

計畫編號：DOH95-DC-1023

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

2002-2005南台灣臨床與環境*Acinetobacter baumannii*分離株的抗藥性  
與菌株散佈之趨勢

## 研究報告

執行機構：高雄榮民總醫院 感染控制室

計畫主持人：陳堯生

研究人員：陳亞雷

執行期間：95年1月1日至95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

中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	5
材料方法.....	7
結果.....	11
討論.....	13
結論與建議.....	14
計畫重要研究成果及具體建議.....	15
參考文獻.....	17
圖.....	19
表.....	25

## 中文摘要

本計畫規模性的收集 2002-2005 年之 *A. baumannii*(AB)臨床分離株與環境分離株。臨床分離株取自菌血症病人(菌血症發生日數>7 日)之血液檢體分離株。環境檢體分離株，取自高雄榮民總醫院 ICU 或各病房的自來水管路。所有菌株都經過生化與分子檢測而確認之。環境分離株則特別以 16S-23S RNA ITS 之分子檢定，排除 *A. baumannii* 以外之 *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex 菌群或未定義的類似菌。所有菌株均使用抗生素感受實驗，界定為 GR (general resistant)、MDR (multiple drug-resistant)與 PDR (pandrug-resistant)菌株。得到臨床分離之 GR-AB、328 株; MDR-(PDR-)AB、34 株，環境分離株則都屬 GR-AB。分析臨床分離株的分離地點，顯示呼吸治療病房發生 *A. baumannii* 院內感染的件數最多。所有分離菌株經過 integron 基因的篩選，證實>90%的菌株，皆攜帶有 Int I 基因，但是並無 Int II 或 Int III 基因的發現。大多菌株內 Int I 基因 cassette 所攜帶的抗藥基因相同，屬於 Type IV。但是臨床分離株中，則有偵測到 blaVIM-2 carbapenem resistant gene，突顯了藉由 integron 之 horizontal transfer 而產生 MDR-AB 的重要性。藉由 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)與 PFGE(Plused-field gel electrophoresis)基因圖譜的分子比對，證實 MDR-AB 隨機的散佈於各病房，並未發生特別病房產生獨立菌落化的情形。同時，MDR-AB 的基因圖譜亦與環境分離株無關聯性。但是 RAPD cluster A 的菌株，曾於 2004 年發生明顯的院內感染聚集，但已疏緩。2004 年以後，則出現三種的 RAPD cluster 菌株，並有增加的趨勢。顯示院內 MDR-AB 的感染源開始增多與複雜，需要重視。

## 英文摘要

The clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii* (AB) were collected with a large panel from 2002 to 2005. These isolates were respectively originated from blood specimens of septicemia patients and water conduits of Kaoshiung Veterans General Hospital. All isolates were identified by testing with biochemical and molecular diagnosis. In particular, the environmental isolates had been identified with nucleotide sequences of 16S-23S RNA ITS to exclude the presences of other *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex or unidentified AB-like bacteria. Subsequent to analysis of antibiotic susceptible test, these isolates divided into GR (general resistant), MDR (multiple drug-resistant) and PDR (pandrug-resistant) groups. Totally, 328 of GR-AB and 34 of MDR (or PDR)-AB were collected. All environmental isolates (n=25) were GR-AB group. The number of AB isolates from respiratory ward is greater than that from the other wards. All isolates were performed with molecular analysis for integron genes. Over 90% of isolates harbored int I gene but not harbor int II or int III gene. Almost strains had same antibiotic genes (Type IV) in the cassette of int I gene. However, the int I carrying with blaVIM-2 (carbapenemase gene) was found in the clinical isolates. The evidences in different patterns of RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) and PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) profiling demonstrated that the MDR-AB was randomly distributed in wards of hospital not colonized in any certain wards. Also, the genotypes in MDR-AB were not correlated with those in environmental isolates. Nevertheless, the strains with RAPD cluster A profiling had been colonized in hospital in 2004. After 2004, the strains of MDR-AB with novel three distinct RAPD cluster profiling were increased, indicating that the origins of MDR-AB in hospital were multifarious and complicated.

## 前言

自 1970 年起，*Acinetobacter baumannii* 受抗生素濫用的影響，逐漸發展成 multiple drug-resistant(MDR-AB)菌種，成為全球新興的院內感染病原菌 (Bergogne-Berezin and Towner, 1996)。自 1991 年時，美國發生第一次的 carbapenem-resistant *A. baumannii* 的 nosocomial outbreak (Go et al., 1994)，MDR-AB 即成為全球性的焦點。台灣則於 1998 年首度分離出 MDR-AB，並於 1999 年證實，此分離株在醫院 ICU 病房，發生長達一年的菌落化與散佈，計有 73 人因此而感染(Hsueh et al., 2002)。迄今(2006) MDR *A. baumannii* 發生的比例，已>6-10% (Hsueh et al., 2002; 高雄榮民總醫院統計資料)。若不有效的控制 MDR-AB 的擴散，以及研究其抗藥機制，MDR-AB 的院內感染，將會完全無法掌握。因此，自 2004 年起則開始建置院內感染基因資料庫與流行病學即時監測，包括有系統的建立台灣 MDR-AB 的基因圖譜與抗藥基因之核酸序列基礎資料。本計畫則針對南台灣地區 MDR-AB 之分離菌，進行蒐集、基因圖譜與 Integron 之 horizontal transfer 抗藥基因之分析。

