計畫編號：DOH100-DC-1025

行政院衛生署疾病管制局 100 年度科技研究發展計畫

計畫名稱： 臺灣腸內菌中 carbapenem 的抗藥性機轉和流行病學研究

研 究 報 告

執行機構：財團法人國家衛生研究院感染症研究組
計畫主持人：蕭樑基
研究人員:蕭樑基,馮長風,吳竹蘭,林永崇,盧柏樑,賈儒馨
執行期間：100 年 2 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

目錄

封面

目錄

(1)前言: 包括研究問題之背景與現況, 研究目的等 (3)

(2) 材料與方法 (4)

(3)結果 (8)

(4)討論 (12)

(5) 結論與建議 (15)

(6)計畫重要研究成果及具體建議 (16)

(7) 參考文獻 (17)

表 1 (21)

表 2 (23)

表 3 (23)

表 4 (24)

表 5 (24)

圖 1 (25)

(1)前言：包括研究問題之背景與現況，研究目的等

Carbapenem 類的抗生素(ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem)在對 *Enterobacteriaceae* 引起的感染一貫以來都保持有相當好的療效。它優於第三代,第四代的 cephalosporins 抗生素之處是它不會被細菌產生的 AmpC 或 ESBL 水解。儘管 imipenem 已經上市 20 年, 對它的抗藥性仍屬少數。但是由於近年來 ESBL 在全球的廣泛又快速的傳播, Carbapenem 類的用量直線上升。隨著 cabapenem 抗藥的腸內菌(CRE)的出現,特別是近年來被稱為超級細菌的 KPC 和 NDM-1[1-3] 在世界各地的爆發,對健康照護政策是一個重要的挑戰。CRE 通常對所有的 beta-lactam 類藥物以及其他類的藥物都抗藥。對感染 CRE 的病患在治療上的選擇變得非常有限。在感控上感染 CRE 的病患通常被認為是一個傳播源, 正確診斷出 CRE 的患者並採取及時隔離措施是預防擴散的一個重要步驟。CRE 發生機制主要是菌株得到 carbapenemase 或菌株產生 extended-spectrum cephalosporinase, 如 AmpC 型的 beta-lactamse 合併細菌外膜的缺失[4]。當前 CRE 在全球的快速增加已引起了國內外相當大的關注。在臺灣的腸內菌中曾經有 IMP-8 和 VIM-2 爆發的報導[5], 但是並沒有做過全國性的包括 CRE 的抗藥情形和機制的流行病學的調查。為了建立一套能有效防治具有 cabapenem 抗藥性的腸內菌的感染控制政策，我們對本土的 cabapenem 類藥物抗藥性進行流行病學調查並且瞭解引起其產生抗藥性的原因，而抗藥機轉的研

究更為政府在制定防疫政策前之一個不可或缺的步驟。故於本計畫中，我們將依循著上述的研究目標，分成三個子計畫來研究臺灣腸內菌 cabapenem 類藥物抗藥性存在的實際情形及其對 cabapenem 類藥物的抗藥機轉。本研究所使用的抗藥性細菌皆來自醫學中心且範圍涵蓋全國，而三個子計畫分工的研究內容為：子計畫一為分析抗 cabapenem 腸內菌的流行病學及感控措施的關聯性；更由於具有 cabapenem 抗藥性的腸內菌主要集中於大腸桿菌和克雷白氏肺炎桿菌並且計畫執行時間僅有一年，故我們對這兩種主要發生 cabapenem 抗藥性的腸內菌之抗藥性機轉分成子計畫二及子計畫三來研究。我們所得到的研究結果將可為臺灣具有 cabapenem 抗藥性的腸內菌提供第一個完整的資料庫，而這個資料庫將可為政府對瞭解這一類的感染和醫療照護在臺灣的現況提供一個總覽，有利於政府相關部門運用這個資料庫為將來制定適當的感染控制政策及預防超級細菌基因的入侵。

本計畫的主要研究所要達成之目標為對本土的多重抗藥腸內菌，特別是大腸桿菌和克雷白氏肺炎桿菌對 cabapenem 類藥物的抗藥性進行流行病學調查及抗藥性機轉的研究。

(2) 材料與方法

1. 菌株

收集了 2010 及 2011 年 1-5 月由北、中、南五大醫學中心[三總, 榮總(北榮,高

榮) 中國醫藥大學附屬醫院, 高醫, 長庚 (基隆、林口、及高雄分院)]的八家醫院的對 carbapenem 具有抗藥性的腸內菌臨床菌株共 175 株包括克雷白氏肺炎桿菌 122 株和大腸桿菌 53 株。最初的抗藥性篩選在各自的醫院執行, 第二次的 MIC 確認和菌種的鑒定由我們進行。

2. 抗生素敏感性試驗

利用 Clinical and Laboratory Standards Institute 所建議的 broth micro dilution method[6] 來檢測下列各抗生素的最小抑菌濃度(Minimal inhibitory concentrations, MICs)： cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime/clavulanic acid, ceftriaxone, cefepime, cefoxitin, ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem, gentamicin, amikacin, tigecycline, trimethoprim-sulfonamides 及 colistin，而 tigecycline 的敏感性試驗將利用 E-test(由 AB Biodisk, Solna, Sweden 所生產)的方式來取得，本研究的抗生素敏感性試驗將用 *P. aeruginosa* ATCC 27853 和 *E. coli* ATCC 29212 兩株菌株當作對照菌株，tigecycline 的判讀標準將以 FDA 所建議的為主，而其他抗生素的判讀標準則以 CLSI 為標準 [7]

3. Carbapenemase, AmpC 與 ESBL 的偵測

針對 carbapenem 類抗生素抗性相關基因，包括 carbpanemase、AmpC 與 ESBL cephalosporinase 基因，包括：bla_{SHV}, bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{IMI}, bla_{SME}, bla_{GES}, $bla_{NMC,}$ bla_{KPC}, bla_{OXA}, bla_{CMY}, bla_{DHA}, bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{NDM} 等、及外膜蛋白（大

腸桿菌為 OmpA、OmpC 及 OmpF 基因；克雷白氏肺炎桿菌為 OmpK35 及 OmpK36 的專一性引子對（引子序列詳如附表一）進行聚合酶鏈合反應增幅(PCR)偵測菌株抗藥性基因的有無並將增幅產物進行定序分析得知其基因內容及種類。PCR 反應條件如下: 在反應的 50μL 中包括 5μL DNA 萃取液，1.5U Taq DNA polymerase,dNTP(200μM each)及引子(各 10 pmoles)，作用條件為 94℃ 5 分鐘，35 循環 94℃ 60 秒，依不同引子設定 58~60℃ 60 秒，72℃ 60 秒，然後再 72℃ 10 分鐘。產物以 1.5％ agarose gel 進行電泳分析，利用 PCR 純化 kit(Bioneer, Daejeon, Korea)純化所合成的聚合酵素鏈鎖反應的產物，之後進行 ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)定序。

