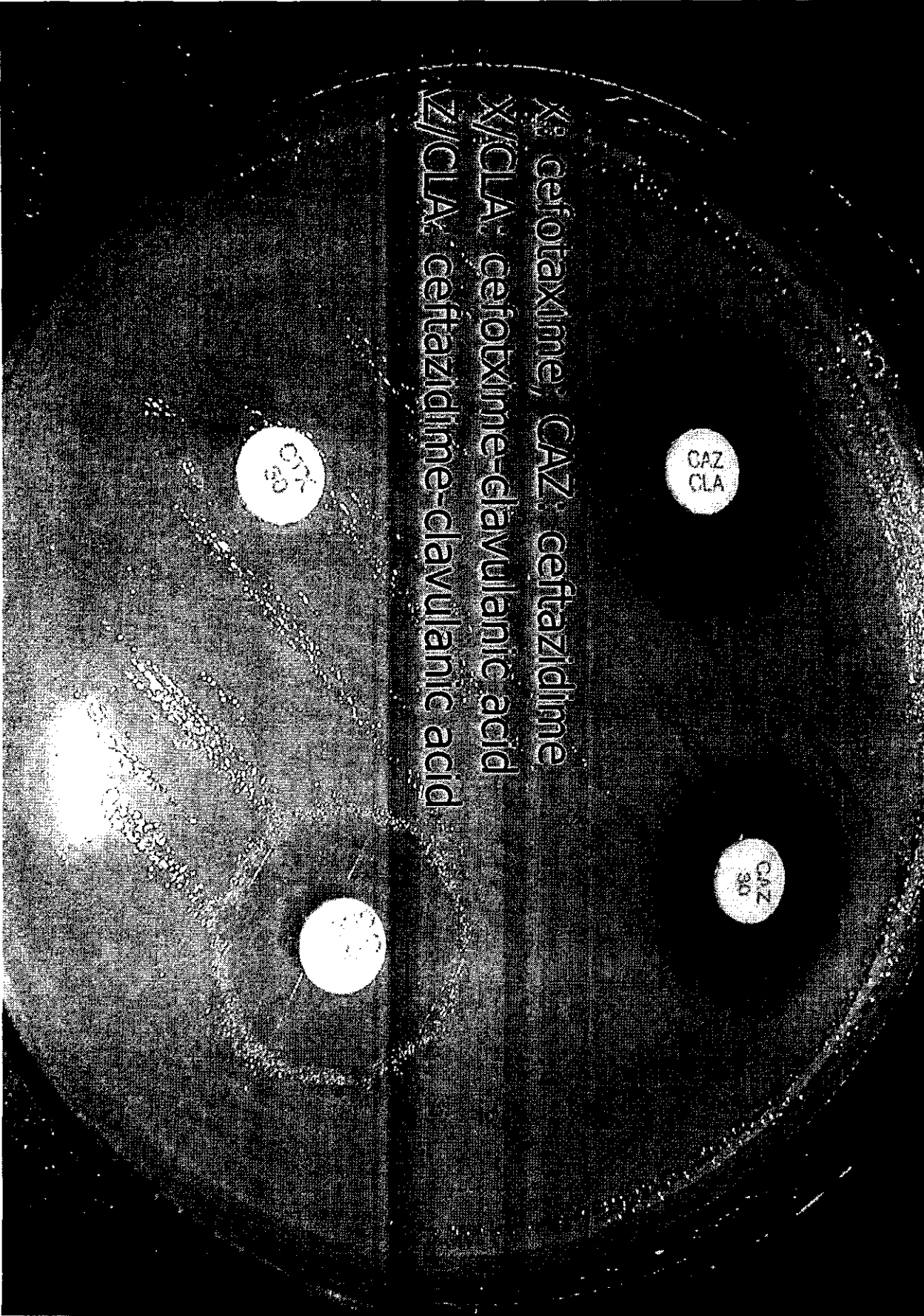
11	87	64/M	05/12/90	31/12/90 (院內感染)	導尿管	尿路感染 (發熱性)	急診加護	腦溢血	ORSA	Foley CHD	CHD(R)	出院 30/01/91
12	92	65/M	01/09/90	31/12/90 (院內感染)	血	血流感染	RCW (呼吸病房)	糖尿病 腦溢血 COPD	肺炎 尿路感染	Unasyn CVC	IPM(S)	出院 10/02/91
13	97				導尿管 尖端							
14	103	67/F	05/12/90	17/01/91 (院內感染)	導尿管	無熱性 膿尿症	RCU (呼吸加護)	糖尿病 神經性膀胱	腸球菌	Foley CHD Unasyn	CHD(R)	出院 28/01/91
15	116				血							

