

計畫編號：DOH92-DC-1042

行政院衛生署疾病管制局九十二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：92年1月1日至92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	(4-5)
參、研究報告內容	
一、前言	(6-10)
二、實施方法及進行步驟	(11-21)
三、結果	(22-30)
四、討論	(31-32)
五、結論與建議	(33)
六、參考文獻	(34-36)
七、圖表	(37-45)

共 (45) 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

在第一年計畫中，我們利用過去三年時間裏，成大醫院持續性地收集到之多重抗藥大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌菌株，建立多基因位點序列(MLST)分型技術。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法，以測試

MLST 區分菌株能力。同時，我們建構一具搜尋與基因比對功能之基因與流行病學資料庫。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。

主要發現

在測試的 14 段 structural genes 中，我們篩選到六段多形性較明顯的基因，分別為 *adk*、*gcl*、*gdh*、*mdh*、*metA* 與 *ppk*，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 與脈衝電場瓊膠電泳分型法比較中，25 株大腸桿菌可被分為 24 脈衝電場瓊膠電泳型，但僅可分為 18 MLST 型；15 株克雷氏肺炎桿菌可被分為 13 脈衝電場瓊膠電泳型，但僅可分為 7 MLST 型，顯示 MLST 多形性分型法區分菌株能力仍不及標準的脈衝電場瓊膠電泳分型法。進一步分析 285 株大腸桿菌與 439 株克雷氏肺炎桿菌多重抗藥菌株，285 株大腸桿菌可分出 37 MLST 型，439 株克雷氏肺炎桿菌可分出 29 MLST 型。這些資料皆儲存於資料庫中。

結論及建議事項

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，並發展出一套方法快速、步驟簡易的 MLST 菌株分型技術以監控醫院多重抗藥性格蘭氏陰性桿菌的散佈。雖然 MLST 在大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌的分型能力，仍不及 PFGE，然而，MLST 法可作為 PFGE 的輔助分型工具。本計劃須持續進行抗藥菌株分析，以充實資料庫；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；可進一步改良，使其能自動化，達到及時監控的目標，並可將系統擴充，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 database included gram-negative bacilli which produce extended-spectrum beta-lactamases, AmpC cephalosporinase, or metallo-beta-lactamases. These bacterial strains were collected between 1999 and 2002 and the beta-lactamases produced by these strains have been characterized recently. The multilocus sequence typing (MLST) method, a recently developed bacterial typing method, was developed in this study. 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 *Escherichia coli* and nucleotide sequencing was followed to select the most polymorphic genes. A total of 25 *E. coli* strains and 15 *Klebsiella pneumoniae* strains were tested by MLST and the results were compared with those obtained by the “gold standard” typing method, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). After the most polymorphic genes were selected, a total of 285 *E. coli* isolates and 439 *K. pneumoniae* isolates, which had been known to produce extended-spectrum beta-lactamases, were further typed by MLST and the data were saved in the database. Phylogenetic analysis can be done easily by comparing several polymorphic genes among different isolates, and thus the isolates can be typed.

Moreover, the results can be saved easily in a digitalized manner so that they can be retrieved very quickly. A genetic and epidemiologic database was also established in this study.

Results

Among the 14 structural genes tested, six genes were found to be most polymorphic; they were *adk*, *gcl*, *gdh*, *mdh*, *metA*, and *ppk*. 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 six numbers together. Among 25 *E. coli* strains and 15 *K. pneumoniae* strains tested, there were 24 and 13 PFGE types, respectively. However, only 18 and 7 MLST types were found for *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively. The 285 *E. coli* isolates and 439 *K. pneumoniae* isolates, which had been known to produce extended-spectrum beta-lactamases, were further typed by MLST and 37 and 29 MLST types were found among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates, respectively.

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. 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 已是全球性的問題，其引起的問題包括治療上的困難、嚴重危害病人的生命與醫療支出的增加等等[1-3]。在傳統的 outbreak 調查研究中，醫院與臨床微生物實驗室須採取的措施[4,5]，其缺點包括：(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人為的警覺性，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，整個過程曠日廢時，浪費人力，更有可能花費人力及物力後，結果發現是假性 outbreak；(4) 更重要的是，多重抗藥菌株有可能因為調查時間的延宕而廣為散佈，造成更嚴重的問題。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 皆在常規的感控監控系統下被忽略。其中的抗藥性克雷氏肺炎桿菌，更有逐漸增加的趨勢出現。由此可見，傳統的 outbreak 調查研究已不能應付日益嚴重的多重

抗藥性問題。因此，另外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，將有助於降低發生 outbreak 的影響層面以及控制多重抗藥菌株的擴散。