4. 細胞外膜蛋白分析

以 Mueller-Hinton 液體培養基培養至對數期的菌液以超音波震碎菌體後超高速離心，加入醯基肌氨酸鈉(sodium lauryl sarcosinate)洗滌產物後進行丙烯醯胺膠體電泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)，為 Limanskey 等學者所使用的方法[8]。比較對 carbapenem 具有感受性的標準菌株與本研究中具有 carbapenem 抗藥性卻不帶有 carbapenemase 基因的菌株兩者的細胞外膜蛋白。菌株先於 37℃LB 培養液中隔夜培養，利用離心（7,000 x g 十分鐘）取得細菌，用 ice-cold phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na2HPO4, 1.4 mM KH2PO4 [pH 7.4])清洗後，重新懸浮於

PBS 液體（0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 以及 1 mM dithiothreitol，利用超音波打破細菌的細胞膜，低溫離心（5,000 x g for 10 min at 4℃）收集上清液，加入 N-Lauroyl sarcosinate (sodium salt)，最終濃度為 2.2% (wt/vol), 此產物將保存於 20℃三十分鐘，於 4℃下 100,000g 離心取得外膜碎片，再次用 2.2% (wt/vol) sodium N-lauroyl sarcosinate 沖洗一次，最後重新懸浮於 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)–0.1 mM EDTA–1% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS)。.

上述產物將用 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 分析，polyacrylamide gels 的濃度為 12.5%，使用 Coomassie blue staining 染色，所有的產物在執行電泳前須煮沸 5 分鐘。電泳結果將與大腸桿菌標準菌株 ATCC 25922 或克雷白氏肺炎桿菌標準菌株 ATCC 13883 作對照組分析其外膜蛋白型式。

5. 脈衝式電場膠體電泳分析(Pulsed-field gel electrophoresis [PFGE]analysis)

依過去所述之方式製備細菌的基因體 DNA 並進行脈衝式電場膠體電泳分析[9]。依據製造廠所建議之方法使用限制脢 *Xba*I (購自 New England Biolabs, Beverly, MA, USA)將 DNA 切為片段，再利用脈衝式電場，以 0.5 倍 TBE 溶液(45mM Tris, 45 mM boric acid, 1.0 mM EDTA, pH8.0)作為脈衝液，在 1%洋菜膠體(購自 Bio-Rad, Hercules, CA, USA)進行電泳分離這些片段，電泳時間 22 小時，電壓 200V，設定溫度為 14°C，電場轉換時間為 2 至 40 秒，所使用之儀

器為 Bio-Rad CHEF MAPPER apparatus (購自 Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)。電泳結束後以 ethidium bromide 進行膠體的染色，在紫外光下照相，所得之基因體 DNA 染色條帶將根據 Tenover 等人所述之方法進行判讀[10]。

6. 多重基因分析比對(multilocus sequences typing)

本研究使用七個基因(*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* 及 *tonB*)來做比對，所有的實驗步驟將如之前的參考文獻[11]。Primers 的基因序列如附表一，聚合酵素鏈鎖反應的條件為起始變性反應溫度為 94 ^{o}C 五分鐘，之後重複 35 個變性-黏合-延長反應循環，(變性溫度為 94°C 三十秒、黏合介於 50-60 ^{o}C 三十秒，*gapA* 黏合溫度為 60℃，*tonB* 為 45℃，其他的基因則為 50℃，延長反應溫度為 72℃一分鐘)，最後加上 5 分鐘的延長反應。利用 PCR 純化 kit(Bioneer, Daejeon, Korea)純化所合成的聚合酵素鏈鎖反應的產物，之後進行 ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)定序。

(3)結果

1. 菌株和藥物敏感試驗性試驗結果

在經過我們的菌株鑒定和 MIC 測試之後共有 116 株克雷白氏肺炎桿菌和 51 株大腸桿菌符合收菌標準。116 株克雷白氏肺炎桿菌中北部有 74 株, 中部有 19 株, 南部有 23 株。大腸桿菌部分北部有 40 株, 中部有 6 株, 南部有 5 株。藥

物敏感試驗性的結果見表 1 和表 2.說明如下:在克雷白氏肺炎桿菌的部分，當菌株對 ertapenem 有抗藥性時，gentamicin, cefazolin, cefotaxime, cefoxitin, ceftriaxone, ceftazidime, ciprofloxacin 以及 trimethorprim/sulfamethoxazole 的抗藥性比例皆達9成以上，而臨床上用來治療嚴重革蘭氏陰性菌感染症的抗生素如 cefepime, imipenem,meropenem 其抗藥性比例亦達 7 成以上,而 colistin 以及 tigecycline 的抗藥性比率則小於 2%。在大腸桿菌部分，當菌株對 ertapenem 有抗藥性時 cefazolin, cefotaxime, cefoxitin, ceftriaxone, ceftazidime 的抗藥性比例皆達 9 成以上,其他抗生素未具感受性(non-susceptable)的比率依次為 ciprofloxacin 86.3%, imipenem 62.7%, gentamicin 54.9%, cefepime 51%, meropenem 33.3%, doripenem 27.5%, 而 colistin 以及 tigecycline 的抗藥性比率則是零，只有 1 株 E.coli 對 tigercycline 為中度敏感。

2. Cabapenemase, AmpC 和 ESBL 基因檢測的結果

在 116 株 CRKP 中共有 6 株菌產生 carbapenemase, 4 株是 IMP-8, 2 株是 VIM-1。AmpC 類型的 cephalosporinase 有兩種,分別是 CMY-2 2 株和 DHA-1 85 株。ESBL 基因方面有 CTX-M 和 SHV; CTX-M 基因主要是 CTX-M-14 48 株,也有零星的 CTX-M-3, CTX-M-15; 在 SHV 基因方面比較有多樣性,有 SHV-2,SHV-2A,SHV-5, SHV-12, SHV-28, SHV-31 共 26 株;在 51 株 CR 大腸桿菌中有 2 株菌產生 carbapenemase, 1 株是 IMP-8,1 株是 VIM-1。 AmpC 類型的 cephalosporinase 中有 CMY-2 37 株和 DHA-1 7 株。在屬於 ESBL 的

cephalosporinase 方面,SHV 基因有 SHV-12 和 SHV-31 各 4 株; CTX-M 基因比較有多樣性,有屬於 CTX-M-1 群組的 CTX-M-3,CTX-M-15, CTX-M-55; 有屬於 CTX-M-9 群組的 CTX-M-14 15 株,CTX-M-27;還有的菌株同時擁有 CTX-M-1 群組和 CTX-M-9 群組的基因;其餘的 class A carbapenemase KPC, IMI, SME, GES, NMC, calss B 的 NDM-1, 還有 class D carbapenemase OXA-48 都沒有偵測到。

