

計劃編號：DOH90DC-2019

行政院衛生署九十年度
自行研究計劃

台灣地區鼠傷寒桿菌多重抗藥性菌株
及其分子流行病學之研究

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計劃主持人：李智隆

研究人員：陳光爐、王添貴、邱秀櫻、蔡金來、朱文碧

執行期間：90年1月1日至91年12月1日

** 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 **

摘要

過去十幾年來，對具有安匹西林、氯黴素、鏈黴素、磺胺藥及四環黴素(ampicillin、streptomycin、sulfonamides、chloramphenicol、tetracycline 等 ACSSuT, MDR-type 菌株)的鼠傷寒桿菌(*Salmonella typhimurium*)多重抗藥性菌株，在各國有明顯增加趨勢。而多重抗藥性鼠傷寒桿菌有較高致病性及住院率，引起世界各國注意；近年來，對較新的抗菌藥物如 trimethoprim 及 ciprofloxacin 的抗藥性鼠傷寒桿菌也陸續被發現。台灣地區食因性及散發性感染事件中，以鼠傷寒桿菌檢出率最高，且國內有濫用抗生素情形，但對鼠傷寒桿菌抗藥性情形卻一直未被學界及醫界重視；另外，台灣地區歷年來由食因性中毒案件或散發性感染事件所分離出之鼠傷寒桿菌菌株，其分子流行病學特性為何？是另一個欲探討的問題。

為分析台灣地區歷年來，分離的沙門氏鼠傷寒桿菌菌株抗藥性衍化情形，使用 12 種紙錠抗生素敏感試驗(disk diffusion test)，來篩選自 1990-2001 年間 157 株鼠傷寒桿菌菌株，包括五種抗藥性及特定種類抗藥性(如抗 ciprofloxacin 藥物)的多重抗藥性菌株，初步結果顯示，有 34 株多重抗藥性菌株被分離出，佔 21.7% (34/157)，而第二代頭孢子素(cephalosporin)之 cefermandole 有 21 株抗藥性產生，約佔 13% (21/157)，另外有特定 4 株抗 ciprofloxacin 藥物及 7 株抗 ceftirioxone (頭孢子素第三代)的菌株出現，顯示

目前國內鼠傷寒桿菌對 quenolone 類藥及第二、三代頭孢子素類藥物已有抗藥性產生，值得醫界注意。而計劃也嘗試利用複合式聚合酶 PCR(multiplex polymerase chain reaction, MP-PCR)，以四組不同引子(ant-3' N、pse-1、sul-1 及 flost 引子等)，分別放大 4 個不同的抗藥性基因(streptomycin、ampicillin、sulfonamides 及 chloramphenicol)，其產物分別位於大小 1008bp，1250bp，1133bp 與 584bp，將可應用於快速且專一性檢測鼠傷寒桿菌的多重抗藥性基因之分子技術。

為分析多重抗藥性鼠傷寒桿菌菌株之致病性之相關因子，藉由三組不同引子 invA(invasion gene)、int(integron)、spvC(virulence gene)之 PCR 實驗，結果顯示，鼠傷寒桿菌侵入深層內皮細胞所必須之 invasion(invA, invasion gene 321bp)基因有 131 株，佔 93.57% (131/140)比率，帶有經由 site-recombination 機制的嵌入基因(integron，265bp)有 88 株佔 62.86% (88/140)，而與毒力有關之 spvC(virulence gene，392bp)則有 107 株 76.4% 陽性率(107/140)。而 34 株多重抗藥性鼠傷寒桿菌菌株，則均帶有侵入、嵌入及毒力基因。

在菌株分子流行病學探討方面，以質體輪廓分型法及限制酶脈衝式電泳法，對特定食因中毒案件菌株進行探討，分析結果均呈一致性，顯示二種方法對分子流行病學事件調查具有其適用性；進一步對各地散發性感染