^aBPH: benign prostate hypertrophy, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, ORSA: oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*

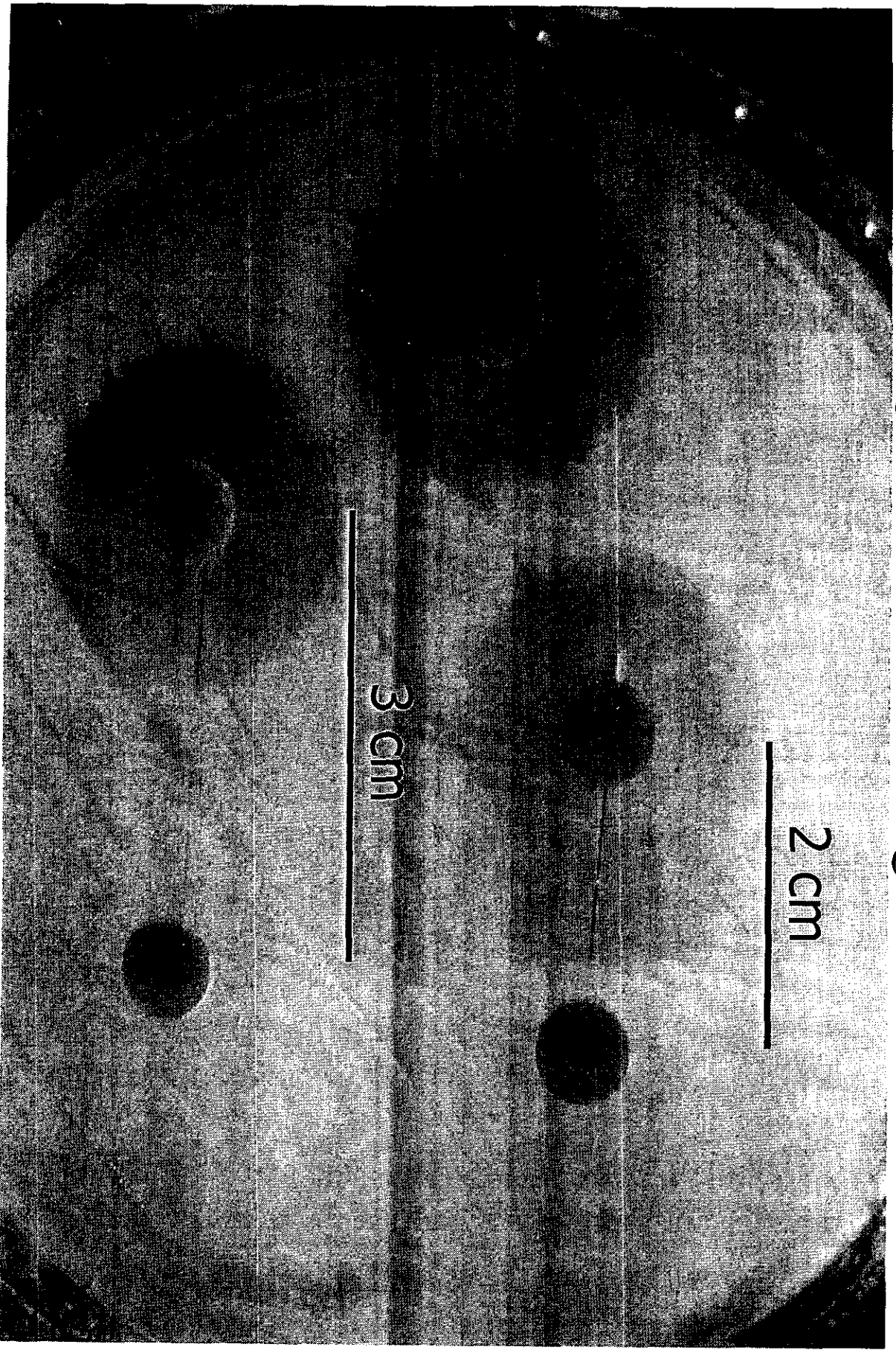
^bCHD: cefhradine, LMF: lomefloxacin, PIP-TAZ: piperacillin-tazobactam, IPM: imipenem, CVC: centra venous catheter

^dCIP: ciprofloxacin, CTX: cefotaxime, GM: gentamicin, S: susceptible, R: resistant