3. 外膜分析

結果分別見表 4 和表 5,說明如下:在 116 株 CRKP 中共有 85 株 AmpC 產生菌合併有外膜 OmpK35 或 OmpK36 的缺失。AmpC 類型的 cephalosporinase 有兩種,分別是 CMY-2 和 DHA-1。共有 64 株 ESBL 產生菌合併有外膜的缺失, 極大部分是 ESBL 合併 AmpC 再加外膜的缺失。少數菌株是單獨產生 ESBL 再加 OmpK36 或兩者同時的缺失。在 51 株 CR 大腸桿菌中有 2 株菌產生 carbapenemase, 他們都合併有外膜 OmpF,OmpC 的缺失。產生 AmpC 類型的 cephalosporinase 中有 31 株合併有外膜的缺失。其中有 11 株是 OmpF 的缺失,5 株是 OmpC 的缺失, 15 株是 OmpF, OmpC 同時缺失。在屬於 ESBL 的 cephalosporinase 方面, 共有 22 株 ESBL 產生菌合併 AmpC cephalosporinase 再合併有外膜的 OmpF, OmpC 或兩者同時缺失。

4. 脈衝式電場膠體電泳分析和多重基因分析比對

Klebsiella pneumoniae 的脈衝式電場膠體電泳分析結果如圖 1, 大部分的菌株皆屬於不同 clone,然而在各醫院仍有部分菌株小規模散播。T 醫院的 K20 和 CG 醫院的 K89 分析上屬於同一個 clone。根據 PFGE 結果,本研究挑選了 60 株 *Klebsiella pneumoniae* 來做多重基因分析比對結果,其中有 10 株菌株分析的結果需要再討論, 其餘 50 株的分析結果顯示臺灣的菌株以 ST11 為主, 共有 26 株(52%, 26/50), 其次為 ST37 (14%, 7/50), ST15 (6%, 3/50), ST147 (6%, 3/50), ST48 (4%, 2/50)。

5. 評估感染管制措施的執行

從本研究的結果看來，對 ertapenem 有抗藥性的腸內菌屬同時對大部分臨床上常使用的抗生素皆具有抗藥性，因此在臨床上常常會造成住院天數的延長甚至會使病人的死亡率增加，因此如何降低此類抗藥性細菌的產生是非常重要的議題。在降低抗藥性細菌產生的的策略當中，以降低抗生素使用量與嚴格執行傳播途徑為基準之防護(Transmission-based Precaution)兩大策略是目前最廣為接受的，然而本研究為一年期的計畫，因此無法看出此類抗藥性細菌發生的趨勢為上升或是下降，另外本研究並未包含各醫院當年使用 carbapenem 的藥量,因此也無法確認carbapenem的使用量與此類抗藥性細菌的發生是否有密切相關，因此此類抗藥性細菌在台灣的流行病學調查應常規的執行，以瞭解感染管制政策的介入(例如限制抗生素的使用,或是單位時間內循環式的使用抗生素等)是

否能有效的降低抗藥性細菌產生的比率。根據疾病管制局於 2007 年所公佈的醫療(事)機構隔離措施建議，目前對於此類抗藥性細菌的臨床照護除了標準措施(standard precaution)外應採取嚴格的接觸隔離，而有效的標準防護措施包含洗手、手套、隔離衣、護目鏡、用具及設備的消毒，與環境的清潔等，而接觸隔離措施則需考慮盡可能單獨房間或將感染相同病原菌的病人放置於同一房間，而由本研究 PFGE 的結果看來，參與研究的八家醫院目前尚無大規模的院內感染發生,顯示目前對於此類具多重抗藥性細菌的臨床照顧應可有效防止院內擴散。

本研究的研究對象為急性醫療機構的抗藥性細菌的流行病學,然而目前台灣 人口老化現象明顯，慢性養護機構的增加，許多經歷嚴重疾病的病人往往出院並非回到社區家中居住，而是轉往慢性養護中心，而本研究並未追蹤帶有這類抗藥性細菌的病患的來源與去向,因此慢性養護機構在目前是否成為此類抗藥性細菌淺在的散撥源是值得探討的,尤其在本研究發現 T 醫院的 K20 和 CG 醫院的 K89 分析上屬於同一個 clone，顯示此菌株已有醫院間傳播的能力。

(4)討論

具有 cabapenem 抗藥性的腸內菌(CRE)主要集中於和克雷白氏肺炎桿菌和大腸桿菌, CRE 通常對所有的 beta-lactam 類藥物以及其他類的藥物都抗藥。對感染

CRE 的病患在治療上的選擇變得非常有限。在感控上感染 CRE 的病患通常被認為是一個傳播源, 正確診斷出 CRE 的患者並採取及時隔離措施是預防擴散的一個重要步驟。CRE 發生機制主要是菌株得到 carbapenemase 或菌株產生 extended-spectrum cephalosporinase, 如 AmpC 型的 beta-lactamse 合併細菌外膜的缺失。在 CRE 中最多見的是 CRKP(抗藥的克雷白氏肺炎桿菌)。在美國, CRKP 中最重要的抗藥機制是 carbapenemase KPC 基因。由於 KPC 基因在一個可移動的基因片段轉為子(trasposon)上增加了抗藥性基因傳播的風險。CRKP 同時在治療上帶來了很大的挑戰, CRKP 感染與死亡率的增加, 住院時間的延長, 醫療費用的增加有關。對 carbapenemase 產生的偵測是一件複雜的事情, 因為許多菌株在對 cabapenem MIC 的表現為”敏感”, 為了避免遺漏對那些 carbapenemase 基因的篩選,CLSI 對 cabapenem 類藥物 MIC 的標準在 2011 年有大幅度的修正。簡單來說 imipenem, meropenem 的標準降低了 4 倍。Ertapenem 的標準降低了 8 倍。同時 CLSI 也公佈了對 doripenem 的 CLSI 更改他們的標準有它的原因。因為很多 cabapenemase 例如 IMP-8, KPC, NDM 他們對 carbapenem 的最小抑制濃度都只有 1 g/mL 或 2 g/mL, 而且他們都是在質粒(plasmid)上, 傳播速度相當快, 如果不降低標準會遺漏對這些有潛在威脅性的基因的篩選。我們依照 2011 年的標準收到了按舊標準不是抗藥但新標準是抗藥的菌株,表面上看抗藥的細菌數目是增加了但實際上並沒有突然間增

