

計畫編號：DOH93-DC-1011

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

建立一爆發多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌
院內感染指標與預警系統

研究報告

執行機構：國立成功大學

計畫主持人：曾新穆

研究人員：顏經州，柯文謙

執行期間：93年1月1日至93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

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、中文摘要	(1-3)
貳、英文摘要	(4-6)
參、研究報告內容	
一、前言	(7-11)
二、實施方法及進行步驟	(12-25)
三、結果	(26-40)
四、討論	(41-43)
五、結論與建議	(44)
六、參考文獻	(45-47)
七、圖表	(48-62)

共 (62) 頁

壹、中文摘要

研究目的

多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌造成的院內感染 outbreak 為全球性的問題。傳統院內感染 outbreak 之確認需要冗長繁瑣的調查研究及標準化的菌株分型技術，過程曠日廢時，耗費人力。更重要的是，多重抗藥菌株有可能因為調查時間的延宕而加速擴散。因而，必須考慮建立一套預警與快速偵測系統，以減少其影響層面並控制其擴散。本研究計畫主要目的，在建立一套以臨床微生物實驗室為中心之指標與預警系統，建構一具搜尋與基因比對功能之基因與流行病學資料庫，以監控醫院多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌的散佈，及早偵測 outbreak 之發生。

研究方法

在第二年計畫中，我們探討多基因位點序列(MLST)分型技術運用在綠膿桿菌菌株分型之可能性。其原理主要是利用 PCR，將一些具多形性的 structural 基因放大，比較這些基因在不同菌株之間的差異而將菌株分型。首先利用 PCR，測試 14 段 structural genes，以挑選出基因序列變異最大者，作為 MLST 菌株分型技術之標的基因，並比較 MLST 與脈衝電場瓊膠電泳分型(PFGE)法，以測試 MLST 區分菌株能力。同時，我們建構一以實驗室為基礎電腦輔助之院內感染預警系統，以監控醫院內群聚感染之發生。資料庫設計部分主要包含四大部分：(1)資料庫綱要設計；(2)去氧核糖核酸序列比對方法設計及實作；(3)資料索引方法設計及實作；(4)網頁系統及介面設計及實作。同時，我們嘗試在此預警系統設立群聚感染指標。

主要發現

在測試的 14 段 structural genes 中，我們篩選到 7 段多形性基因，分別為 *arcA*、*aroE*、*gdh*、*prlC*、*tal*、*gor* 與 *dadx*，作為 MLST 菌株分型技術之標的基因。綜合不同多形性基因分型結果，給予每株菌株一 MLST 的序列分型代號。在 MLST 與 PFGE 分型法比較中，20 株綠膿桿菌可被分為 13 種 PFGE 型，但僅可分為 7 種 MLST 型，顯示 MLST 多形性分型法區分菌株能力不及標準的 PFGE 法。具有基因序列類比功能之基因資料庫已完成建構，可透過 MLST 中之任一標的基因序列比對，收尋出可能造成群聚感染菌株，以便進行進一步流行病學調查。另外，亦可透過 MLST 分型結果比對，收尋出可能造成群聚感染之菌株。院內感染指標與預警系統建立後，我們進一步加以測試。自預警系統可得到某種抗藥型菌株數目與其佔該菌種總分離菌株比率之趨勢圖。進一步分子流行病學及臨床分析發現，出現該抗藥型之菌株比率超過兩個標準差值時，皆證實為院內群聚感染，而且皆是並未被感控小組偵測出來者。

結論及建議事項

1. 本研究計畫建立了一套以臨床微生物實驗室為中心之指標與預警系統，建構一具搜尋與基因比對功能之基因與流行病學資料庫，並發展 MLST 菌株分型技術以監控院內群聚感染之發生。
2. MLST 在大腸桿菌、克雷氏肺炎桿菌與綠膿桿菌分型能力，仍不及 PFGE，然而，MLST 法可作為 PFGE 的輔助分型工具。
3. 本電腦系統輔助的監控預警系統可用以偵測已發生及提早偵測可能發生的院內群聚感染。以兩個標準差作為指標，可偵測發生中的院內群聚感染；加上菌株資料庫的運用，發現同一時期同一區域出現某種抗藥型菌株或此種菌株出現比率有上升趨勢時，便應警覺有院內群聚感染的發生。

4. 本監控預警系統可偵測到一些潛在性的院內群聚感染發生。實際應用時，應可降低潛在性院內群聚感染發生率，進一步降低多重抗藥菌株的盛行率。
5. 應進一步進行回顧性與前瞻性的研究，與現有人為的監測方式比較，以測試此系統偵測 outbreak 與預測抗藥菌株盛行率變化趨勢的能力。
6. 進一步改良系統，使其能自動化，以監控各種不同抗藥機轉引起之抗藥菌株，減少人力的耗費，並達到及時監控的目標。
7. 可將系統擴充，作為全國性長期性地監控抗藥菌株流行之用途。

中文關鍵詞：多重抗藥性；感染管制；監控系統；多基因位點序列；基因與流行病學資料庫

貳、英文摘要

Purpose

Nosocomial infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacilli are a global problem. Since the conventional investigation algorithm for detection of nosocomial outbreaks seems incapable of curbing the widespread of multidrug-resistant strains, the major purposes of the present project were to establish an effective real-time detection system, which was reinforced by modern computer technology and included a genetic and epidemiologic database and a rapid strain typing method.

Material and Methods

The multilocus sequence typing (MLST) method, a recently developed bacterial typing method, was developed for genotyping *Pseudomonas aeruginosa* in this year. The method is based on polymorphisms of structural genes among different strains of a bacterial species. Firstly, polymerase chain reaction assays were performed to amplify 14 structural genes of *P. aeruginosa* and nucleotide sequencing was followed to select the most polymorphic genes. A total of 20 *P. aeruginosa* isolates that were found to produce OXA-type beta-lactamases were tested by MLST and the results were compared with those obtained by the “gold standard” typing method, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The results of MLST typing can be saved easily in a digitalized manner so that they can be retrieved very quickly. A genetic and epidemiologic database that included basic data of gram-negative bacilli isolated during the study period was established. A computer-assisted surveillance system for detecting clonal outbreaks of nosocomial infections was also established. We attempted to define an alert threshold for suspected outbreaks using this system.

Results

Among the 14 structural genes tested, seven genes were found to be most polymorphic; they were *arcA*, *aroE*, *gdh*, *prlC*, *tal*, *gor*, and *dadx*. After phylogenetic analysis, a number was given for each variant of a structural gene for each isolate, and a MLST type was given for each isolate with seven numbers together. The 20 *P. aeruginosa* isolates gave 13 PFGE types and 7 MLST types, respectively. A genetic and epidemiologic database was also established. Isolates that have the same antibiotype, the same MLST type, or the same sequence of a polymorphic gene within one period can be retrieved from the database. Based on the retrieved basic data of the bacterial isolates, the link among these isolates can be investigated. An algorithm defining an alert as two standard deviations above the mean monthly rate or number of isolates with a resistance phenotype was applied to the computer-assisted surveillance system to determine alert thresholds for suspected outbreaks. The algorithm has been shown to detect clonal outbreaks of nosocomial infections in this study. Moreover, the system was shown to detect occult nosocomial outbreaks of infections that could not be detected by the standard infection control surveillance for the detection of clonal outbreaks.

Conclusions

A genetic and epidemiological database was established in this study. MLST was developed but the typing method was found to be less discriminatory than PFGE. Since MLST is easier to perform and to save in a database, the method may become an auxiliary typing tool to PFGE or a useful screening typing method. The computer-assisted surveillance system with the two standard deviations to determine alert thresholds can be used to detect the occurrences of clonal outbreaks of nosocomial infections. However, when the rate or number of isolates with a resistance phenotype from a ward is on the increase but is below

the two standard deviations, infection control and prevention teams in hospitals should be informed for early detection of clonal outbreaks of nosocomial infections. More multidrug-resistant bacterial strains should be tested to intensify the functions of the system; further retrospective and prospective studies should be performed to evaluate the usefulness of the system. Furthermore, the system may be used in a nationwide surveillance program for monitoring multidrug-resistant bacterial strains.

Keywords: nosocomial outbreak, multilocus sequence typing, bioinformatics, genetic database

參、研究報告內容

一、前言

多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌造成的院內感染 outbreak，其引起包括治療上的困難、醫療支出的增加…等等[1-3]的問題。傳統的 outbreak 調查研究中，醫院與臨床微生物實驗室所採取的措施[4,5]之缺點包括：(1) outbreak 之早期偵測，有賴臨床病房照料人員與微生物實驗室工作人員的警覺性與資料的分析，因此，往往 outbreak 已經發生一段時間後才被懷疑；(2) 當懷疑 outbreak 時才開始收集菌株，不見得能反應過去真實的情況；(3) outbreak 之確認，需要冗長繁瑣的調查研究，而且需要有標準化的菌株分型技術，整個過程繁瑣費時，更可能在分析結果後發現是假性 outbreak；(4) 最重要的是，多重抗藥菌株可能因調查時間的延宕而廣為散佈，造成更嚴重的交叉感染問題。在我們最近發表的研究報告中[6]，將過去收集的菌株加以分析，便發現在成大醫院內，曾發生過產生水解 Carbapenem (院內感染常用的最後一線抗生素)的 B 類頭孢子黴素水解酵素之克雷氏肺炎桿菌與 *Enterobacter cloacae* 引起院內感染 outbreak 的情形。然而，這些 outbreak 在常規的感控監控系統下卻被忽略。由此可見，傳統的 outbreak 調查研究已不勝應付日益嚴重的多重抗藥性問題。因此，建立一套多重抗藥菌株引起院內感染 outbreak 的預警與快速偵測系統，實有其必要性。另外此系統可提供醫務人員的預警參考與降低可能發生 outbreak 的影響層面以及控制多重抗藥菌株的擴散。

而建立一套預警與快速偵測 outbreak 之系統，主要取決於三個要件：

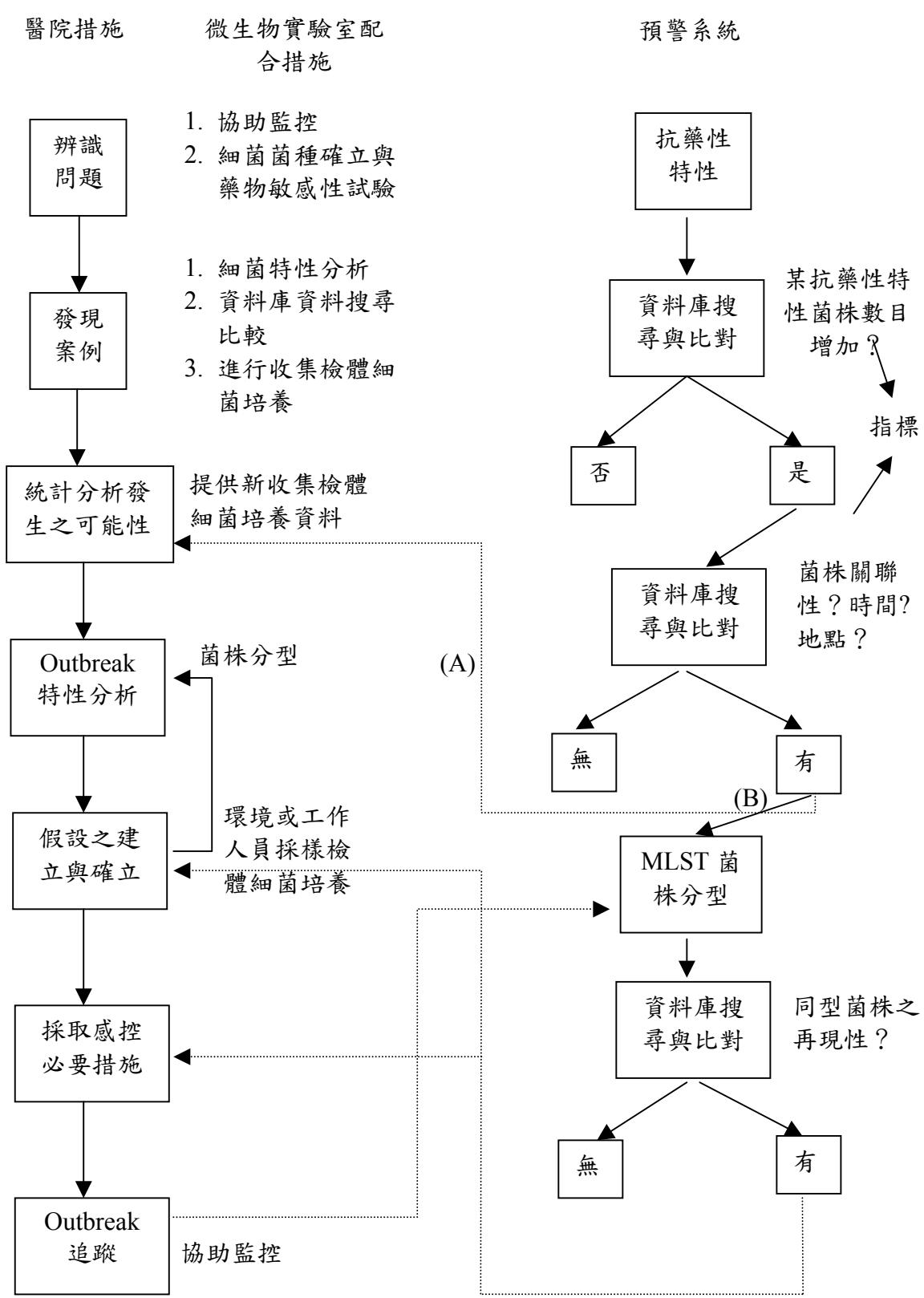
- (1) 完整且功能齊全的基因與流行病學資料庫：此種資料庫，除了可以達到持續性地監控抗藥性菌株流行情況目的，更可透過比對及搜尋的方式，特別是基因比對的方式，建立抗藥性菌株與過去菌

株之關聯性，即時瞭解是否有 outbreak 的可能性與是否需要啟動 outbreak 調查研究，省時省力。

- (2) 快速且區分鑑別能力良好、操作容易的菌株分型技術：最好能數位儲存於資料庫，隨時能立即搜尋出來作為比較用途。
- (3) 設計完善的預警指標，從資料觀察出菌株數量的變化，更準確與即時地分析是否有 outbreak 的發生而能及早提出預警，降低院內感染的可能性。

目前標準的細菌菌株分型技術，主要是以 PFGE 為主[7]，處理步驟繁瑣、費時且需要熟練的技術及電腦分析軟體，方可得到一致性的結果，否則，便必須把欲比較的菌株，同時放在一起，才能進行比對，不利於長期的監控研究。其他方法如 ribotyping [8]，其處理步驟較之 PFGE，並不較簡便，分型效果常不比 PFGE 佳；另外一些以聚合酶連鎖反應(PCR)為基本的技術[8]，如 arbitrarily primed PCR，雖簡易許多，然 PCR 的穩定度為一大問題，分型效果亦不比 PFGE 佳，常作為菌株分型篩選技術，亦常必須把欲比較的菌株，同時放在一起，才能進行比對，因而不適於長期間的監控研究。