建立一套預警與快速偵測 outbreak 系統，取決於兩要件：

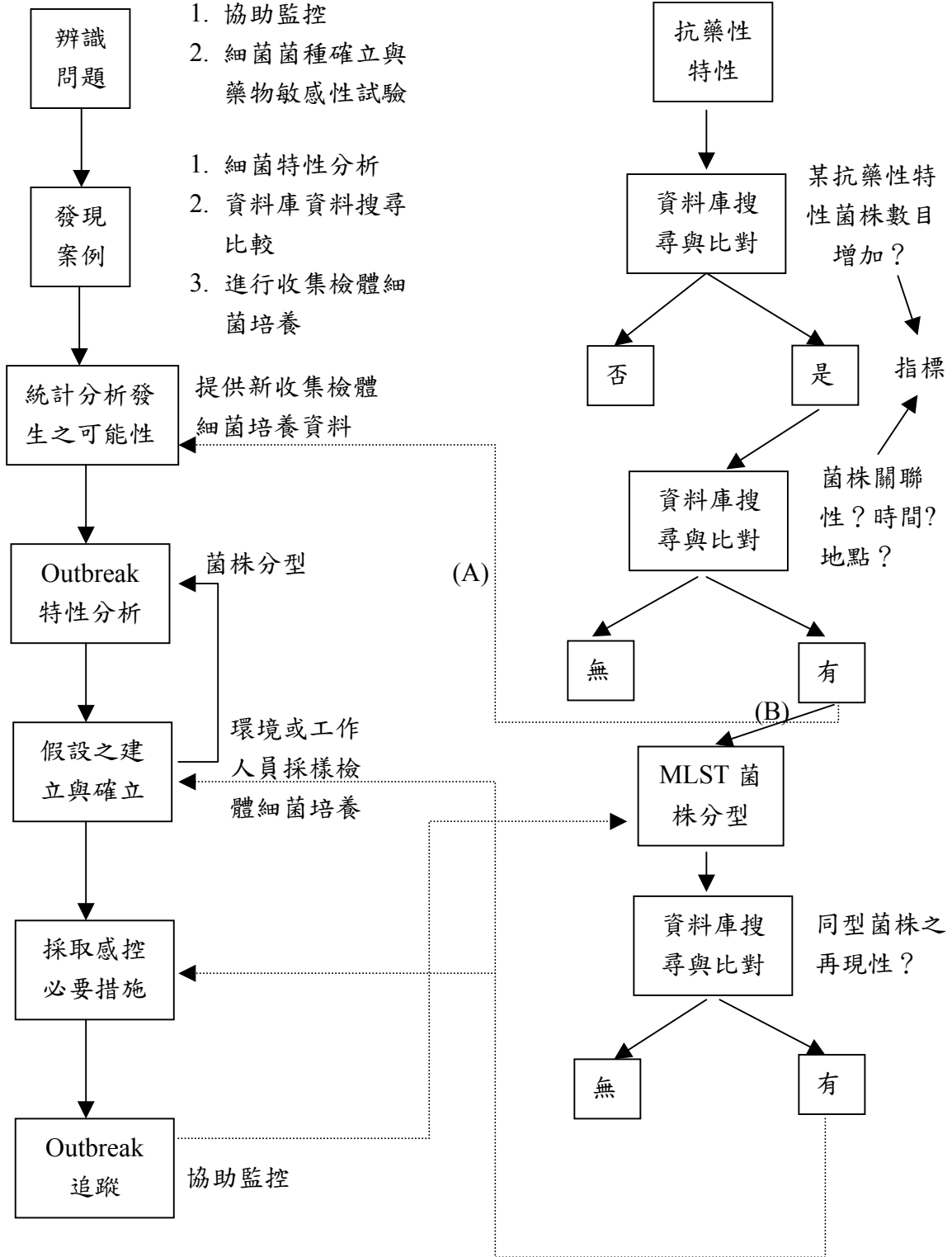
- (1) 完整且功能齊全的基因與流行病學資料庫：此種資料庫，除了可以達到持續性地監控抗藥性菌株流行情況目的，更可透過比對及搜尋的方式，特別是基因比對的方式，建立抗藥性菌株與過去菌株之關聯性，即時瞭解是否有 outbreak 的可能性與是否需要啟動 outbreak 調查研究，省時省力。
- (2) 快速且區分鑑別能力良好、操作容易的菌株分型技術：最好能數位儲存於資料庫，隨時能立即搜尋出來作為比較用途。

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，並屬較簡便，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

醫院措施

微生物實驗室配合措施

預警系統



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。

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。

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、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。本計畫將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) 菌株：

本年度研究之菌株包含 1999 一月至 2002 年年中連續收集分離於成大醫院之且已分析過之產生廣效性頭孢子黴素水解酵素大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌菌株。產生 A 群廣效性頭孢子黴素水解酵素菌株之確定乃根據 2002 年 The National Committee for Clinical Laboratory Standards 訂定的標準 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 12th informational supplement)。

(二) 臨床微生物實驗室：藥物敏感性試驗[13]。加作或補作過去未實施之非 β -lactam 類抗生素藥物敏感性試驗，方法為常規實驗室使用之紙錠擴散法，並以此法決定 antibiograms。使用抗生素為 ciprofloxacin、ofloxacin、amikacin、tobramycin、gentamicin、trimethoprim-sulfamethoxazole。

(三) 分子生物實驗室：

(1) 利用脈衝電場瓊膠電泳法(pulsed-field gel electrophoresis)來決定菌株間之關係[7]，結果經照相後，利用電腦軟體 Gel-Compar (Applied maths) 進行演化分析。

(2) MLST 菌株分型[9-15]：

1. 基因庫已知大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌酸序列比對以及參考相關文獻 [19, 20]，找出 14 個 structural genes 菌種有核酸序列有差異之區域，設計大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌皆可使用之引子(表一)。

2. 多形性基因篩選：先找出流行病學不相關之臨床菌株，用上述之引子分別進行 PCR 及核酸定序分析，篩選出具多形性之基因區域。

3. 多基因位點分型與演化分析：其餘菌株，用篩選出來之五段具多形性之基因區域，分別進行 PCR 及核酸定序分析，所得結果，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。