加。

我們的研究結果發現臺灣 carbapenem 抗藥的主要機制是 AmpC cephalosporinaseCMY-2 或 DHA-1(肺炎克雷白氏桿菌 DHA-1 占決大多數,大腸桿菌是 CMY-2 占決大多數)。少部分菌是由 cabapenemaseIMP-8 造成。其他的 cabapenemase 都沒有發現。 我們認為由於 CLSI 對 cabapenem 類藥物 MIC 的降低而造成的這些落入”抗藥”範圍而其抗藥機制又是 cepalosporinase 合併外膜的缺失造成的並不代表 cabapenem 類藥物的完全不能使用。如果照 2010 年的標準的話他們還是屬於對藥物有感受性的。而且 carbapenem 是治療由帶有 ESBL 病原體引起的嚴重感染的首選藥物, 所以由 cephalosporinase 合併外膜的缺失引起的 carbapenem 的”抗藥” 還需結合病患的資料具體情況具體分析, 也就是說由這個機製造成的”抗藥”在臨床上有無意義還需結合臨床的治療做進一步的分析。從我們的流行病學調查的結果也發現 plasmid AmpC DHA-1 和 CMY-2 基因和 ESBL 基因 SHV, CTX-M 的普遍存在。我們發現在 *K. pneumoniae* 中的 AmpC cephalosporinase 絕大部分是 DHA-1 在 *E. coli* 中主要是 CMY-2。由於這兩個基因都存在於傳播速度很快的質粒上, 所以在 *K. pneumoniae* 中很可能有 DHA-1 質粒傳播, 在 *E. coli* 間可能有 CMY-2 質粒傳播, 需要通過取他們的質粒用限制酶切後來證實這些 DHA-1 或 CMY-2 是否是有通過質粒的傳播。

(5) 結論與建議

在本次的流行病學調查中我們發現在造成 cabapenem 抗藥的 carbapenemase 中 IMP-8 和 VIM-1 是主要的兩個基因,但是他們的盛行率很低。在臺灣主要引起 cabapenem 抗藥的機制主要是 AmpC 型的 cefalosporinaseCMY-2 或 DHA-1 合併外膜 OmpK35/36 的缺失(在 *K. pneumoniae*)或者是 OmpF/C 的缺失(在 *E. coli*)。此外,當前引起全球關注的 KPC 和 NDM-1 基因並沒有被偵測到。PFGE 的結果顯示大部分的菌株皆屬於不同 clone, 在各醫院仍有部分菌株小規模散播, T 醫院的 K20 和 CG 醫院的 K89 分析上屬於同一個 clone, 顯示此菌株以有醫院間傳播的能力, 另外,我們發現在 *K. pneumoniae* 中的 AmpC cephalosporinase 絕大部分是 DHA-1 在 *E.coli* 中主要是 CMY-2。由於這兩個基因都存在於傳播速度很快的質粒上, 所以在 *K. pneumoniae* 中很可能有 DHA-1 質粒傳播, 在 *E. coli* 間可能有 CMY-2 質粒傳播,需要通過取他們的質粒用限制酶切後來證實這些 DHA-1 或 CMY-2 是否是同一的。總之, 不管是 AmpC 基因和 ESBL 基因通過質粒傳播造成在臺灣腸內菌的廣範存在,外加外膜的缺失導致 ertapenem 的抗藥, 還是醫院內,醫院間的小小的 clonal 傳播,由於目前醫院之間病患的轉院頻繁,因此嚴格執行此類病患的接觸隔離措施是必要的,以免此類抗藥性菌株在不同的醫院的傳播導致臨床治療的困難。在藥物使用的方面,從 MIC 結果可以知道目前剛在臺灣上市的新一代 carbapenem 類藥物

doripenem 期抗藥性比例亦達到 7 成,此藥在本研究收菌其間並未在臨床上使用,因此這些菌株對 imipenem, meropenem 以及 doripenem 的抗藥機轉可能有部分相同,而 colistin 以及 tigecycline 的抗藥性比率則是小於 2%, 本研究顯示當臨床面臨此類抗藥性細菌感染時, colistin 和 tigecycline 可能是治療上較好的選擇,合併使用這兩類藥物是否能增加病人的存活則仍需臨床的研究證據來支持。在 *E.coli* 部分,較為特別的是 amikacin 的感受性仍有 94%, 顯示本藥物可能可以在臨床上與其他藥物並用來增加治療的成功率。

(6)計畫重要研究成果及具體建議

本計畫的重要研究成果是解明瞭臺灣 CRE 的現況和它的主要的抗藥機制。臺灣的 CRE 的抗藥機制與美國不同,絕大部分不是由 cabapenemase 造成(雖然也有兩個主要的 cabapenemaseIMP-8 和 VIM-1), 主要是由 ESBL/AmpC cephalosporinase 合併外膜的缺失引起的 carbapenem 的”抗藥”。雖然抗藥,但 MIC 尚在低的水準, 如果以 2010 年 CLSI 的標準來看的話對 cabapenem 屬於敏感的範圍, 所以治療上除 ertapenem 之外的其他 cbapenem 是不是完全不能使用當看實際情形,另外對 colistin 和 tigecycline 抗藥性比率低。在降低抗藥性細菌產生的的策略當中，以降低抗生素使用量與嚴格執行傳播途徑為基準之防護(Transmission-based Precaution)兩大策略是目前最廣為接受的，然而本研究為一年期的計畫，因此無法看出此類抗藥性細菌發生的趨勢為上升或是下降，另

外本研究並未包含各醫院當年使用 carbapenem 的藥量(因研究結果顯示並無群突發事件)，因此也無法確認 carbapenem 的使用量與此類抗藥性細菌的發生是否有密切相關， 因此此類抗藥性細菌在台灣的流行病學調查應常規的執行，以瞭解感染管制政策的介入(例如限制抗生素的使用,或是單位時間內循環式的使用抗生素等)是否能有效的降低抗藥性細菌產生的比率。根據疾病管制局於 2007 年所公佈的醫療(事)機構隔離措施建議，目前對於此類抗藥性細菌的臨床照護除了標準措施(standard precaution)外應採取嚴格的接觸隔離，而有效的標準防護措施包含洗手、手套、隔離衣、護目鏡、用具及設備的消毒，與環境的清潔等，而接觸隔離措施則需考慮盡可能單獨房間或將感染相同病原菌的病人放置於同一房間，而由本研究 PFGE 的結果看來，參與研究的 8 家醫院目前尚無大規模的院內感染發生，顯示目前對於此類具多重抗藥性細菌的臨床照顧應可有效防止院內擴散。

(7) 參考文獻

1. Rolain Jm, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemia? *Clin Microbiol Infect* 2010**;16:**1699-701.
2. Wu Hs, Chen Tl, Chen Ic, Huang Ms, Wang Fd, Fung Cp, et al. First identification of a patient colonized with Klebsiella pneumoniae carrying blaNDM-1 in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2010**;73:**596-8.