事件菌株分析比對，使用 *Xba*-1 與 *Sfi*-1 脈衝式電泳法，二種限制酶分型能力相似，由菌株分型圖譜及菌株親緣性樹狀圖結果顯示，各地菌株間差異性不大，但對 34 株多重抗藥性鼠傷寒桿菌菌株，則有較明顯差異出現，可能為抗藥性基因變異或基因重組，導致限制酶無法辨識。唯 PFGE 缺點是步驟繁瑣且耗時，長需 3-4 天方能完成，常無法因應快速防疫案件之需求；而美國 CDC 最近 2001 年發表快速脈衝電泳分型法，實驗僅需二天，分型結果良好，目前亦應用於鼠傷寒桿菌菌株及其他致病株的分型實驗，對流行病學案件調查分析，將有助益。

台灣地區食因性及散發性感染事件，以鼠傷寒桿菌最為常見，而多重抗藥菌株分離比例日益增高，且 *quenolone* 類藥及第二、三代頭孢子素類藥物也有抗藥性產生，顯示國內有濫用抗生素情形，值得醫界重視顯示。另外一方面，由於畜禽類及其產品檢測之鼠傷寒桿菌分離，分屬不同單位農委會及藥物食品檢驗局職責，若能進一步比對家畜類及其產品分離之鼠傷寒桿菌菌株與人體分離鼠傷寒桿菌之差異性，將可釐清菌株抗藥性增加是否與農業養殖生態(如畜禽類養殖過程之飼料添加抗生素等)有因果關係。而鼠傷寒桿菌抗藥性增加，建議醫界對抗生素過份使用應有警覺，而農政單位對抗生素添加畜禽類飼料及其產品檢測，須進一步加強管制及檢驗。

關鍵詞：沙門氏鼠傷寒桿菌、紙錠抗生素敏感試驗、脈衝式電泳法、台灣地區

(1) 前言

1990 年代，鼠傷寒桿菌第 104 確定型(*salmonella typhimurium definitive type 104*, DT104)在英國被發現後，至 1995 年時，DT104 已成為英國所有罹患沙門氏桿菌腸道感染致病因的第二位。所有 DT104 型鼠傷寒桿菌中，有 90%對安匹西林、氯黴素、鏈黴素、磺胺藥及四環黴素(R-type, ACSSuT 菌株)等藥物具有抗藥性(1)，而對較新的抗菌藥物如 trimethoprim 及 ciprofloxacin 具有藥性的 DT104 也陸續被發現(3)。在過去十幾年來，鼠傷寒桿菌抗藥性在各國均有明顯增加趨勢(1,2)；在美國疾病管制局 1996 年監測抗藥性報告，3903 傷寒株被分離出，1995 年有 976 株(25%)為 *Salmonella typhimurium*，其中大約有 28% 則為鼠傷寒桿菌第 104 確定型，相較於 1990 年的 7% 要高出許多；在 1996 年人體分離的鼠傷寒桿菌有 32% 是具有多重抗藥性的(2,4)；因此在世界各國鼠傷寒桿菌抗藥性問題似乎日愈嚴重。

在臺灣地區食因性及散發性感染事件中，多年來以鼠傷寒桿菌檢出率最高；以本局(原預防醫學研究所)歷年來菌株血清型資料顯示，在 1983-1993 十年間食物中毒案件之 1647 菌株中，以沙門氏菌血清型 O4(44%)及 O9(32.5%)最多，其中 O4 血清型以 *Salmonella typhimurium* 最常見，而 O9 則為 *Salmonella typhi*(19)；進一步 1993-1997 年沙門氏菌集體食品中毒案件檢出菌株型別也以 *Salmonella enteritidis* 及 *Salmonella typhimurium* 最多。