(3) 比較 MLST 與限制酵素片段多形性分型法結果。

(四) 流行病學資料：由感染科醫師進行資料收集與分析。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。

(五) 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四大部分:

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

以下說明其設計細節。

使用工具：

資料庫：MySQL 4.0

Web Server：Apache Tomcat 4.1

Language：JSP

Platform：Windows XP

資料庫綱要表(Schema)：

Table Name：病人(Patient)

	病歷號	姓名	性別	出生日期
DataType	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	
	病床號	來源	菌名		
DataType	Varchar(10)	Char(1)	Varchar(50)		

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

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
INT															

CRO	MOX	CMX	CFP	ATM	FOM	TIM	PA	SXT	MA	CEC	CFM	MET	TEC	RA	CID
INT															

CTM	PEF	CPD	MI	AZ	CLR	FA	MEM	S	FEP	CR	GAR	LOM	AC	P	OX
INT															

VA	AM	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)

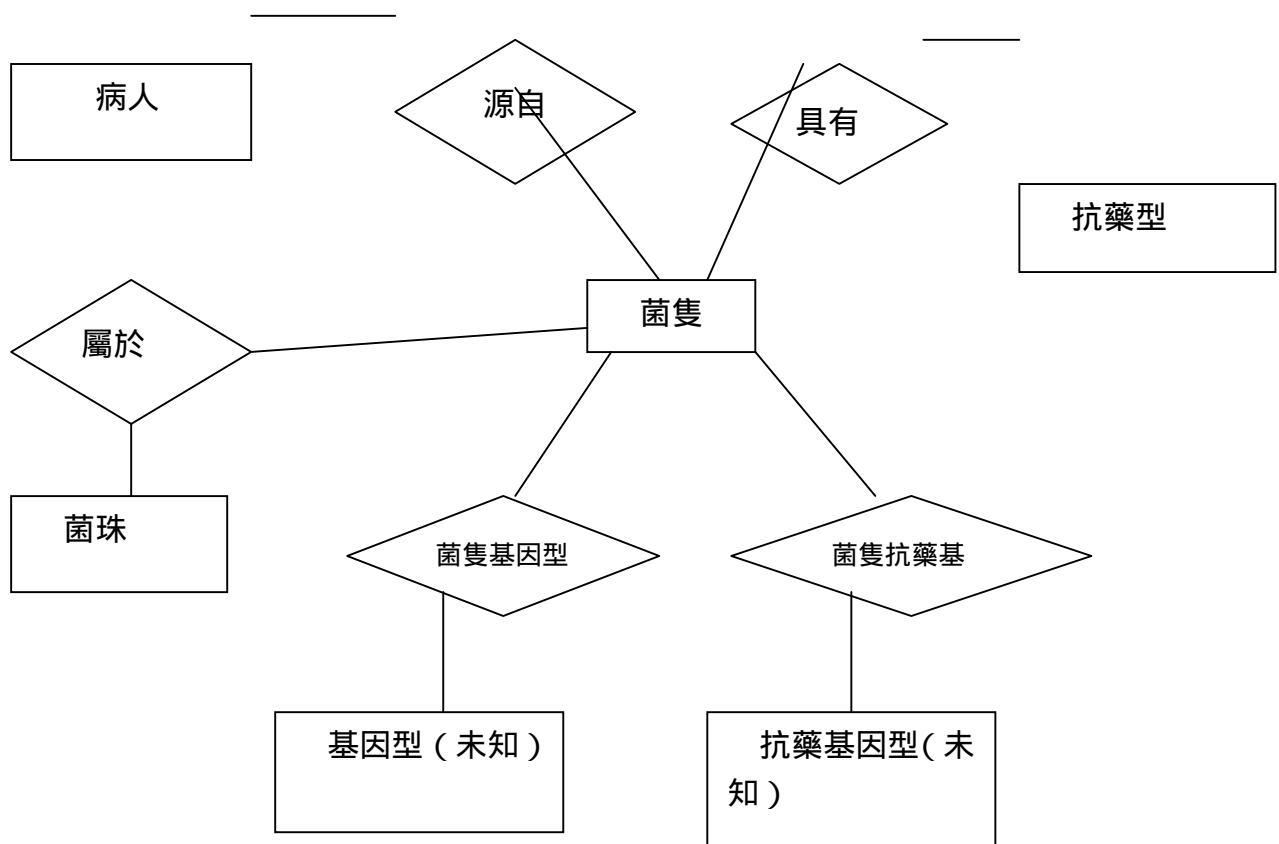
Table Name：菌株(Germ)

	菌名	描述
DataType	Varchar(50)	Text

菌名：Germ_Name 描述：Descri

(註：1. 基因型及抗藥基因型目前無法得知正確資料，僅知道未來可能會需
要用到這些資料，因此先行規劃。2. 斜體字部分為 index(key)。)

