

衛生署疾病管制局委託研究計畫

期末報告

年 度： 九十一年度 DOH91-DC-1014

計畫名稱： 臺灣肺炎克雷伯氏菌感染造成臨床多樣特殊表現之基礎研究
(第一年)

申請機構： 中國醫藥學院醫學系

主 持 人： 盧 敏 吉 簽 名：

填報日期： 九十一年十二月十五日

摘要

KP 感染並非臺灣的法定傳染病，因此並沒有國家衛生機構警戒機制，也沒有系統的探討病因與臺灣地區 KP 流行的關聯性，更沒有這隻重要的臺灣的感染症菌種基因庫的建立。而除了一些臺灣 KP 的臨床疾病與抗藥性研究外，少數的臺灣 KP 的分子生物學研究曾報告某院內感染菌血症及肝膿瘍的 PFGE 分析。但是其引起的原發性肺炎，病程進展快速、疾病嚴重，且伴隨高死亡率，以及高機率的轉移性病灶，特別是腦膜炎及眼內炎常發生於臺灣病人，卻無完整且大規模 KP 致病機轉有關的基因型態分析。

本計畫為兩年期的規劃，自 91 年初開始依據計畫列述之工作項目，進行細菌收集與實驗，以及臨床資料收集與分析，至 91 年 11 月底，收集 KP 之菌種已達 387 株，其中包括菌血症、肺炎、肝膿瘍、腦膜炎、及院內感染的菌種，應用脈衝式電泳法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)方法分析 KP 之基因體，已完成 260 株 KP 的分析，貯存成 DNA 指紋圖譜，建立資料庫。第一年將達成以下成果：(1) 完成近 400 株 KP 菌株的 PFGE 分析，其中包括菌血症、肝膿瘍、及院內感染的 KP 菌種，分析採用美國疾病管制局建立之菌株標準化操作流程與標準化設備與軟體(目前使用 BioNumerics 分析軟體)，與衛生署疾病管制局第三分局合作，正進行資料之比對及菌株流病資料之統計。第二年繼續執行肺炎及腦膜炎較少見不足之菌株收集與分析。(2) 完成近 400 株 KP 菌株的完整病人病史，病人的確定診斷及臨床檢體的來源追蹤，均由感染科醫師與助理實地負責。醫師與助理整理病人臨床數據，包括姓名、年齡、性別、居住所在地、糖尿病及其它內科疾病的病史、藥物包括抗生素使用史、實驗室數據、影像學分析等。分析臺灣 KP 可能的致病變數，目前可見大部份病人患有糖尿病，更有趣的是重複感染 KP 的約有 10 餘位病人，全部患有糖尿病，其他臨床數據的分析正在進行中，第二年我們也將繼續執行 KP 感染的正常人與糖尿病病人糞便 KP 菌種比較，及收集美國及其它國家 KP 菌種進行分析。(3) 本計畫已完成的近 400 株 KP 菌株，將建構成一 PFGE 圖譜資料庫，分析後之菌株委託永久保存於衛生署疾病管制局第三分局細菌病原菌 DNA 指紋資料庫核心實驗室，以利其他醫療與研究者取得菌株，進行研究。未來我們將利用已保存之菌株及資料庫，更進一步研究 KP 的致病機轉與 KP 預防及臨床治療不同的方向。

報告

肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella Pneumoniae* ; KP) 的感染在臺灣好發於糖尿病的病人，表現有高發生率的肝膿瘍、轉移性病灶，特別是腦膜炎及眼內炎，病程進展快速高死亡率的原發性肺炎，且是院內感染常見的菌種造成嚴重的抗藥性問題。它是一個嚴重且臺灣特殊的醫療問題，也是急症與重症加護病人的長期醫療最重要原因之一，造成社會醫療資源的重大負擔。

本研究以中國醫藥學院附設醫院及合作醫院的臨床病人為研究主體，由臨床微生物科每天新培養的 KP 菌種報告，搜集病人血液、痰液、腦脊髓液、眼內炎膿液、及肝膿瘍膿液培養的 KP 菌，在 tryptic soy broth (Difco, Detroit, Michigan) 中，以 37 shaking 加以繁殖，KP 菌種保存在 4 冰箱中，提供菌種的分析與使用。菌株於疾病管制局第三分局進行分析工作，使用標準方法進行菌株之脈衝式電泳分型 (PFGE)，所得之 PFGE 圖譜並標準化以照像貯存，經由軟體分析後，貯存成圖譜資料庫，建立 DNA 圖譜資料庫與圖譜比對，該資料庫將再與菌株之流病資料結合，做為後續菌株型別與疾病關係的分析基礎。

本研究為兩年期連續性計畫，自 91 年初開始依據計畫列述之工作項目，進行細菌收集與實驗，以及臨床資料收集與分析，至 91 年 11 月底，已達成之目標項目，分項敘述如下：

1. 收集臨床檢體：

收集 KP 菌種已達 387 株，其中包括菌血症、肺炎、肝膿瘍、腦膜炎、及院內感染的菌種，分別來自於臨床微生物科每天新的血液培養、新痰液或支氣管肺泡沖洗液培養、新的膿液培養、及新的腦脊髓液培養。其中以菌血症、肝膿瘍、及院內感染的 KP 居多，而肺炎及腦膜炎的菌種最少。所有上述 KP 菌種均逐日培養，分裝保存，提供菌種的分析與使用。本計畫與衛生署疾病管制局第三分局合作，該處將建構為細菌病原菌 DNA 指紋資料庫核心實驗室，分析後值得保存之菌株已委託該局生物材料與基因庫中心進行永久保存

2. 臨床資料收集與分析

所有上述菌血症、肺炎、肝膿瘍、腦膜炎、及院內感染病人的確定診斷及臨床檢體的來源追蹤，均由感染科醫師與助理實地負責。醫師與助理整理病人臨床數據(包括姓名、年齡、性別、居住所在地、糖尿病及其它內科疾病的病史、藥物包括抗生素使用史、實驗室數據、影像學分析等)，分析臺灣 KP 可能的致病變數。初步可見大部份病人患有糖尿病，更有趣的是重複感染 KP 的約有 10 餘位病人，全部患有糖尿病，其他臨床數據的分析正在進行中。

3. PFGE 分析菌株、建立 DNA 圖譜資料庫與圖譜比對

本計畫應用脈衝式電泳法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)方法分析 KP 之基因體，細菌基因體約為 4×10^6 bp 左右，以特定限制酶 (Xba I) 到 10-40 條大小不同片斷，再以脈衝式電泳儀電泳跑膠分層這些大 DNA 片斷，可在瓊膠上得到菌株特定之 DNA 圖譜。本研究自 91 年初，開始進行 KP 脈衝式電泳分析實驗，至 91 年 11 月底，已完成 260 株 KP 的分析 (部分如下圖 Fig 1 – Fig 11)，貯存成 DNA 指紋圖譜資料庫，經由 PFGE 技術方法的改進，更清晰且標準化的圖譜資料庫(部分如下圖 Fig 12 – Fig 15)已建立。研究資料顯示，脈衝式電泳是目前細菌分子分型法中分型效力(discriminatory power)最強的方法，適用於 KP 細菌種類之分型分析。本研究已採用美國疾病管制局建立之菌株標準化操作流程與標準化設備與軟體(目前使用 BioNumerics 分析軟體)，正在進行所建立資料之比對，以及菌株流病資料之統計。