而鄰近日本自 1989 年至今，*Salmonella enteritidis* 及 *Salmonella typhimurium* 引起食品中毒案件中其分離率亦排名第一、二位。國內在抗生素濫用情況下，分離之肺炎雙球菌或葡萄球菌等高青黴素類抗藥性情形日益嚴重，而鼠傷寒桿菌是台灣地區主要食品中毒致病菌，其抗藥性情形卻一直未被醫界重視，是目前值得憂慮的一個嚴重問題。另一方面，歷年來由食因性中毒案件或散發性感染事件所分離出之鼠傷寒桿菌菌株，其分子流行病學特性為何？對中毒事件或爆發疫情案件，以防疫角度而言，釐清並迅速處理案情是絕對必須的，而實驗室則需要有提供快速、正確的分子分型結果，這是另一個欲探討的問題。

近來由分子生物學研究顯示，鼠傷寒桿菌抗藥性機制，是由 R 質體 (R-plasmid) 或轉位子 (transposons 如 Tn2/family) 的作用，經由原位重組 (site-specific recombination) 或染色體插入 (chromosomally integrated) 方式 (5,6)。而 integron 內亦有特異性插入位 (integration site, attI) (6) 及 integrase 催化特異性重組影響抗藥性機制的進行 (7,8)。由最近 DT104 抗藥性菌株研究顯示，integron 能夠經由 site-specific recombination 結合一個或數個抗藥性基因，且至少包含有二個 integron；在每一個 integron 含有 2 個 conserved segment, 5' % 與 3' %。而其中一個 integron 的 5' % 包含 ant(3'')-Ia 與 pse-1 基因及 3' % 區域包含 sul-1 與 gacEΔ1 基因，這些基因會造成鼠傷寒桿菌多

重抗藥性的產生；例如 *ant(3'')*-Ia encoded 出 aminoglycoside resistance gene cassette 造成對 streptomycin 的耐受性(11)。而 *floS* gene 則是另一種 Chloramphenicol 抗藥性基因(12,14)。

為明瞭近年來台灣地區臨床分離的鼠傷寒桿菌抗藥性情形，實驗收集來自 1990-2001 十一年間由人體分離的鼠傷寒桿菌約 157 株，依據 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards 標準，以 12 種紙錠抗生素敏感試驗(15)，來篩選鼠傷寒桿菌的多重抗藥性菌株及其他種類抗藥性菌株(如抗 ciprofloxacin)。將 5 種鼠傷寒桿菌抗藥性菌株 (ACSSuT,R-type)，以 4 組引子不同抗藥性目標基因(包括 streptomycin、ampicillin、sulfonamides 及 chloramphenicol 抗藥性基因等)的複合式 PCR 方法(11,15,16,17)，來快速檢測鼠傷寒桿菌多重抗藥性基因，藉以瞭解近年來各種抗藥性菌株的抗藥性情形，進一步再由不同引子 *invA*(invasion gene)、*int*(integron)、*spvC*(virulence gene)PCR 實驗，來探討鼠傷寒桿菌菌株帶有侵入、嵌入及毒力基因致病之相關性因子。

以分子分型方法而言，簡單、迅速、正確與高再現性是必須的。而文獻中各種分型方法均有其優缺點；例如隨機放大 DNA 分型法(random amplified polymorphic DNA,RAPD)方法簡單快速，但再現性不高，而核糖體分型法(ribotyping,RT)則分型效果較差，另外限制酶脈衝電泳法(pulsed-field

gel electrophoresis, PFGE), 雖然是步驟繁瑣且耗時, 但使用特定限制酶切割染色體再現性高, 是目前較被公認的分型方法之一, 質體輪廓分型法 (plasmid profile analysis, PPA) 亦常被應用, 方法簡單但報告其質體穩定性較差, 大質體易被遺失或丟棄等。然而適合其實驗室對分子流行病學調查的要求, 是更重要的。因此本實驗將選用脈衝電泳法及質體輪廓分型法二種分型法, 來進行菌株分型工具。

質體輪廓分型法, 是利用市售質體抽取試劑組 (high pure plasmid isolation kit, Roche Molecular Biochemicals 公司), 小規模抽取 plasmid-DNA 後, 以電泳分析其質體大小。取其特性為快速、方法簡單而應用於單一中毒或流行案件之判別。以特定小於 25Kb 分子量之質體, 為分型依據。