*A. baumannii* 易藉由醫護人員而帶源或醫療器皿的汙染，導致住院病人發生感染。茲為釐清過去 MDR-AB 是否透過醫院環境之水管線而散佈，因此，本計畫分析之 *A. baumannii* 菌種，將涵蓋醫院環境之分離菌。不過，環境中分離之 *A. baumannii* 是屬於 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex，此 complex 菌群包括 *A. calcoaceticus*、*A. baumannii*、genomic species 3 與 13TU 等菌株，其基因型與生物表現型非常相近(Gerner-Smidt and Tjernberg, 1993)。因此，本計畫將使用 16S RNA 與 23S RNA 間的 ITS 序列，做為 Intra-與 Inter-species 鑑別指標(Barry et al., 1991)。先從環境分離之 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex，確實的分離出 *A. baumannii*，再進行基因圖譜與抗藥性的分析。

雖然 *A. baumannii* 的基因分型已建置了多種的分析方法，包括有 antibiogram typing、ribotyping、PCR fingerprinting、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)與 PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis)等(Gurtler and Mayall, 2001)。雖然

PFGE 被視為是菌株分型的標準方法，但是分析大量菌株時，卻因耗時、耗成本、耗人力，變得滯礙難行。因此，本計畫以 RAPD 配合 PFGE 的方式，進行菌株分型與比較。

*A. baumannii* 抗藥性產生的機制，非常複雜。包括 porin 性質改變，使得  $\beta$ -lactams 抗生素無法進入菌體 (Nitzan et al., 2002)，plasmid-encoded 或 chromosome- encoded  $\beta$ -lactamase 發生變異，使得水解  $\beta$ -lactam 類抗生素的能力增強 (Amyes and Young, 1996)。或者藉由 integron gene，將許多院內感染菌種之抗藥基因，經由 horizontal transfer 的方式，產生 MDR 的菌種 (Koeleman et al., 2001)。至於 Natural transformation 產生之抗藥性機制，雖然在 *Acinetobacter* 菌屬中被證實 (Palmen and Hellingwerf, 1997)，但是較少發生 (Heritier et al., 2005)。台灣地區目前並無對 *A. baumannii* 攜帶 integron 的種類，進行規模性的篩檢，以瞭解抗藥性基因水平轉移的情形。不過已證實 *Pseudomonas aeruginosa* 之抗藥性菌株，攜有 blaVIM-3- containing integron (Yan et al., 2006)，以及有 2 株 *A. baumannii* 攜有 integron-encoding metallo-  $\beta$ -lactamase gene (Liu et al., 2005)，說明了 *A. baumannii* 的抗藥性在院內藉由 integron 水平轉移的重要性。因此，本計畫亦將對 *A. baumannii* 臨床與環境分離株，進行規模性的 integron 的篩檢，以及分析 integron cassette 內所攜抗藥基因的特徵與種類。

MDR-AB 造成的院內感染，是非常棘手的問題 (Webster et al., 1998)，並且會在 ICU 發生 nosocomial outbreak，是屬於全球性新興與嚴重公衛問題的疾病。因此，本計畫開始有系統的收集與建立台灣 *A. baumannii* 的基因體資料庫，與抗藥基因等基本資訊，是建置 *A. baumannii* 的流行病學之即時監測的重要參考資料。

## 材料與方法

### 檢體收集與菌株保

檢體分為臨床檢體與醫院環境檢體分離株等。臨床檢體則收集自 2002-2006 年間之病人檢體的分離株。醫院環境檢體分離株，則取 2003-2006 年高雄榮民總醫院各病房的自來水為檢體來源，所得之 *A. baumannii* 分離株。所有檢體均經生化檢測、16S-23S rRNA 基因鑑定後，保存於-80°C。

### DNA 檢體處理

*B. pseudomallei* 於 LB broth 隔夜培養後，將菌體離心之。細菌沉澱物的 DNA 萃取係使用 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)，萃取的方法依據標準手冊實施之。DNA 的沉澱物於室溫或 65°C、以 TE buffer 溶解之。DNA 的純度以 OD260nm/OD280nm 的比值決定之。所有的 DNA 檢體儲存於-20°C，直到實驗時使用之。

### 16S-23S rRNA 基因鑑定

菌種 16S-23S RNA ITS 核酸的 PCR 反應，是使用 Universal primers 1512F (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3')與 6R (5'-GGGTTYCCCCRTTTCR) GAAAT-3' (Y=C or T; R=A or G)。並以 *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex 萃取之 chromosomal DNA 為模板，進行 PCR 反應。反應混合物包括 0.25µl *Taq* polymerase (TaKaRa)、20 pmol forward 與 reverse primer、6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>、5 µl 2 mM dNTP、5 µl 10x PCR buffer、0.5 µl 2.5-mg/ml 8-methoxypsoralen (Sigma)。反應條件為：Denature：94°C、1min.；Anneal：55°C、30sec；Extention：72°C、1min.。所得之 0.5-0.7 kb 之 specific amplicon 為鑑別菌種的依據(Chang et al., 2005)。PCR 反應與各項分子技術依據標準步驟實施之(Sambrook and Russell, 2001)。

## 菌株的抗藥性試驗

臨床檢體分離株之抗藥性試驗，是依據 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 定義之 agar dilution method 實施之。並將實驗結果區分 pandrug-resistant (PDR; 全面具抗性)、multiple drug-resistant (MDR; >4 種以上) 與 general resistant (GR;  $\leq 3$  種) 等三類。所選用之抗生素計有：ceftazadime, cefepime, amikacin, flomoxef, imipenem, meropenem, ampicillin-sulbactam 與 moxifloxacin。將菌液以 McFarland standard 調整為 0.5 單位後，均勻塗抹於 Mueller-Hinton agar，於 35°C 培養後觀察之。所得之抗藥性圖譜，亦依據 PDR、MDR 與 GR 分類之。