另外隨著自動化核酸定序技術的普遍，目前已發展出利用該技術將菌株加以分型的方法。方法之一，便是多基因位點序列分型法 (MLST) [9-12]。其原理主要是利用 PCR，將一些具多形性的 Structural 基因放大，比較這些基因在不同菌株之間的差異而將菌株分型。MLST 已被運用在如 *Neisseria meningitidis*，*Enterococcus* spp.，*Staphylococcus aureus*，*Streptococcus pyogenes*，*Streptococcus pneumoniae* 等菌種之菌株分型，其分型效果甚至比這些菌種之標準分型方法佳，可將標準分型方法分出來的菌株再作進一步細分。此法較昂貴，然其具相當多的優點，包括方法快速、



圖示：傳統爆發院內感染醫院時須採取之步驟、臨床微生物實驗室應配合之措施與院內感染 outbreak 發生預警系統之應用。(A) 不具分子生物技術之實驗室；(B) 具分子生物技術之實驗室。

簡易；不須培養大量的細菌；結果容易判讀與比對；容易以基因資料庫的形式儲存；便於日後搜尋及不同地區、不同實驗室之結果比對；非常方便流行菌株之追蹤。一旦一完整的資料庫建立後，日後即使只有少數的菌株、甚至僅有單一的菌株需要分析時，只要對後來的菌株加以分型，便可快速地與過去所有分型過的菌株比對，如此不但省時省力，甚至反而更節省經費。而且由於有越來越多的定序中心出現，一般實驗室只要能夠操作 PCR 技術，便可進行菌株分型，並且亦可與資料庫之菌株比對，因此，預期此技術將越來越普遍。目前，除了沙門氏桿菌外，此法尚未應用在常見的格蘭氏陰性桿菌之分型。因此，具有相當大的潛力可以用來發展成為即時監控多重抗藥菌株引起院內感染 Outbreak 的預警系統。

基於目前醫院監控院內感染系統的缺失與日漸嚴重的多重抗藥性問題，我們提出此一跨學系的合作計畫，嘗試建立一套以臨床微生物實驗室為中心之指標與預警系統。在過去三年時間裏，成大醫院持續性地收集所有格蘭氏陰性桿菌臨床分離菌株，並在正進行中的一項 91 年度疾病管制局科技計畫中，用以探討綠膿桿菌、大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌產生廣效性頭孢子黴素水解酵素的盛行率與院內感染流行病學分析。本計畫進一步運用這些已得到之菌株與流行病學資料，由臨床病理學科運用多基因位點序列分型原理，負責發展快速菌株分型技術；感染學科負責院內感染流行病學分析；主要的工作則由資訊工程學系負責，建構一具搜尋與基因比對功能之基因與流行病學資料庫。另外，由於 MLST 技術之昂貴，將利用建構之資料庫資料，根據過去盛行率與流行病學資料，設立是否需要進一步研究之指標或參考點。本系統若能運作，將可監控抗藥菌株之流行，及早偵測 Outbreak 之發生，減少人力的耗費，日後亦可再加以擴充，作為全國性長期性地監控抗藥菌株流行之用途，最終達到減少抗藥菌株擴散的目的。

此資料庫儲存之資料，亦可作為日後大規模臨床與流行病學研究之基礎。

二、實施方法及進行步驟

(一) 綠膿桿菌菌株資料庫之建立

(1) 菌株

本年度分析之菌株為 2000 至 2002 年分離於成大醫院之綠膿桿菌，共 8681 分離菌株。另外，針對 MLST 技術之建立，增加 1989 and 1996 年間，366 株分離自血液檢體之綠膿桿菌株分析。

(2) 藥物敏感性試驗

採用標準紙錠擴散法，加作或補作過去未測試抗生素之藥物敏感性，以決定 antibiograms，以利於資料庫比對搜尋用。抗藥與否結果之判讀，則根據 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 標準 [23]。

(3) 菌株與流行病學資料庫之建立

將菌株基本資料，包括檢體編號、檢體類別、檢體收集時間、檢體收集地點、病人姓名與病歷號等，輸入菌株資料庫。另外，將臨床資料包括病人基本資料、患者原疾病、接受過何種治療、接受過何種抗生素、接受過抗生素天數、住院天數、住院地點、可能原感染部位、病人免疫狀態(白血球數)、病人健康狀態等級、病人肝腎功能、感染後使用抗生素情形與菌株抗藥性之藥物種類等，輸入流行病學資料庫。

(二) 綠膿桿菌 MLST 技術之建立

(1) 菌株之選擇

從所有收集分離菌株中，挑選出對廣效性頭孢子黴素有抗藥性之菌株，以進一步偵測製造廣效性頭孢子黴素水解酵素之菌株，作為 MLST 技

術建立之研究菌株。

(2) 廣效性頭孢子黴素水解酵素之偵測

利用聚合酶連鎖反應法偵測攜帶廣效性頭孢子黴素水解酵素基因菌株。主要標的基因為 SHV、TEM、CTX-M、OXA、VEB 型基因[24-26]。利用菌落雜交法，使用以上聚合酶連鎖反應法產物來製造探針，來排除聚合酶連鎖反應法偽陰性的可能性。利用直接核酸定序法來決定各個基因亞型。

(3) 等電點聚焦法(Isoelectric focusing)分析

對製造廣效性頭孢子黴素水解酵素之菌株，進行等電點聚焦法來決定細菌產生之廣效性頭孢子黴素水解酵素特性[27, 28]。水解酵素之粗萃取，乃利用超音波震破細胞而得[27]。將細胞粗萃取液點於 pH3.0 至 9.5 之膠 (Amersham Pharmacia Biotech, Hong Kong) 上進行電泳。電泳完畢後用 nitrocefin 呈色。

(4) 藥物敏感性試驗

對製造廣效性頭孢子黴素水解酵素之菌株，進行瓊膠稀釋法藥物敏感性試驗。使用抗生素為 piperacillin、piperacillin/tazobactam、ceftazidime、cefotaxime、ciprofloxacin、cefepime、aztreonam、amikacin、gentamicin、imipenem、meropenem。

(5) 脈衝電場瓊膠電泳法 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

利用脈衝電場瓊膠電泳法(pulsed-field gel electrophoresis)來決定菌株間之親緣關係。抽取菌株的全 DNA 後，以限制酵素 *XbaI* 切割，再進行電泳。

PFGE 型的判讀，乃根據 Tenover 的標準[29]。

(6) MLST 菌株分型

由於文獻上尚未出現過 MLST 菌株分型用於綠膿桿菌分型的報告，因此，我們使用用在大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌 MLST 菌株分型的 6 個 structural genes (*arcA*、*aroE*、*dnaE*、*adk*、*gdh*、*gcl*)，再從已發表之綠膿桿菌 PA01 之全序列，另外再找 8 個 structural genes 作為標的基因(*prlC*、*polA*、*tal*、*speB2*、*gor*、*sth*、*dadX*、*lipH*)，設計聚合酶連鎖反應法之引子(表一)。再以聚合酶連鎖反應的產物進行核酸定序分析，以作多形性基因篩選，篩選出具有多形性之基因區域。所得核酸序列，暫時儲存於國家衛生研究院之 GCG 的軟體中，並利用其 sequence analysis (Phylogenetic tree) 軟體進行演化分析，按照親疏遠近，每一基因中不同的核酸序列，分別給予一 allele 的代號，綜合不同的基因，給予每株菌株一 MLST 的序列分型 (sequence typing) 代號。

(7) MLST 與 PFGE 分型結果比較

比較 MLST 與 PFGE 分型結果，看 MLST 分型效果是否比 PFGE 為佳？是否比 PFGE 適合作為院內爆發群聚感染時之菌株分型用途。

(三) 資料庫設計

利用已知的病人菌株資料，建立一個菌株的資料庫。內容包含從病人身上取得的菌株抗藥型、收集日期、菌株名稱以及一些病人的基本資料。並利用該資料庫，實做一個 Web Base 的介面，透過該介面，使用者可以輸入某一菌株的抗藥型表現值，並依據所欲查詢的日期、菌株名稱、病房位置來查詢該菌株是否曾經出現過，或是查詢最接近的菌株資料（根據菌株

的抗藥型表現值來做 RANK 來做排列)。

本計劃在資料庫設計部分主要包含五大部分：

1. 資料庫綱要 (Database Schema) 設計。
2. 資料索引 (Index) 方法設計及實作。
3. 去氧核糖核酸序列比對 (DNA Sequence Comparison) 方法評估及實作。
4. 預警系統指標設計及實作。
5. 網頁系統及介面設計及實作。

以下將說明其設計細節。

(四) 資料庫功能之增強：強化基因資料庫功能，進一步使其具有基因序列比對之功能。當輸入基因序列，若發現新分離出來之菌株為一新基因型，可藉由序列比對結果，分析與過去出現過之基因型之關係，瞭解其可能為何流行菌株演化出來之菌株。

使用工具：

資料庫：MySQL 4.0

Web Server：Apache Tomcat 5.0

Language：Java Server Page

Platform：Windows Server 2003

資料庫綱要 (Database Schema)：

Table Name：病人(Patient)

	病歷號	姓名	性別	出生日期
--	-----	----	----	------

ataType	Varchar(20)	Varchar(15)	Char(1)	Date
---------	-------------	-------------	---------	------

病歷號：Anamnesis_No 姓名：Name 性別：Sex

出生日期：Birthdate

Table Name：菌株(Germ_Unit)

	收集號	檢體編號	病歷號	收集日期	檢體別
DataType	Varchar(15)	Char(4)	Varchar(20)	Date	Int

病床號	來源	菌名	MLST
Varchar(10)	Char(1)	Varchar(50)	Char(6)

收集號：Collect_No 檢體編號：Spec_No 病歷號：Anamnesis_No

收集日期：Collect_Date 檢體別：Spec_Type 病床號：Sickbed_No

來源：Source 菌名：Germ_Name MLST：MLST 代碼

Table Name：抗藥型(Tolerance)

	收集號	收集日期	檢體編號	菌名	SAM	AMC	PIP	TZP	CC	TE	C
DataType	Int	Date	Char(4)	Varchar(50)	Int						

E	GN	NN	AN	CF	FOX	CXM	CMZ	CTX	FLO	NET	LVX	OFX	CIP	IPM	CAZ	CRO
Int																

MOX	CMX	CFP	ATM	FOM	TIM	PA	SXT	MA	CEC	CFM	MET	TEC	RA	CID	CTM	PEF
Int																

CPD	MI	AZ	CLR	FA	MEM	S	FEP	CR	GAR	LOM	AC	P	OX	VM	AM
Int															

AmphotericinB	Fluconazole	Fluorocytosin	Itraconazole	Streptomycin
Int				

Isoniazid	Rifampin	Ethambutol
Int		

收集號：Collect_No 收集日期：Collect_Date

檢體編號：Spec_No 菌名：Germ_Name

(註：在資料庫中抗藥型以英文字母的順序排列)

Table Name：菌株(Germ)

	菌名	描述
DataType	Varchar(50)	Text

菌名：Germ_Name 描述：Descri

Table Name：流行病學資料(Epidemic)

Infectionsite	Foci	Apache	Instrumentation	Comorbid
Varchar(15)	Varchar(20)	Int	Varchar(25)	Varchar(25)

Antibiotic	Treatment	Result of Treatment	Outcome
Varchar(25)	Varchar(25)	Varchar(20)	Varchar(30)

Location of Infection：Infectionsite

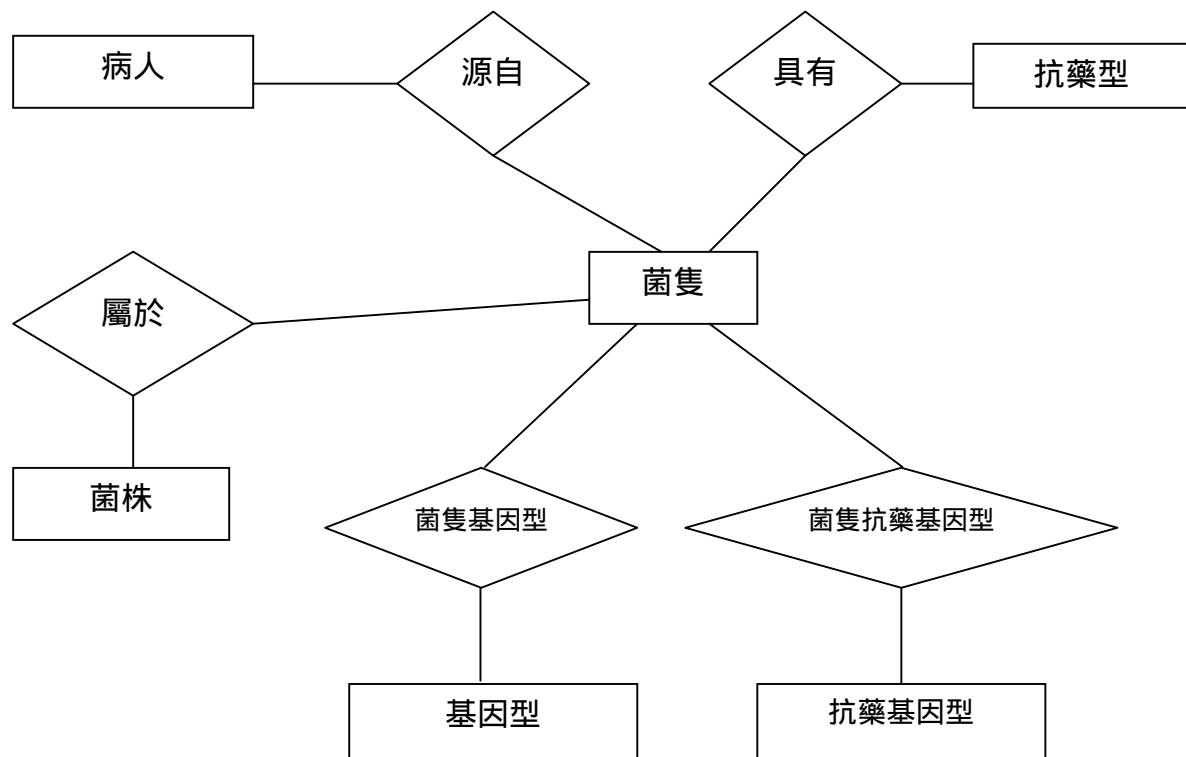
Foci of Infection：Foci Apache Score：Apache

Instrumentation：Instrumentation Comorbid conditions：Comorbid

Prior antibiotic use：Antibiotic Treatment：Treatment

Treatment result：Result Outcome：Outcome

簡易 ER Model :



建立資料庫的 Script :

以下為建立資料的 script 檔內容 :

```
CREATE TABLE patient
(
  Anamnesis_No    varchar(20) NOT NULL PRIMARY KEY,
  Name            varchar(15),
  Sex             char(1),
  Birthdate       date
);
```

```

CREATE TABLE Germ_Unit
(
    Collect_No      varchar(15),
    Spec_No         char(4)    NOT NULL,
    Anamnesis_No   varchar(20),
    Collect_Date    date       NOT NULL,
    Spec_Type       int,
    Sickbed_No     varchar(10),
    Source          char(1),
    Germ_Name       varchar(50) NOT NULL,
    Mlst           char(6),
    CONSTRAINT cs PRIMARY KEY(Spec_No, Collect_Date, Germ_Name)
);