使用 *Xba-1* 與 *Sfi-1* PFGE 脈衝電泳法 (13,18) 對不同多重抗藥性基因菌株及發生流行案件之菌株予於分子分型, 由不同限制酶特定切割位置, 可將染色體 DNA 切成不同片段大小, 再由不斷電場方向 (angles) 改變與電場轉換時間 (switch time) 不同, 得到脈衝電泳分型圖譜 (PFGE profile), 藉由電腦中 Phorxtic 1D 分析軟體, 來進行鼠傷寒桿菌的抗藥菌株及中毒案件菌株之親緣性樹狀圖分析, 以 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 的方式, 經由標準菌株比對及菌株間比較, 目的用來探討抗藥性菌株的 DNA 分子排列情形及不同案件間彼此菌株分子的相關性。

(2) 材料與方法

菌株分離及生化、血清鑑定

實驗收集 11 年(1990-2001)由人體分離的鼠傷寒桿菌 157 株，包括二件集體食因性中毒案件(八十九年四月間仁愛之家 19 株中毒案及 90 年四月間 11 株原住民食因中毒案件)及各地散發個案之菌株，培養於 SS-medium (salmonella shigella agar) 36°C，16-18 小時，進行基礎生化試驗(triple sugar iron, TSI test)與血清鑑定後，將菌株於-20°C 下保存。

紙錠藥物敏感試驗(disk sensitivity test)：

利用洋菜紙錠擴散法(agar disc diffusion)，進行菌株抗生素敏感試驗分析，使用紙錠藥物(BBL) 計 12 種試驗包括 ampicillin、sulfonamides、chloramphenicol、streptomycin、tetracycline 及其他種類抗生素如 ciprofloxacin、amikacin、cephalothin(頭孢子素第 1 代)、cefamandole(頭孢子素第 2 代)、ceftiraxone(頭孢子素第 3 代)、gentamicin 與 nalidixic acid 等藥物，以培養於 tryptic soy broth(TSB)之新鮮菌液，製成 McFarland No.0.5 硫酸鋇標準懸浮液，平均塗抹於 Mueller-Hinton medium(M-H medium)上，37°C，18-20 小時培養後觀察抑制圈大小，依其 BBL 提供抗藥判讀標準。

複合式 PCR 實驗：

新鮮 2-3 個菌落，以 100 λ 滅菌水製成懸浮液，經沸水 10 分鐘後，離心 13000 轉 15 分鐘，抽取上清液 2 λ 當作板模，將 4 組引子(ant-3' N,20bp、pse-1,20bp、sul-1,20bp 及 flost,24bp 引子等各 1 λ)同時進行 PCR 實驗，實驗條件 94°C 60 秒，55°C 60 秒，72°C 90 秒，進行 35 個循環反應，得到分別為 1008bp，1250bp，1133bp 及 584bp 大小，用以確認鼠傷寒桿菌菌株是否具有 streptomycin、ampicillin、sulfonamides 及 chloramphenicol 抗藥性基因。

毒力因子 PCR 實驗

實驗條件設定 94°C 45 秒，60°C 45 秒，72°C 90 秒，進行 30 個循環，產物 7 λ 進行 1.2% 瓊膠分析。以三組引子 invA(21bp)、int(18bp)、spvC(18bp)進行實驗，探討鼠傷寒桿菌菌株分別帶有侵入 invA(invasion gene, 321bp)、嵌入 int 基因(integron, 265bp)、毒力基因 spvC(virulence gene, 392bp)致病之相關性因子。

質體輪廓分型法(plasmid profile analysis, PPA)

使用市售之 Roche Molecular Biochemicals 之 high pure plasmid isolation kit，依據試劑組所附之標準操作，抽取菌株質體 DNA，使用 1.2% SK Gold agarose 及 0.5 \times TBE 電泳液，電泳條件為 100V, 3.5 小時，進行 DNA 片段

脈衝式電泳法(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)