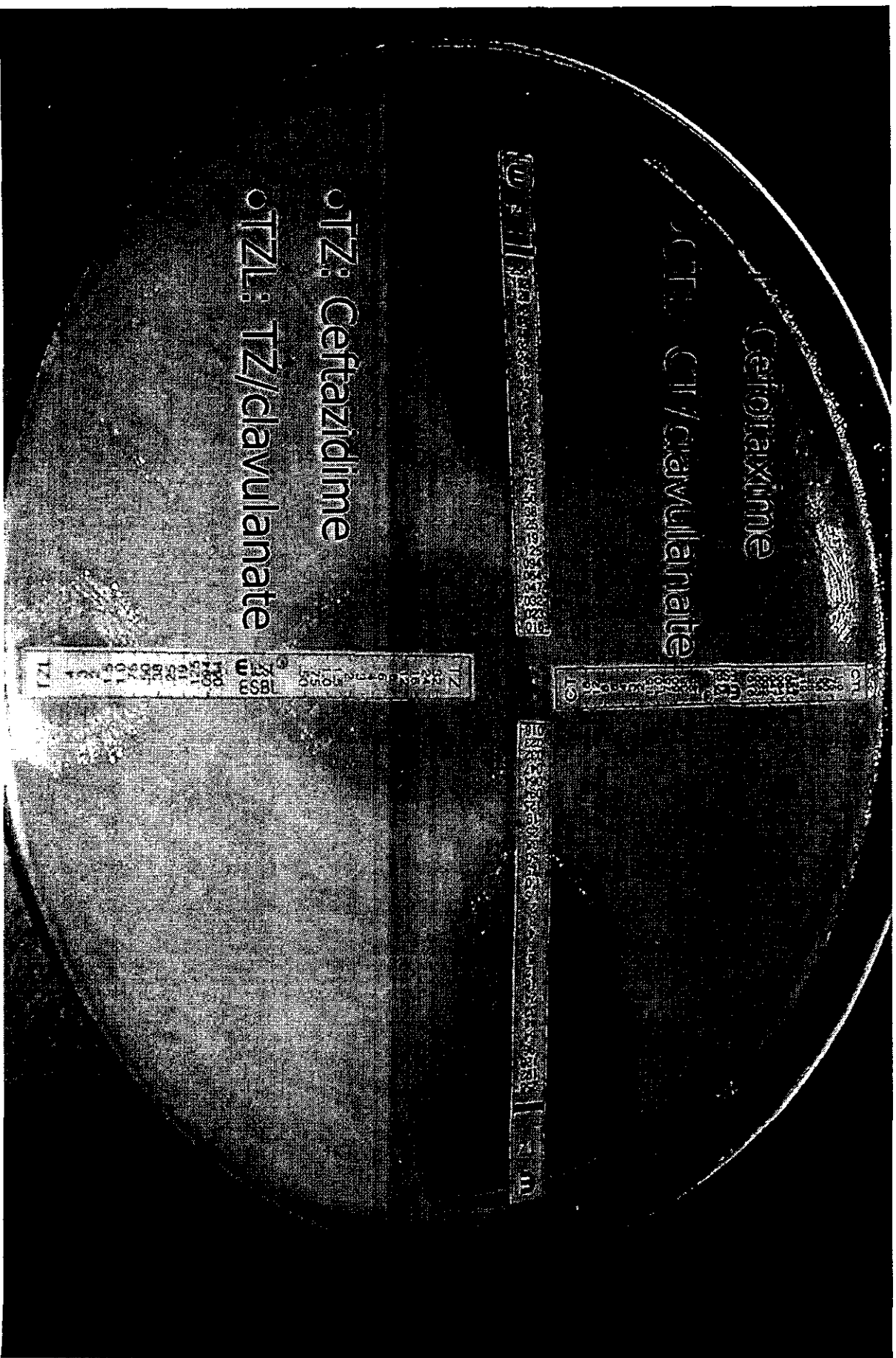
圖一：ESBL Double-Disk Synergy Test



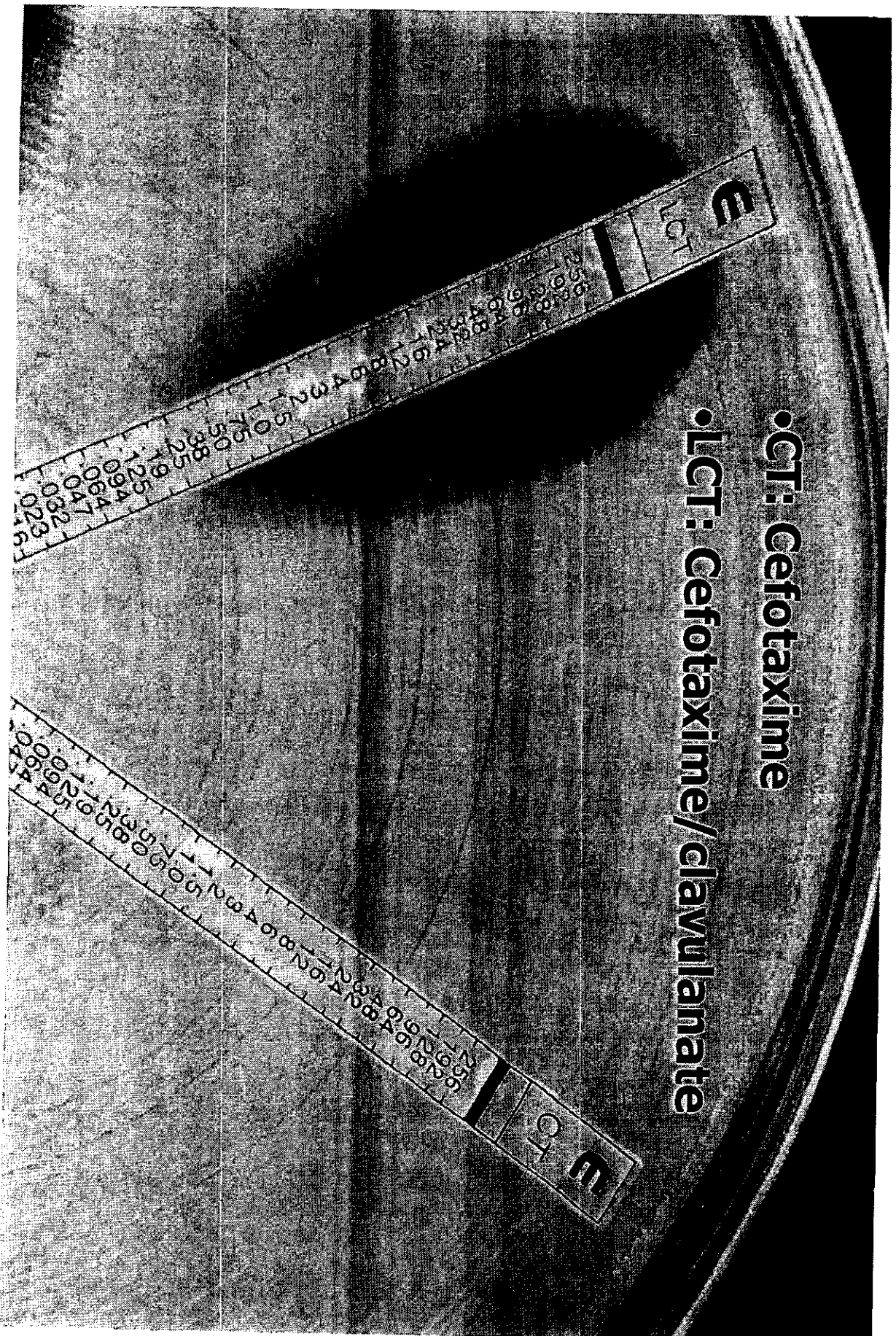
圖二：Cefepime-Augmentin (2cm, 3cm) for
Confirming ESBL-Producing *S. marcescens*