## 基因分型

### 1. RAPD

RAPD 的 primer 選擇是使用前述之 ERICI、OPH03、OPQ-03、OPQ-16 與 primer-W。PCR 反應容積為 25  $\mu$ l，包括 50 pmol random primer、2 mM MgCl<sub>2</sub>、2 U Taq polymerase、250  $\mu$ M dNTP。反應條件：95°C 1 min., 35°C 2 min., 72°C 2 min. 進行 5 次循環，95°C 1 min., 35°C 1 min., 72°C 1 min. 再進行 35 次循環。反應畢，以 1% agarose gel 電泳之。

### 2. PFGE

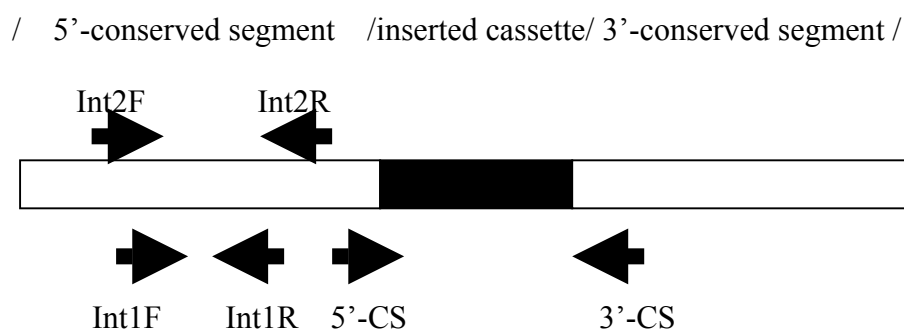
待測菌株於 37°C 培養 16 h 後，取細菌沉澱物均質混合於 10 mM Tris-HCl buffer，並取 1:1 比例之 2.0% (w/v) pulsed-field certified agarose (Bio-rad) 混合之，其混合液添加 4  $\mu$ l lysozyme (25mg/ml)。取其混合液 100  $\mu$ l 加入固定器中，並於 4°C 下固化之。所得之固化方塊置於 lysozyme buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.2 % (w/v) sodium deoxycholate; 0.5 % (w/v) sodium lauryl sarcosine)，並添加 40  $\mu$ l lysozyme (25 mg/ml)，於 37°C 下作用 1 h。作用畢，以 wash buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) 洗滌之。洗滌後之固化方



塊，加入 1 mg proteinase K 於 1 ml proteinase buffer (100mM EDTA; 0.2% (w/v) sodium deoxycholate; 1.0% (w/v) sodium lauryl sarcosine; pH 8.0)，並以含有 100mM PMSF 之 wash buffer 洗滌 30 min. 洗滌畢，以 SpeI、XbaI 或 Sau3I 於 37°C 作用 18 h。反應後之 DNA 片段以 PFGE 電泳之 (CHEF DRII system, Bio-rad)，電泳條件：initial plus 5 sec., final plus 35 sec., 14°C, 20 h, 1% plused-field certified agarose。

### Integrase gene 篩檢

PCR 擴增 integron，係使用其 integron 的特性而設計 specific primer (Koeleman et al., 2001; Ramirez *et al.*, 2005)，如下圖：



5'CS : GGCATCCAAGCAAG

3'CS : AAGCAGACTTGACCTGA

Int1F : CAGTGGACATAAGCCTGTTC

Int1R : CCCGAGGCATAGACTGTA

Int2F : TTGCGAGTATCCATAACCTG

Int2R : TTACCTGCACTGGATTAAGC

Int3F : AGG TGC CTC CGG CAG CG

Int3R : GAC CAT GCT CGC CAC CGC CGA GA

經由 PCR 反應鑑別 integron Class (1-3) 後，若 int gene 呈陽性，再藉由 integron 之 inserted gene cassette 的 conserved region 的 specific primer 反應 (5' CS 與 3' CS)。混合物包括 0.25 μl Taq polymerase (TaKaRa)、20 pmol forward 與 reverse primer、6 μl 25 mM MgCl<sub>2</sub>、5 μl 2 mM dNTP、5 μl 10x PCR buffer、0.5 μl 2.5-mg/ml 8-methoxypsoralen (Sigma)。反應條件為：Denature：94°C、1min.；

Anneal : 55°C、30sec ; Extention : 72°C、1min.。所得之 PCR 反應物，經定序分析後，以 BLAST 分析其 cassette 內的基因分佈。

### 統計分析

DNA 片段的 cluster analysis 是使用 BioNumerics (version 2.0)分析軟體 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belguim)，相似度的判定是依據 Pearson product moment coefficient ( $r^2$ )，grouping analysis 則使用 unweight pair group average linked method。

## 結果

### 一、檢體收集與分析

檢體分為臨床檢體、環境檢體兩方面收集。臨床檢體收集自 2000-2005 (1-4 月)之菌血症病人(菌血症發生日數>7 日)之血液檢體分離株，計 362 株。環境檢體分離株，則取 2003-2004 年高雄榮民總醫院 ICU 或各病房的自來水為檢體來源，計 157 株。但經生化檢測進一步確認，以及 16S-23S RNA ITS 之核酸序列分析，發現大多屬於 *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex 或未定義的類似菌。因此，取 16S-23S RNA ITS 達 100% identities 的分離菌，定義為 *A. baumannii* (計 25 株)，進行後續的實驗(表一)。