將特定抗藥性菌株及食因性中毒案件與各地散發個案之菌株，依據美國 CDC 所建立之脈衝電泳標準程序操作(Gautom,1997)略加修改，以 *Xba-I* 與 *Sfi-I* 二種限制酶進行染色體 DNA 切割作用，以不同變換時間方式(*Xba-I* 採 5-20 秒與 *Sfi-I* 採 5-20 秒及 20-45 秒)，電泳時間分別為 18 及 16 小時，使用 1.2% PFGE agarose 及 0.5x TBE 電泳液，進行 DNA 片段分析，EtBr 染色及照相，依片段產生不同的分子圖譜，再以 phorxtic 1D 分析軟體，進行菌株分子流行病學分析

Phorxtic 1D 分析軟體及親緣性樹狀圖：

菌株的分型圖譜進行 Phorxtic 1D 軟體分析，以 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)的方式，分別計算其分子量大小及 Rf 值，經由標準菌株比對而製成親緣性樹狀圖，進行鼠傷寒桿菌的抗藥菌株及流行案件菌株其彼此菌株分子差異性。

(3) 結果

以紙錠抗生素敏感試驗方法，分析 1990-2001 年間 157 株鼠傷寒桿菌菌株，有 34 株多重抗藥性菌株被分離出，佔 21.7% (34/157)，第二代頭孢子素之 cefermandole 有 21 株抗藥性產生，約佔 13% (21/157) 另外有特定 4 株抗 ciprofloxacin 藥物及 7 株抗 ceftirioxone (頭孢子素第三代) 的菌株被分離出。

在四組不同引子(ant-3' N、pse-1、sul-1 及 flost 引子等)之多套式 PCR 實驗，同時檢測菌株帶有四種 streptomycin、ampicillin、sulfonamides 及 chloramphenicol 抗藥性基因，經電泳瓊膠分析，其產物大小分別位於 1008bp，1250bp，1133bp 與 584bp 之間。實驗亦嘗試三種不同黏合溫度 60℃、55℃ 及 50℃，取最佳黏合溫度為 55℃，經不同菌種之特異性及敏靈度 (10¹ CELLS) 測試後，將可應用於快速偵測鼠傷寒桿菌多重抗藥性基因的分離技術。

為探討鼠傷寒桿菌菌株帶有侵入、嵌入及毒力基因致病之相關性因子，在三組不同引子 invA、int 及 spvC 引導進行 PCR 檢測下，結果顯示鼠傷寒桿菌侵入深層內皮細胞所必須之 invasion(invA, invasion gene 321bp) 基因有 131 株，佔 93.57% (131/140) 比率，帶有經由 site-recombination 機制的嵌入基因(integron, 265bp) 有 88 株佔 62.86% (88/140)，而與毒力有關之

spvC(virulence gene, 392bp)則有 107 株 76.4% 陽性率(107/140)。而 34 株多重抗藥性鼠傷寒桿菌菌株，則均帶有侵入、嵌入及毒力基因。

以質體輪廓分型法，對 89 年及 90 年二件特定食因中毒案件菌株進行探討，89 年仁x 之家 19 株中毒案，呈現單一質體型別(P1)，有三條質體分別為 10Kb、20 Kb 及 25 Kb 大小，而對於 90 年原住民食因中毒案件的 11 株，則呈現另一型別(P2)，有 2.5 Kb、2.8Kb、4 Kb、5 Kb、10 Kb 及 20 Kb 之六條質體出現。另外亦分析 83 年 15 株散發病例，將其區分成 6 型(P1-P6)，以 P1 為主要型別，有 9 株(為聚集案件)質體分別為 10、20 及 25 Kb，其餘各一株。