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,
    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
);

```

查詢索引作法說明：

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）。

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。在這個階段裡面，比較難的在於跟所輸入的抗藥性作比對，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， $R\rightarrow I$ or $I\rightarrow S$ 的 RANK 比 $R\rightarrow S$ 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 $R\rightarrow I$ 、 $I\rightarrow R$ 、 $I\rightarrow S$ 、 $S\rightarrow I$ 相減後取絕對值都是 1， $R\rightarrow S$ 、 $S\rightarrow R$ 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。

三、結果

(一) 菌株與病患資料之建檔：

將 1999 一月至 2002 年年中連續收集分離於成大醫院之所有大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌菌株資料(包含已分析過之產生廣效性頭孢子黴素水解酵素菌株)，以及感染產生廣效性頭孢子黴素水解酵素菌株患者臨床收集到之資料，儲存於資料庫中。

(二) MLST 菌株分型技術之建立

(1) 菌株選擇

從產生廣效性頭孢子黴素水解酵素菌株中，任意挑選出流行病學不相關之 25 株大腸桿菌與 15 株克雷氏肺炎桿菌菌株，進行脈衝電場瓊膠電泳法分析，並利用電腦軟體 Gel-Compar 進行演化分析。結果如圖一、二所示。25 株大腸桿菌共可分 24 型 (代號為 I 至 XXIV)；15 株克雷氏肺炎桿菌，共可分 13 型 (代號為 I 至 XIII)。此 40 株菌株用以進一步進行 MLST 菌株分型技術之建立。

(2) 多形性基因篩選

首先測試 14 組放大不同 structural genes 之引子，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。PCR 引子序列、PCR 反應條件以及 PCR 產物大小如表一所示。PCR 產物純化後，使用 ABI 310 自動化定序儀決定 PCR 產物之核酸序列，並將所得序列存於國家衛生研究院之 GCG 的軟體中，經 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。每一組引子可得到之 allele 數顯示於表一。在測試的 14 段 structural genes 中，多形性較明顯的基因為 *adk* (allele 數 5)、*gcl* (allele 數 6)、*gdh* (allele 數 5)、*mdh* (allele 數 4)、*metA* (allele 數 5) 與 *ppk* (allele 數 5)，因此選定這六段基因作為 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 (sequence typing) 代號。

(3) 脈衝電場瓊膠電泳與 MLST 多形性分型法結果比較

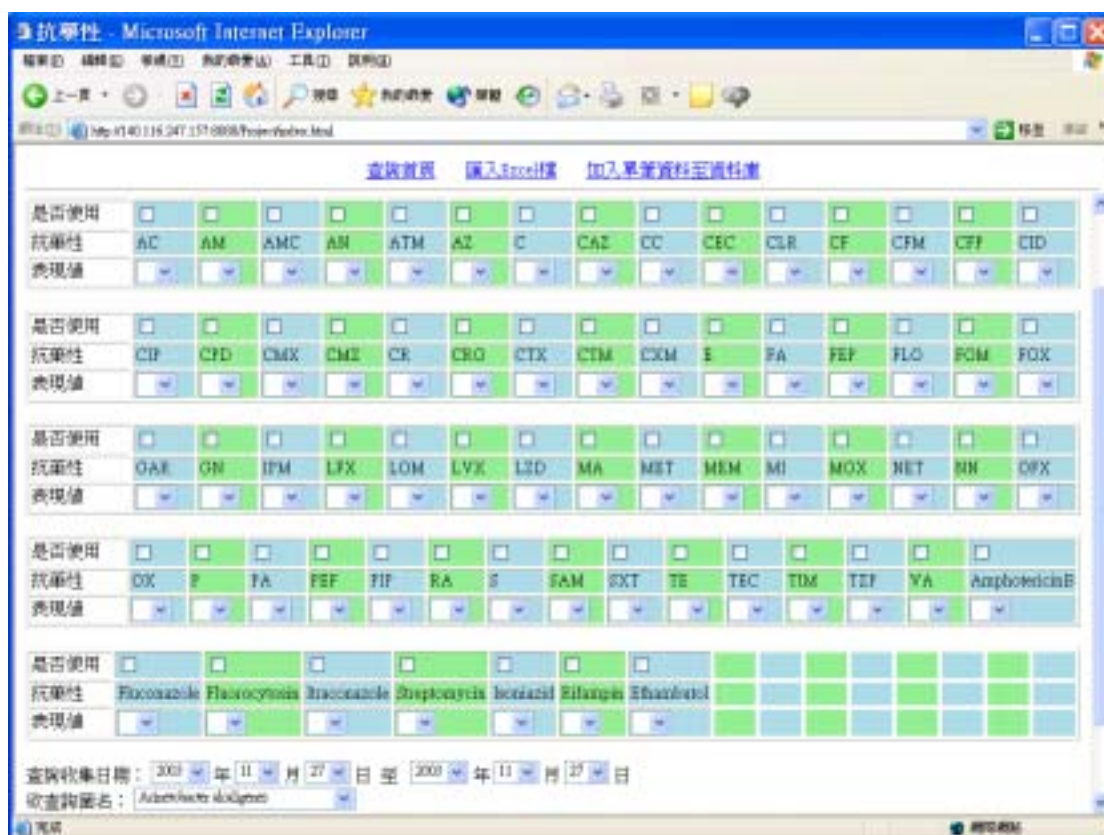
40 株大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌脈衝電場瓊膠電泳與 MLST 多形性分型法結果如表二所示。25 株大腸桿菌可被分為 24 脈衝電場瓊膠電泳型，但僅可分為 18 MLST 型；15 株克雷氏肺炎桿菌可被分為 13 脈衝電場瓊膠電泳型，但僅可分為 7 MLST 型。此結果顯示 MLST 多形性分型法區分菌株能力仍不及標準的脈衝電場瓊膠電泳分型法。

(三) 建立菌株 MLST 基因資料庫

將 1999 一月至 2002 年年中連續收集分離於成大醫院之產生廣效性頭孢子黴素水解酵素非重複大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌菌株次培養，進行 MLST 菌株分型，所得資料建檔於資料庫中。連同前述 40 株已測試過之菌株，總共分析大腸桿菌 285 株與克雷氏肺炎桿菌 439 株，結果摘要於表三與表四。285 株可分出 37 MLST 型，439 株克雷氏肺炎桿菌可分出 29 MLST 型。

(四) 資料庫系統實作結果

以下為實作完成之系統首頁介面：



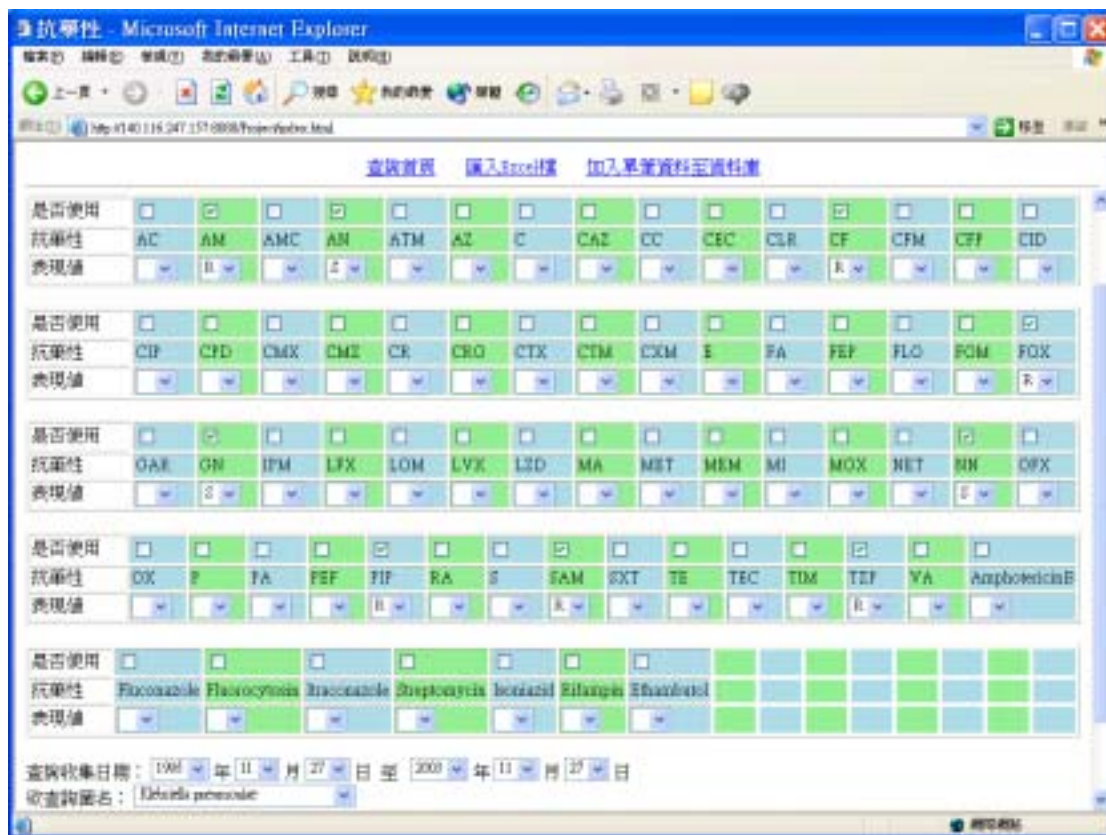
該頁面目前包含兩個框架，上面的框架包含三個鍊結，這個框架會一直出現在其他頁面上。這三個鍊結中，第一個是查詢首頁，即為此頁面。第二個為匯入 Excel 檔，主要功能為將 Excel 的資料匯入資料庫中。第三個為手動輸入單筆資料進入資料庫中。