使用 disk diffusion 之抗生素的抗性分析的結果，顯示臨床分離株，若對於 carbapenem 產生抗性，則同時對目前使用之抗生素，產生全面性的抗性，因此可歸類於 pan-drug resistant (PDR)。PDR-AB 則於 2003 年開始產生盛行的波峰，迄今、每年約有 11-16%的分離率(圖一)。環境分離株的抗藥性，則尚為發現有 MDR-AB 或 PDR-AB，對各抗生素的抗藥比例，平均約 10-30% (圖二)。

*A. baumannii* 特別易於 ICU 造成聚集感染，因此進一步分析 2002-2005 年間之 *A. baumannii* 院內感染的個案，其所治療的病房位置。結果顯示患者分別隸屬於 40 個不同的病房(包括 ICU 等)，雖然 ICU 病房感染 *A. baumannii* 的病患較一般病房高，但 53 號病房(呼吸治療病房；病患使用呼吸器治療)，則明顯的有高於其它病房的趨勢 (圖三)。

### 二、菌種之 Integron gene 分析

利用 Int gene 之特異性序列，鑑別 *A. baumannii* 菌種之 integron 的分佈。結果顯示臨床分離株與環境分離株，>90% 攜帶有 Int I gene，但並無 Int II 或 Int III 基因的發現。將 CS region 的核酸序列分析，顯示 Int I gene 之 cassette 有四種型式(圖四)。臨床與環境分離株之 Int 基因，多屬於 Type IV (80%)。但環境分離株，則無 Type I 與 Type II 的兩種形式。值得特別注意的是 Int I 攜帶 blaVIM-2

carbapenemase 的 MDR-AB，則首度於台灣地區發現。迄今已分離兩株，雖然經分子鑑定後，尚無明顯的聚集於醫院各病房。但是利用 integron 補捉 carbapenemase 的 horizontal transfer，進而產生 MDR-AB 或其他抗藥性菌種的重要性，則因而增加。

### 三、菌種之基因圖譜分析

我們分析 MDR-AB 之 RAPD 基因圖譜，發現可明顯的分為五個聚集(圖五)。但以 PFGE 分析，Cluster A-D 之各菌株，仍可獲得相同的基因圖譜而歸屬於相同的聚集。但 Cluster E 的聚集分離株，則經 PFGE 基因圖譜分析後，歸屬於兩個獨立基因型的分離株(圖六)。顯示本研究使用的 random primer，具有足夠的鑑別能力，在本研究的 PCR-RAPD 分析條件下，可以進行 *A. baumannii* 菌株之分子分型工作。

我們亦追蹤 Cluster A-D 之 MDR-AB 的分離趨勢，發現 Cluster A 曾在院內發生菌落化，並且盛行於 2004 年。而 Cluster B-D 則於 2004 年起，正在散佈、並且有菌落化聚集增加的趨勢(圖七)，顯示院內感染 *A. baumannii* 的來源可能逐漸分散與增加。

由於 *A. baumannii* 在呼吸治療病房特別盛行，因此分析各聚集的分離株於各病房的散佈情形。結果顯示，cluster A-D 之各聚集菌株，均隨機的散佈於各病房，並未發生特別病房產生獨立菌落化的情形。

我們亦使用 *A. baumannii* 的環境分離株之 RAPD 基因圖譜，進行比對分析。結果環境分離之 25 株 *A. baumannii*，都屬於獨立的基因型，並與臨床分離株的基因圖譜不相同，顯示院內感染的 *A. baumannii* 的來源，可能不是來自於各病房的水管管線。

## 討論

自 2000 年起，MDR-AB 則可於院內感染之患者分離，但個案數小於 5 例。並且於 2002 年，並未分離出 MDR-AB。但自 2003 年起，MDR-AB 院內感染之個案數又開始增加，迄今已維持在 15% 的分離率，成為院內管控的重要事件。MDR-AB 產生抗藥的機制，非常複雜。包括 porin 性質改變(Nitzan et al., 2002)，plasmid-encoded 或 chromosome- encoded  $\beta$ -lactamase 發生變異(Amyes and Young, 1996)，Natural transformation(Heritier et al., 2005)與藉由 integron gene 發生抗藥性基因的菌種間水平轉移(Koeleman et al., 2001)等等。本計畫規模性的分析所有臨床分離株之 integron，幾乎(>90%)所有的臨床或環境的分離株，都攜有 int I 基因。特別是由兩株 MDR-AB 之 int I 基因 cassette 內，發現 blaVIM-2 (carbapenemase resistant gene)，雖然目前尚未發生明顯的菌落化，但 *A. baumannii* 產生 carbapenem-resistant，將可能藉由 integron 而快速散佈。

迄今，涉及 carbapenem resistant 的 MDR-AB 之 int I 基因 cassette 內包括有 metallo- $\beta$  lactamase gene 與 OXA-type carbapenemases gene (Tsakris et al., 2006; Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006)。除了本計畫報告之 blaVIM-2 菌株外，台灣地區亦有兩株 integron-mediated bla<sub>IMP-1</sub> 的報告(Lee et al., 2006)。這些 integron 的 horizontal transfer 將可能誘發院內各抗藥菌種的產生。因此，需要對 integron 所攜帶之 IMP-, VIM-like 或 OXA type 的 cassette，繼續進行監測，並瞭解其分佈與擴散的情形。