使用二種限制酶 *Xba-1* 及 *Sfi-1* 脈衝式電泳法，對食物中毒案件分析，二種限制酶均可區分，而呈現單一脈衝型別(X1 與 S1)。進一步比較各地散發性感染事件共計 43 株，以 *Sfi-1* 切割作用後，分型依據位於 48-240 Kb 大小，DNA 片段約 10-14 條，而 *Xba-1* 分型位置則在於 48-432 Kb 之間，DNA 片段有 12-15 條左右，依差異大於三個 DNA 片段(bands)，為型別區分標準時，*Sfi-1* 將 43 株脈衝圖譜區分成 7 型；而 *Xba-1* 可區分成 8 型，二者分型能力相似。再由菌株分型圖譜及菌株親緣性樹狀圖結果顯示，各地菌株間差異性不大，較有較明顯差異在 34 株多重抗藥性鼠傷寒桿菌菌株。

(4) 討論

紙錠敏感試驗分析抗藥性情形：

由於鼠傷寒桿菌是台灣地區主要食品中毒致病菌，而探討其抗藥性文獻並不多，為瞭解近年來台灣地區臨床分離的鼠傷寒桿菌抗藥性情形，本實驗共分析 1990-2001 年間 157 株鼠傷寒桿菌菌株，由抗藥性初步結果顯示，有 21.7% 比率為五種藥物之多重抗藥性菌株，而第二代頭孢子素之 cefermandole 抗藥性也有 13% ，另外有 7 株抗 ceftirioxone 及特定 4 株抗 ciprofloxacin 藥物的菌株被分離出。值得注意的是，分離的抗 ceftirioxone 及抗 ciprofloxacin 藥物菌株，幾乎對 12 種藥物均產生抗藥性，在醫界及防疫單位使用抗生素治療上，須特別考量，

鼠傷寒桿菌抗藥性比率逐年升高，正顯示國內目前抗生素濫用日益嚴重。另外有些菌株分離屬於原發性的抗藥性(primary resistance)，亦即並非病人接受過治療後，才產生抗藥性，因此推想這些致病株可能在動物體內即為抗藥性菌株，未來若能進一步比對家畜類及其產品(蛋類或生雞肉)所分離之鼠傷寒桿菌與人體分離鼠傷寒桿菌菌株之間差異性，或可釐清菌株抗藥性增加是否與農業養殖生態(如畜禽類養殖過程之飼料添加抗生素等)有因果關係。

複合式 PCR 應用於快速檢測鼠傷寒桿菌多重抗藥性基因：

利用四組不同標的 DNA 分子之專一性引子混合於同一管內，同時進行 PCR 反應，放大四組大小不同基因產物。若菌株帶有四種 streptomycin、ampicillin、sulfonamides 及 chloramphenicol 抗藥性基因，經電泳瓊膠分析，其產物大小分別位於 1008bp，1250bp，1133bp 與 584bp 之間。而經實驗嘗試最佳黏合溫度為 55°C。將可應用於快速偵測鼠傷寒桿菌多重抗藥性基因的分離技術。

質體輪廓分型法使用於特定中毒案件之釐清：

利用市售質體抽取試劑組，抽取 plasmid-DNA 後，以電泳分析其質體大小，取其特性為快速、方法簡單而應用於單一中毒或流行案件之研判。本實驗分析 89 年及 90 年二件特定食因中毒案件菌株，結果呈現一致性之質體型別 P1(3),10、20、25 Kb)，及 P2((6) 2.5、2.8、4、5、10、20 Kb)，顯示質體輪廓分型法可應用於分子流行病學事件調查；另外，分析了 83 年 15 株散發病例，將其區分成 6 型(P1—P6)，以 P1 為主要型別，有 9 株(為聚集案件)質體型別為 10、20 及 25Kb，其餘型別各一株。由此可得知質體輪廓分型法除對中毒案件之判別外，對散發病例亦有某程度分型效果；然而質體穩定性不夠，其再現性會因時間或多次培養導致質體遺失而不足，因此採用質體分型時，建議取 2Kb-25Kb 大小質體為分型依據為宜。