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。若您要輸入並使用該抗藥型來做查詢的話，務必記得將該抗藥型上面的”是否使用”這一欄打勾，使用這個欄位的目的主要是怕不小心因為滑鼠沒點好，在表現值上選擇了值，但實際上並不使用該抗藥型。若沒有將”是否使用”這欄打勾的話，程式會視為您並不使用該抗藥型來做查詢。

由於收集日期以及菌株名稱的不同會影響所查詢出來的結果，我們希望能夠限制所查詢的範圍，因此在下方可以輸入所欲查詢的收集日期，並找出資料庫目前所有菌株名稱以提供使用者選取。而在左下角有一個列出前 n 筆資料的欄位。這是可以讓你輸入會列出查詢結果的前 n 筆資料。預設值為 20。填完之後按下送出。

查詢結果的頁面：show_rank.jsp

假設我們輸入的內容為：



則查詢結果的基本介面為：

您輸入的資料
所查詢菌名: *Klebsiella pneumoniae*

抗藥性	AM	AN	CF	FOX	GN	NM	HIF	SAM	T2P
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	NM	HIF	SAM	T2P
1	1121	1999-01-06	R	S	R	R	S	S	R	R	R
2	1101	1999-06-12	R	S	R	R	S	R	R	R	R
3	1137	2002-03-16	R	S	R	R	I	R	R	R	R
3	1725	2000-03-13	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1537	2000-02-29	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1436	2000-02-28	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1339	2000-02-26	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1117	2000-02-15	R	S	R	I	S	I	R	R	R
3	1044	2000-02-11	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1070	2000-01-31	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1199	2000-01-27	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	1125	1999-06-29	R	S	R	R	S	R	R	R	S
3	1126	1999-06-29	R	S	R	R	S	R	R	R	S
3	1132	1999-06-10	R	S	R	R	S	R	R	R	I
3	1127	1999-05-21	R	S	R	R	S	R	R	R	I
3	1183	1999-05-14	R	S	R	R	R	I	R	R	R

這個頁面會將查詢的結果列出來。在這個頁面最上方為我們所輸入的菌株的簡單資料，內含所查詢的菌株名稱以及所輸入的抗藥性表現值。而下方是從資料庫查詢出來的結果，並依照 RANK 來排列，而且僅僅列出簡單的資料，包括檢體編號、收集日期以及我們所輸入欲查詢的抗藥性表現值。而兩筆資料排名相同時，兩者的 RANK 值則相同。因此在上圖中可以見到 RANK 為三的有多筆資料同時存在。

由於該頁面只列出簡單的資訊，因此我們對每筆資料提供鍊結，點選該

鍊結便會另外彈出一個視窗，該視窗會完整的呈現該筆資料的所有內容。

詳細資料：show_detail.jsp

基本介面：



The screenshot shows a Microsoft Internet Explorer browser window. The address bar displays the URL: http://140.116.247.157/8888/Resistance/show_detail.jsp?Spec_No=1225&Collect_Date=2009-01-06. The main content area contains a table with patient information and a detailed table of antibiotic resistance patterns.

收集號	檢體編號	病源號碼	收集日期	姓名	性別	出生日期	病床號	來源	菌名
99kp-24	1125	01397015	1999-01-06	黃陳玉	F	1920-10-16	3M211	3	Klebsiella pneumoniae

抗藥性表現

AC	AM	AMC	AN	ATM	AZ	C	CAE	CC	CEC	CLR	CF	CFM	CFP	CID	CIF	CFD	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	NH	OPX	OX	P	PA	PEP	PIP	RA	E	SAM	SXT	TE	TEC	TIM	TZF	VA	AmphotericinB
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