MDR-AB 的基因圖譜分析，發現 Cluster A 的分離菌株，已由 2003 年起，在院內感染中聚集，並且盛行於 2004 年。此外，2004 年起，Cluster B、C 與 D 的分離菌，亦開始增加，顯示 MDR-AB 的感染源有擴散與增多的趨勢。不過，目前的 MDR-AB，在院內各病房都屬於隨機的出現，並無任何病房發生明顯的菌落化情形，此可能是藉由一個非固定式工作的人員或用具的污染，因隨機性的出現在各病房而導致，但其相關的分子證據仍待證實。本計畫透過對院內水管管道的分離株的基因圖譜比對，已初步排除藉由水管通道傳播的可能性。未來更需要建置院內感染基因資料庫，方可即時監測 MDR-AB 的感染源。

## 結論與建議

藉由臨床分離株(n=362)，以及醫院水管管道之環境分離株(n=25)的抗藥分析結果，臨床株有 10 %之 MDR-AB，環境株則無 MDR-AB 的分離。經過 integron 基因的篩選，>90%的菌株皆攜帶有 Int I 基因，但是並無 Int II 或 Int III 基因的發現，雖然大部份菌株之 int 基因，是屬於 Type IV。但是臨床分離株中，有偵測到 blaVIM-2 carbapenemase resistant gene，突顯了藉由 integron 之 horizontal transfer 而產生 MDR-AB 的重要性。

藉由基因圖譜的分子比對，證實了 MDR-AB 之 cluster A，曾經於 2004 年在院內感染中，發生明顯的聚集，但已逐漸疏緩。然而，2004 年以後，產生多種的 MDR-AB cluster，並且有增加的趨勢，顯示 MDR-AB 的感染源增加。但 MDR-AB 並無在院內任何病房發生明顯的菌落化，同時也未與環境分離株的基因型有相關性。

因此，我們建議：

1. 持續追蹤 int 1 基因 cassette 內 metallo- $\beta$  lactamase gene 與 OXA-type carbapenemases gene 的發展，並且建置其抗藥基因的資料庫。特別針對 IMP-, VIM-like 或 OXA type 的 cassette，以及新的突變株的產生，以掌握 MDR-AB 抗藥趨勢的發展。
2. 雖然 *A. baumannii* 主要構成 ICU 病房的院內感染威脅，但在本院則高峰的出現在呼吸治療器使用的病房。雖然目前 MDR-AB 並未菌落化在此病房，亦未藉由院內水管管路散播，但卻出現多種的感染源在院內中出現的趨勢。因此，繼續建置 *A. baumannii* 基因圖譜資料庫，完成流行病學的即時監測。

## 計畫重要研究成果及具體建議

### 重要研究成果概述

#### A. baumannii 菌株收集分析

依據計畫書內容，已順利的收集 2002-2005 年之 *A. baumannii* 臨床分離株與環境分離株，所有菌株都經過生化與分子檢測而確認之。其中環境分離株，特別以 16S-23S RNA ITS 之分子檢定，排除 *A. baumannii* 以外之 *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex 菌群或未定義的類似菌。所有菌株均使用抗生素感受實驗，界定為 GR (general resistant)、MDR (multiple) 與 PDR (pandrug-resistant) 菌株。同時，亦完成臨床分離菌的分離地點分析，顯示呼吸治療病房發生 *A. baumannii* 院內感染的件數最多，是首要排除 *A. baumannii* 院內感染的地點。

#### 完成菌株之基因分型分析

本計畫使用 RAPD 與 PFGE 進行基因分型，並對基因圖譜加以比較。發現 MDR-AB 於 2002-2005 年間，cluster A 有明顯盛行的趨勢，特別高峰於 2004 年。迄今，則出現三種 cluster 之 MDR-AB，有在院內散佈與菌落化的趨勢，提供了院內感控的標的，並且建置了基因圖譜。

#### 完成菌株之 integrase gene 篩檢

本計畫清楚的證明，>90% 的 *A. baumannii* 菌株攜有 int I 基因。並且 intI 基因的 cassette 可分為四種形式。不論臨床或環境分離株，均主要是以 Type IV 為主。特別重要的是發現是 Int I 攜帶 blaVIM-2 carbapenemase 的 MDR-AB，雖然目前此類菌株尚不普遍，但是利用 integron 補捉 carbapenemase，發生 horizontal transfer，進而產生 MDR-AB 或其他抗藥性菌種的重要性，則因而增加。

具體建議：

### 1. Carbapenemase IMP-、VIM-like 與 OXA type 之篩檢與鑑別

目前檢測的 carbapenem-resistant 菌株，均屬於 MDR 或 PDR。其抗藥機制非常複雜，至少涉及四種 IMP-like、三種 VIM-like 與八種 OXA type 之  $\beta$ -lactamase。須持續追蹤 int 1 基因 cassette 內 metallo- $\beta$  lactamase gene(包括 IMP-like、VIM-like 與 OXA type)，以建置其抗藥基因的資料庫。特別針對 IMP-, VIM-like 或 OXA type 的 cassette，以及新的突變株的產生，以掌握 MDR-AB 抗藥趨勢的發展。