3. Andrade Ln, Curiao T, Ferreira Jc, Longo Jm, Climaco Ec, Martinez R, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of Klebsiella pneumoniae clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011**;55:**3579-83.
4. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009**;9:**228-36.
5. Yan Jj, Ko Wc, Chuang Cl, Wu Jj. Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in Enterobacter cloacae and first identification of VIM-2 in Citrobacter freundii. *J Antimicrob Chemother* 2002**;50:**503-11.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI M07-A8*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement CLSI M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2011.
8. Limansky As, Mussi Ma, Viale Am. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in Acinetobacter baumannii is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 2002**;40:**4776-8.
9. D'agata Em, Gerrits Mm, Tang Yw, Samore M, Kusters Jg. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment-length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. *InfectControl HospEpidemiol* 2001**;22:**550-4.

10. Tenover Fc, Arbeit Rd, Goering Rv, Mickelsen Pa, Murray Be, Persing Dh, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *JClinMicrobiol* 1995**;33:**2233-9.

11. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont Pa, Brisse S. Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005**;43:**4178-82.

12. Queenan Am, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007**;20:**440-58, table of contents.

13. Chia Jh, Su Lh, Lee Mh, Kuo Aj, Shih Ny, Siu Lk, et al. Development of high-level carbapenem resistance in Klebsiella pneumoniae among patients with prolonged hospitalization and carbapenem exposure. *Microb Drug Resist* 2010**;16:**317-25.

14. Giakkoupi P, Tambic-Andrasevic A, Vourli S, Skrlin J, Sestan-Crnek S, Tzouvelekis Ls, et al. Transferable DHA-1 cephalosporinase in Escherichia coli. *Int J Antimicrob Agents* 2006**;27:**77-80.

15. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore Dm. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother* 2001**;45:**583-8.

16. Chia Jh, Chu C, Su Lh, Chiu Ch, Kuo Aj, Sun Cf, et al. Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M beta-lactamases of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Enterobacter cloacae in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005**;43:**4486-91.

17. Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *AntimicrobAgents Chemother* 2004**;48:**1249-55.

18. Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodriguez Mc, Velasco M, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical Escherichia coli during therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2008**;32:**534-7.

19. Kallman O, Motakefi A, Wretlind B, Kalin M, Olsson-Liljequist B, Giske Cg. Cefuroxime non-susceptibility in multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae overexpressing ramA and acrA and expressing ompK35 at reduced levels. *J Antimicrob Chemother* 2008**;62:**986-90.

(8) 圖、表

表一　本研究所採用之引子序列

目標基因/分群	引子名稱	引子序列（5’-3’）	參考文獻
Housekeeping gene for MLST			
gapA	gapA : F : 173	TGAAATATGACTCCACTCACGG	11
	gapA : R : 181	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	
mdh	mdh : F : 130	CCCAACTCGCTTCAGGTTCAG	11
	mdh : R : 867	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	
pgi	pgi : F : 1R	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	11
	pgi : R : 1F	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
phoE	phoE : F : 604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	11
	phoE : R : 604.2	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	
infB	infB : 1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	11
	infB : 1R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
tonB	tonB : 1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	11
	tonB : 2R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	
ClassA carbapenemases			
NMC	NMC-F	GCATTGATATACCTTTAGCAGAGA	12
	NMC-R	CGGTGATAAAATCACACTGAGCATA	
SME	SME-F	AGATAGTAAATTTTATAG	12
	SME-R	CTCTAACGCTAATAG	
IMI	IMI-F	ATAGCCATCCTTGTTTAGCTC	12
	IMI-R	TCTGCGATTACTTATCCTC	
KPC	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	12
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
GES	GES-F	GTTTTGCAATGTGCTCAACG	12
	GES-R	TGCCATAGCAATAGGCGTAG	
Class B metalloenzymes			
IMP-1	IMP-1-F	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	12
	IMP-1-R	TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	
IMP-2	IMP-2-F	GGCAGTCGCCCTAAAACAAA	12
	IMP-2-R	TAGTTACTTGGCTGTGATGG	
VIM-1	VIM-1-F	TTATGGAGCAGCAACCGATGT	12
	VIM-1-R	CAAAAGTCCCGCTCCAACGA	
VIM-2	VIM-2-F	AAAGTTATGCCGCACTCACC	12
	VIM-2-R	TGCAACTTCATGTTATGCCG	
NDM	NDM-F	TCTCGACAATGCCGGGTTT	In this study
	NDM-R	GAGATTGCCGAGCGACTT	

表一　本研究所採用之引子序列（續）

目標基因/分群	引子名稱	引子序列（5’-3’）	參考文獻
AmpC beta-lactamases			
CMY	CMY-F	CAAGTTTGATTCCTTGGACTCT	13
	CMY-R	CTCATCGTCAGTTATTGCAGCT	
DHA-1	DHA-1-F	CTGATGAAAAAATCGTTATC	14
	DHA-1-R	ATTCCAGTGCACTCAAAATA	
Class D oxacillinases			
OXA-23	OXA-23-F	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	15
	OXA-23-R	TCACAACAACTAAAAGCACTG	
OXA-24	OXA-24-F	GTACTAATCAAAGTTGTGAA	15
	OXA-24-R	TTCCCCTAACATGAATTTGT	
ESBL genes			
SHV	SHV-F	AACGGAACTGAATGAGGCGCT	16
	SHV-R	TCCACCATCCACTGCAGCAGCT	
CTX-M-1 group	CTX-M-1F	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	17
	CTX-M-1R	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	
CTX-M-2 group	CTX-M-2F	ATGATGACTCAGAGCATTCG	17
	CTX-M-2R	TGGGTTACGATTTTCGCCGC	
CTX-M-9 group	CTX-M-9F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	17
	CTX-M-9R	CCCTTCGGCGATGATTCTC	
TEM	TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	17
	TEM-R	CCAATGCTTAATCAGTGAGG	
Outer membrane protein in *E. coli*			
OmpA	OmpA-F	GCGTGGATAAGCCCGTTTG	18
	OmpA-R	TTACCCGTATTCCATCATTTTAT	
OmpC	OmpC-F	GCAGGCCCTTTGTTCGATA	18
	OmpC-R	GCCGACTGATTAATGAGGGTTA	
OmpF	OmpF-F	GCAGTGGCAGGTGTCATAAA	18
	OmpF-R	TCGGCATTTAACAAAGAGGTG	
Outer membrane protein in *K. pneumoniae*			
OmpK35	OmpK35-F	GAAGGTTCCCAGACCACAAA	19
	OmpK35-R	ACGGCCATAGTCGAATGAAC	
OmpK36	OmpK36-F	GCCGACTGATTAGAAGGGTAA	19
	OmpK36-R	GCGTGCTTAGAACTGGTAAAC	