該頁面為所選取的資料的詳細內容。該視窗為新視窗，所以多了一個關閉視窗的功能。

匯入 Excel 檔：insert_file.jsp

選取該功能後，會出現以下的頁面。



利用瀏覽選取電腦中所欲匯入的 Excel 檔後即可。

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。

加入單筆資料至資料庫：insert.jsp

該連結為手動輸入單筆的資料進入資料庫中。基本頁面為：

病人病歷號: 病人姓名:

性別: 男 女

出生日期: 西元 年 月 日

收集日期: 檢體編號: 檢體別:

收集日期: 西元 年 月 日

病床號: 來源: 菌名:

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"/>	
抗菌性	AC	AM	AMC	AN	ATM	AZ	C	CAZ	CC	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"/>	
抗菌性	CIP	CID	CMX	CMZ	CR	CRO	CTX	CTM	CXM	E	FA	FEP	FLO	POM	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 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	LOM	LVX	MA	MET	MEM	ME	MOX	NET	NN	CFX	OX	P
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"/>
抗菌性	PA	FEP	PIP	RA	S	SAM	SXT	TE	TEC	TDM	TZF	VA		
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"/>

填寫完畢送出即可將該筆資料存入資料庫中。

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。在此計畫中，首先，我們從 14 個 structural 基因中，篩選出六段具多形性的基因。我們進一步比較 MLST 與 PFGE 兩方法分型能力。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。其最大缺點為價格昂貴。然而，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。就分型能力而言，

我們發現 MLST 在大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌的分型能力，仍不及 PFGE。綜合比較這兩種方法，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。

在此計畫中，我們已就 1999 一月至 2002 年年中連續收集分離於成大醫院之產生廣效性頭孢子黴素水解酵素大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌菌株，進行 MLST 菌株分型，並將資料建檔於基因資料庫中。由於僅包含三年半的菌株資料，就長期監控的角度而言，資料仍嫌不足，仍須持續不斷地將此後陸續出現的抗藥菌株進行分析，以充實資料庫。至於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，則須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。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 在大腸桿菌與克雷氏肺炎桿菌的分型能力，仍不及 PFGE，然而，MLST 法可作為 PFGE 的輔助分型工具。
4. 持續進行抗藥菌株分析，以充實資料庫。
5. 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，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。

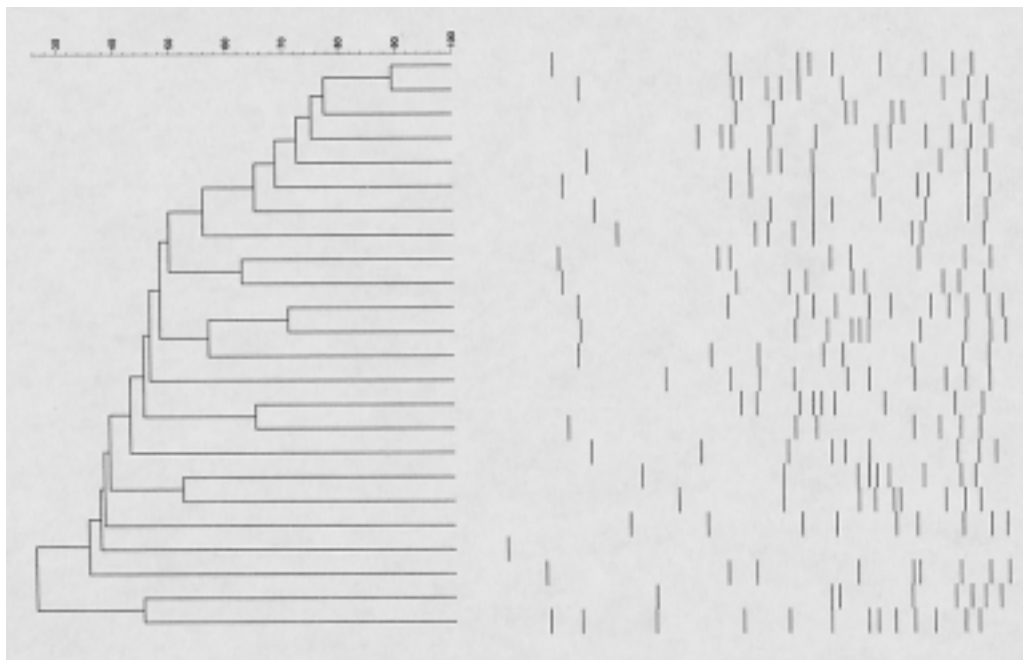
六、參考文獻

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.

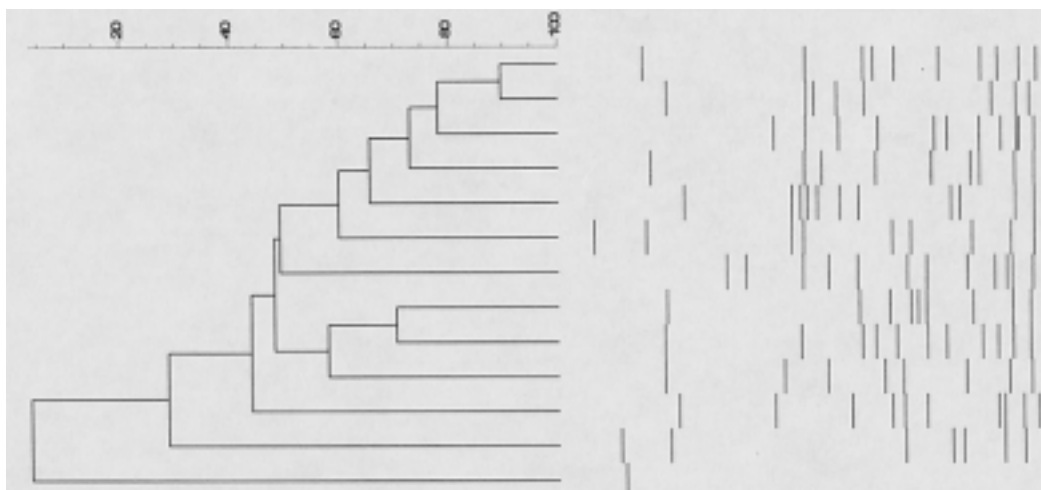
9. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a probable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:3140-5.
10. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus 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.

七、圖表



圖一、大腸桿菌脈衝電場瓊膠電泳法分析，共可分 24 型，
由上而下之代號依序命名為 A 至 X。



圖二、克雷氏肺炎桿菌脈衝電場瓊膠電泳法分析，共可分
13 型，由上而下之代號依序命名為 A 至 M。