### 2. 建置 *A. baumannii* 基因圖譜資料庫，完成流行病學的即時監測

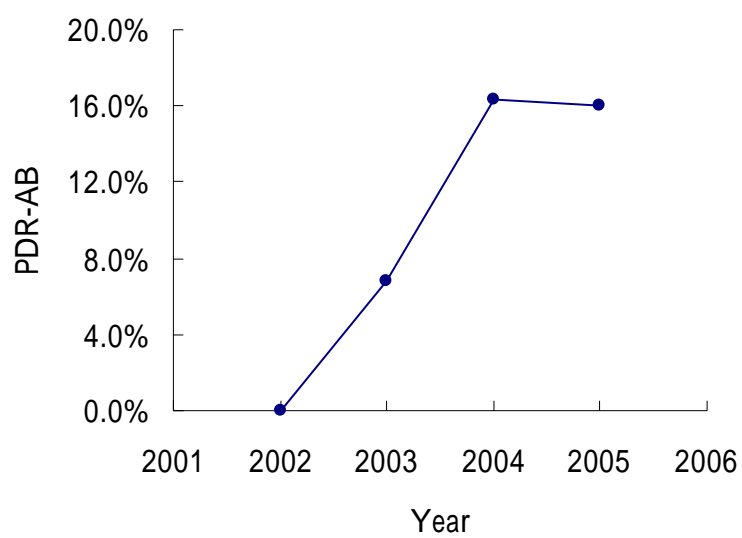
*A. baumannii* 易藉由醫護人員或醫療器皿，發生院內感染。目前 MDR-AB 雖然有三種 cluster，逐年發生聚集的情形，但尚未發生明顯的菌落化。因此，繼續建置 *A. baumannii* 基因圖譜資料庫，完成流行病學的即時監測，將可利於管控 *A. baumannii* 所造成的院內感染。



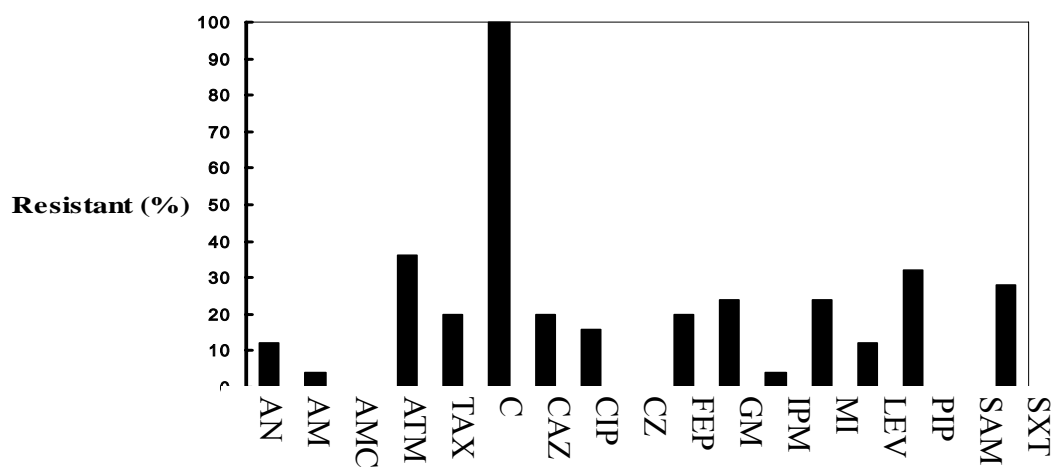
## 參考文獻

- Amyes SG, Young HK.** Mechanisms of antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. genetics of resistance, p. 185-223. In E. Bergogne-Bérézin, M. L. Joly-Guillou, and K. J. Towner (ed.), *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. CRC Press, 1996; Boca Raton, Fla.
- Barry, T, Colleran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F.** The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1991; 1, 51-56
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbio. Rev* 1996; 9, 148-165
- Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC.** Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 2005; 43, 1632-1639
- Gerner-Smidt P, Tjernberg I.** *Acinetobacter* in Denmark. II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS* 1993; 101, 826-832
- Go ES, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, Mosinka-Snipas K, Rahal JJ.** Clinical and molecular epidemiology of acinetobacter infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet.* 1994; 344, 1329-32
- Gurtler V, Mayall BC.** Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51(Pt 1):3-16
- Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P.** Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49, 4174-4179
- Huseh PR, Teng RJ, Chen CY, Chen WH, Yu CJ, Ho SW, Luh KT.** Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002; 8, 827-832
- Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH.** Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39, 8-13
- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong**

- Y.** Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49, 4485-4491
- Liu SY, Lin JY, Chu C, Su LH, Lin TY, Chiu CH.** Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 27, 81-84
- Nitzan Y, Deutsch EB, Pechatnikov I.** Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Curr Microbiol.* 2002; 45, 446-455
- Palmen R, Hellingwerf KJ.** Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Gene* 1997; **192**, 179-190
- Ramirez MS, Quiroga C, Centron D.** Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; **49**, 5179-5181
- Sambrook J, Russell DW.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2001; Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleki LS, Sofianou D, Legakis NJ, Maniatis AN.** VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 2006; **12**, 981-983
- Walther-Rasmussen J, Hoiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **57**, 373-383
- Webster CA, Crowe M, Humphreys H, Towner KJ.** 1998. Surveillance of an adult intensive care unit for long-term persistence of a multi-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17, 171-176
- Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Ko WC, Wu JJ.** Characterization of acquired {beta}-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J Antimicrob Chemother.* 2006 ; 58, 530-536