表二 肺炎克雷白氏桿菌藥物敏感試驗性結果

Carbapenem resistant *K. pneumoniae* (n=116)					2011 criteria
	MIC range (μg/ml)	MIC_{50} (μg/ml)	MIC_{90} (μg/ml)	Breakpoint (μg/ml)	Susceptible (%)
Ertapenem	0.12 – 256	64	128	≤ 0.25	0 %
Imipenem	0.25 – 256	16	32	≤ 1	12.9 %
Meropenem	0.06 – 128	8	16	≤ 1	19.8 %
Doripenem	0.06 – 128	8	16	≤ 1	25 %
Amikacin	2.0 – >256	> 256	> 256	≤ 16	27.6 %
Gentamicin	0.5 – > 256	> 256	> 256	≤ 4	12.9 %
Cefazoline	64 – > 256	> 256	> 256	≤ 2	0 %
Cefotaxime	0.5 – > 256	> 256	> 256	≤ 1	1.7 %
Cefoxitin	32 – > 256	> 256	> 256	≤ 8	0 %
Ceftriaxone	0.5 – > 256	> 256	> 256	≤ 1	0.9 %
Ceftazidime	1.0 – > 256	> 256	> 256	≤ 4	1.7 %
Cefepime	0.5 – > 256	128	256	≤ 8	11.2 %
Ciprofloxacin	0.25 – > 256	128	256	≤ 1	6 %
TMP/SMX	0.12 – > 256	> 256	> 256	≤ 2	12 %
Tigecycline	0.25 – 16	1	4	≤ 2	88.8 %
Colistin	1.0 – 2.0	1	1	≤ 2	100 %

表三 大腸桿菌藥物敏感性試驗結果

Carbapenem resistant *E. coli* (n=51)					2011 criteria
	MIC range (μg/ml)	MIC_{50} (μg/ml)	MIC_{90} (μg/ml)	Breakpoint (μg/ml)	Susceptible (%)
Ertapenem	0.5 – 256	8	64	≤ 0.25	0 %
Imipenem	0.1 – 64	2	16	≤ 1	37.3 %
Meropenem	0.06 – 32	0.5	4	≤ 1	66.7 %
Doripenem	0.06 – 32	0.5	2	≤ 1	72.5 %
Amikacin	2.0 – 64	4	16	≤ 16	96.1 %
Gentamicin	0.5 – > 256	32	256	≤ 4	45.1 %
Cefazoline	> 256	> 256	> 256	≤ 2	0 %
Cefotaxime	4 – > 256	256	> 256	≤ 1	0 %
Cefoxitin	16 – > 256	> 256	> 256	≤ 8	0 %
Ceftriaxone	2 – > 256	256	> 256	≤ 1	0 %
Ceftazidime	8 – > 256	> 256	> 256	≤ 4	0 %
Cefepime	0.25 – 256	16	128	≤ 8	49 %
Ciprofloxacin	0.06 – > 256	64	256	≤ 1	13.7 %
TMP/SMX	0.06 – > 256	> 256	> 256	≤ 2	31.4 %
Tigecycline	0.12 – 4	0.25	0.5	≤ 2	98 %
Colistin	0.5 – 2.0	1.0	1.0	≤ 2	100 %