圖三：Etest ESBL Screen for ESBL Production
in *S. marcescens*



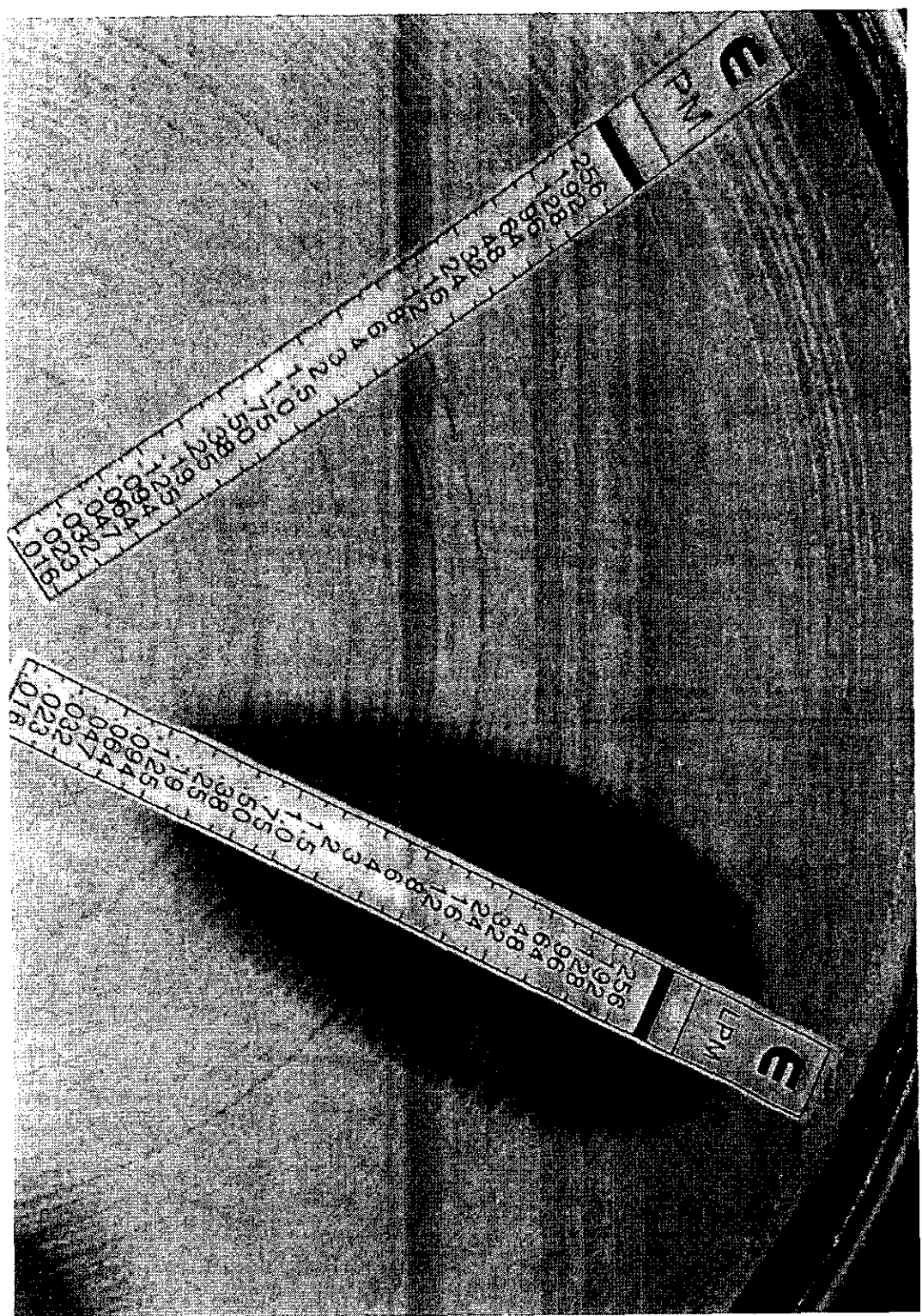
圖四：ESBL Confirmatory Test



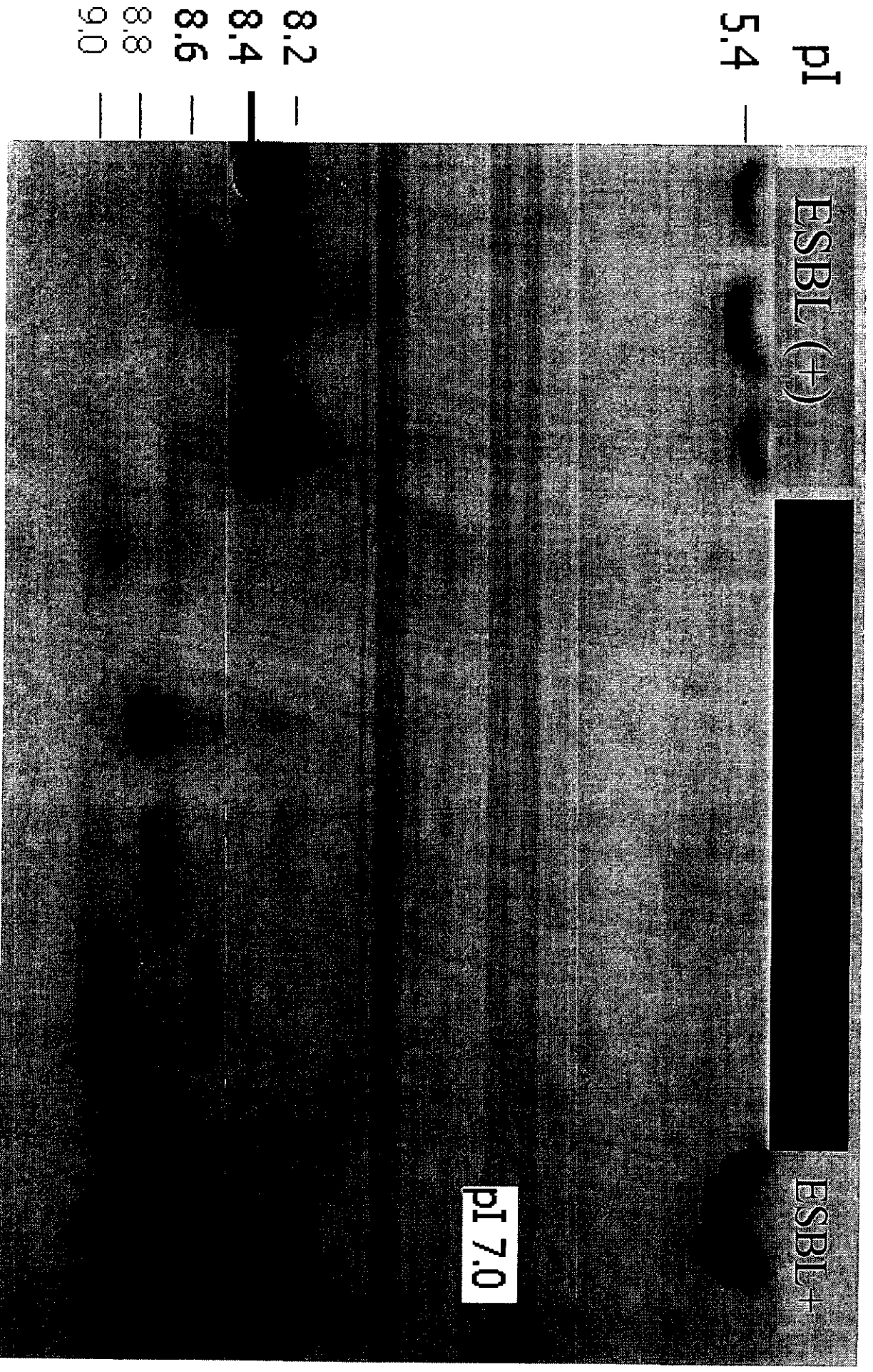
•CT: Cefotaxime

•LCT: Cefotaxime/clavulanate

圖五：Etest Showing Reduction of Cefepime MIC by Clavulanate. PM: cefepime; LPM: cefepime-clavulanic acid



圖六: pI of β -Lactamases in *S. marcescens*



圖七： *Serratia marcescens* 103 plasmid DNA CTX-M-3 PCR 產物之 DNA 序列分析結果

Primer: CTX-M31 5'- TGT TGT TAG GAA GTG TGC CGC -3'
 CTX-M32 5'- TCG TTG GTG GTG CCA TAG TC -3'

Sequence result:

```
GGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAA
TTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGAAA
AGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGC
ACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGC
TCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGGAGACGAAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACG
TAAACACCCGCATTCCGGGCGATCCGCGTGATAACCACTTACCTCGGGCAATGGCGCAAACTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTA
AAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCCGTGCAGCGAGCATTTCAGGCTGGACT
GCCTGCTTCCTTGGTTGTGGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCACCACCACAA
```

Blast result:

>gi|18390030|gb|AF462634.1|AF462634 Enterobacter cloacae plasmid pSUN-4 extended-spectrum
 beta-lactamase CTX-M-3 gene, partial cds, Length = 759,
 Score = 1273 bits (642), Expect = 0.0, Identities = 648/650 (99%), Strand = Plus / Plus

```
Sm103: 2 ggcggacgtacagcaaaaacttgccgaattagagcggcagtcgggagggcagactgggtgt 61
      |
      |
```

```
Sbjct: 39 ggcggacgtacagcaaaaacttgccgaattagagcggcagtcgggagggcagactgggtgt 98
```

```
Sm103: 62 ggcattgattaacacagcagataattcgcaatactttatcgtgctgatgagcgtttgc 121
      |
      |
```

```
Sbjct: 99 ggcattgattaacacagcagataattcgcaatactttatcgtgctgatgagcgtttgc 158
```

```
Sm103: 122 gatgtgcagcaccagtaaagtgatggccgcgccgcggtgctgaagaaaagtgaaagcga 181
      |
      |
```

```
Sbjct: 159 gatgtgcagcaccagtaaagtgatggccgcgccgcggtgctgaagaaaagtgaaagcga 218
```

```
Sm103: 182 accgaatctgttaaatacagcagagttgagatcaaaaaatctgacctgttaactataatcc 241
      |
      |
```