```

```

CREATE TABLE Tolerance
(
    Collect_No      varchar(15),
    Spec_No         char(4)    NOT NULL,
    Collect_Date    date       NOT NULL,
    Germ_Name       varchar(50) NOT NULL,
    P              int,
    OX              int,
    VA              int,
    AM              int,
    SAM             int,
    AMC             int,
    PIP             int,
    TZP             int,
    CC              int,

```

TE	int,
C	int,
E	int,
GN	int,
NN	int,
AN	int,
CF	int,
FOX	int,
CXM	int,
CMZ	int,
CTX	int,
FLO	int,
NET	int,
LVX	int,
OFX	int,
CIP	int,
IPM	int,
CAZ	int,
CRO	int,
MOX	int,
CMX	int,
CFP	int,
ATM	int,
FOM	int,
TIM	int,
PA	int,
SXT	int,
MA	int,
CEC	int,

CFM	int,
MET	int,
TEC	int,
RA	int,
CID	int,
CTM	int,
PEF	int,
CPD	int,
MI	int,
AZ	int,
CLR	int,
FA	int,
MEM	int,
S	int,
FEP	int,
CR	int,
GAR	int,
LOM	int,
AC	int,
LZD	int,
LFX	int,
AmphotericinB	int,
Fluconazole	int,
Fluorocytosin	int,
Itraconazole	int,
Streptomycin	int,
Isoniazid	int,
Rifampin	int,
Ethambutol	int,

```
CONSTRAINT cs PRIMARY KEY(Spec_No, Collect_Date, Germ_Name)
);
```

```
CREATE TABLE Germ
(
    Germ_Name    varchar(50),
    Descri       text
);
```

```
CREATE TABLE Epidemic
(
    Infectionsite    varchar(15),
    Foci              varchar(20),
    Apache            int,
    Instrumentation   varchar(25),
    Comorbid          varchar(25),
    Antibiotic        varchar(25),
    Treatment         varchar(25),
    Result            varchar(25),
    Outcome           varchar(25)
);
```

資料索引 (Index) 方法設計及實作：

本計劃之重點為設計快速易用之抗藥性比對方法以供研究者能依輸入之抗藥性快速找到其標的菌株資料。在這個階段裡面，比較難的在於跟所輸入的抗藥性做比對，並利用輸入的抗藥型將資料庫的資料排出 RANK。而抗藥性的種類繁多，但每一種只會有三種值，分別為：R(Resistant)，

I(Intermediately resistant), S(Susceptible)。為了比對的方便，我們將這三種值在資料庫中存成 INT，其值依次為 3、2、1。

由於抗藥性的種類很多，每一個菌株（在資料庫中 Germ_Unit 的每一筆資料）所測試的抗藥性不一定會相同，因此會有些抗藥性的值為 NULL。根據討論的結果，我們決定，在輸入的抗藥型資料時，若資料庫中的菌株並無此抗藥性的測試值時（其值為 NULL 的時候），便不考慮該菌株。

而在比對抗藥性的 RANK 時，所輸入的抗藥性表現值相同數越多的其 RANK 值越高。舉例來說。假設輸入 10 種抗藥性來做查詢，在資料庫中，某一菌株擁有跟輸入的抗藥性完全 match 的有 9 種，他的 RANK 高於另一抗藥性只有 8 種完全 match 的菌株的 RANK 還高。而假設若兩菌株的抗藥性表現的完全 match 數相同（假設都是 8 種），則依照那兩種不同的抗藥性的值來排 RANK。原則為(R>I>S)。即不同的值的部分，R→I or I→S 的 RANK 比 R→S 高。

以上為所查詢結果的 RANK 排列基本原則。而在做法上，我們會先去考慮完全相同的 Match 個數，擁有越多相同的抗藥型的資料 RANK 越高，在 SQL 的語法中我們使用了 IF 的敘述，若兩者相同傳回值為 1，再相加之後便可得到完全 Match 的抗藥型個數。

對於擁有 Match 相同個數的抗藥型表現，對其 RANK 的排列則為兩比資料中的抗藥型數值相減取絕對值後相加，因此可知由 R→I、I→R、I→S、S→I 相減後取絕對值都是 1，R→S、S→R 相減取絕對值其值為 2，因此總和越大則兩筆資料的差異性越大，所以 RANK 越低。

透過上面的方法，我們便可以透過 SQL 的語法的應用，將我們所需要的 RANK 值排列出來。而由於收集日期跟菌株名稱的不同也會影響查詢的結果，因此也對所欲查詢的收集日期跟菌株名稱加以篩檢。

本計劃之重點則為設計快速易用之序列比對方法以供研究者能依輸入之序列片段快速找到其標的基因資料。

去氧核糖核酸序列比對 (DNA Sequence Comparison) 方法評估及實作：

在生物序列比對 (biosequence comparison) 的分析中[17-19]，以分析不精確匹配 (inexact matching) 為主。對於生物序列比對的分析，最早期的研究以 Needleman-Wunsch[14] 的廣域性排比 (global alignment) 問題最具代表性，其提供了兩個生物序列整體相似性的分析；另外 Smith-Waterman[15]的區域性排比 (local alignment) 問題則提供了瞭解兩個生物序列局部近似的完整描述。

以 Smith-Waterman 問題所發展出來的區域性排比演算法雖能找到極佳的近似字串，但其效能不佳，其時間複雜度 (time complexity) 為 $O(mn)$ ，不適合應用在具有大資料量的生物序列資料庫中做比對的工作，因此而有近似區域性排比方法的發展，這類的方法目的在誤差允許的範圍內，以更有效率的方式尋找出所有的近似序列 (similarity sequence)，BLAST[16] 便是其中一個即為成功的例子，其所找到的近似序列，稱之為局部最大節對 (locally maximal segment pair)。經過諸多考量之後，我們決定採用 BLAST 為我們的排比演算法，並實作出 BLAST 系統。

院內感染指標與預警系統之建立與測試：

(一) 院內感染指標與預警系統之建立

本研究以實驗室應用為主的感染指標與預警系統，主要以資料的收集日期、病床號、菌名、抗藥性等建立臨界指標。根據菌株之各種不同抗藥型建立之預警系統，可計算出每個月各種不同抗藥型菌株數目與其佔該菌種

總分離菌株之出現比率，以此建立其流行之趨勢圖。再根據每個月數值，計算出整段期間各抗藥型菌株數目與所佔比率之平均值與標準差，並以平均值與兩個標準差值，各畫出一直線，以便判斷不同時段某抗藥型菌株之出現是否超出預期，嘗試以兩個標準差值作為 outbreak 可能發生之參考點或指標。出現比例（即以月為單位觀察某種菌株位於某病房的某些抗藥性之比例），其公式如下所示：

$$\text{出現比例} = \frac{\text{使用者選擇菌株之抗藥性表現的數量}}{\text{該種菌株於當月出現的數量}}$$

$$\text{臨界指標 Baseline} = \text{數據平均值} + \text{數據標準差}$$

若菌株的出現比例超過此臨界指標代表有發生 outbreak 的危機。

(二) 院內感染指標與預警系統之測試

進行回溯性研究，測試此系統之可運作性。輸入具某種抗藥型之菌種，判斷是否出現該抗藥型之菌株數目或比率超出預期者。若然，則利用菌株資料庫與流行病學資料庫，調出該時期所有具某種抗藥型菌株之菌株資料與感染患者資料，作為 outbreak 發生與否的參考。如可能為 outbreak 者，如來自同一病房，則進一步以前述方法進行菌株特性分析(廣效性頭孢子黴素水解酵素基因之偵測)、分子分型(PFGE)與病人病史分析來確認。

三、結果

(一) 綠膿桿菌菌株資料庫之建立

將菌株基本資料，包括檢體編號、檢體類別、檢體收集時間、檢體收集地點、病人姓名與病歷號等，輸入菌株資料庫。另外，將臨床資料包括病人基本資料、患者原疾病、接受過何種治療、接受過何種抗生素、接受過抗生素天數、住院天數、住院地點、可能原感染部位、病人免疫狀態(白血球數)、病人健康狀態等級、病人肝腎功能、感染後使用抗生素情形與菌株抗藥性之藥物種類等，輸入流行病學資料庫。

(二) 綠膿桿菌 MLST 技術之建立

(1) 菌株之選擇

所有分析菌株中，總共收集到對廣效性頭孢子黴素有抗藥性之綠膿桿菌菌株 1294 株，以進行進一步分析。其中包括收集自 1989 and 1996 年間 42 菌株以及 2000 至 2002 年分離之 1252 菌株。

(2) 廣效性頭孢子黴素水解酵素之偵測

利用聚合酶連鎖反應法偵測攜帶廣效性頭孢子黴素水解酵素基因菌株。所有 1294 對廣效性頭孢子黴素有抗藥性之綠膿桿菌菌株在聚合酶連鎖反應法與菌落雜交法中，對 SHV、TEM、CTX-M 與 VEB 皆呈陰性反應；來自 21 病人之 45 菌株則對 OXA 基因呈陽性反應。利用直接核酸定序法來決定 OXA 基因亞型，結果在 45 菌株中，8 株具 OXA-10 基因亞型，35 株具 OXA-17 基因亞型，2 株具 OXA-14 基因亞型。每一病人取一菌株作進一步分析。

(3) 等電點聚焦法 (Isoelectric focusing) 分析

對製造廣效性頭孢子黴素水解酵素之菌株，進行等電點聚焦法分析。所有具 OXA-10 與 OXA-17 基因亞型之菌株皆 pIs 6.1 與 7.9 的酵素表現，具 OXA-14 則皆具 pIs 6.1 and 7.9 的酵素表現。pI 6.1 相等於 OXA-10 與 OXA-17 的表現，pI 6.2 相等於 OXA-14 的表現，pI 7.9 則相等於綠膿桿菌本身具有的 C 類水解酵素的表現。

(4) 藥物敏感性試驗

對製造廣效性頭孢子黴素水解酵素菌株進行瓊膠稀釋法藥物敏感性試驗的結果如表二所示。

(5) 脈衝電場瓊膠電泳法 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

產生 OXA 酵素之 PFGE 結果如圖一與表三所示。在 21 株來自不同病人的菌株中，有一株因無法得到理想的 DNA 而無法分型。其餘 20 株可分成 13 主型，其中分型 III 與 V 可分成二亞型，分型 IX 可分為三亞型。這二十株進一步進行 MLST 菌株分型。

(6) MLST 菌株分型

在 14 個標的基因的聚合酶連鎖反應法中，有 7 個標的基因(*dnaE*、*adh*、*gcl*、*polA*、*speB2*、*sth*、*lipH*)僅出現一種 allele 型，6 個標的基因(*arcA*、*aroE*、*gdh*、*prlC*、*tal*、*gor*)出現兩種 allele 型，1 個標的基因(*dadX*)出現三種 allele 型。去掉僅出現一種 allele 型者，以 7 個標的基因來決定 MLST 分型，每一基因中不同的核酸序列，分別給予一 allele 的代號，綜合不同的基因，給予每株菌株一 MLST 的序列分型 (sequence typing) 代號。各標的基因各 allele 之序列如圖二所示。

(7) 比較 MLST 與 PFGE 分型結果

扣除一株無法分型，在 20 株來自不同病人的菌株，可分成 13 種 PFGE 主型。這 13 種 PFGE 主型，利用 MLST 分型，僅可得到 7 種 MLST 型。各個 PFGE 亞型皆具有相同之 MLST 分型。MLST 與 PFGE 分型結果比較如表三所示。

(三) 資料庫功能之增強

具有基因序列類比功能之基因資料庫已完成建構，可透過 MLST 中之任一標的基因序列比對，收尋出可能造成群聚感染菌株，以便進行進一步流行病學調查。另外，亦可透過 MLST 分型結果比對，收尋出可能造成群聚感染之菌株。

(四) 院內感染指標與預警系統之建立與測試

院內感染指標與預警系統建立後，我們進一步加以測試。當輸入對 ceftazidime 與 cefoxitin 同時有抗藥性之克雷氏肺炎桿菌時，自預警系統可得到該抗藥型菌株數目與其佔該菌種總分離菌株比率之趨勢圖(圖三)。從圖中可發現，有三個時期出現該抗藥型之菌株比率超過兩個標準差值。第一與第二次出現異常增加現象，目前已知是產生 IMP-8 之克雷氏肺炎桿菌在外科加護病房造成之群聚感染。針對第三次該抗藥型菌株比率超過兩個標準差值，我們將具該抗藥型之菌株作進一步分析。每一病人各取一菌株，共分析 71 菌株。結果發現其中 65 株為產生 CMY-2 之菌株。65 株中，有 17 株來自外科加護病房。經過進一步臨床及流行病學分析，在來自非外科加護病房的 48 株產生 CMY-2 菌株中，有 36 株來自曾住過外科加護病房的病人。這些正住在或曾經住過外科加護病房的病人，發現皆是因車禍外傷或腦出血而接受神經外科手術者。我們進一步將產生 CMY-2 之菌株作 PFGE

分析，發現來自正住在或曾經住過外科加護病房病人的菌株，皆具有相同或相似之 PFGE 型(圖四)，證實曾發生過院內群聚感染。此院內群聚感染並未被感控小組偵測出來。

(五) 院內感染指標與預警系統實作成果

以下為實作完成之 Web Base 指標與預警系統首頁：



此頁面左方顯示本系統所有子系統之功能，其中共包含了八個子鏈結，第一個為本計畫的研究成員簡介，亦為本系統預設首頁；第二個為抗藥性查詢頁面；第三個為匯入 Excel 檔頁面，主要功能為將 Excel 的資料匯入資料庫中；第四個為手動輸入單筆資料進入資料庫中；第五個為預警系統頁面；第六個為 MLST 序列比對頁面；第七個為 MLST 代號查詢頁面；第八個為流行病學資料頁面。以下將依序針對每一個子系統做介紹：

(1) 抗藥性查詢頁面

院內感染指標與預警系統
National Cheng Kung University Hospital

查詢收集日期：2008 年 11 月 19 日 至 2008 年 11 月 19 日
欲檢視的菌株名稱：Acinetobacter baumannii
列出前 20 筆資料

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗藥性	AC	AM	AMC	AN	ATM	AZ	C	CAZ	OC	CEC	CLR	CF	CFM	CFP	CID				
表現值																			

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗藥性	CIP	CPD	CMX	CMZ	CR	CRO	CTX	CTM	CXM	E	FA	FEP	FLO	FOM	FOX				
表現值																			

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗藥性	OAR	ON	IPM	LPX	LOM	LVX	LZD	MA	MET	MEM	MI	MOX	NET	NN	OFX				
表現值																			

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗藥性	OX	F	FA	FEF	FP	RA	S	SAM	SXT	TE	TBC	TIM	TZF	VA	AmphotericinB				
表現值																			

在這個查詢頁面中，可以輸入欲查詢的抗藥型表現值，然後按送出來查詢。每一個抗藥型的表現值為下拉式選單，可以選其為 R、I、或 S。若欲輸入並使用該抗藥性來做查詢，務必得勾選該抗藥性上方的「是否使用」選取盒；「是否使用」選取盒沒勾選之抗藥性，系統將會忽略該抗藥性，而不使用該抗藥性來做查詢條件。