脈衝式電泳法討論分子流行病學部分：

脈衝式電泳主要是以不斷改變電場方向，進行大片段 DNA 分子的分離，為公共衛生及流行病學的研究及調查的有效分型工具。而影響脈衝電泳成敗關鍵因素為，限制酶選擇、脈衝電場方向與電場轉換時間等等。實驗限制酶選擇為已發表文獻上常用之二種限制酶 *Xba-1* 及 *Sfi-1*，而脈衝電場方向以固定 120 度，電場轉換時間已設定為 *Xba-1* 採 5-20 秒與 *Sfi-1* 採用 5-20 秒及 20-45 秒，電泳時間分別為 18 及 16 小時。結果顯示，對食因中毒案件調查時，二種限制酶均呈現單一脈衝型別(X1 與 S1)，顯示其對分子流行病學事件調查具有一致性。由菌株分型圖譜及菌株親緣性樹狀圖分析顯示，各地菌株間差異性不大，但對 34 株多重抗藥性鼠傷寒桿菌菌株，則有較明顯差異出現，可能為抗藥性基因變異或重組，導致限制酶無法辨識。

脈衝式電泳是目前流行病學上較被採認一種分型方法，唯 PFGE 缺點是步驟繁瑣且耗時，長需 3-4 天方能完成，無法因應疫情案件之需求；而為解決且因應快速防疫需求，採用美國 CDC 最近 2001 年發表快速脈衝電泳分型法，其最大不同之處，在於使用瓊膠包埋菌體之內外均加入蛋白酶，並利用 54°C 水浴為操作溫度，加速蛋白酶破壞菌體，而大幅縮短反應、清洗時間，使其分型實驗僅須二天，且分型結果良好，目前亦應用於鼠傷寒桿菌菌株及其他致病株的分型實驗，對流行病學案件調查分析，將有助益。

(5) 結論與建議

結論

分析近十年來，國內沙門氏鼠傷寒桿菌抗藥性情形，有 21.7% 多重抗藥性菌株被分離出，且頭孢子素二代、三代抗生素及 quenolone 類均產生抗藥性，值得醫界在治療及防疫衛生單位疫情管制上加以重視。

以不同抗藥性目標基因為標靶的複合式 PCR 方法，建立快速且專一性鼠傷寒桿菌多重抗藥性基因的分子檢測技術，因應本局對致病菌快速偵檢要求。進一步檢測三種不同之侵入、嵌入及毒力基因，來探討源自人體沙門氏鼠傷寒桿菌致病株之致病因子，尤其是多重抗藥性菌株完全帶有三種毒力基因，而其他鼠傷寒桿菌菌株也高毒力基因比率顯現，值得進一步分析其菌株特性。

以質體輪廓分型法及限制脈衝式電泳法，對特定食因中毒案件分析的一致性結果，顯示二種方法均可使用於分子流行病學案件調查。因此對特定流行案件使用質體輪廓分型法有快速、省時之效，但對散發性菌株無法區分時，則採用分型效果較佳且再現性的脈衝式電泳法為宜。

雖然脈衝式電泳法步驟繁瑣且耗時，但採用美國 CDC 最近 2001 年發表快速脈衝電泳分型法，實驗僅需二天，分型結果良好，目前已應用於鼠傷寒桿菌菌株分型實驗，對分子流行病學案件調查時效上，將有很大助益。

建議

台灣地區食因性及散發性感染事件，以鼠傷寒桿菌最為常見，而多重抗藥菌株分離比例日益增高，且 quenolone 類藥及第二、三代頭孢子素類藥物也有抗藥性產生，顯示國內有濫用抗生素情形，值得醫界及本局與基層衛生單位重視。

食物或肉類受鼠傷寒桿菌污染導致中毒案件甚多，但卻一直無法釐清整個事件來龍去脈，導因於畜禽類及其產品檢測之鼠傷寒桿菌分離，分屬不同單位農委會及藥物食品檢驗局職責，人體鼠傷寒桿菌是本局業務範圍，若能整合不同單位，以整合型計劃或合作計劃，進一步比對家畜類及其產品所分離之鼠傷寒桿菌與人體分離鼠傷寒桿菌菌株之間差異性，或可釐清菌株抗藥性增加是否與農業養殖生態(如畜禽類養殖過程之飼料添加抗生素等)有因果關係。