Sbjct: 219 accgaatctgttaaatacagcgagttgagatcaaaaaatctgaccttgtaactataatcc 278

Sm103: 242 gattgcggaagcagcgtcaatgggacgatgtcactggctgagcttagcgggcccgct 301
 |||

Sbjct: 279 gattgcggaagcagcgtcaatgggacgatgtcactggctgagcttagcgggcccgct 338

Sm103: 302 acagtacagcgataacgtggcgatgaataagctgattgctcacgttggcgcccgctag 361
 |||

Sbjct: 339 acagtacagcgataacgtggcgatgaataagctgattgctcacgttggcgcccgctag 398

Sm103: 362 cgtaaccgcttcgcccagcagctgggagacgaaacgttccgtctcgacctaccgagcc 421
 |||

Sbjct: 399 cgtaaccgcttcgcccagcagctgggagacgaaacgttccgtctcgacctaccgagcc 458

Sm103: 422 gacgttaaacaccgccattccgggagatccgctgataccacttcacctcgggcaatggc 481
 |||

Sbjct: 459 gacgttaaacaccgccattccgggagatccgctgataccacttcacctcgggcaatggc 518

Sm103: 482 gcaaactctgcggaatctgacgctgggtaaagcattgggagcagccaacgggagcagct 541
 |||

Sbjct: 519 gcaaactctgcggaatctgacgctgggtaaagcattgggagcagccaacgggagcagct 578

Sm103: 542 ggtgacatggatgaaaggcaataaccaccggtgcagcgagcattcaggctggactgcctgc 601
 |||

Sbjct: 579 ggtgacatggatgaaaggcaataaccaccggtgcagcgagcattcaggctggactgcctgc 638

Sm103: 602 ttccttggttggtggggataaaaccggcagcggtgactatggcaccacca 651
 |||

Sbjct: 639 ttcctgggttggtggggataaaaccggcagcggtgactatggcaccacca 688

圖八：Serratia marcescens 103 plasmid 之 integron DNA 序列分析結果

Integron primer(class I)

P1 5'- CGG ATG AAG GCA ACC CA -3'

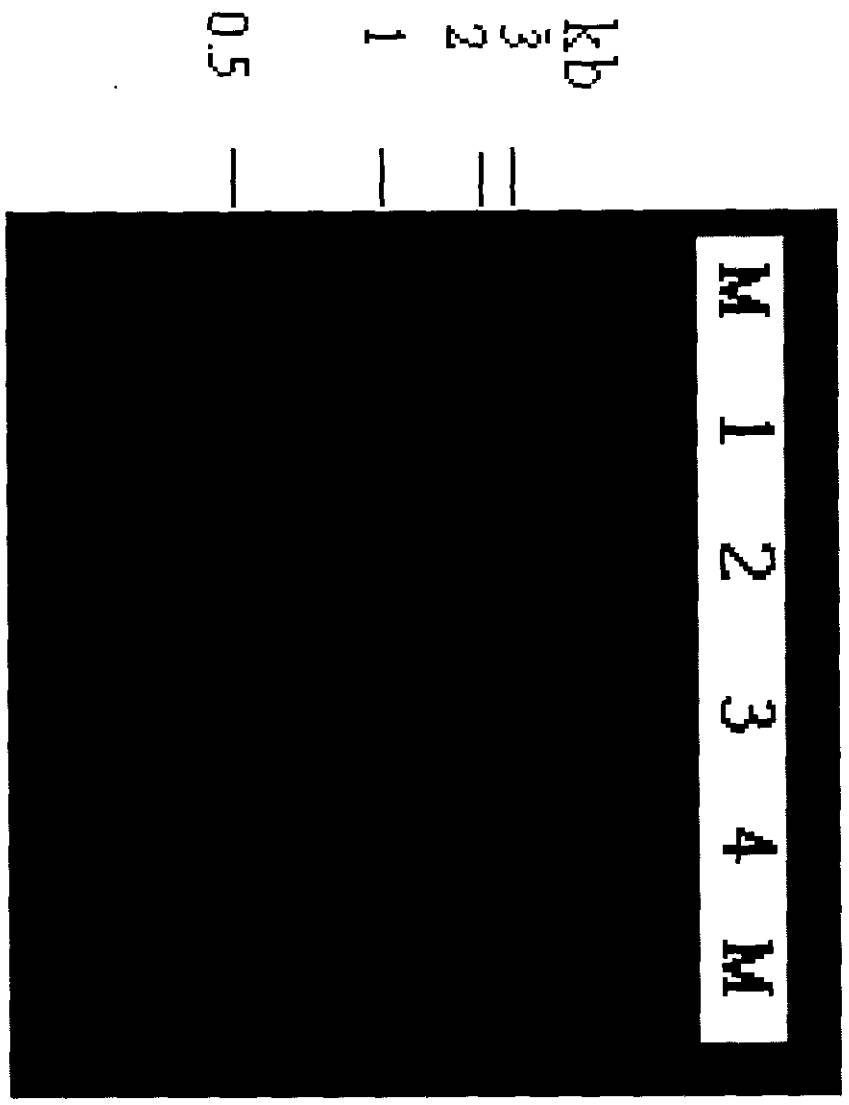
P2 5'- AAG CAG ACT TGA CCT GAT AGT -3'