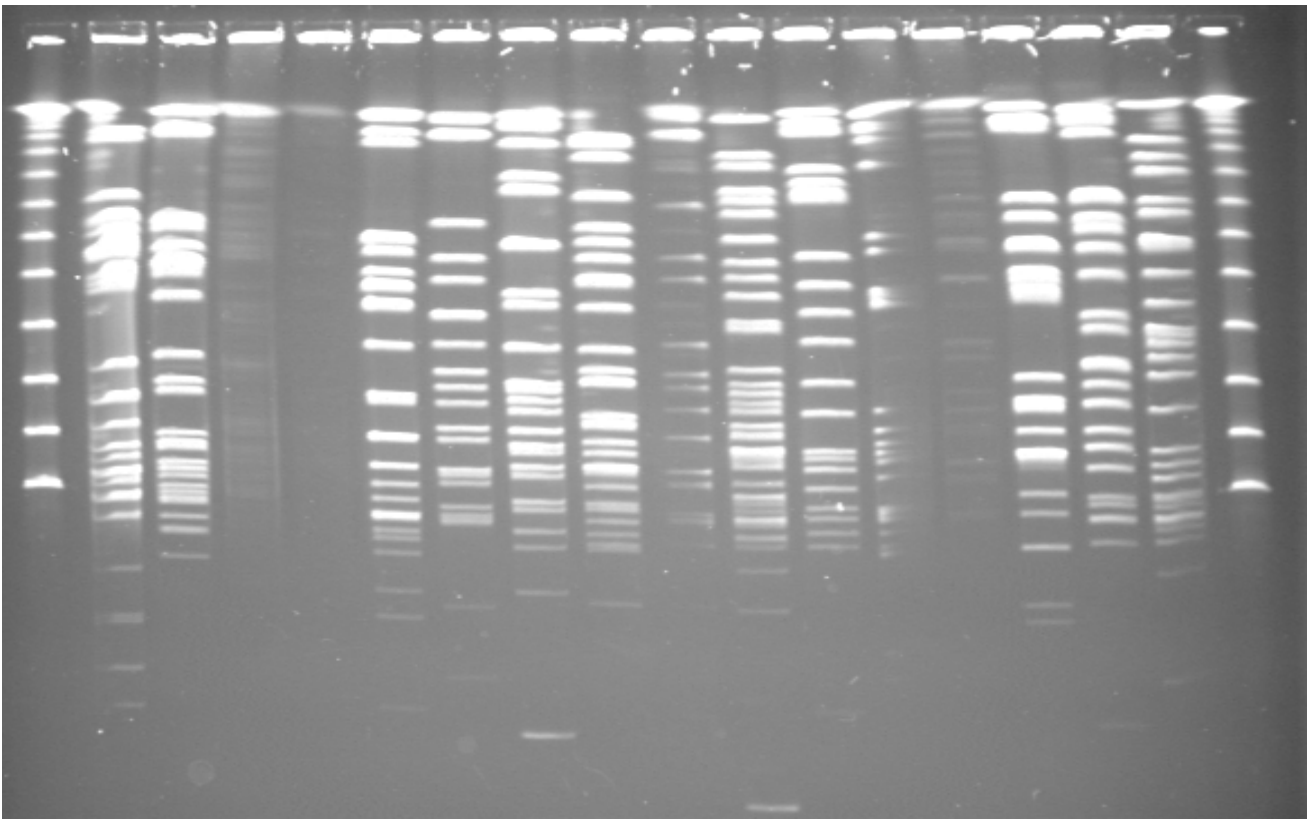


Fig 1

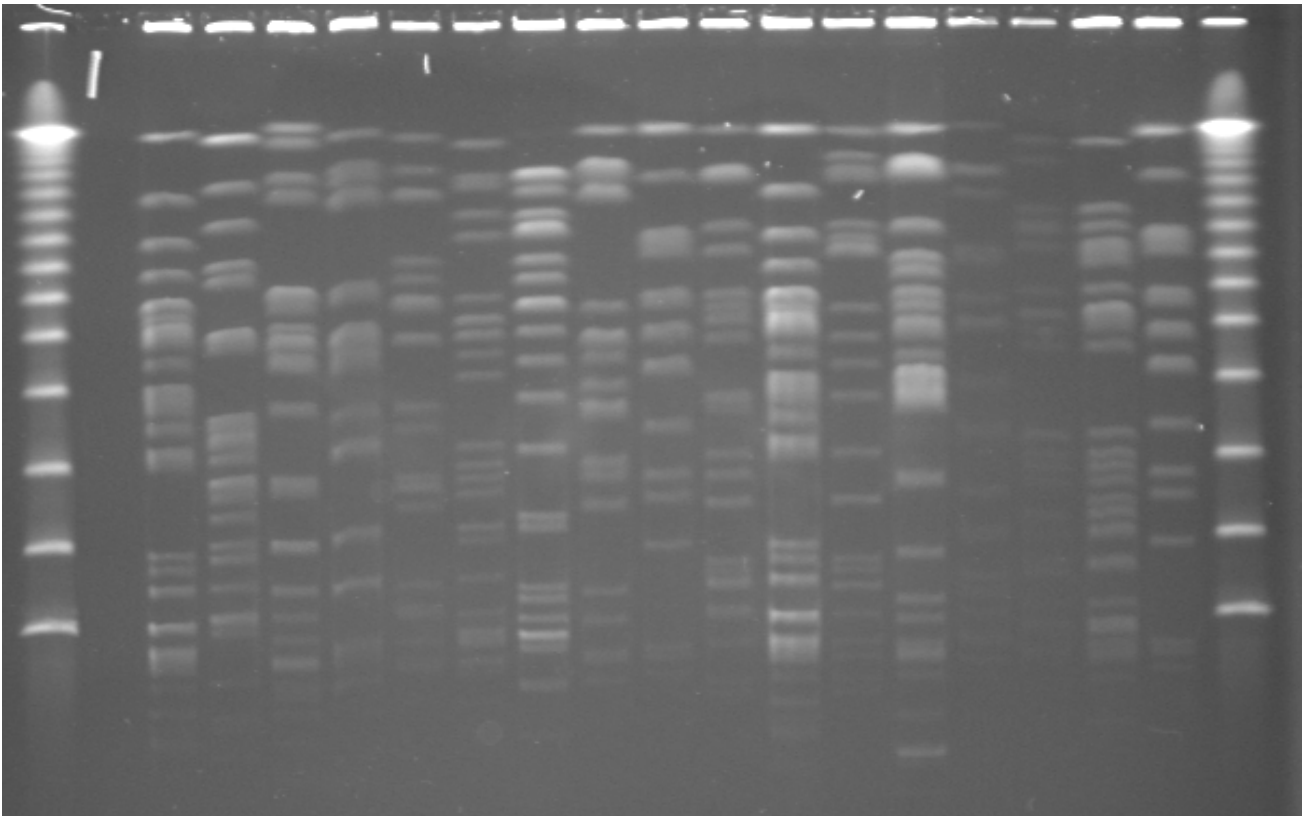


Fig 2

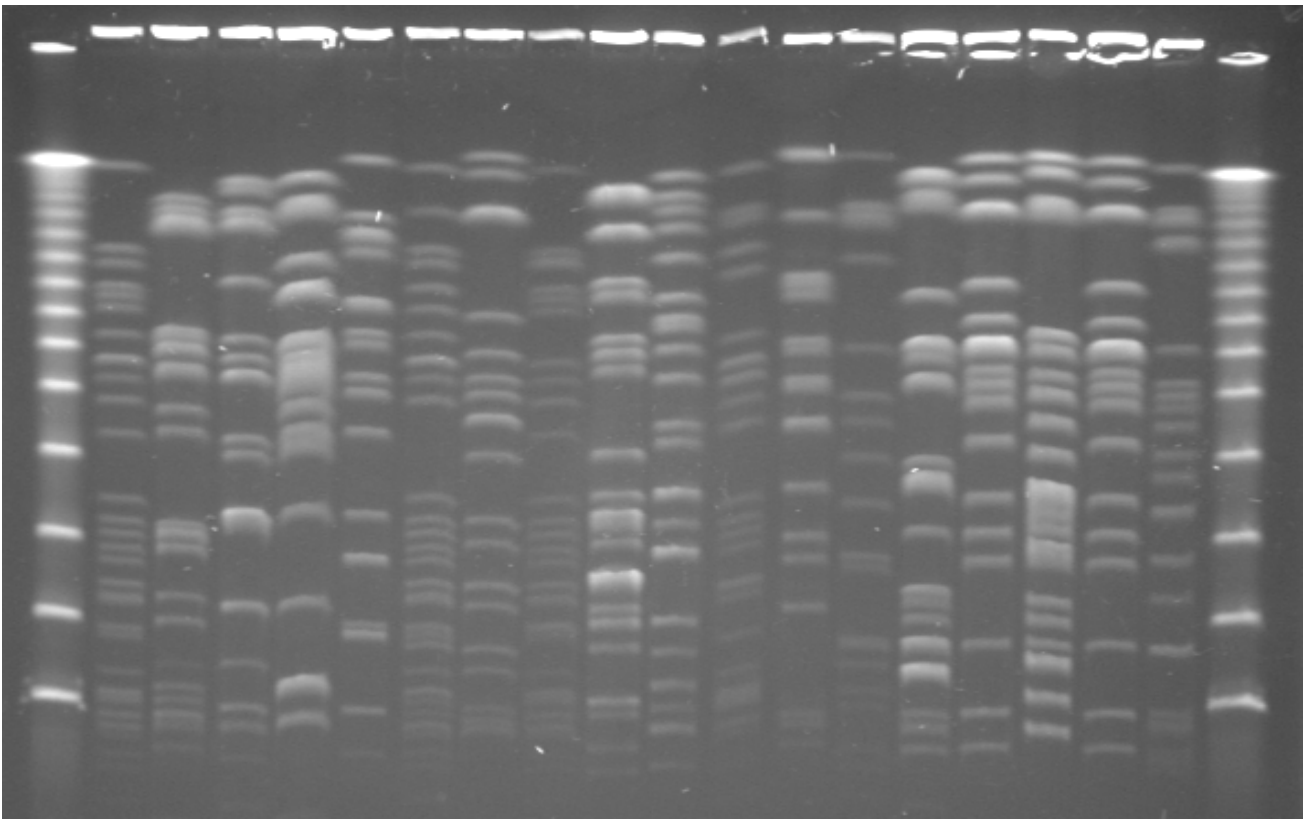


Fig 3

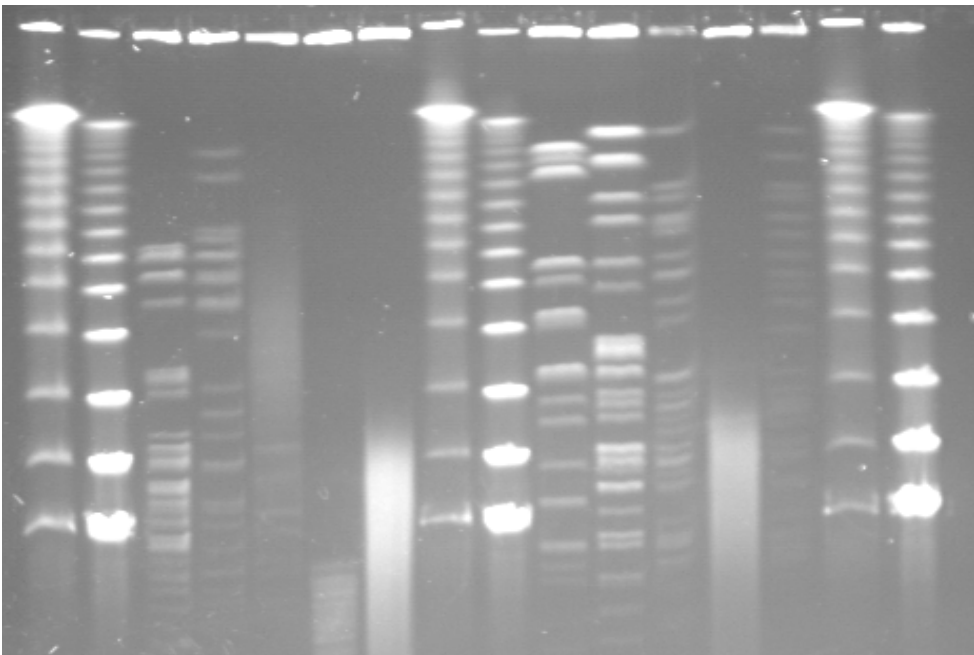


Fig 4

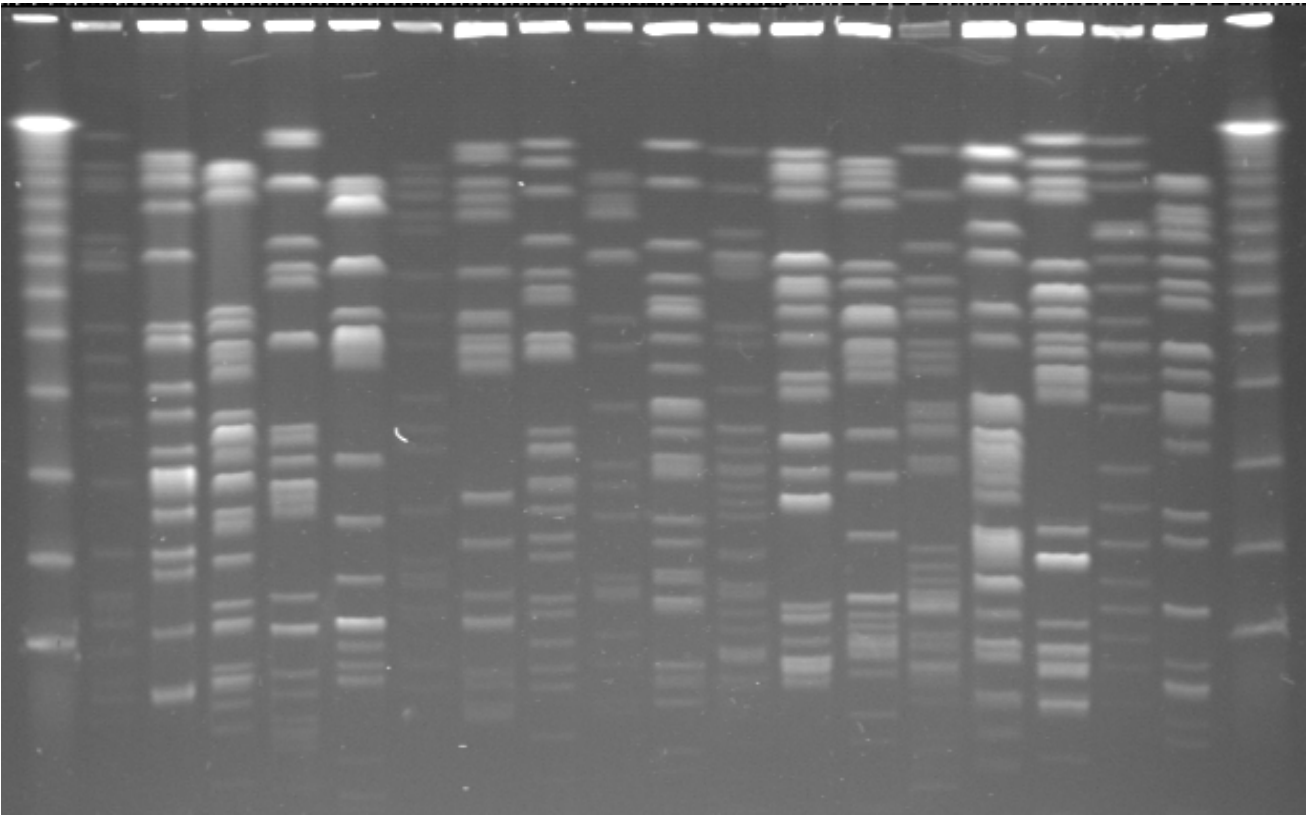