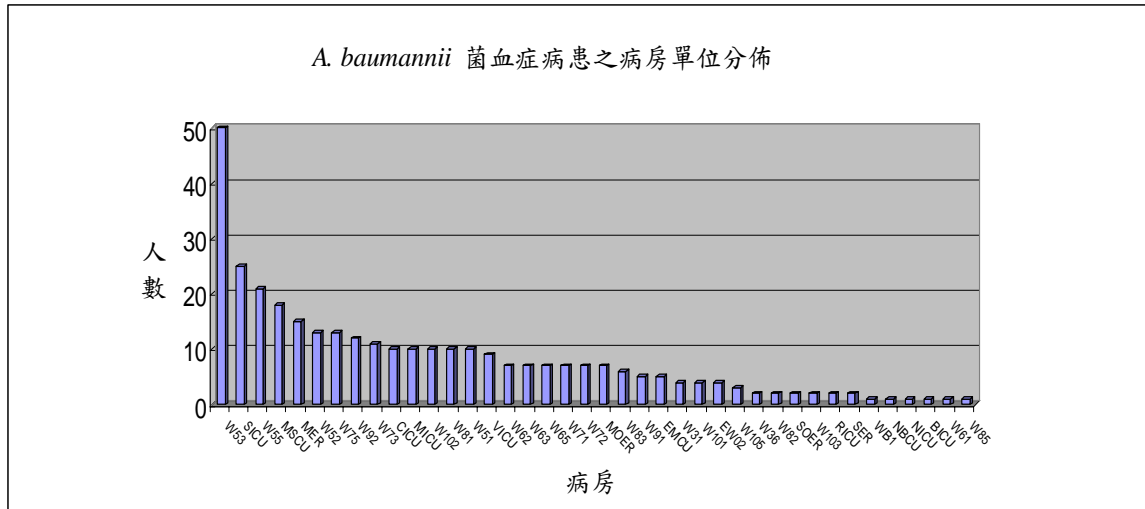


圖一、*A. baumannii* 引發院內感染案例分析圖。

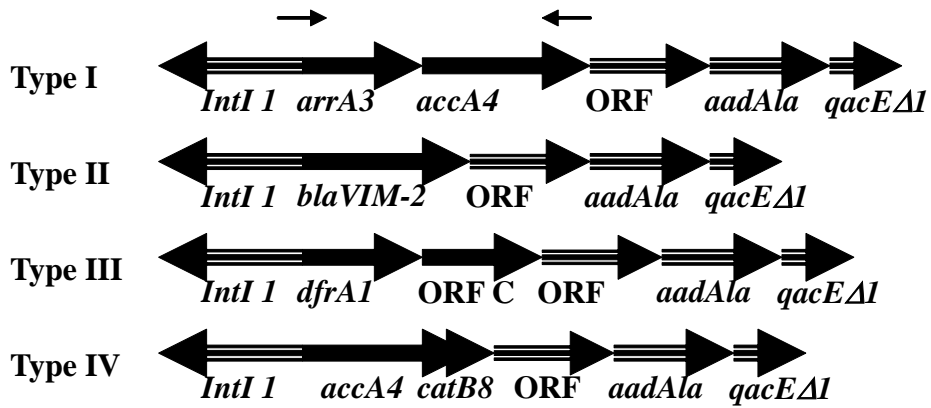


圖二、環境分離株的抗藥性分析圖

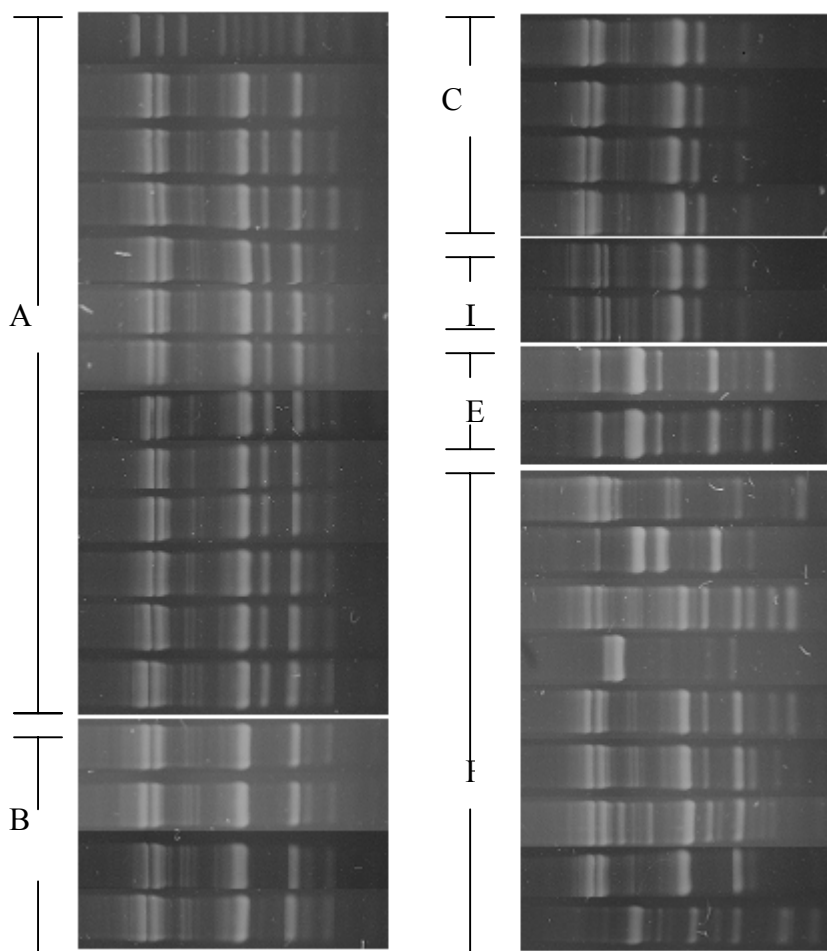
AN:Amikacin,CIP:Ciprofloxacin,GM:Gentamicin,PIP:Pipril,IPM:Imipenem,ATM :Aztreonam,TAX:Cefotaxime, MI:Minocycline, C:Chloramphenicol, SXT:Baktar, CAZ:Ceftazidime,FEP:Cefepime,LEV:Levofloxacin