Integrase I dhfrXII(trimethoprim) aadA2(streptomycin/spectinomycin)

CGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTTCGGTTAGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCG
 CTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTT
 GTTATGACTGTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCTGA
 TGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAA**GTTAGCC**CATATG
 AACTCGGAATCAGTACGCATTTATCTCGTTGCTGCGATGGGAGCCAATCGGGTTATTGGCAATGGTCCTAA
 TATCCCCTGGAAAATTCCGGGTGAGCAGAAGATTTTTCGCAGACTCACTGAGGGAAAAGTCGTTGTCATGG
 GCGAAAGACCTTTGAGTCTATCGGCAAGCCTCTACCGAACCGTCACACATTGGTAATCTCACGCCAAGCT
 AACTACCGCGCCACTGGCTGCGTAGTTGTTTTCAACGCTGTCGCACGCTATCGCTTTGGCATCCGAACTCGG
 CAATGAACTCTACGTCGCGGGCGGAGCTGAGATATACTCTGGCACTACCTCACGCCACGGCGTGTTTC
 TATCTGAGGTACATCAAACCTTCGAGGGTGACGCCTTCTTCCCAATGCTCAACGAAACAGAATTCGAGCTT
 GTCTCAACCGAAACCATTCAGCTGTAATTCGGTACACCCACTCCGTTTATGCGCGTCGAAACGGCTAACC
 ATPCCGTCAACGGGACGCCAAAATGCTGCGCATTTTGGTTCCCTCCGCTGCGCTCCGGCTCTCGTTACGTC
 CAACGTTAGCACCCTGAAACCCAGCTTTATTTAGCTCATGTTTATTCAAACGGCATTTAGCTTTTCAGGC
 GTTATTCAGTGCCTGTTTTGCCTTTTTTCCGGGCTTCGCCTGCATGGGCTGCGCAGGTTTTTCAGTCTTTTT
 GGCCTCTAGCCCTTGCGTAGCAAGCGCAAGCAGCTATCGTTTTTGCAGTGCTGTGCCGCCTCGGTGGCGCA
 ACGTTTTTTCACGGTTAGCGCCCGTCGCCAAATTCAGTTATCCGTTTTGGCTTCTGGTTCTAACATTTTCG
 GTCAAGCCGACCCGCATTCGCGGTTCGGCTTACCTCGCCCGTTAGACATCATGAGGGAAGCGGTGACCATC
 GAAATTTCGAACCAACTATCAGAGGTGCTAAGCGTCATTGAGCGCCATCTGGAATCAACGTTGCTGGCCGT

GCATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCATACAGCGATATTGATTTGTTGGTTACTGTGG
CCGTAAAGCTTGATGAAACGACGCGGCGAGCATTGCTCAATGATCTTATGGAGGCTTCGGCTTTCCTGGC
GAGAGCGAGACGCTCCGCGCTATAGAAGTCACCCTTGTCTGTCATGACGACATCATCCCGTGGCGTTATCC
GGCTAAGCGCGAGCTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCGGGTATCTTCGAGCCAGCCA
TGATCGACATTGATCTAGCTATCCTGCTTACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCGGCA
GCGGAGGAATTCTTTGACCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTCGAAAACCCTGAGGGAAACCTTGAAGCTAT
GGAACTCGCAGCCCGACTGGGCCGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGC
GCAATAACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATAAAACGCCTACCTGCCAGTA
TCAGCCCGTCTTACTTGAAGCTAAGCAAGCTTATCTGGGACAAAAGAAGATCACTTGGCCTCAGCGCGAG
ATCACTTGAAGAATTTATTCGCTTTGTGAAAGGCGAGATCATCAAGTCAGTIGGTAAATGATGTCTAACA
ATTCGTTCAAGCCGACCGCTACGCGCGGCGGCTTAACTCCGGC**GTTAGAT**GCACCTAAGCACATAATTGCTC
ACAGCCAAACTATCAGGTCAAGTCTGCTT

圖九: Molecular Epidemiology using RAPD Method



M: marker, lane 1: strain 86,

lane 2: strain 80, lane 3: strain 12

lane 4: strain 103