Fig 5

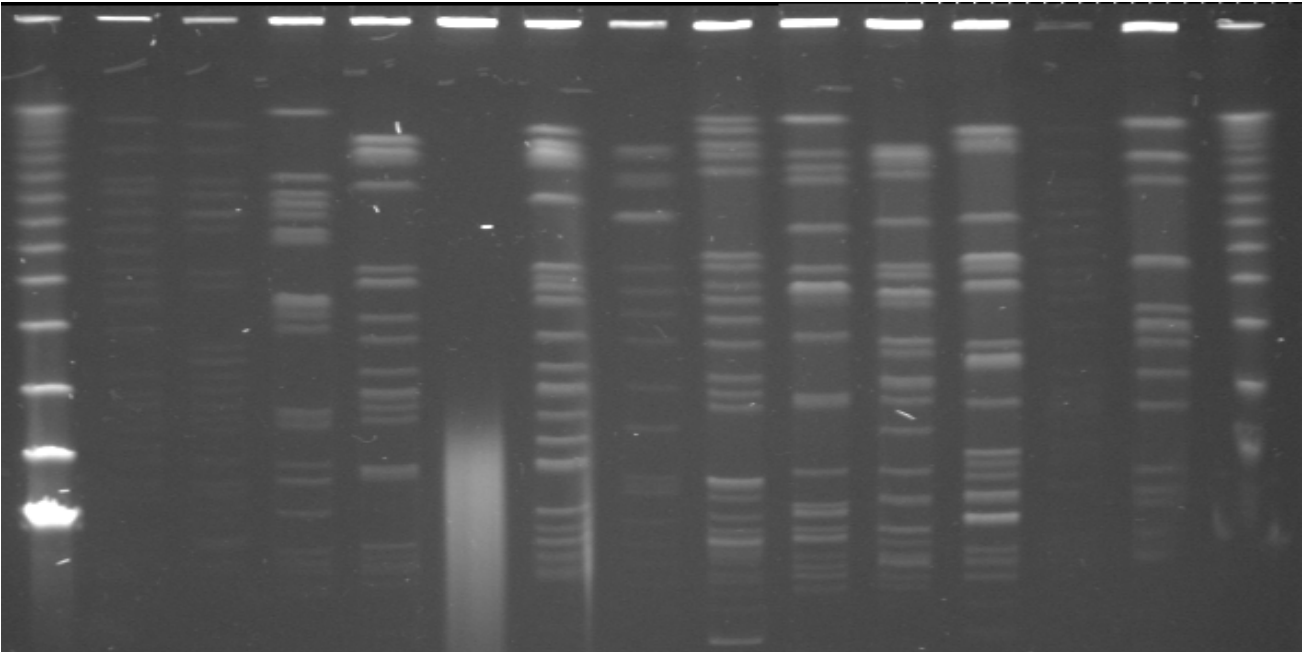


Fig 6

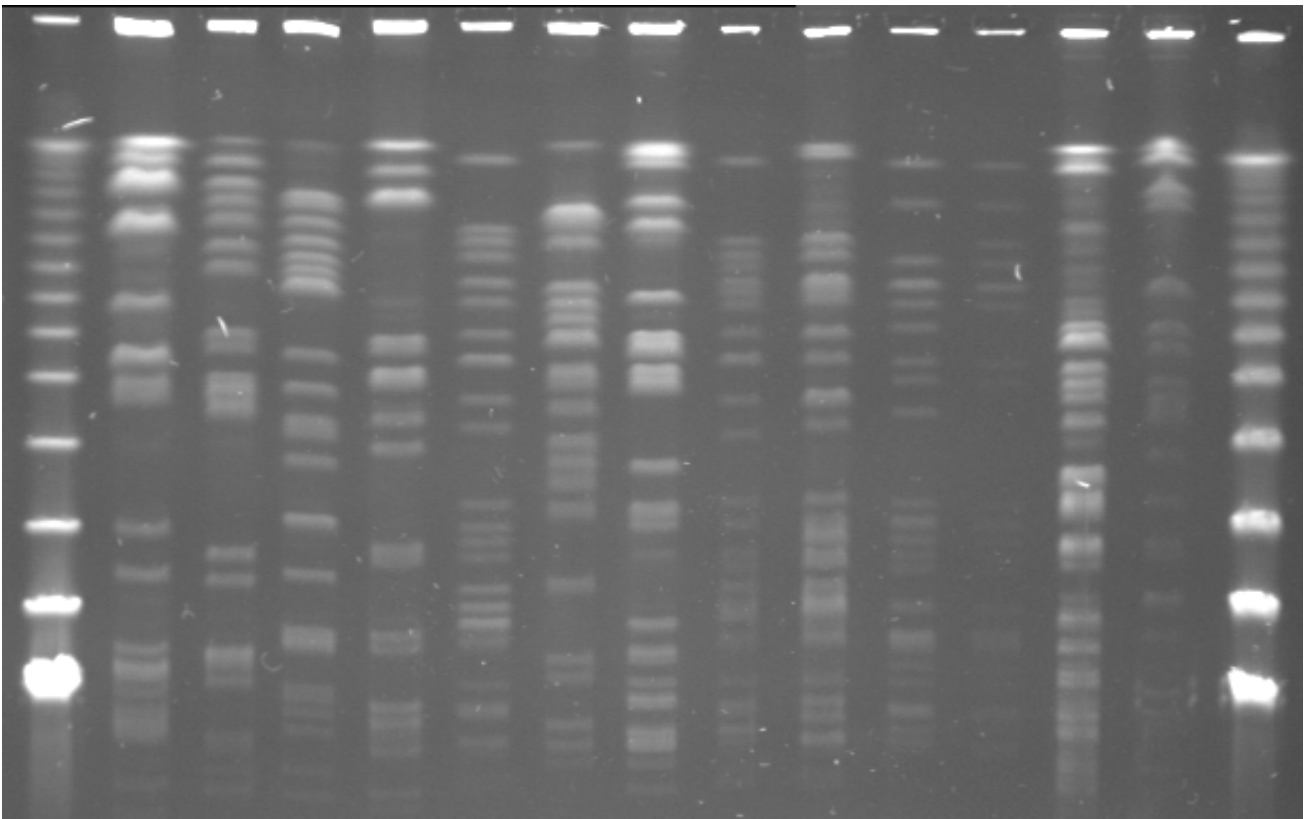


Fig 7

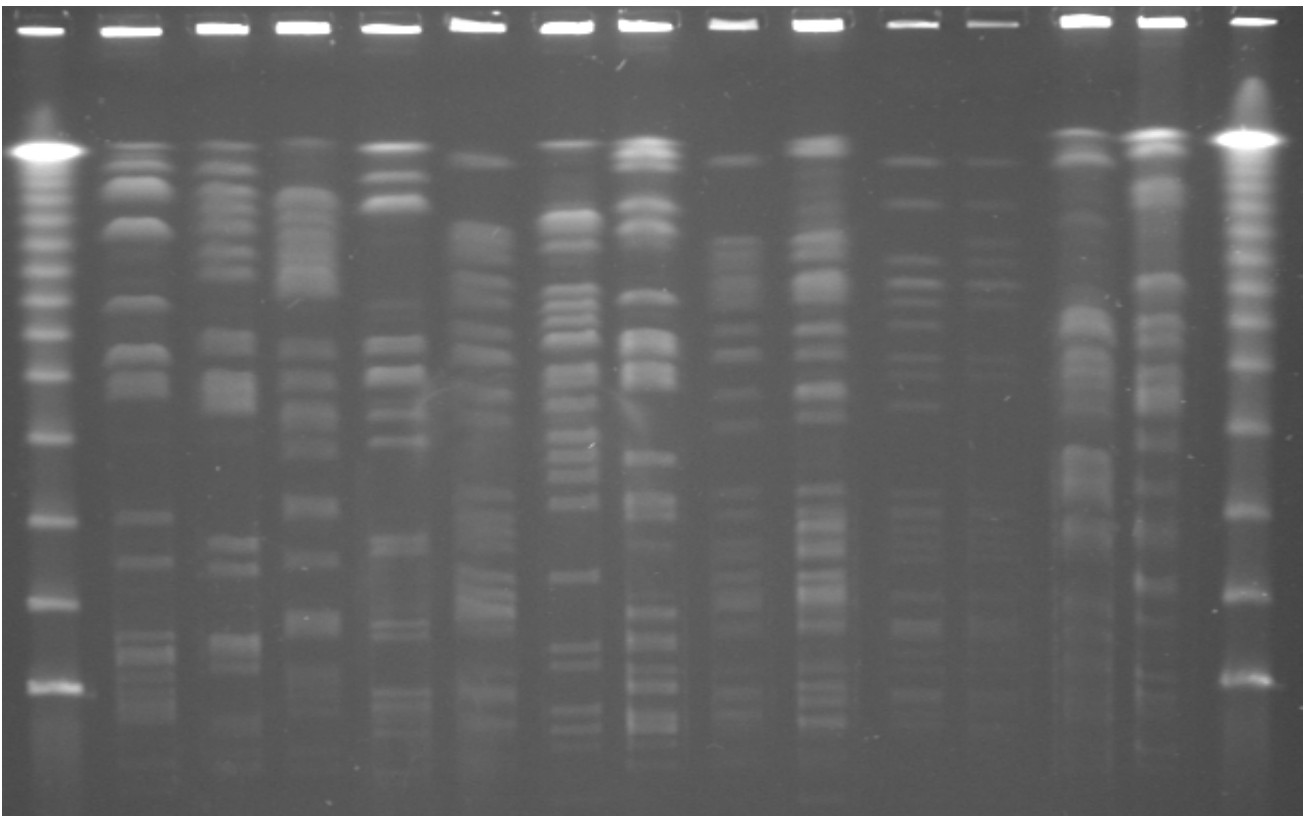


Fig 8

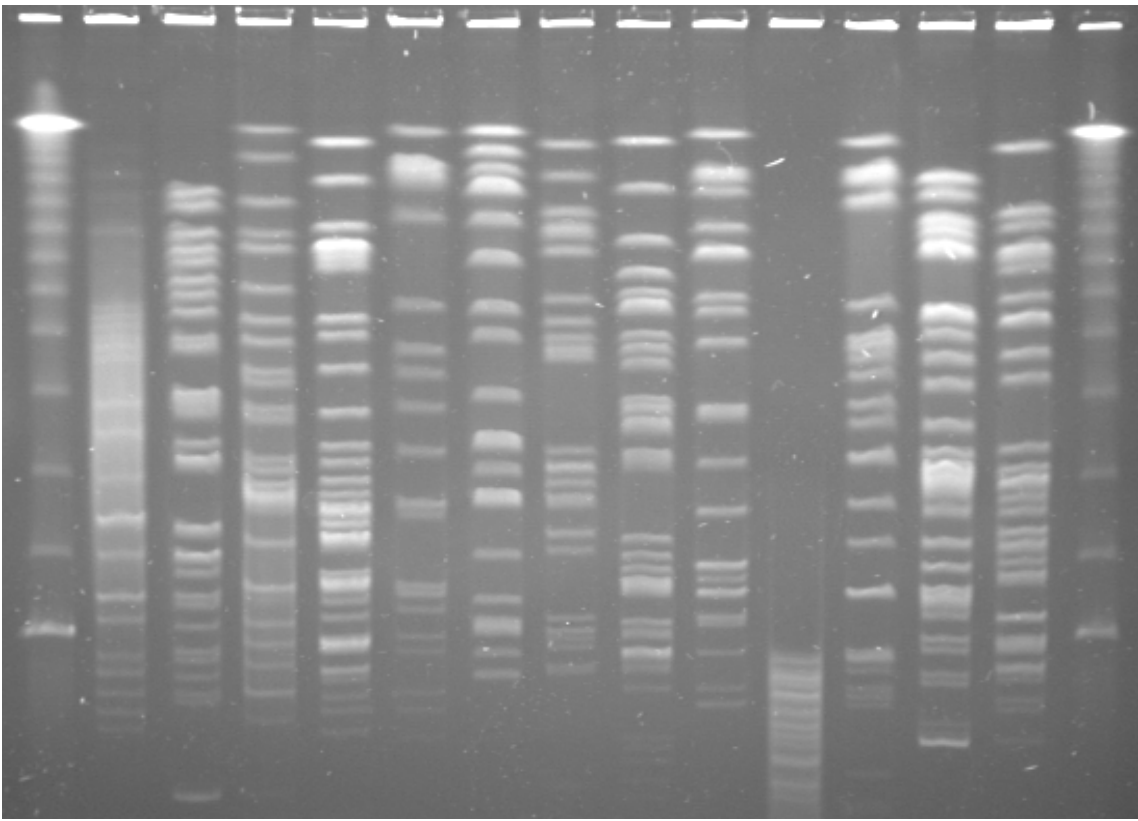


Fig 9

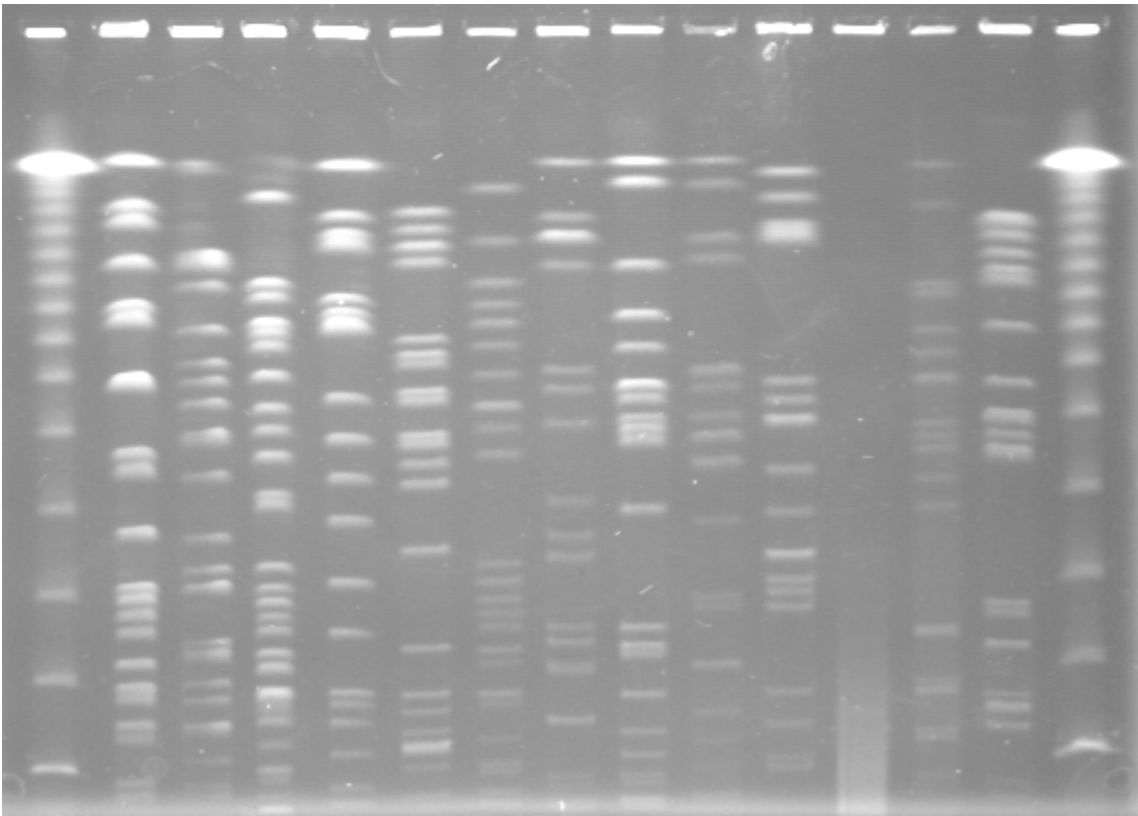