我們希望能夠查詢某特定期間以及某特定菌名之抗藥性表現資料，所以我們在頁面中加入了收集日期期間限制，並動態列出目前資料庫中所有菌株名稱以提供使用者選取。另外由於查詢出來的資料筆數可能極多，所以我們加入了只列出查詢結果的前 n 筆資料的功能，預設值為 20。輸入完畢之後按下「送出」來查詢。

查詢結果頁面

假設我們輸入欲查詢的內容如下：

今天 2004年11月18日(星期四) 農曆 10月 1日

院內感染指標與預警系統

National Cheng Kung University Hospital

欲檢視的菌株名稱：

列出前 筆資料

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗菌性	AC	AM	AMC	AN	ATM	AZ	C	CAZ	OC	CEC	CLR	CF	CFM	CFP	CID
表現值	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗菌性	CIP	CPD	CMX	CMZ	CR	CRO	CTX	CTM	CXM	E	FA	FEP	FLO	FOM	FOX
表現值	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗菌性	GAR	GN	IPM	LFX	LDM	LVX	LZD	MA	MET	MEM	MI	MOX	NET	NN	OFX
表現值	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

是否使用	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
抗菌性	OX	F	PA	PEP	PIP	RA	S	SAM	SXT	TE	TBC	TIM	TZP	VA	AmphotericinB
表現值	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

最後更新日期：
11/18/2004 13:47:38
建議瀏覽器版本：1024*768

則查詢結果的顯示如下：

今天 2004年11月18日(星期四) 農曆 10月 1日

院內感染指標與預警系統

National Cheng Kung University Hospital

您輸入的資料
所查詢菌名：Klebsiella pneumoniae

抗菌性	AM	AN	CF	FOX	GN	NN	PIP	SAM	TZP
表現值	R	S	R	R	S	S	R	R	R

查詢結果

RANK	檢體編號	收集日期	AM	AN	CF	FOX	GN	NN	PIP	SAM	TZP
1	1123	1999-01-06	R	S	R	R	S	S	R	R	R
2	801	1999-06-12	R	S	R	R	S	R	R	R	R
3	4027	2002-03-16	R	S	R	R	I	R	R	R	R
3	2184	2000-05-03	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	2150	2000-05-02	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	v124	2000-05-02	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1875	2000-04-29	R	S	R	R	I	R	R	R	R
3	4205	2000-03-13	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	4537	2000-02-29	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	4436	2000-02-28	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	4332	2000-02-26	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	6317	2000-02-15	R	S	R	I	S	I	R	R	R
3	6044	2000-02-11	R	S	R	R	R	R	R	R	R

最後更新日期：
11/18/2004 13:47:38
建議瀏覽器版本：1024*768

此頁面上方顯示先前所輸入欲查詢的菌株之條件，包含菌株名稱及抗藥性表現值。而下方則為系統由資料庫中查詢出來之結果，並依照相似度 RANK 來排列，這裡只列出菌株的基本資料，這可以避免頁面顯得過於凌亂，其中包括檢體編號、收集日期及其抗藥性表現值。當有兩筆資料排名相同時，兩者的 RANK 值會一樣，因此在圖中可以見到有多筆資料的 RANK 都為 2。

由於本頁面只列出了基本資料，所以我們為每筆資料提供了一個鍊結，若欲察看詳細的菌株資料，可點選該菌株之「檢體編號」中的鍊結便會彈出一個新視窗顯示完整的菌株資料。

菌株詳細資料頁面

收集號	檢體編號	病歷號碼	收集日期	姓名	性別	出生日期	病床號	來源	菌名										
99kp-24	i123	01397015	1999-01-06	黃陳玉	F	1920-10-16	3M211	1	Klebsiella pneumoniae										
抗藥性表現																			
AC	AM	AMC	AN	ATM	AZ	C	CAZ	CC	CBC	CLR	CF	CFM	CFP	CID	CIP	CPD	CMX	CMZ	CR
-	-	-	R	R	-	R	R	-	-	-	-	S	S	S	R	R	R	-	R
CRO	CTX	CTM	CXM	E	FA	FEP	FLO	FOM	FOX	GAR	GN	IPM	LPX	LOM	LVX	LZD	MA	MET	MEM
S	-	-	R	R	S	R	-	R	-	-	R	-	I	-	R	R	-	R	-
MI	MOX	NET	NN	OFX	OX	P	PA	PEF	PIP	RA	S	SAM	SXT	TE	TEC	TIM	T2P	VA	AmphotericinB
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluconazole		Fluorocytosin		Itraconazole		Streptomycin		Isoniazid		Rifampin		Ethambutol							
-		-		-		-		-		-		-							
關閉視窗																			

此頁面為所選取的資料之詳細內容。另外本頁面「病歷號碼」中的鍊結可顯示此病歷號碼的流行病學資料，其結果如下圖所示：



(2) 匯入 Excel 檔頁面



利用瀏覽選取電腦中所欲匯入的 Excel 檔後按「提交」即可。

要注意的是，所匯入的 Excel 檔中，第一列必須明白列出欄位的值，

例如：收集號，病歷號碼以及所用到的抗藥型等等，並至少必須存在以下的欄位：收集號、檢體編號、病歷號碼、收集日期、檢體別、姓名、性別、出生日期、病床號、來源、菌名。不一定要照順序排列，且除了病歷號碼，收集號，收集日期三個欄位每一筆資料必須有值以外，其他的欄位可以為空白。

至於抗藥型，除了第一列必須明白指出所用的抗藥型（如：AM）以外，所有的抗藥型必須放在其他非抗藥型欄位的後面。至於是否記錄每一種抗藥型則沒有限制。

(3) 加入單筆資料頁面

該連結為手動輸入單筆的資料進入資料庫中。基本頁面為：

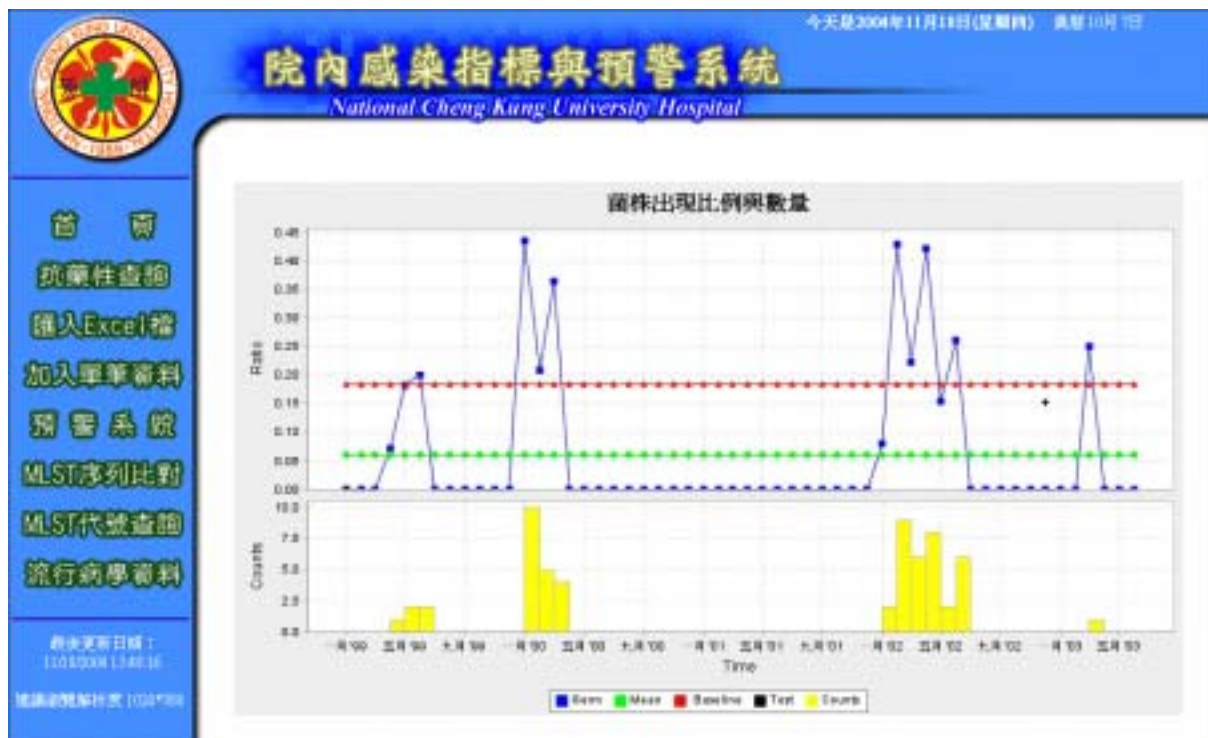
填寫完畢送出即可將該筆資料存入資料庫中。

(4) 預警系統頁面



(因頁面過長所以用兩個圖來顯示完整介面)

挑選菌名為 *Klebsiella pneumoniae*、病房位置為 3S、抗藥性 CAZ=R，FOX=R，得到的分佈結果如下圖所示：



根據我們建立的 Baseline，若有菌株的出現比例超過 Baseline，代表有出現 Outbreak 的可能性，以此作為預警或在臨床上的密切觀察。圖中紅色線即為臨界指標 Baseline，綠色線為菌株出現比例的平均值，藍色曲線為每月菌株出現的比例，下面的長條圖代表菌株每月出現的數目，黑色點則是使用者限制於一段時間內具某些抗藥性菌株出現的比例，用來觀察檢測此段時間內是否有 Outbreak 的危機。

(5) MLST 序列比對頁面



在此頁面輸入欲比對的 MLST 序列後按「送出查詢」即可，下圖顯示一個比對 *adh* 基因 Allele 2 序列之結果範例：



在此頁面中可以看到其 MLST 序列比對結果，比對執行結果會依匹配 (matching) 程度高低列出相似的基因，並顯示其序列排比 (alignment) 結果，此例中即正確比對出「*adh* Allele 2」序列具最高 Score，*adh* 基因的其餘 Allele 序列 Score 稍低，至於其他的基因序列之 Score 則非常低。所以若新分離出來之菌株為一新基因型時，便可藉由此序列比對系統，分析與過去出現過之基因型之關係，瞭解其可能為何流行菌株演化出來之菌株。

(6) MLST 代號查詢頁面

院內感染指標與預警系統
National Cheng Kung University Hospital

今天是2004年11月18日(星期四) 農曆10月 7日

欲查詢的MLST代號: 233425 送出查詢

檢體編號	菌株號碼	收集日期	病序號	區名	AC	AM	AMC	AN	ATM	AZ	C	CAZ	CC	CEC	CLR	CF	CFM	CFF	CID	CIP	CPD	CMX	CMZ	CR	CRO	CTX	C
------	------	------	-----	----	----	----	-----	----	-----	----	---	-----	----	-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----	-----	-----	---

最後更新日期: 11/18/2004 13:40:16
總機電話: 1030*200

在此頁面中可以查詢具有各 MLST 代號之菌株資料，頁面會動態列出目前資料庫中所有 MLST 代號以供使用者選取，選取欲查詢的 MLST 代號後按「送出查詢」即可，下圖顯示一個查詢 MLST 代號為「233425」之結果範例：

今天是2004年11月18日(星期四) 農曆10月12

院內感染指標與預警系統

National Cheng Kung University Hospital

檢查詢的MLST代號:

檢體編號	病例號碼	收集日期	病床號	菌名	AC	AM	AMC	AN	ATM	AZ	C	CAZ	CC	CBC	CLR	CF	CFM	CFP	CID	CIP	CP
4524	07197475	1999-04-29		Escherichia coli	-	R	-	R	I	-	-	S	-	-	-	R	R	-	-	R	-
4563	07333754	1999-10-08	3s205	Escherichia coli	-	R	S	S	-	-	-	S	-	-	-	R	-	R	-	R	R
4117	05235155	1999-11-20	10A13A	Escherichia coli	-	R	-	S	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R
4343	07879649	2000-06-27	3s107	Escherichia coli	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-
2882	05141719	2001-05-07	06B53C	Escherichia coli	-	R	-	S	I	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
4911	07880747	2000-08-08	08B39A	Klebsiella oxytoca	-	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R
4108	01397015	1999-01-06	3M211	Klebsiella pneumoniae	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-
6002	02664008	1999-03-07	10B49C	Klebsiella	-	R	-	S	R	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	R	-

另外我們為每筆資料提供了一個鍊結，若欲察看更詳細的菌株資料，可點選該菌株之「檢體編號」中的鍊結便會彈出一個新視窗顯示完整的菌株資料，其頁面及其更詳細資料與「抗藥性查詢結果頁面」中的「菌株詳細資料頁面」相同。

(7) 流行病學資料頁面

今天是2004年11月18日(星期四) 農曆10月12日

院內感染指標與預警系統

National Cheng Kung University Hospital

首頁

抗藥性查詢

匯入Excel檔

加入單筆資料

預警系統

MLST序列比對

MLST代號查詢

流行病學資料

最新更新日期: 11/18/2004 13:48:16
維護說明書詳見: 10327308

病歷號碼 姓名 性別 男 女

出生日期 年 月 日 (yyyy/MM/DD)

Location of Infection

Foci of infection

APACHE score

Instrumentation

Comorbid conditions

Prior antibiotic use

Treatment

Treatment Result

Outcome

提供輸入流行病學資料的一個介面，包含病人的基本資料及臨床醫學資料如 Location of Infection、Foci of Infection、APACHE score、Instrumentation、Comorbid conditions、Prior antibiotic use、Treatment、Result of Treatment、Outcome。

(六) 資料庫功能之增強

具有基因序列類比功能之基因資料庫已完成建構，可透過 MLST 中之任一標的基因序列比對，收尋出可能造成群聚感染菌株，以便進行進一步流行病學調查。另外，亦可透過 MLST 分型結果比對，收尋出可能造成群聚感染之菌株。

四、討論

本研究計畫主要目的，在建立一套以臨床微生物實驗室為中心之指標與預警系統，建構一具搜尋與基因比對功能之基因與流行病學資料庫，以監控醫院多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌的散佈，及早偵測 outbreak 之發生。計畫的重點之一，在建立一套快速且區分鑑別能力良好、操作容易的菌株分型技術，配合基因資料庫的建立，能夠即時分析是否有 outbreak 的可能性。在計畫中，我們發展的菌株分型技術為 MLST，其原理主要是利用 PCR，將一些具多形性的 structural 基因放大，比較這些基因在不同菌株之間的差異而將菌株分型。MLST 已被運用在如 *Neisseria meningitidis*，*Enterococcus* spp.，*Staphylococcus aureus*，*Streptococcus pyogenes*，*Streptococcus pneumoniae* 等菌種之菌株分型，其分型效果甚至比這些菌種之標準分型方法佳。

在去年度的計畫中，我們發現 MLST 在大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌的分型能力，不及 PFGE。在今年度的計畫中，重點之一，在探討 MLST 是否適合運用在綠膿桿菌菌株分型。由於由於文獻上尚未出現這類的報告，因此，我們使用用在大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌 MLST 菌株分型的 6 個 structural genes，再從已發表之綠膿桿菌 PA01 之全序列，另外再找 8 個 structural genes 作為標的基因，以作多形性基因篩選，篩選出具多形性之基因區域。結果我們選用的標的基因並不具有明顯的多形性，在 14 個標的基因中，有 7 個標的基因僅出現一種 allele 型，6 個標的基因僅出現兩種 allele 型，1 個標的基因出現三種 allele 型。總和 MLST 分型結果，13 種 PFGE 型亦僅能分成 7 種 MLST 型，顯示在綠膿桿菌的分型能力，仍然不及 PFGE。就操作的方法與步驟而言，PFGE 的處理步驟繁瑣、費時、需要非常標準化的步驟及電腦分析軟體，方可得到一致性的結果，此法並不十分有利於長