鼠傷寒桿菌抗藥性增加，建議醫界對抗生素過份使用應有警覺，而農政單位對抗生素添加畜禽類飼料及其產品檢測，須進一步加強管制及檢驗。

(6) 參考文獻

1. Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt : Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med* 1998 ; 338:1333-1338.
2. Gross, U., H. Tschape, I. Bednarek, and M. Frosch : Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*. *Eur. J. Clin. Micro. Infect. Dis* 1998 ; 17:385-387.
3. Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR. Increasing spectrum of resistance in multiresistance *Salmonella typhimurium*. *Lancet* 1996 ; 347:1052-1053.
4. Multidrug-Resistant *Salmonella* Serotype *Typhimurium*--United States. 1996 April 11, 1997/ 46(14);308-31
5. Hall, R.M., C. Vockler : The region of the IncN plasmid coding for resistance for β -lactam antibiotic, streptomycin/spectinomycin and sulfonamide is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmid and Tn21-like transposons. *Nucleic acid Res* 1987 ; 15:7491-7501.
6. Stokes, H.W. and Hall, R.M. : A novel family of potentially mobile DNA element encoding site-specific gene-integration function: integron. *Mol. Microbiol* 1989 ; 3:1669-1683.
7. Collis, C.M., and R.M Hall. : Gene cassette from the insert region of integrons

- are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 1992 ; 6:2785-2885.
8. Martinez, E., and F. dela Cruz. : Genetic element involved in T21 site-specific integration, a new mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J* 1990 ; 9:1275-1281.
 9. Hall, R.M. and Stokes, H.W. : integron: novel DNA element which captures genes by site-specific recombination. *Genetica* 1993 ; 90: 115-132.
 10. Ridley, A. and Threlfall, E.J : Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT104. *Microb. Drug resist* 1998 ; 4:113-118.
 11. Sandvang, D., Aarestrup, F.M. and Jensen, L.B : Characteristics of integron and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 ; 160: 37-41.
 12. Axel, C. and Karim, S.B : Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the *floR* gene in *Salmonella enterica* serovar Agona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 ; May. Vol. 44 : No 5, 1359-1361.
 13. Tenover, C.F., Arbeit, R. D., Goering, R. V. : Interpreting chromosome DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol* 1995 ; 32:2233-2239.
 14. Lance F. Bolton, Lynda C. Kelley. : Detection of multidrug-resistant *Salmonella*

- enterica* serotype *typhimurium* DT104 bases on a gene which confers cross-Resistance to florfenicol and chloramphenicol. J. Clin. Microbiol. 1999 ; 37:1348-1351.
- 15 Antonis M G., Panayotis T. Tassios., Maria Lambiri. : Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104. J. Clin. Microbiol 2000 ; 38:1269-1271.
- 16 Ashraf A, Khan., Mohammed S. Nawaz., Saeed A. Khan. : Decton of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104.by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 2000 ; 182:355-360.
17. Dorthe Sandvang., Frank Moller Aarestrup. : Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica typhimurium* DT104. FEMS Microbiol Lett 1997 ; 162:177-181
- 18.K.L. Thong., Y.F.Ngeow., Martin Altwegg. : Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. J.Clin. Microbiol. 1995 ; 33:1070-1074.
- 19.王添貴,蔡金來,林建生等 : 近年食品中毒沙門氏菌血清型之新趨勢. 疫情報導 1999 ; 15:1-6.
- 20.Cheng-Hsun Chiu., T. Y Lin., and J, T.Ou. : Prevalence of the virulence plasmid of nontyphoid *Salmonella* in the serovars isolated from human and their association with bacteremia .Mol. Microbiol. 1999 ; 43:899-903.

21. Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G. ; Molecular analysis of spv virulence genes of the salmonella virulence plasmids. *Mol Microbiol.* 1993 ; 7:825-830.
22. Altschul, S. F., Madden, A.A. Schaffer, J. 1997. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402.