Fig 10

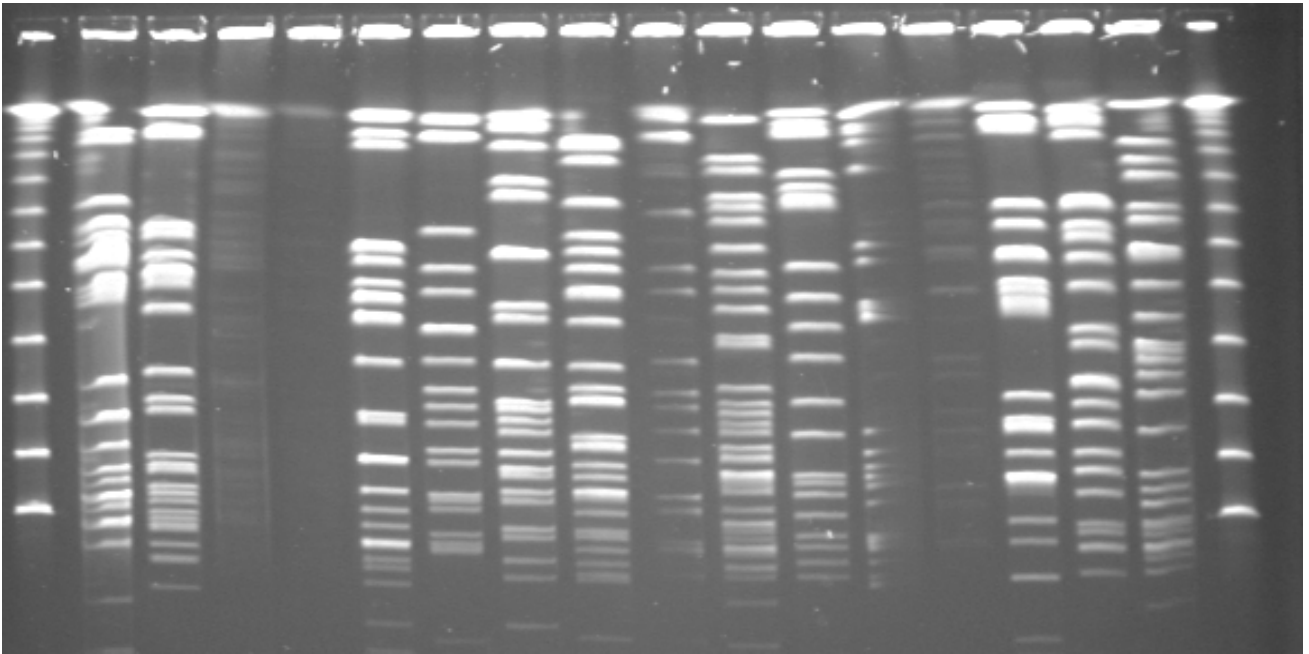


Fig 11

mw

mw

mw

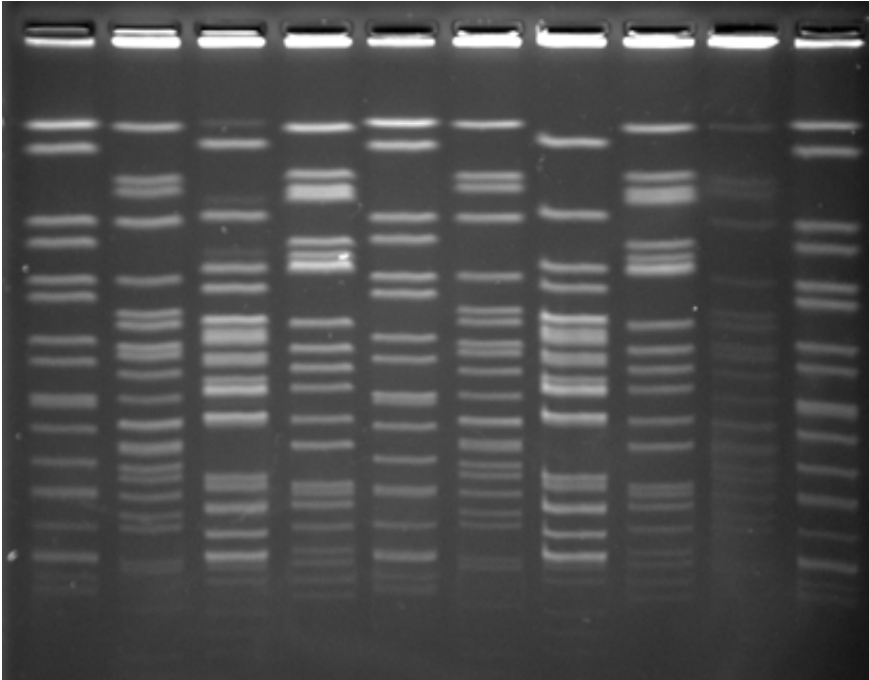


Fig 12

mw

mw

mw

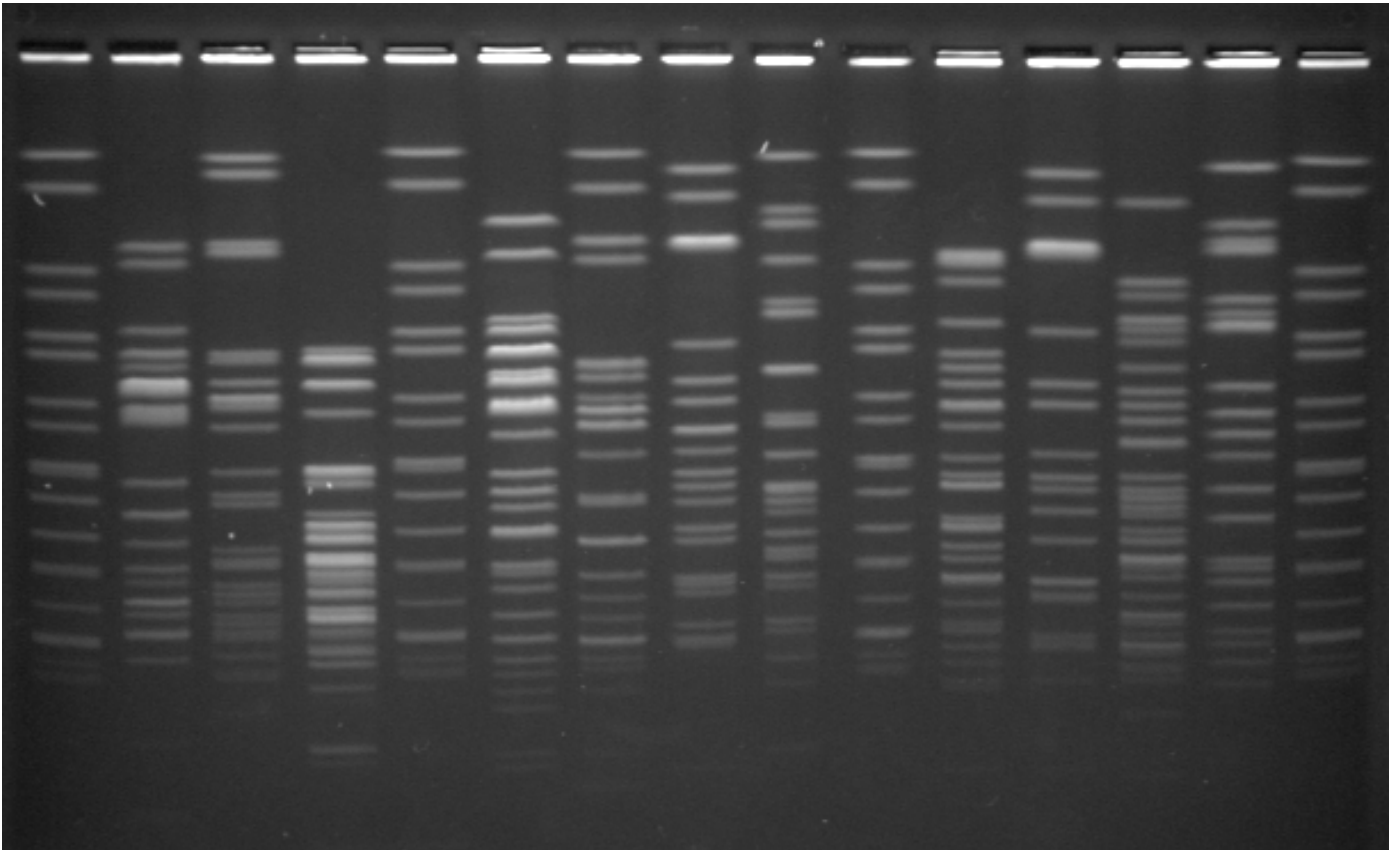


Fig 13

mw

mw

mw

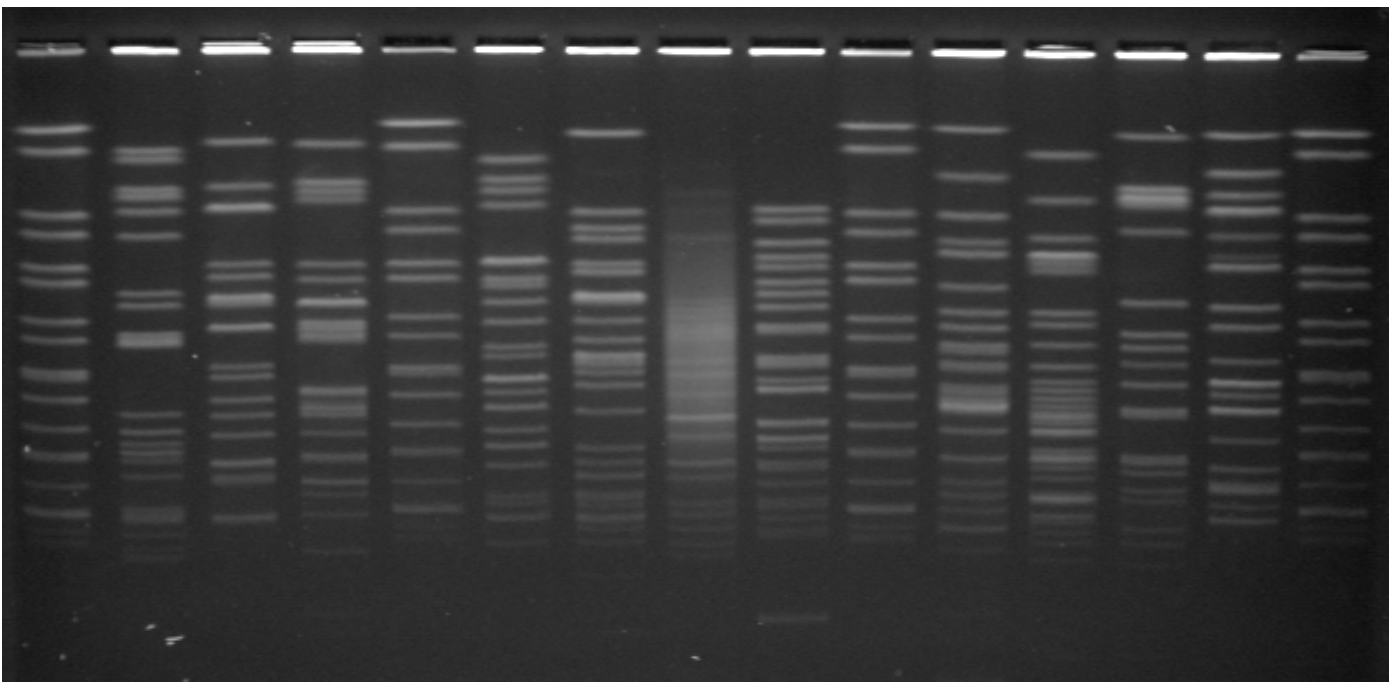