期的監控研究。MLST 的優點，則包括方法快速、步驟簡易；結果容易判讀與比對。配合上基因資料庫的建立，有利於日後搜尋、長期的監控，並可進行不同地區、不同實驗室之結果比對，便於流行菌株之追蹤。其最大缺點，除了分型效果較差外，價格昂貴為另一主要問題。因此，MLST 法似乎可作為 PFGE 的輔助分型工具，作為快速菌株分型篩選工具，減少需要進行 PFGE 的情況。另外，亦可再嘗試其他 structural 基因，找出變異性更大的基因標的，以改善 MLST 的分型能力，屆時或許便可替代 PFGE，或再進一步減少需要進行 PFGE 或感染管制措施的情況。

本研究計畫建立的以臨床微生物實驗室為中心之指標與預警系統，希望在電腦系統的輔助下，可及早發現院內多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌爆發的群聚感染。在此計畫中，我們發現，當同一種抗藥型菌株出現的比率超過兩個標準差時，皆可確認為院內群聚感染。然而，這些爆發的群聚感染已經發生一段時間了，此時再介入感控措施，僅能防止此群聚感染的持續發生，並不能提早偵測其發生。因此，兩個標準差僅能當作群聚感染發生的指標。要能提早偵測其發生，可由此系統菌株資料庫的建立達成目的。當監控預警系統顯示同一種抗藥型菌株在同一時期出現，或由趨勢圖上發現其數目或比率與過去一段時期比較有上升趨勢時，此時可立即由菌株資料庫調出這一時期這一種抗藥型菌株的基本資料，藉此分析這些菌株是否可能具有流行病學上的關聯性。當可能性存在時，可藉由分子流行病學的研究，確立其菌株間之親緣關係。當分子流行病學研究亦建立其關係時，可進一步進入院內感染調查，以預防群聚感染的大型爆發。因此，此時的指標，主要是同一時期，是否出現某種具關聯性的菌株。此系統的最當優點，在於有電腦的輔助，可在短時間內，監控各種不同抗藥型組合的菌株，可節省人力、時間，並提高偵測的敏感度。

多重抗藥菌株常會發生潛在性的院內群聚感染，不易被偵測出來。本研究中發現產生 CMY-2 的克雷氏肺炎桿菌爆發之院內群聚感染即為一潛在性的院內群聚感染。本研究開發之監測預警系統的優點之一，便是可輕易的偵測出這種潛在性的院內群聚感染。藉由輸入 CMY-2 引起的抗藥表現型，對 ceftazidime 與 cefoxitin 具抗藥性，我們便可偵測到此潛在性的院內群聚感染。因此，本系統應用在臨床，應可降低潛在性院內群聚感染的發生，進一步降低多重抗藥菌株的盛行率。此兼具資料儲存與監控功能的系統，是否能達到預期的效果，須進一步進行前瞻性的研究，與現有人為的監測方式比較，以測試此系統偵測 outbreak 與預測抗藥菌株盛行率變化趨勢的能力。另外，此系統亦可進一步改良，使其能自動將每日臨床微生物實驗室分離菌株的資料儲存，並與資料庫原有的資料進行比對，減少人力的耗費，達到及時監控的目標。亦可再加以擴充，作為全國性長期性地監控抗藥菌株流行之用途，最終達到減少抗藥菌株擴散的目的。此資料庫儲存之資料，並可作為日後大規模臨床與流行病學研究之基礎。

五、結論與建議

1. 本研究計畫建立了一套以臨床微生物實驗室為中心之指標與預警系統，建構一具搜尋與基因比對功能之基因與流行病學資料庫，以監控醫院多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌的散佈。
2. 本研究計畫發展出一套方法快速、步驟簡易的 MLST 菌株分型技術。
3. MLST 在綠膿桿菌的分型能力，雖不及 PFGE，然而，MLST 法可作為 PFGE 的輔助分型工具。
4. 本電腦系統輔助的監控預警系統可用以偵測已發生及提早偵測可能發生的院內群聚感染。以兩個標準差作為指標，可偵測發生中的院內群聚感染；加上菌株資料庫的運用，發現同一時期同一區域出現某種抗藥型菌株或此種菌株出現比率有上升趨勢時，便應警覺有院內群聚感染的發生。
5. 本監控預警系統可偵測到一些潛在性的院內群聚感染發生。實際應用時，應可降低潛在性院內群聚感染發生率，進一步降低多重抗藥菌株的盛行率。
6. 進一步進行回顧性與前瞻性的研究，與現有人為的監測方式比較，以測試此系統偵測 outbreak 與預測抗藥菌株盛行率變化趨勢的能力。
7. 進一步改良系統，使其能自動化，以監控各種不同抗藥機轉引起之抗藥菌株，減少人力的耗費，並達到及時監控的目標。
8. 可將系統擴充，作為全國性長期性地監控抗藥菌株流行之用途。

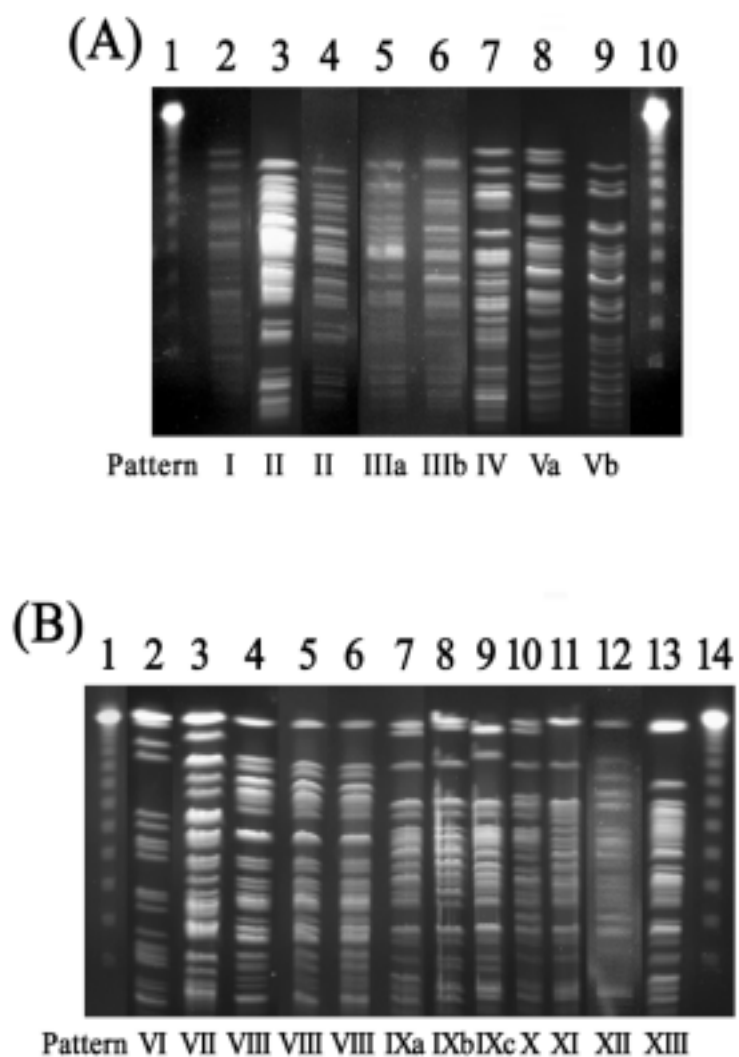
六、參考文獻

1. Nordmann P. 1998. Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. Clin Infect Dis 1998;27 (Suppl. 1):S100-S106.
2. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis. 2001;30:473-478.
3. Schiappa DA, Hayden MK, Matushek MG, et al. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation. J Infect Dis 1996;174:529-536.
4. Zaza S, Jarvis WR. 1999. Investigation of outbreaks, p. 105-114. In Mayhall CG (ed.). Hospital epidemiology and infection control, Williams & Wilkins, Baltimore.
5. McGowan JE, Jr., Metchock BG. 1999. Infection control epidemiology and clinical microbiology, p. 107-115. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ed.), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
6. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla_{IMP-8}* in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol 2001;39:4433-4439.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.
8. Arbeit RD. 1999. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 116-137. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ed.), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
9. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a probable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:3140-5.
10. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 2002;40:1963-71.
11. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of

- Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2002;38:1008-15.
12. Tzanakaki G, Urwin R, Musilek M, Kriz, et al. Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. J Clin Microbiol 2001;39:1235-40.
 13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.
 14. Needleman SB, Wunch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J Mol Biol 1970;48:443-53.
 15. Smith TF, Waterman MS, Fitch WM. Identification of common molecular subsequences. J Mol Biol 1981;147:195-7.
 16. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403-10.
 17. Williams HE, Zobel J. Indexing Nucleotide Databases for Fast Query Evaluation. Proc. International Conference on Advances in Database Technology (EDBT), pp. 275-288, Avignon, France, 1996.
 18. 嚴國何, "An Index For Fast Accessing DNA Sequences." 國立成功大學資訊工程研究所碩士論文, 2000.
 19. Noller AC, McEllistrem MC, Stine OC, Morris JG, Jr., Boxrud DJ, Dixon B, and Harrison LH. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2003;41:675-679.
 20. Adiri RS, Gophna U, and Ron EZ. Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. FEMS Microbiol Lett 2003;222:199-203.
 21. RON. B. SCHIFMAN, ROBERTA A. PALMER. Surveillance of Nosocomial Infections by Computer Analysis of Positive Culture Rates. Journal of CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1985.
 22. Joseph M. Analysis of Infection Control Surveillance Data in a Long-term-care Facility: Use of Threshold Testing. Infect. Control Vol 17 No.2, 1996.
 23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – Fourteenth Informational Supplement: Approved standard M100-S14. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory

- Standards; 2004.
24. Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal H, Saribas S, Tansel O, Coşkun F. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* 1998;36:827-9.
 25. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Jin YT, Wu JJ. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2000;38:4320-5.
 26. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:839-52.
 27. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990;18:294-8.
 28. Matthew M, Harris M, Marshall MJ, Rose GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975;88:169-78.
 29. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.

七、圖表



圖一、PFGE of *Xba*I-digested genomic DNA of 20 *P. aeruginosa* isolates. Numbers designating PFGE profiles are shown below the gels. (A) Lanes 1 and 10, a lambda ladder; lanes 2 to 9, isolates 195/96, 38-59/91, 44-67/92, 4-16/89, 39-69/91, 32-52/91, 176/96, and 178/96. (B) Lanes 1 and 14, a lambda ladder; lanes 2 to 13, isolates 29-1/91, 611/00, 956/00, 1110/00, 106/01, 1390/00, 87/02, 444/02, 103/02, 312/02, 181/96, and 195/01.

圖二、綠膿桿菌 MLST 各 allele 序列

基因：*arcA*

allele 1:

TGAACCAGGCCAAGCGCGACCACTTCGACTTCGTACCAAGATGCGCGAGCGCG
GCATCGACGTCCTCGAGATGCACAATCTGCTGACCGAGACCATCCAGAACCCGGA
AGCGCTGAAGTGGATCCTCGATCGCAAGATCACCGCCGACAGCGTCGGCCTGGG
CCTGACCAGCGAGCTGCGCTCCTGGCTGGAGAGCCTGGAGCCGCGCAAGCTGGC
CGAGTACCTGATCGGCGGCGTCGCCGCTGACGACCTGCCCGCCAGCGAAGGCGC
CAACATCCTCAAGATGTACCGCGAGTACCTGGGCCATTCCAGCTTCCTGCTGCCG
CCGTTGCCGAACACCCAGTTCACCCGCGACACCACTTGCTGGATCTACGGCGGCG
TGACCCTGAACCCGATGTACTGGCCGGCGCGACGACAGGAAACCTGCTGACCA
CCGCCATCTACAAGTTCACCCCGAGTTCGCCAACGCCGAGTTCGAGATCTGGTA
CGGCGACCCGACAAAGGACCACGGCTCCTCGACCCTGGAAGGCGGCGACGTGAT
GCCGATCGGCAAC

allele 2:

TGAACCAGGCCAAGCGCGACCACTTCGACTTCGTACCAAGATGCGCGAGCGCGG
CATCGACGTCCTCGAGATGCACAATCTGCTGACCGAGACCATCCAGAACCCGGA
GCGCTGAAGTGGATCCTCGATCGCAAGATCACCGCCGACAGCGTCGGCCTGGGCC
TGACCAGCGAGCTGCGCTCCTGGCTGGAGAGCCTGGAGCCGCGCAAGCTGGCCG
AGTACCTGATCGGCGGCGTCGCCGCTGACGACCTGCCCGCCAGCGAAGGCGCCAA
CATCCTCAAGATGTACCGCGAGTACCTGGGCCATTCCAGCTTCCTGCTGCGGCCGT
TGCCGAACACCCAGTTCACCCGCGACACCACTTGCTGGATCTACGGCGGCGTGAC
CCTGAACCCGATGTACTGGCCGGCGCGACGACAGGAAACCTGCTGACCACCGCC
ATCTACAAGTTCACCCCGAGTTCGCCAACGCCGAGTTCGAGATCTGGTACGGCG
ACCCGGACAAGGACCACGGCTCCTCGACCCTGGAAGGCGGCGACGTGATGCCGAT
C

基因：*aroE*

allele 1:

AATGTCACCGTGCCGTTCAAGGAAGAGGCCTATCGTCTGGTGGACGAGTTGAGCG
AGCGGGCCACCCGGGCCGGGGCGGTGAACACCCTGATCCGCCTCGCCGACGGTC
GCCTGCGCGGGCGACAACACCGACGGCGCCGGCCTGCTGCGGGACCTGACGGCGA
ACGCCGGGGTCGAGCTGCGCGGCAAGCGGGTTCTCCTGCTCGGCCGCCGGCGGTGC
GGTGCCTGGGGTGCTCGAACCTTCCTCGGCGAGTGCCCGGGCGGAGTTGCTGATC
GCCAACCGCACGGCGCGGAAGGCCGTGGACCTGGCCGAGCGGTTCCGCCGACCTC
GGCGCGGTGCACGGCTGCGGTTTCGCCGAGGTCGAAGGGCCTTTCGACCTGATCG
TCAACGGCACCTCGGCCAGTCTTGCCGGCGACGTGCCCGCCGCTGGCGCAGAGCGT
GATCGAGCCCGGCCGTACCGTCTGCTACGACATGATGTATGCCAAGGAACCGACT
GCCTTCAACCGCTGGGCCGCCGAACGCGGTGCGGCGCGTACCCTGGATGGCCTGG
GCATGCTGGTGGAGCAGGCCGCCGAGGCATTCTCCTCTGGCGCGGCGTGCGTCC

TGCCTCGGCGCCAGTGTTGGAGACGCTGCGCCGACAGTTGGCAACTGTCTGAGTT
G

allele 2:

AATGTCACCGTGCCGTTCAAGGAAGAGGCCTATCGTCTGGTGGACGAGTAGAGCG
AGCGGGCCACCCGGGCCGGGGCGGTGAACACCCTGATCCGCCTCGCCGACGGTC
GCCTGCGCGGGCGACAACACCGACGGCGCCGGCCTGCTGCGGGACCTGACGGCGA
ACGCCGGGGTTCGAGCTGCGCGGCAAGCGGGTTCCTGCTCGGCCGCCGGCGGTGC
GGTGCCTGGGGTGTCTCGAACCTTCCTCGGCGAGTGCCCGGGCGGAGTTGCTGATC
GCCAACCGCACGGCGCGGAAGGCCGTGGACCTGGCCGAGCGGTTTCGCCGACCTC
GGCGCGGTGCACGGCTGCGGTTTCGCCGAGGTCGAAGGGCCTTTCGACCTGATCG
TCAACGGCACCTCGGCCAGTCTTGCCGGCGACGTGCCGCCGCTGGCGCAGAGCGT
GATCGAGCCCGGCCGTACCGTCTGCTACGACATGATGTATGCCAAGGAACCGACTG
CCTTCAACCGCTGGGCCGCCGAACGCGGTGCGGCCGCTACCCTGGATGGCCTGGG
CATGCTGGTGGAGCAGGCCGCCGAGGCATTCTTCCTCTGGCGCGGCCGTGCGTCCT
GCCTCGGCGCCAGTGTTGGAGACGCTGCGCCGACAGTTGGCAACTGTCTGAGTTG

基因：*dnaE*

allele 1:

TTGACCTTGCGGTGGTTGGCGTAGACATCCGCCTCCGGCTCGGCGAAGACTCCGC
CGAACAGGTCCATGTGCCCGCTGTCTGGTGGTGGCGCGGTTGAGGTCGACGGTAGCC
TGGTAGGCCTTTAGCTCGTCGTGGTAGTGCGGCCCCAGGCGATCCAGCGCACCCGG
CGCGGATCAGCGCTTCCAGGGTGCCTTGTGATGCGTTTCAGGTCGACGCGGTC
GCAGAAGTCGAACAGGGTGTGAACGGCCCCGCCTTCGGCGCGGCATTCCGGTGATC
GCCTCCACCGGCCCTCGCCGACGCCCTTGATCGCGCCCAGGCCATAGACGATCC
GGCCATCGTCGTCGACGGTGAAGCGGAACCTCGGAGTTGTTACGTCCGGCGCCAC
GATGCGCAGCTTCATGTGCCGGCATTCTTCGATCAGCGTCACCACCTTGTCCGGTGT
TCTGCATATCCGCGGTGAGTACCGCGGCCATGAACGGCGCCGGGAAGTGGGTCTT
CAGCCAGGCGGTCTGGTAGGAGACCAGGCCGTAGGCTGCCGAGTGCGACTTGTT
GAAGCCGTAGCCGGCGAATTTTTCCACCAGGTCGAAGATGTTGCCCGCGAGGTGCG
GCATCGATGCCGTTGTTCTTGCAACCCTCGATGAAACCGCCGCGCTGCTTGGCCA
TTTCCTCGGGCTTCTT

基因：*adk*

allele 1:

GGCGATGCTGTGGTATTTCCGGGGTGCCTTCGGCGGCCGACAGCTTCTGGTAGAAG
TCGACCAGCGGCTTGGTCTGCGAATGGTAGACCGACAGGCGGTGACGCACGGTCT
CTTCCTTGTCTGCTCCTCGCGCTGGATCAGCTCTTCGCCGGTAACGTCTCCTTGCCG
GCGACCTTCGGCGGGTGTGCTCGGTGTGGTACACGCGGCCGGAGGCCGGATGCA
CGCGACGACCGGCGATAACGCGACACGATCTCCTCGTCGTCGACGGCGATCTCGAC
CACATGGTTCGATGGTACGCCGGCGTCTTCAGCGCTTCGGCCTGCGGGATGGTC
CGCGGGAAGCCGTCGAACAGGAAGCCCTTGGCGCAATCGGCCTCGGTGATGCGT

TCCTTGATCAGGGCGATGATGATGTCGTCGGATACCAGGCCGCGCTGTCCATCA
CGCCTTTCACCTGCTGGCCGAGCGGGCTGCCGGCCTTGACTGCGGCCGCGCAGCAT
GTCGCCGGTGGAGATCTGCGGAATGCCGAATTCTCGGTGATGAACCG

基因：*gdhA*

allele 1:

GTGCAGCTTGGTATCCACCTCGCCCTCGCTCCAACGCAGGCGCATGGCGTTCTGC
GACATCTCCAGGCCGCTCACCGCCACCCCGCCGGCGTTCGACGCCTTGCCCGGCG
CGTAGAGGATGCCGGCCTCGAGGAACAGGTCGACGGCTTCCAGGGTCGAGGGCA
TGTTGGCGCCTTCGGCGACACAGACGCAGCCGTTGGCCAGCAGGCGCCGCGCATC
CTCGGCATCCAGTTCGTTCTGGGTGCGCGAGGGCAGCGCGATATCGCAGGCCAGG
CCCCAGGGCCGCGCCCTTCGAGAAACTGCAGGGAAACTGCTCCGCCATCTCGC
GGATGCGCCCGCGGCGCACGTTCTTCAGCTCCATCAGGTATTCCCACTGCTCGTC
GGAGAGCCCCGCCTCGGCATACAGGGTGCCTTCGGAATCGGACAGCGAGATCAC
CTTGCCGCCCATTTCCATGACCTTGCGCGCCGCGTACTGGGCGACGTTGCCCGAG
CCGGAGATCGCCACCCGCTGGCCGTCGAAGCCGCGGCCACGATCCTTGAGCATTT
CCTGGGCGAAGTAGACGCAGCCGAAGCCGGTTCGCCTCCGGGCGGATCAGGCTGC
CGCCATAGCTCAGGCCCTTGCCGGTCAGCACCGAGGTGAACTGGTTGGACAGGGC
CTTGTACTGGCCGAACAGGTAGCCGATCTCACG

allele 2:

GTGCAGCTTGGTATCCACCTCGCCCTCGCTCCAACGCAGGCGCATGGCGTTCTGCG
ACATCTCCAGGCCGCTCACCGCCACCCCGCCGGCGTTCGACGCCTTGCCCGGCGC
GTAGAGGATGCCGGCCTCGAGGAACAGGTCGACGGCTTCCAGGGTCGAGGGCAT
GTTGGCGCCTTCGGCGACACAGACGCAGCCGTTGGCCAGCAGGCGCCGCGCATCC
TCGGCATCCAGATCGTTCTGGGTGCGCGAGGGCAGCGCGATATCGCAGGCCAGGC
CCCAGGGCCGCGCCCTTCGAGAAACTGCAGGGAAACTGCTCCGCCATCTCGCG
GATGCGCCCGCGGCGCACGTTCTTCAGCTCCATCAGGTATTCCCACTGCTCGTCGG
AGAGCCCCGCCTCGGCATACAGGGTGCCTTCGGAATCGGACAGCGAGATCACCTT
GCCGCCCATTTCCATGACCTTGCGCGCCGCGTACTGGGCGACGTTGCCCGAGCCG
GAGATCGCCACCCGCTGGCCGTCGAAGCCGCGGCCACGATCCTTGAGCATTTCTT
GGGCGAAGTAGACGCAGCCGAAGCCGGTTCGCCTCCGGGCGGATCAGGCTGCCGC
CATAGCTCAGGCCCTTGCCGGTCAGCACCGAGGTGAACTGGTTGGACAGGGCGCTT
GTACTGGCCGAACAGGTAGCCGATCTCACG

基因：*gcl*

Allele 1:

TGGTGCTGCTGCATCAGTTCGCGGGCCTTGGCCAGGGCGGCGCCGATCTCGTTCCG
GGTCGAACACCCGGATCGCCTTGCAGCCCAGGCCCTCGACCACCGCGACGTGGTC
GACGCCGTAGCCTTCCAGCTCGGGGGCGTTGATGTTGTCGAAGGCCAGCTGCACG
CAATAGTCCATGTCGAAGCCGCGCTGCGCCTGGCGGATCAGGCCAGGTAGGAG
TTGTTACCAGTACGTGGATATAGGGCAGCTTGAAGTGCGCGCCGACCGCCAGTT
CCTCGATCATGAACTGGAAGTCGTAGTCGCCGGAGAGCGCCACCACCTGGCGGCT

CGGGTCGGCCTTGACCACTCCCAGCGCGGGCGGGAATGGTCCAGCCCAGCGGGCC
GGCCTGGCCGCAAGTTGATCCAGTGGCGCGGCTGGTAGACATGGAGGAACTGTGC
GCCGGCGATCTGCGACAGGCCGATGGTGCTGACGTAGCAGGCATCCTTGCCGAA
GAACTCGTTTTCATCTCTTCGTAGACGCGCTGCGGTTTCACCGGCACGTTGTCGAAGT
GGGTCTTGCGCTGCAGCGTGCCTTTCGCGCTGCTGGCAGCTTTCAGCCAGGCCGGC
GCGCGACTTCAGCTTGCCGGCGGCCTTCCACTCGCGGGCCACTTCGAGGAATGCG
TCGAGGGCGGGCGCCGGCGTTCGGAGACGATGCCAGGTCGGGCATGAACACCCGG
CCGATCTGGGTTCGGTTCGATGTCGACATGGATGAAGCGGCGACCTTCGGTATAGAC
CTCGACGC

基因：*prlC*

Allele 1:

ACGTGGCCCAGAAAACCATCCTCGAACACGCCCTGCGCGACTTCCGCCTGTCCGG
CATCGACTTGCCGGCGGACAAGCAGAAGCGCTATGCCGAGGTGCAGTCGCGCCT
GTCCGAGCTGGGTAGCCGTTTCTCCAACCAGCTGCTCGACGCCACCCAGGCCTGG
ACCAAGCATGTCACCGACGAAGCCGCGCTGGCCGGCCTGACCGATTTCGGCCAAG
GCCAGATGAAGCAGGCCGCGGAGGCCAAGGGCCTGGACGGCTGGCTGATCAGC
CTGGAGTTCCCCAGCTACTACGCAGTGATGACCTATGCCGATGACCGCGCCCTGC
GCGAAGAGGTATACGCCGCCTACTGCACCCGCGCCTCCGACCAGGGCCCCGAACG
CCGGGCAGAACGACAACGGTCCGGTGATGGAAGAGATCCTCGACTTGCGCCAGG
AGCTGGCCGGCCTGCTCGGCTTCGCCAACTACGCCGAGCTGTCGCTGGCGACCAA
GATGGCCGAGTCCAGCGACCAGGTGCTCAGCTTCCCTCCGCGACCTGGCGGTGCGC
AGCAAGCCGTTTCGCCGCCCGCGACCTGGAGCAGCTGCGCGCCTACGCCGCCGAG
CAGGGCTGCACCGAATTGCAGAGCTGGGACGCCGGCTACTACGCCGAGAACTC
CGCGAGGCGCGCTACAGCGTGTCCCAGGAGGCGCTGCGTGCCTACTTCCCGGTGG
ACAAGGTGCTTTCGGCCTGTTTCGCCATCGTCGAGCGCCTCTACGGCATCCAGAT
CCGCGAACTGCACGATTTCGAACGC

Allele 2:

ACGTGGCCCAGAAAACCATCCTCGAACACGCCCTGCGCGACTTCCGCCTGTCCGG
CATCGACTTGCCGGCGGACAAGCAGAAGCGCTATGCCGAGGTGCAGTCGCGCCTG
TCCGAGCTGGGTAGCCGTTTCTCCAACCAGCTGCTCGACGCCACCCAGGCCTGGA
CCAAGCATGTCACCGACGAAGCCGCGCTGGCCGGCCTGACCGATTTCGGCCAAGGC
CCAGATGAAGCAGGCCGCGGAGGCCAAGGGCCTGGACGGCTGGCTGATCAGCCT
GGAGTTCCCCAGCTACTACGCAGTGATGACCTATGCCGATGACCGCGCGCTGCGCG
AAGAGGTATACGCCGCCTACTGCACCCGCGCCTCCGACCAGGGCCCCGAACGCCGG
GCAGAACGACAACGGTCCGGTGATGGAAGAGATCCTCGACTTGCGCCAGGAGCT
GGCCGGCCTGCTCGGCTTCGCCAACTACGCCGAGCTGTCGCTGGCGACCAAGATG
GCCGAGTCCAGCGACCAGGTGCTCAGCTTCCCTCCGCGACCTGGCGGTGCGCAGCA
AGCCGTTTCGCCGCCCGCGACCTGGAGCAGCTGCGCGCCTACGCCGCCGAGCAGG
GCTGCACCGAATTGCAGAGCTGGGACGCCGGCTACTACGCCGAGAACTCCGCGA
GGCGCGCTACAGCGTGTCCCAGGAGGCGCTGCGTGCCTACTTCCCGGTGGACAAG
GTGCTTTCGGCCTGTTTCGCCATCGTCGAGCGCCTCTACGGCATCCAGATCCGCGA
ACTGCACGATTTCGAACGC

基因：*polA*

allele 1:

CTTTCCTGCAGCCAGTTATCCACAGCGACCATGGCGCGCTTCATGATGTCCGCCG
CGGTGCCCTGCATCGGCGCGTTGATCGCGGTGCGCTCGGCGGCCTTGCGCATGGC
ACCGTTCTTCGAATGGATCTCCGGCAGGTACAGGGCAGCGGCCGAACAGGGTTTCG
ACGAAGCCCTGCTCCGCGGCCTGGGCGCGGGTCCGCTCCATGTACGCCAGGACGC
CGGGGTAGCGGGCGAAGTAACGGTCGATGTAGGCCTGGGCCTCCTTGCGCTCGAC
GCCGATCTGCTTGGCCAGGCCGAAGGCGCTCATGCCGTAGATCAATCCGAAGTTG
ATCGCCTTGGCGCTGCGTCGCTGGTCGCCGCTGACGTCTTCCAGCGGCACGCCGA
AGACTTCCGCCGCGGTGGCGCGGTGTACGTCCAGGTCGTGGCGGAAGGCATCCA
GCAGGCCATCGTCCTTGGCCAGGTGGGCCATGATCCGCAGCTCGATCTGCGAGTA
GTCCGCGGCCAATAGCTTGTAGCCCTGCGGCGCGACGAACGCCTGGC GGATGCGC
CGGCCCTCCGCGGTACGGATCGGGATGTTCTGCAGGTTCCGGTTCGCTCGACGACA
GCCGCCCCGGTAGCCGCCACCGCCTGGTGGTATGAGGTATGGATGCGTCCGGTACG
CGGGTTGATCTGCTCGGGCAGGCGGTCCGGTGTAGGTGCTCTTGAGCTTGCTCATG
GAGCGGTACTGCATGATCACCTTGGG

基因：*tal*

allele 1:

TTCTTCCCAAGAACCCACCTGACAAGACCTCGCCATGACTTCGAAGCTGGAACAA
CTCAAGCAATACACCACGGTGGTCGCCGACACCGGCGACTTCGATGCCATTGCC
GCCTGAAGCCGGTGGACGCCACCACCAACCCGTCGCTGCTGCTCAAGGCCGCCGC
CCTGCCGCGCTACGCCGAGCACCTTCGACAGGCTACCGCAGGTAGCGGGCGGCGA
CGCCGGACTGGCTTGCGACCGCTTCGCCGTGGCAGTCGGCAAGGACATCCTCGGA
GTCATTCCCGGACGTATTTCCACCGAAGTCGACGCGCGCCTGTTCGTTTCGACAGCG
AGGCCACCCTCGCCCCGCGCCCACCGCCTGATCGAGCTGTACGACGAACAGGGCAT
CGACCGCGAGCGGGTTCTGATCAAGATCGCCTCCACCTGGGAAGGAATCCGCGCC
GCCGAGATTCTGGAACGCGAGGGCATCCAGACCAACCTGACCCTGCTGTTCTCCT
TCGCCCAGGCGGTGGCCTGCGCCGACGCCGGGGTGTTCCTCATCTCTCCGTTTCGTC
GGGCGCATCTACGACTGGTACAAGAAGAGCGAGAACC GCGACTACGCCGGCGCC
GAGGATCCCGGCGTGCAGTCGGTCTCGCGCATCTATCGCTACTACAAGGCCAACG
GCTACAAGACGGTGGTGTATGGGCGCCAGCTTCCGCAATCTCGGCCAGATCGAGC
AACTGGCCGGCTGCGACCGCCTGACCATCAGTCCCGACCTGCTGCAACA ACTGGC
TGA

allele 2:

TTCTTCCCAAGAACCCACCTGACAAGACCTCGCCATGACTTCGAAGCTGGAACAA
CTCAAGCAATACACCACGGTGGTCGCCGACACCGGCGACTTCGATGCCATTGCC
GCCTGAAGCCGGTGGACGCCACCACCAACCCGTCGCTGCTGCTCAAGGCCGCCGC
CCTGCCGCGCTACGCCGAGCACCTTCGACAGGCTACCGCAGGTAGCGGGCGGCGAC
GCCGGACTGGCTTGCGACCGCTTCGCCGTGGCAGTCGGCAAGGACATCCTCGGAG
TCATTCCCGGACGTATTTCCACCGAAGTCGACGCGCGCCTGTTCGTTTCGACAGCGAG
GCCACCCTCGCCCCGCGCCCACCGCCTGATCGAGCTGTACGACGAACAGGGCATCG

ACCGCGAGCGGGTACTGATCAAGATCGCCTCCACCTGGGAAGGAATCCGCGCCGC
CGAGATTCTGGAACGCGAGGGCATCCAGACCAACCTGACCCTGCTGTTCTCCTTC
GCCCAGGCGGTGGCCTGCGCCGACGCCGGGGTGTTCCTCATCTCTCCGTTTCGTCG
GGCGCATCTACGACTGGTACAAGAAGAGCGAGAACC GCGACTACGCCGGCGCCG
AGGATCCC GCGTGCAGTCGGTCTCGCGCATCTATCGCTACTACAAGGCCAACGGC
TACAAGACGGTGGT GATGGGCGCCAGCTTCCGCAATCTCGGCCAGATCGAGCAAC
TGGCCGGCTGCGACCGCCTGACCATCAGTCCCGACCTGCTGCAACA ACTGGCTGA

基因：*speB2*

CAGCCGCGGATGATTTCCATCGCCTGGATGGTGGTCAGGCCGCCGATTTCCGGGGT
GCCGGTGCCGGGCGCCAGGCCGGGTCGATGCCGTCGATGTCGAAGCTCAGGTAG
ACGGGGCCGCGCCGACCTTCTCGCGGACCTCGGCCATCAGCGGCTCCAGCGACT
TGTGCCAGCACTCCTCGGCCTGCACCACGCGGAAGCCCTGCTTGCGGGCTCCAGTT
GAAGTCTTCGGCGGTGTAGCCCTGGGCGCGCAGGCCGATCTGCACAACACGGTTCG
CAATCCAGCAGGTCTTCTTCCACCGCGCGGGCGGAAGGTGGT GCCGTGGGCGATCT
TCTCGCCGAACATGTGGTCGTTGACGTCGGCGTGGGCGTCGACGTGGACCAGGCC
GACCTTGCCGTGCTTCTTCTTGATCGCGCGGAGGATCGGCAGGGT GATGGTGTGGT
CGCCGCCGAGGGTCAGCGGGAGGATGCCGTGACCGAGGATGCGGTCGTATTCTTG
CTCGATGATGCGCACGGCTTCCAGCAGGTTGAAGGTGTTGATCGCGACGTCGCCG
ATGTCGCCACGTT CAGCGAGTCGAAGGGGGCGGCGCCGGTGGCCATGTTGTAGG
GACGGATCATCAC

基因：*gor*

allele 1:

AACAAGAACCGCGAGATCCAGCGGCTCAACGGGATCTACCGCAACCTGCTGGTG
AACAGCGGGGTGACCTTGCTCGAAGGTCACGCCCGTCTGCTCGATGCGCACAGCG
TCGAGGTGGACGGCCAGCGCTTCAGCGCCAAGCACATTCTCGTCGCCACCGGTGG
CTGGCCGCAGGTGCCGGACATTCCCGGCAAGGAACACGCGATCACCTCCAACGA
AGCGTTCTTCTCGAGCGCCTGCCGCGCCGCGTGCTGGTGGTCGGCGGCGGCTAC
ATCGCCGTCGAATTGCTCGATCTTCAACGGGCTCGGCGCCGAGACCACCTTGC
TCTACCGTCGCGACCTGTTCTGCGCGGCTTCGACCGCAGCGTCCGCGAGCATCT
GCGCGACGAATTGGGCAAGAAGGGCCTGGACCTGCAGTTCAACAGCGACATTGC
CCGTATCGACAAACAGGCCGATGGTAGCCTCGCCGCGACCCTCAAGGACGGCCG
GGTGCTGGAGGCGGACTGCGTGTTCTACGCCACCGGGCGGCGGCCGATGCTGGA
CGACCTGGGCCTGGAACACAGCTGTGAAGCTGACCGACAAGGGCTTCATCGC
GGTCGACGAGCACTACCAGACCAGCGAACCCTCGATACTCGCCCTCGGTGACGTG
ATCGGTCGCGTCCAGTTGACCCCCGTGGCGCTGGCCGAGGGTATGGCGGTGGCAC
GGCGATTGTTCAA

allele 2:

AACAAGAACCGCGAGATCCAGCGGCTCAACGGGATCTACCGCAACCTGCTGGTGA
ACAGCGGGGTGACCTTGCTCGAAGGTCACGCCCGTCTGCTCGATGCGCACAGCGT
CGAGGTGGACGGCCAGCGCTTCAGCGCCAAGCACATTCTCGTCGCCACCGGTGGC
TGGCCGACAGGTGCCGGACATTCCCGGCAAGGAACACGCGATCACCTCCAACGAAG

CGTTCTTCCTCGAGCGCCTGCCGCGCCGCGTGCTGGTGGTCGGCGGGCGGCTACATC
GCCGTCGAATTCGCTCGATCTTCAACGGGCTCGGGCGCCGAGACCACCTTGCTCTA
CCGTCGCGACCTGTTCTGCGCGGCTTCGACCGCAGCGTCCGCGAGCATCTGCGC
GACGAATTGGGCAAGAAGGGCCTGGACCTGCAGTTCAACAGCGACATTGCCCGTA
TCGACAAACAGGCCGATGGTAGCCTCGCCGCGACCCTCAAGGACGGCCGGGTGCT
GGAGGCGGACTGCGTGTTCTACGCCACCGGGCGGGCGCCGATGCTGGACGACCTG
GGCCTGGAAAACACAGCTGTGAAGCTGACCGACAAGGGCTTCATCGCGGTGAC
GAGCACTACCAGACCAGCGAACCCTCGATACTCGCCCTCGGTGACGTGATCGGTC
GCGTCCAGTTGACCCCCGTGGCGCTGGCCGAGGGTATGGCGGTGGCACGGCGATT
GTTCAA

基因：*sth*

allele 1:

TGAAGGTGGTGTGACGAAGTACTTCAGGGTATTCAGCTCGCCCGGCTGGTTCAT
GATCGCCTGGCCGATGTGGACGATTTCCGAAGCCTGGTCGCCGAAGCAGTGCACG
CCGAGGATCTCCAGGGTCTCGCGATGGAACAGGATCTTCAGCATGCCACCGGCT
CGTTGGAAATCTGCGCCCGGGCCATGCCCTTGAAGAACGCCTTGCCCACTTCGTA
GGGAATCTTCGCCGCGGTGAGTTCGCTTTCGTTCTTGCCGATCGAGCTGATCTCCG
GAATGGTGTAGATGCCGGTCGGCACATCGTTGACGAAGCGCCAGCTGTCGCTCTC
GACGATGTTGCCGGCGGCCGAGCGGCCCTGGTCGTAGGCAGCGCTGGCCAGGCT
CGGCCAGCCGATCACGTCGCCAGCGGCCGAAGATGTTGCTCACCGAAGTGCGGTA
GTTCTCGTCCACCTCGATCTGGCCACGGCTGTTGACCTTGATGCCGACGTTCTCCA
GGCCGAGCTTGTCCGTGTTGCCGGTCCGGCCGTTGCACCAGAGCAGCGCGTCCGC
CTTGATCTTCTTGCCCGACTTCAGGTGCAGGATGACACCGTTGTCCAGCCCCTCGA
CGCGCTCGTACTCCTCGTTGTGGCGGATCAGCACGTTGTTGTTGCGCAGGTGGTA
GCTCAGCGCATCGGAAATCTCGTCATCGAGGAAGCTGAGCAACTGGTCGCGCGTA
TCGATCAGGTCCACCAGCACGCCAGGCCGCTGAAGATCGACGCGTATTCGCA

基因：*dadX*

allele 1:

ACAGCAGCTGGTAGGGAATGCTGCCGAAGTGCGCCGCCAGGGCGCCGACCGGCA
CGTTCCGGGCCCATAGTTCGACCCGGCTGCCAGCCCGGCCTGGGGATGGTCGGT
AAGGTCGACGGTGAGCATGTCCATCGATACCCGGCCAACCAGGCGCCCCGGCTTG
CCGTCGATGAACACAAGGGTGCCGTCGGCGGGCGTGGCGCGGATAGCCATCGGCG
TAGCCCATGGCGACCACGCCGATGCGCTGGCTACGCTCGGTGCTGTAGCGCGCGC
CGTAGCCGACCGGTTCCGCCGGCCGGCAGGTCGCGGACGCTGATCACCTTCGATTC
TAGGGTCATACCGGGCGCAAGCGGTCGGCCAGCGGATGTGCGCGCTCGAACGG
CGTGGCTCCGTAGAGCAGGATGCCCGGACGTACCCAATCGCTGGGCACCTTCGGC
CAGCCGAGCACGGCTGGCGAATTGCGCAGGCTGATCTCGCCTTCAGGCCCTGGC
TCGCGGCCCGCAAGGGCGGGCAGCTGTTCTCGGTGCGCGGGCAATCCAGTTCGTC
GGCGCGGGAGAAGTGACTCATCATCACGATCTTCGCCACCTTGCCGCTGGCCCGC
AGGCGCTCGTGGGCGGGCGCTGAAGTCCTCGGGGAAGAAGCCGACGCGGTGCATG
CCCGAATCCATCTTCAGCCAGACGTTACAGCGGGCGGGCCAGGCTGGCGCGTTCGA
TCGCCTCCAATTGCCAGGCGCAAT

allele 2:

ACAGCAGCTGGTAGGGAATGCTGCCGAACTGCGCCGCCAGGGCGCCGACCGGCA
CGTTCGGGCCCCATAGTTCGACCCGGCTGCCAGCCCGGCCTGGGGATGGTCGGT
AAGGTCGACGGTGAGCATGTCCATCGATAACCCGGCCAACCAGGCGCCCCGGCTTG
CCGTCGATGAACACAAGGGTGCCGTCGGCGGCGTGCGCGGATAGCCATCGGCG
TAGCCCATGGCGACCACGCCGATGCGCTGGCTACGCTCGGTGCTGTAGCGCGCGC
CGTAGCCGACCGGTTCCGCCGGCCGGCAGGTCGCGGACGCTGATCACCTACGATT
TAGGGTCATCACCGGGCGCAAGCGGTTCGGCCAGCGGATGTGCGCGCTCGAACGG
CGTGGCTCCGTAGAGCAGGATGCCCGGACGTACCCAATCGCTGGGCACCTTCGGC
CAGCCGAGCACGGCTGGCGAATTGCGCAGGCTGATCTCGCCTTCCAGGCCCTGGC
TCGCGGCCGCGAAGGCGGCGAGCTGTTCTCGGTGCGCGGGCAATCCAGTTCGTC
GGCGCGGGAGAAGTGACTCATCATCACGATCTTCGCCACCTTGCCGCTGGCCCCG
AGGCGCTCGTGGGCGGCGCTGAAGTCTCGGGGAAGAAGCCGACGCGGTGCATG
CCGAATCCATCTTCAGCCAGACGTTTCAGCGGGCGGGCCAGGCTGGCGCGTTCGA
TCGCTCCAATTGCCAGGCGCAAT

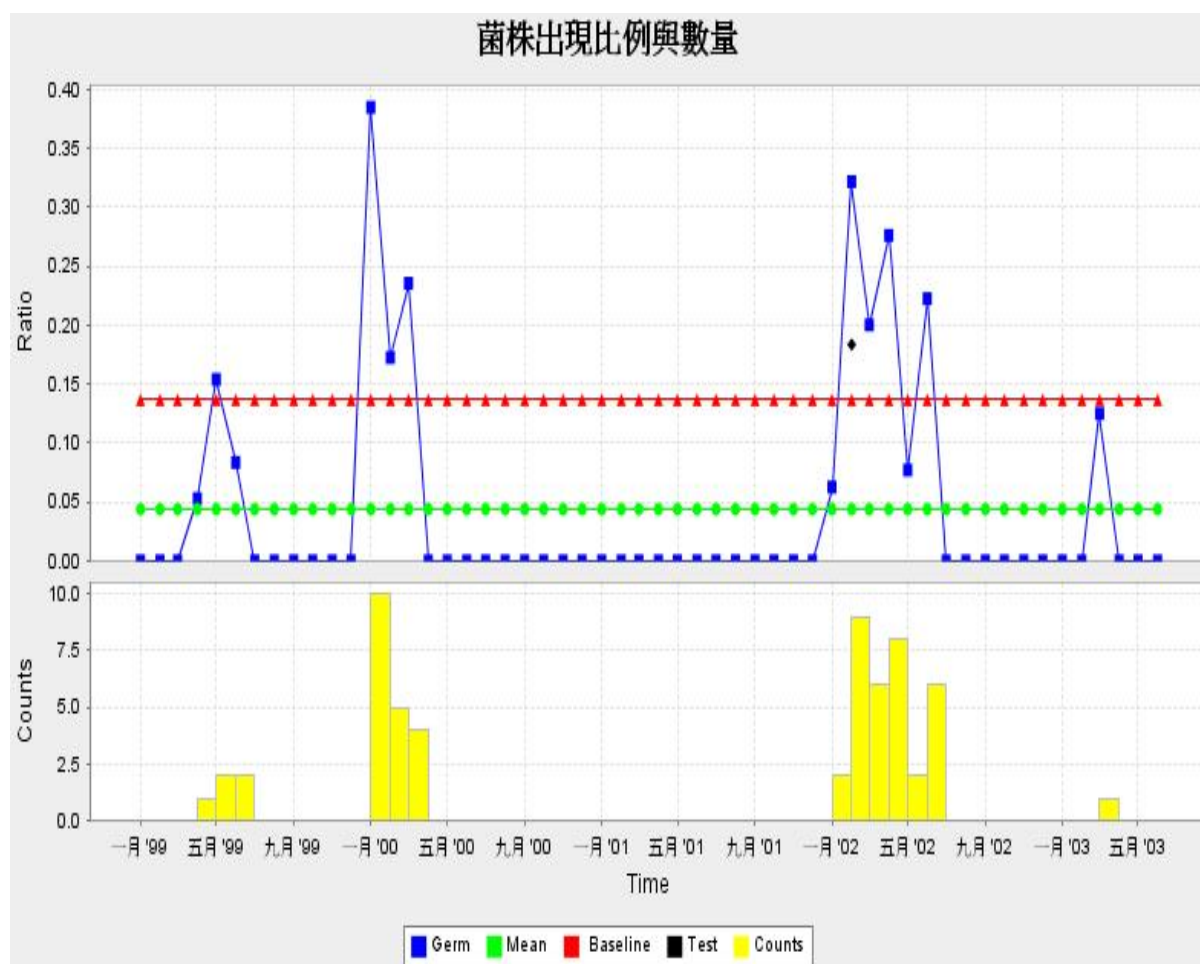
allele 3:

ACAGCAGCTGGTAGGGAATGCTGCCGAACTGCGCCGCCAGGGCGCCGACCGGCA
CGTTCGGGCCCCATAGTTCGACCCGGCTGCCAGCCCGGCCTGGGGATGGTCGGT
AAGGTCGACGGTGAGCATGTCCATCGATAACCCGGCCAACCAGGCGCCCCGGCTTG
CCGTCGATGAACACAAGGGTGCCGTCGGCGGCGTGCGCGGATAGCCATCGGCGT
AGCCCATGGCGACCACGCCGATGCGCTGGCTACGCTCGGTGCTGTAGCGCGCGCC
GTAGCCGACCGGTTCCGCCGGCCGGCAGGTCGCGGACGCTGATCACCTTCGATTCT
AGGGTCATCACCGGGCGCAAGCGGTTCGGCCAGCGGATGTGCGCGCTCGAACGGC
GTGGCTCCGTAGAGCAGGATGCCCGGACGTACCCAATCGCTGGGCACCTTCGGCC
AGCCGAGCACGGCTGGCGAATTGCGCAGGCTGATCTCGCCTTCCAGGCCCTGGCT
CGCGGCCGCGAAGGCGGCGAGCTGTTCTCGGTGCGCGGGCAATCCAGTTCGTCG
GCGCGGGAGAAGTGACTCATCATCACGATCTTCGCCACCTTGCCGCTGGCCCCGA
GGCGCTCGTGGGCGGCGCTGAAGTCTCGGGGAAGAAGCCGACGCGGTGCATGC
CCGAATCCATCTTCAGCCAGACGTTTCAGCGGGCGGGCCAGGCTGGCGCGTTCGAT
CGCTCCAATTGCCAGGCGCAAT

基因：*lipH*

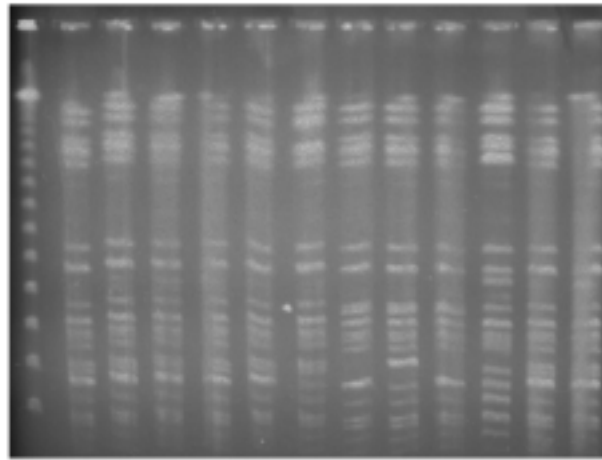
GATGGCAGTTTCAGTGTCGACGCCAGCGGCAACCTGCTGATCACCCGCGACATCC
GCAACCTGTTCTGACTACTTCTCAGCGCCGTCGGCGAAGAGCCCCTGCAGCAAAG
CCTGGACCGCCTGCGCGCCTACATCGCCGCCGAACTCCAGGAGCCGGCGCGCGGC
CAGGCGTTGGCGCTGATGCAGCAATACATCGACTACAAGAAGGAACTGGTGCTGC
TCGAACGCGACCTGCCGCGCCTGGCCGACCTCGACGCCCTGCGCCAGCGGGAAAG
CCGCGGTGAAAGCCCTGCGCGCGCGGATCTTCAGCAACGAAGCGCACGTGGCGTT
CTTCGCCGACGAGGAAACCTACAACCAGTTCACCCTGGAGCGCCTGGCGATCCGC
CAGGACGGCAAGCTCAGCGCCGAGGAAAAGGCCGCCATCGACCGCCTGCGC
GCCAGCCTGCCGGAAGACCAGCAGGAAAGCGTGCTGCCGCAACTGCAAAGCGAA
CTGCAGCAGCAGACCGCCGCCCTCCAGGCCGCTGGCGCCGGCCCCGGAAGCCATCC
GCCAGATGCGTCAGCAACTGGTGGGCGCCGAAGCCACCACCCGCTGGAGCAAC

TCGATCGGCAACGCTCGGCCTGGAAGGGCCGGCTGGACGACTATTTGCGCGAGAA
GAGC

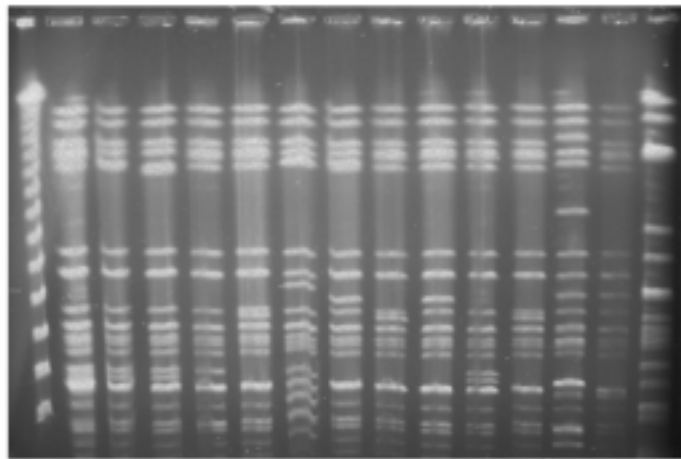


圖三、對 ceftazidime 與 ceftoxitin 同時具抗藥性之抗雷氏肺炎桿菌

(A) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



(B) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



圖四、PFGE of *Xba*I-digested genomic DNA of representative CMY-2-producing *K. pneumoniae* isolates. Lane 1, a lambda ladder; lanes 2-13 in (A) and lanes 2-6, 8-12, and 14 in (B), isolates from patients who had stayed or was at surgical intensive care units; lanes 7, 13, and 15 in (B), isolates from patients who had never stayed at surgical intensive care units.

表一・MLST 用在綠膿桿菌分型所選用之基因、PCR 引子、PCR 反應條件、PCR 產物大小、產生之 Allele 數

基因	引子序列	PCR 反應條件 ^a	PCR 產物 大小 (bp)	Allele 數
<i>arcA</i>	F: 5'-TGAACCAGGCCAAGCGCGAC -3' R: 5'-GTTGCCGATCGGCATCACGT-3'	95°C for 1 min, 60°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	557	2
<i>aroE</i>	F: 5'-AATGTCACCGTGCCGTTCAA-3' R: 5'-CAACTCAGACAGTTGCCAAC-3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 28 cycles	658	2
<i>dnaE</i>	F: 5'-TTGACCTTGCGGTGGTTGGC-3' R: 5'-AAGAAGCCCGAGGAAATGGC -3'	94°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 1 min, 30 cycles	731	1
<i>adk</i>	F: 5'-GGCGATGCTGTGGTATTTTCG -3' R: 5'-AACTTCTCGGTGATGAACCG-3'	94°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	543	1
<i>gdh</i>	F: 5'-GTGCAGCTTGGTATCCACCT-3' R: 5'-CGTGAGATCGGCTACCTGTT-3'	94°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	690	2
<i>gcl</i>	F: 5'-TGGTGCTGCTGCATCAGTTC-3' R: 5'-TTCGGTATAGACCTCGACGC-3'	94°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	775	1
<i>prlC</i>	F: 5'-ACGTGGCCCAGAAAACCATC -3' R: 5'-GCGTTCGAAATCGTGCAGTT -3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	788	2
<i>polA</i>	F: 5'-CTTTCCTGCA GCCAGTTATC-3' R: 5'-CCCAAGGTGATCATGCAGTA -3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	740	1
<i>tal</i>	F: 5'-TTCTTCCCAAGAACCCACCT-3' R: 5'-TCAGCCAGTTGTTGCAGCAG-3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	771	2
<i>speB2</i>	F: 5'-CAGCCGCGGATGATTTCCAT-3' R: 5'-GTGATGATCCGTCCCTACAA-3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	620	1
<i>gor</i>	F: 5'-AACAAGAACCGCGAGATCCA-3' R: 5'-TTGAACAATCGCCGTGCCAC-3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min,	722	2

<i>sth</i>	F: 5'-TGAAGGTGGTGTGACGAAG-3' R: 5'-TGCGAATACGCGTCGATCTT-3'	30 cycles 95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	769	1
<i>dadX</i>	F: 5'-ACAGCAGCTGGTAGGGAATG-3' R: 5'-ATTGCGCCTGGCAATTGGAG-3'	95°C for 1 min, 60°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	735	3
<i>lipH</i>	F: 5'-GATGGCAGTT TCAGTGTCGA-3' R: 5'-GCTCTTCTCGGCGAAATAGT-3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	660	1

^aAll reactions had an initial denaturation at 95°C for 12 min and a final extension at 72°C for 10 min

表二、21株產生OXA型酵素之綠膿桿菌之藥物敏感試驗結果

Isolate/ year of collection	Specimen type	<i>bla</i> _{OXA} gene	MICs (µg/mL) ^a										
			PIP	TZP	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	GEN	AM K	CIP
4-16/89	Blood	<i>bla</i> _{OXA-10}	>256	>256	32	2	32	8	1	2	>256	>256	0.25
32-52/91	Blood	<i>bla</i> _{OXA-10}	>256	>256	32	2	32	1	>32	32	>256	>256	0.13
38-59/91	Blood	<i>bla</i> _{OXA-10}	128	256	16	1	16	1	1	1	256	>256	0.13
39-69/91	Blood	<i>bla</i> _{OXA-10}	>256	>256	48	2	16	16	1	1	>256	>256	0.06
44-67/92	Blood	<i>bla</i> _{OXA-10}	>256	128	16	1	16	1	1.5	0.5	>256	>256	0.25
195/96	Blood	<i>bla</i> _{OXA-10}	>256	>256	16	1	16	2	>32	8	16	>256	0.03
149/02	Wound	<i>bla</i> _{OXA-10}	>256	>256	64	2	32	8	>32	>32	256	>256	2
176/96	Blood	<i>bla</i> _{OXA-14}	128	64	>256	>256	32	8	2	0.5	>256	>256	8
178/96	Blood	<i>bla</i> _{OXA-14}	>256	>256	>256	16	32	8	2	0.5	128	>256	16
29-1/91	Blood	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	64	4	64	64	2	16	>256	4	0.5
181/96	Blood	<i>bla</i> _{OXA-17}	128	64	128	4	16	16	0.5	4	64	4	4
611/00	Wound	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	64	2	128	16	3	2	>256	16	0.13
956/00	Wound	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	32	128	16	>32	>32	>256	16	0.5
1110/00	Sputum	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	32	>256	16	>32	>32	>256	16	0.5
1390/00	Urine	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	32	32	32	1.5	8	>256	16	1
103/02	Urine	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	128	>256	32	1	2	>256	16	>32
106/01	Sputum	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	64	256	16	>32	16	>256	16	0.5
195/01	Sputum	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	8	64	8	1	2	>256	16	>32
87/02	Sputum	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	32	>256	64	>32	>32	>256	16	>32
312/02	Urine	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	256	>256	4	32	16	1	2	>256	16	1
444/02	CSF	<i>bla</i> _{OXA-17}	>256	>256	>256	>256	128	64	>32	>32	>256	16	>32

^a縮寫：PIP, piperacillin; TZP, piperacillin/tazobactam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MEM, meropenem, GEN, genomicin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin.

^bNS, not successful.

表三、脈衝電場瓊膠電泳與 MLST 多形性分型法結果比較

Isolate/year of collection	<i>bla</i> _{OXA} gene	PFGE								MLST 型
		profile	<i>arcA</i>	<i>aroE</i>	<i>gdhA</i>	<i>prlC</i>	<i>tal</i>	<i>gor</i>	<i>dadX</i>	
149/02	<i>bla</i> _{OXA-10}	NS	1	1	1	2	1	2	1	1112121
195/01	<i>bla</i> _{OXA-17}	XIII	1	1	2	1	2	1	2	1121212
176/96	<i>bla</i> _{OXA-14}	Va	1	2	1	2	2	2	2	1212222
178/96	<i>bla</i> _{OXA-14}	Vb	1	2	1	2	2	2	2	1212222
29-1/91	<i>bla</i> _{OXA-17}	VI	1	2	1	2	2	2	2	1212222
312/02	<i>bla</i> _{OXA-17}	XI	1	2	1	2	2	2	2	1212222
611/00	<i>bla</i> _{OXA-17}	VII	1	2	2	1	2	1	1	1221211
956/00	<i>bla</i> _{OXA-17}	VIII	1	2	2	1	2	1	1	1221211
1110/00	<i>bla</i> _{OXA-17}	VIII	1	2	2	1	2	1	1	1221211
106/01	<i>bla</i> _{OXA-17}	VIII	1	2	2	1	2	1	1	1221211
103/02	<i>bla</i> _{OXA-17}	X	1	2	2	1	2	1	1	1221211
181/96	<i>bla</i> _{OXA-17}	XII	1	2	2	1	2	1	3	1221213
195/96	<i>bla</i> _{OXA-10}	I	1	2	2	2	1	2	3	1222123
38-59/91	<i>bla</i> _{OXA-10}	II	1	2	2	2	1	2	3	1222123
44-67/92	<i>bla</i> _{OXA-10}	II	1	2	2	2	1	2	3	1222123
39-69/91	<i>bla</i> _{OXA-10}	IIIb	1	2	2	2	2	2	3	1222223
4-16/89	<i>bla</i> _{OXA-10}	IIIa	1	2	2	2	2	2	3	1222223
32-52/91	<i>bla</i> _{OXA-10}	IV	1	2	2	2	2	2	3	1222223
1390/00	<i>bla</i> _{OXA-17}	IXa	2	1	2	2	2	2	2	2122222
87/02	<i>bla</i> _{OXA-17}	IXb	2	1	2	2	2	2	2	2122222
444/02	<i>bla</i> _{OXA-17}	IXc	2	1	2	2	2	2	2	2122222