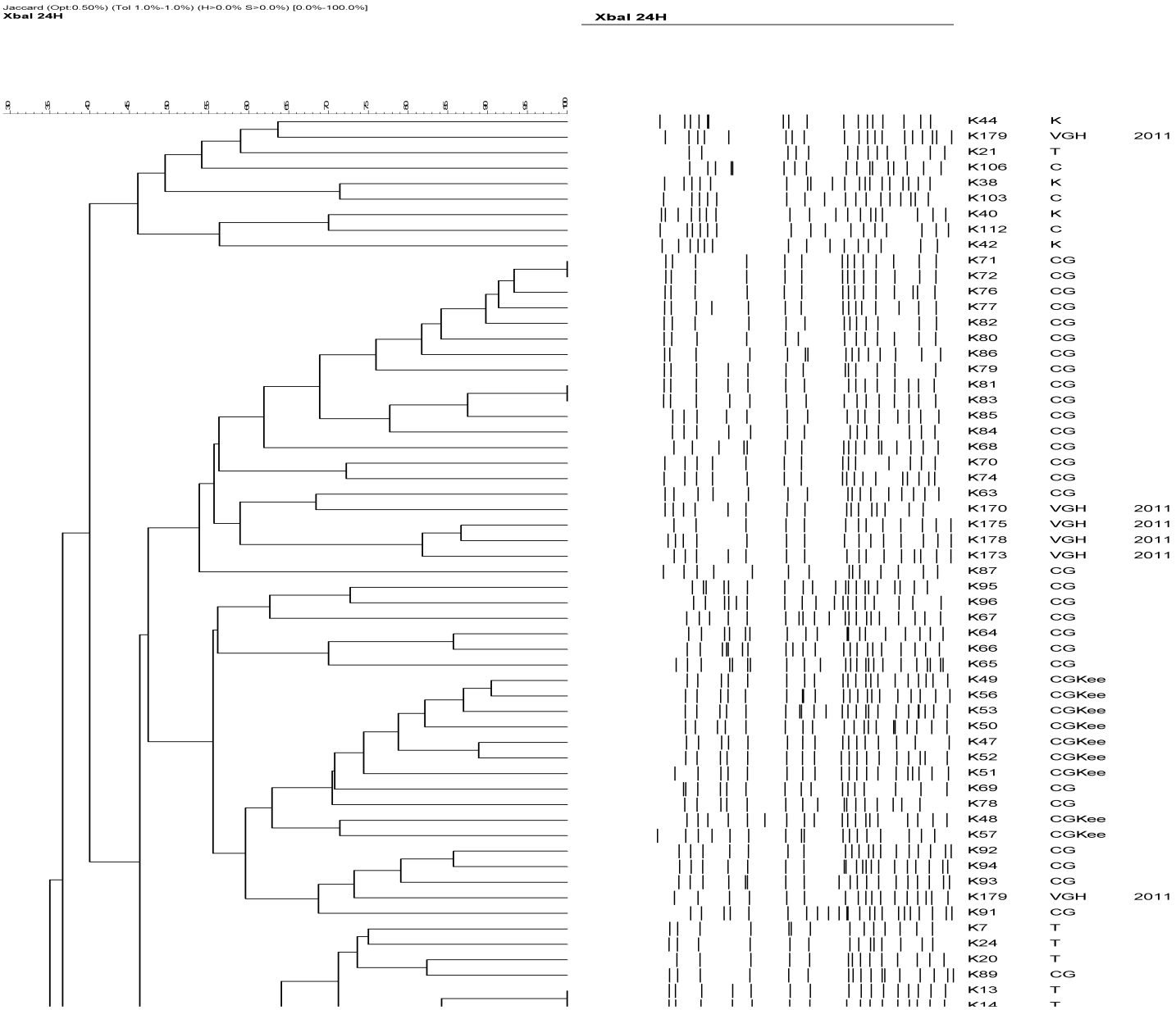
表四 肺炎克雷白氏桿菌中 carbapenem 抗藥的主要抗藥機制

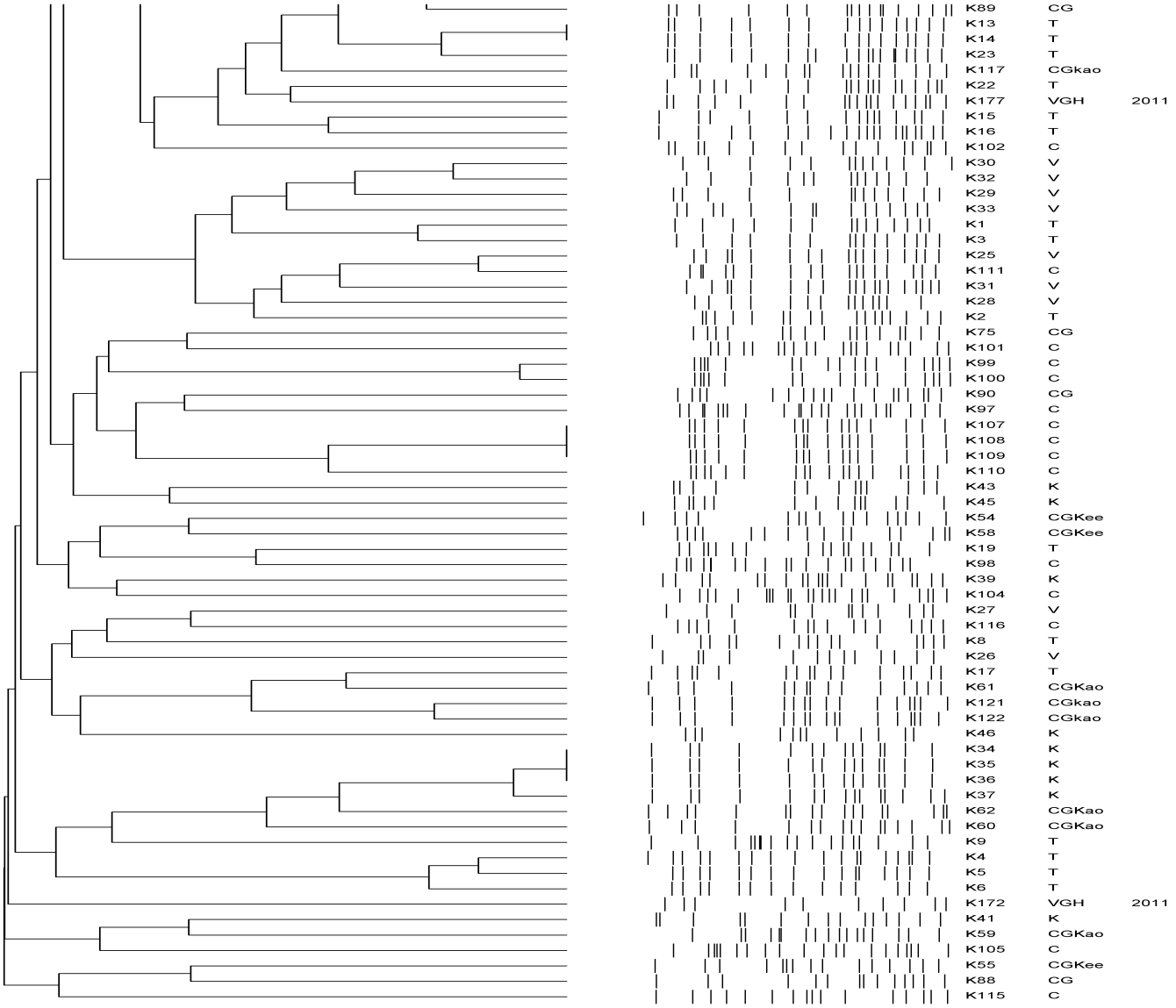
β-lactamases	Outer membrane profile (116)			
	35/36	△35	△36	△35/36
CAR				
IMP-8	1	1	2	0
VIM-1	0	1	0	1
AmpC				
CMY-2	0	0	0	2
DHA	1	16	7	62
ESBL				
CTX-M-G1	0	1	1	1
CTX-M-G9	2	5	2	35
SHV(2,5,12)	0	6	0	16

表五 大腸桿菌中 carbapenem 抗藥的主要抗藥機制

β-lactamases	Outer membrane profile (51)			
	F/C	△F	△C	△F/C
CAR				
IMP-8	0	0	0	1
VIM-1	0	0	0	1
AmpC				
CMY-2	13	9	4	12
DHA	1	2	1	3
ESBL				
CTX-M-G1	1	1	1	1
CTX-M-G9	3	2	2	7
CTX-M-G1+G9	4	3	0	2
SHV(12)	1	2	0	1