Fig 14

mw

mw

mw

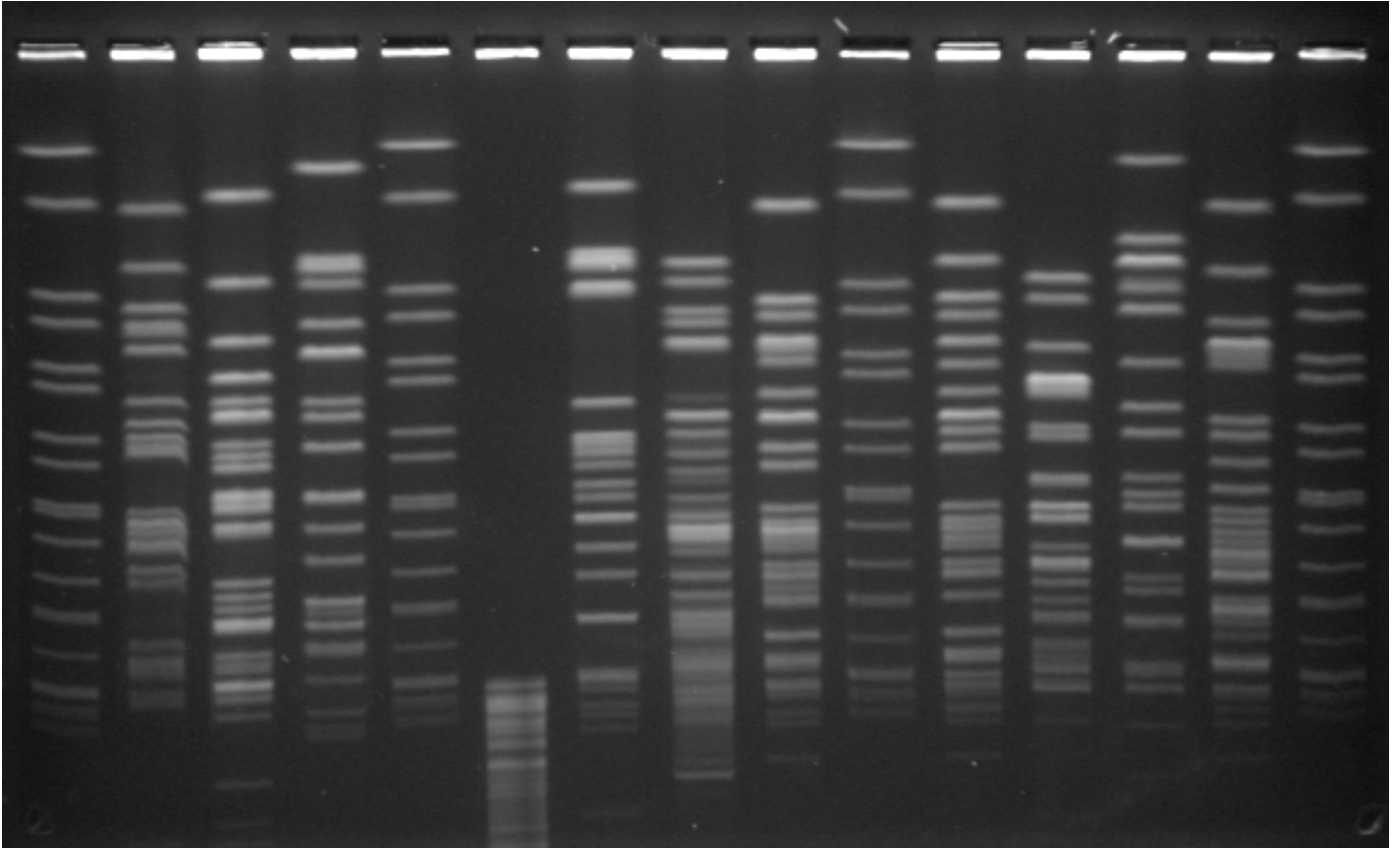


Fig 15

4. 本兩年期連續性計畫之第一年結論與展望

KP 感染並非臺灣的法定傳染病，因此並沒有國家衛生機構警戒機制，也沒有系統的探討病因與臺灣地區 KP 流行的關聯性，更沒有這隻重要的臺灣的感染症菌種基因庫的建立。而除了一些臺灣 KP 的臨床疾病與抗藥性研究外，少數的臺灣 KP 的分子生物學研究曾報告某院內感染菌血症及肝膿瘍的 PFGE 分析。