圖三、2002-2005 年間 *A. baumannii* 感染個案的病房分佈



圖四、MDR-AB 分離菌之 Integron class 1 之 cassette 基因



圖五、RAPD 基因圖譜分析

A: Cluster A 菌群(AB-8; AB-9; AB-10; AB-11; AB-15; AB-16; AB-17; AB-20;

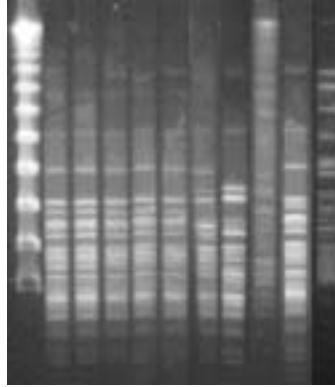
AB-22; AB-29; AB-31) B: Cluster B 菌群(AB-13; AB-14; AB-27; AB-30) C: Cluster

C 菌群 (AB-23; AB-25; AB-26; AB-32) D: Cluster D 菌群(AB-24; AB-28) E:

Cluster E 菌群 (AB-3; AB-21) F: 獨立圖譜之代表菌 9 株 (AB-1; AB-2; AB-4;

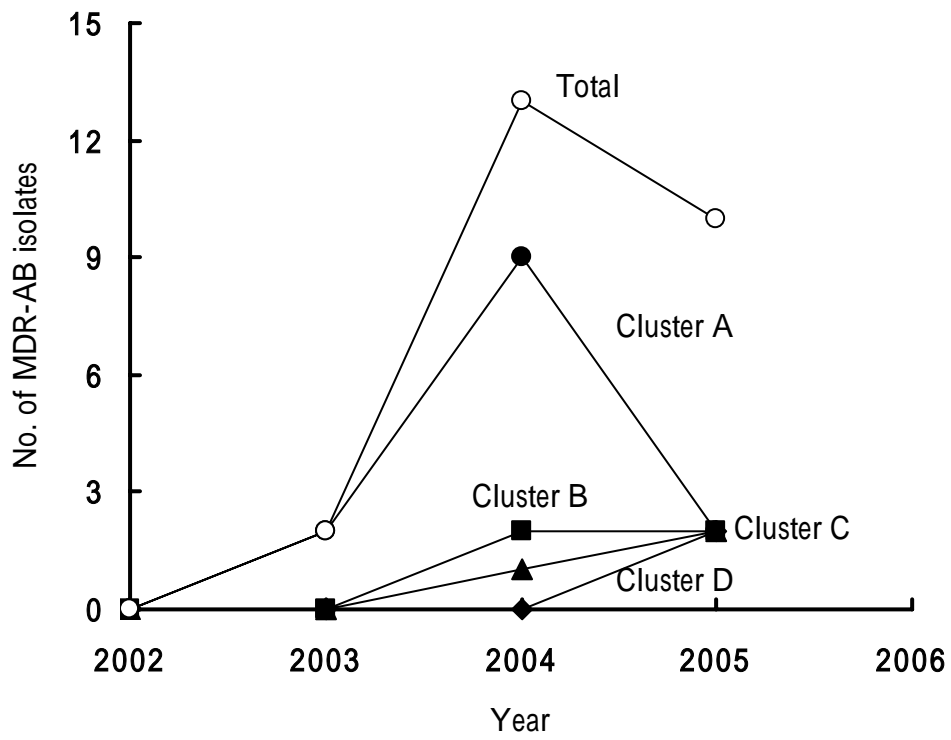
AB-5; AB-6; AB-7; AB-12; AB-18; AB-19)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



圖六、PFGE 基因圖譜分析

M: Molecular weight marker; Lane 1-5: RAPD cluster A 代表菌; Lane 6: RAPD cluster B 代表菌; Lane 7: RAPD cluster C 代表菌; Lane 8 RAPD Cluster D 代表菌; Lane 9-10: RAPD Cluster E 代表菌。(RAPD cluster E 之兩株代表菌之 PFGE 圖譜不同，故定義為兩株獨立菌株)



圖七、RAPD cluster 之 MDR-AB 菌株分離圖

Total: 年度 MDR-AB 之分離總數; Cluster A-D : RAPD 基因圖譜分型之聚集 A-D



表一

*Acinetobacter baumannii* isolates

	<u>Collection (Years)</u>					
	2000	2001	2002	2003	2004	2005 <sup>f</sup>
Clinical						
PDR <sup>a</sup> -AB <sup>b</sup>	4	5	NF <sup>d</sup>	2	13	10
AB	ND <sup>e</sup>	62	63	87	87	29
Environ <sup>c</sup> .						
AB	ND	ND	ND	12	9	4

a: pan-drug resistant. b: *Acinetobacter baumannii*. c: Environmental isolates. d: Not found. e: Not Detected. f: Closing date on April, 30, 2005.