表一・MLST 選用之基因、PCR 引子、PCR 反應條件、PCR 產物大小、產生之 Allele 數與參考文獻

基因	引子序列	PCR 反應條件 ^a	PCR 產物大小 (bp)	Allele 數	參考文獻
<i>arcA</i>	F: 5'-GAAGACGAGTTGGTAACACG-3' R: 5'-CTTCCAGATCACCGCAGAAGC-3'	95°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 3 min, 30 cycles	685	2	
<i>aroE</i>	F: 5'-AAGGTGCGAATGTGACGGTG-3' R: 5'-AACTGGTTCTACGTCAGGCA-3'	95°C for 1 min, 57°C for 2 min, 72°C for 3 min, 28 cycles	620	2	
<i>dnaE</i>	F: 5'-GAG/TATGTGTGAGCTGTTTGC-3' R: 5'-CGA/GATA/CACCGCTTTCGCCG-3'	94°C for 45 s, 45°C for 45 s, 72°C for 1 min, 30 cycles	550	1	
<i>mdh</i>	F: 5'-CAACTGCCTTCAGGTTTCAGAA-3' R: 5'-GCGTTCTGGATGCGTTTGGT-3'	94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min, 30 cycles	580	4	
<i>gnd</i>	F: 5'-GGCTTTAACTTCATCGGTAC-3' R: 5'-TCGCCGTAGTTCAGATCCCA-3'	94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min 10 s, 30 cycles	710	2	
<i>gapA</i>	F: 5'-GATTACATGGCATAACATGCTG-3' R: 5'-CAGACGAACGGTCAGGTCAAC-3'	94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min 10 s, 30 cycles	627	2	
<i>pgm</i>	F: 5'-CCG/TTCG/CCAG/TAACCCGCC-3' R: 5'-TCA/GACA/GAACCATTTGAAA/G/TCC-3'	94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min, 35 cycles	695	1	
<i>espA</i>	F: 5'-ATGGATACATCAAAA/CTGG/CA/CAC-3' R: 5'-TTATTTACCAAGGGATATT-3'	94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min, 35 cycles	580	1	
<i>ompA</i>	F: 5'-AGACAGCTATCGCGATTGC-3'	94°C for 45	676	3	

	R: 5'-GCTTTGTTGAAGTTGAACAC-3'	s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min, 30 cycles		
<i>adk</i>	F: 5'-CGGGCGCGGGGAAAGGGACTC-3' R: 5'-GCGCGAACTTCAGCAACCG-3'	94°C for 45 s, 59°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	595	5
<i>gdh</i>	F: 5'-TCGGCGTAGGGCGTGCTGAC-3' R: 5'-CTGCTCTTGTTCGCGCCCTCTTC-3'	94°C for 45 s, 59°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	796	5
<i>metA</i>	F: 5'-CGCAACACGCCCCGAGAGC-3' R: 5'-GCCAGCTCGCTCGCGGTGTATT-3'	94°C for 45 s, 59°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	610	5
<i>ppk</i>	F: 5'-TGCCGCGCTTTGTGAATTTACCG-3' R: 5'-CCCCGCGCAGAGAAGATAACGT-3'	94°C for 45 s, 58°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	770	5
<i>gcl</i>	F: 5'-GCGTTCTGGTCGTCCGGGTCC-3' R: 5'-GCCGCAGCGATTTGTGACAGACC-3'	94°C for 45 s, 58°C for 45 s, 72°C for 2 min, 30 cycles	758	6

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

表二、脈衝電場瓊膠電泳與 MLST 多形性分型法結果比較