但是其引起的原發性肺炎，病程進展快速、疾病嚴重，且伴隨高死亡率，以及高機率的轉移性病灶，特別是腦膜炎及眼內炎常發生於臺灣病人，卻無完整且大規模 KP 致病機轉有關的基因型態分析。

本計畫為兩年期的規劃，第一年將達成以下成果：(1) 完成近 400 株 KP 菌株的 PFGE 分析，其中包括菌血症、肝膿瘍、及院內感染的 KP 菌種，分析採用美國疾病管制局建立之菌株標準化操作流程與標準化設備與軟體(目前使用 BioNumerics 分析軟體)，與衛生署疾病管制局第三分局合作，正進行資料之比對及菌株流病資料之統計。第二年繼續執

行肺炎及腦膜炎較少見不足之菌株收集與分析。(2) 完成近 400 株 KP 菌株的完整病人病史，病人的確定診斷及臨床檢體的來源追蹤，均由感染科醫師與助理實地負責。醫師與助理整理病人臨床數據，包括姓名、年齡、性別、居住所在地、糖尿病及其它內科疾病的病史、藥物包括抗生素使用史、實驗室數據、影像學分析等。分析臺灣 KP 可能的致病變數，初步可見大部份病人患有糖尿病，更有趣的是重複感染 KP 的約有 10 餘位病人，全部患有糖尿病，其他臨床數據的分析正在進行中，第二年我們也將繼續執行 KP 感染的正常人與糖尿病病人糞便 KP 菌種比較，及收集美國及其它國家 KP 菌種進行分析。(3) 本計畫已完成的近 400 株 KP 菌株，將建構成一 PFGE 圖譜資料庫，分析後之菌株委託永久保存於衛生署疾病管制局第三分局細菌病原菌 DNA 指紋資料庫核心實驗室，以利其他醫療與研究者取得菌株，進行研究。未來我們將利用已保存之菌株及資料庫，更進一步研究 KP 的致病機轉與 KP 預防及臨床治療不同的方向。