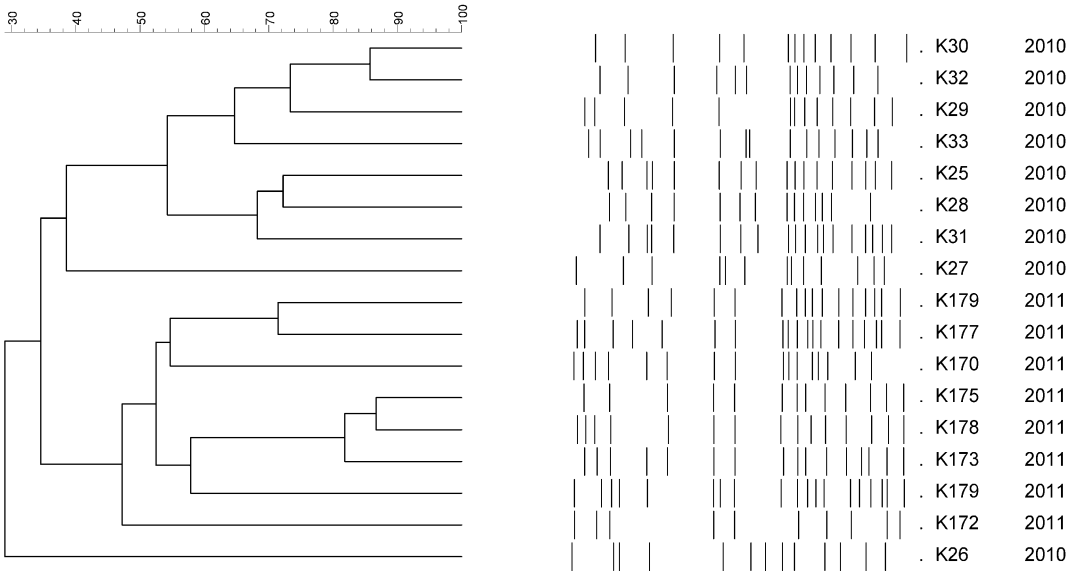
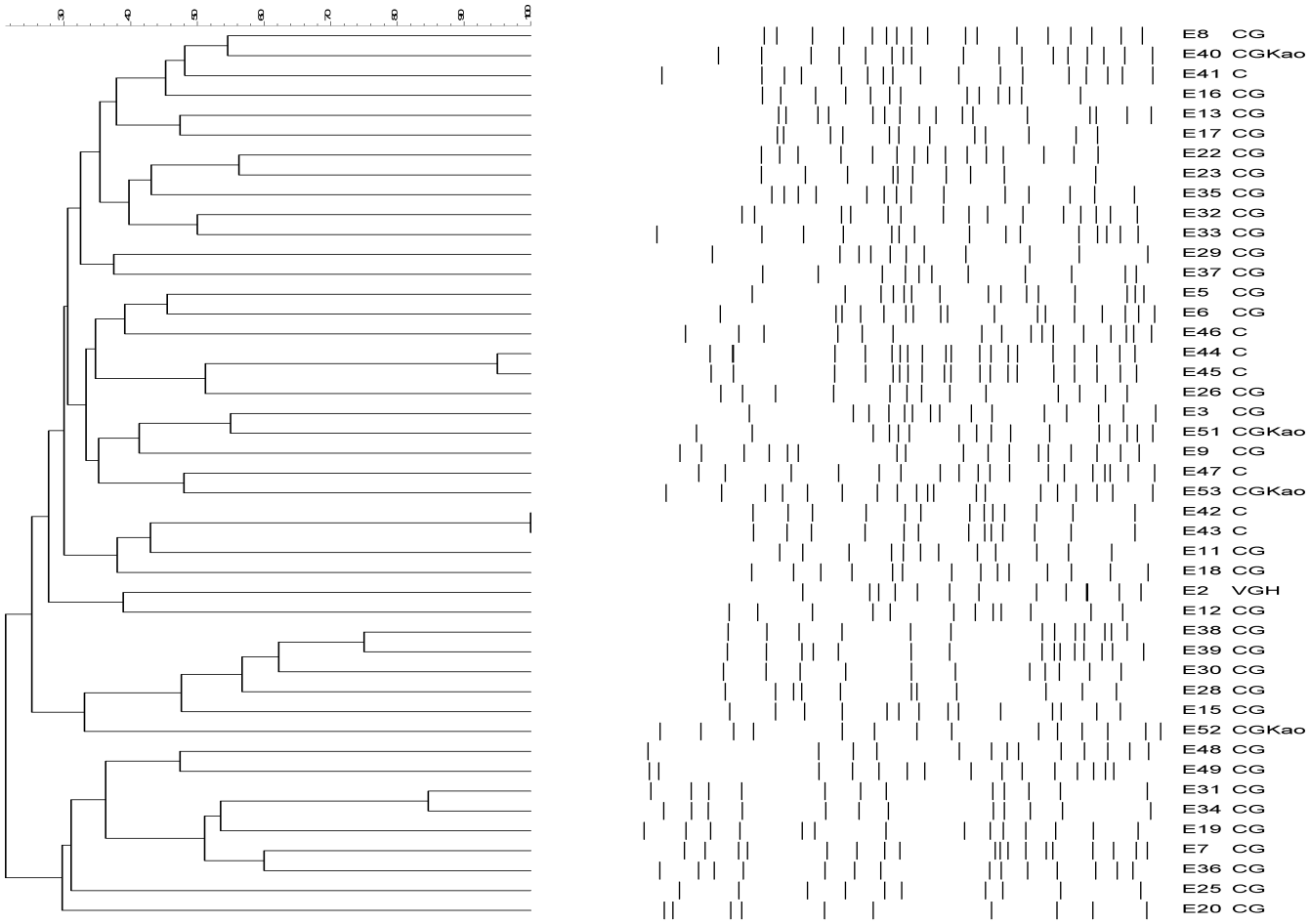
圖 1 脈衝式電場膠體電泳分析和多重基因分析比對




K89 CG
K13 T
K14 T
K23 T
K117 CGkao
K22 T
K177 VGH 2011
K15 T
K16 T
K102 C
K30 V
K32 V
K29 V
K33 V
K1 T
K3 T
K25 V
K111 C
K31 V
K28 V
K2 T
K75 CG
K101 C
K99 C
K100 C
K90 CG
K97 C
K107 C
K108 C
K109 C
K110 C
K43 K
K45 K
K54 CGKee
K58 CGKee
K19 T
K98 C
K39 K
K104 C
K27 V
K116 C
K8 T
K26 V
K17 T
K61 CGKao
K121 CGkao
K122 CGkao
K46 K
K34 K
K35 K
K36 K
K37 K
K62 CGKao
K60 CGKao
K9 T
K4 T
K5 T
K6 T
K172 VGH 2011
K41 K
K59 CGKao
K105 C
K55 CGKee
K88 CG
K115 C

Jaccard (Opt:0.50%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Xbal 24H

Xbal 24H



Jaccard (Opt:0.50%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Xbal 24H