脈衝電場瓊膠電泳 分型	菌株數	MLST 代號	MLST 各基因 allele 代號					
			<i>adk</i>	<i>gcl</i>	<i>gdh</i>	<i>mdh</i>	<i>metA</i>	<i>ppk</i>
大腸桿菌	25							
I	1	324215	3	2	4	2	1	5
II	2	324215	3	2	4	2	1	5
III	1	324215	3	2	4	2	1	5
IV	1	324125	3	2	4	1	2	5
V	1	223145	2	2	3	1	4	5
VI	1	123334	1	2	3	3	3	4
VII	1	242324	2	4	2	3	2	4
VIII	1	133435	1	3	3	4	3	5
IX	1	233251	2	3	3	2	5	1
X	1	233251	2	3	3	2	5	1
XI	1	331252	3	3	1	2	5	2
XII	1	331252	3	3	1	2	5	2
XIII	1	432454	4	3	2	4	5	4
XIV	1	432454	4	3	2	4	5	4
XV	1	211323	2	1	1	3	2	3
XVI	1	231323	2	3	1	3	2	3
XVII	1	331252	3	3	1	2	5	2
XVIII	1	253422	2	5	3	4	2	2
XIX	1	423421	4	2	3	4	2	1
XX	1	362142	3	6	2	1	4	2
XXI	1	441234	4	4	1	2	3	4
XXII	1	545332	5	4	5	3	3	2
XXIII	1	564423	5	6	4	4	2	3
XXIV	1	541432	5	4	1	4	3	2
克雷氏肺炎桿菌	15							
I	1	332423	3	3	2	4	2	3
II	1	232425	2	3	2	4	2	5
III	2	412425	4	1	2	4	2	5
IV	1	412425	4	1	2	4	2	5
V	1	323425	3	2	3	4	2	5
VI	1	222425	2	2	2	4	2	5
VII	1	323425	3	2	3	4	2	5
VIII	1	323425	3	2	3	4	2	5
IX	2	223425	2	2	3	4	2	5
X	1	223425	2	2	3	4	2	5
XI	1	332435	3	3	2	4	3	5
XII	1	223425	2	2	3	4	2	5
XIII	1	223425	2	2	3	4	2	5

表三、大腸桿菌產生之廣效性頭孢子黴素水解酵素、MLST 分型結果與菌株數

廣效性頭孢子黴素水解酵素型/MLST 分型	菌株數
TEM 型	1
153235	
SHV 型	21
133435	3
211323	4
231323	1
263322	5
332435	2
412425	3
545332	3
CTX-M 型	92
123334	5
133435	1
143425	4
222425	3
223145	2
223425	5
224435	4
231323	2
232425	8
253422	3
323425	4
324125	6
342445	4
352435	6
362142	1
423421	6
432454	7
441234	4
452234	4
541432	2
545332	2
564435	4
565423	5
CMY-2 型	171
223145	2
231423	5
232425	1
233251	8
242324	6
253422	31
263322	2
323425	14
324125	1
331252	1

332423	9
332435	5
342445	7
352435	3
362142	5
412425	1
423421	7
441234	4
452234	22
462244	6
545332	29
564423	2
564445	1

表四、克雷氏肺炎桿菌產生之廣效性頭孢子黴素水解酵素、MLST 分型結果與菌株數

廣效性頭孢子黴素水解酵素型/MLST 分型	菌株數
SHV 型	245
122425	1
212325	15
212425	3
222425	1
223425	2
223325	35
223425	18
223435	11
224445	3
332435	1
333445	22
323425	2
323425	4
332423	2
334425	9
334435	24
334445	3
342425	6
343435	4
344425	3
344435	7
354425	6
412425	2
422425	17
423425	3
424435	31
434425	4
434435	5
444435	1
CTX-M 型	82
212325	3
222425	5
223325	2
223425	7
223435	3
224445	1
323425	9
323425	17
334425	2
343435	7
422425	26
424435	3
DHA-1 型	38
223325	4

224445	6
323425	21
334445	4
344425	2
423425	1
CMY-2 型	43
212425	2
332423	32
342425	3
344435	5
434425	1
CMY-8 型	9
222425	6
354425	3
IMP-8 型	22
223425	17
333445	2
334435	2
434435	1
