

計畫編號: DOH88-TD-1001

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

南台灣抗紅黴素 A 群鏈球菌之研究

計畫名稱

研究報告

執行機構: 國立成功大學醫事技術學系

計畫主持人: 吳俊忠

研究人員: 吳秀梅

執行期間: 87 年 7 月 1 日至 88 年 6 月 30 日

目

錄

頁碼

封面	1
目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	4
前言	5-6
材料與方法	7-11
結果與討論	12-15
結論與建議	16
參考文獻	17-20
圖、表	21-34

中文摘要

收集自嘉南地區 144 株具有抗紅黴素能力之 A、B、C、F、G 群及草綠色鏈球菌依 double disks 方法可將抗紅黴素機轉分為三種表現型: 61% 是持續型; 2% 是誘導型; 37% 是新型。在持續型的菌株中, A 群鏈球菌有一株, A15, 具有高度紅黴素抗藥性 ($MIC > 256 \mu\text{g/ml}$)。利用 A15 之質體 (pA15) 進行特性分析時, 發現此質體不僅可傳送至其它同群鏈球菌, 而且也可傳送至 B、C、F 和 G 群鏈球菌。質體, pA15, 同時具紅黴素、阿立索黴素、四環黴素、氯黴素之抗藥性。在 348 株 A、B、C、F 及 G 群鏈球菌中, 與 pA15 同樣具有該四種藥物抗藥性的比率如下: 113 株 A 群鏈球菌中有 30 株 (26.5%); 177 株 B 群鏈球菌中有 12 株 (6.7%); 12 株 C 群鏈球菌中有 5 株 (41.6%); 11 株 F 群鏈球菌中有 2 株 (18.1%); 35 株 G 群鏈球菌中有 1 株 (2.8%)。藉 PCR 技術可知 pA15 所增幅之 *erm B* 基因屬於甲基化的抗藥機制, 而 A、B 群鏈球菌同屬此機制的比率分別為 57 及 6%; 南方墨漬法不僅確認 pA15 含有甲基化的抗紅黴素機制, 更得知該抗藥基因位於質體經 *Hind III* 處理之 1093 bp 片段。由此吾人推斷嘉南地區抗紅黴素 A 群鏈球菌病例之增加, 可能大多數與菌株甲基化後所造成高度抗藥性菌株有關。除此之外, 利用已知抗紅黴素基因的 PCR 篩選發現在我們所收集之鏈球菌株, 有些並不能被偵測出, 此結果暗示著我們的菌株中可能存在著其他未經發現的抗紅黴素機制。

關鍵詞: 紅黴素、抗藥性、鏈球菌

英文摘要

A total of 144 erythromycin-resistance strains of group A、B、C、F、G and viridans *Streptococci* were characterized using the double disk method to classify of three different phenotypes. Among these strains, 61% was constitutive, 2% inducible, and 37% novel. One of the constitutive resistance strains, A-15 from group A *streptococcus*, showed a high level erythromycin-resistance (MIC >256 μ g/ml). Novobiocin curing of plasmid isolated from A-15 showed that the gene of erythromycin-resistance was in plasmid. In addition, azithromycin, tetracycline, chloramphenicol, and clindamycin markers were also present in the plasmid. Furthermore, the plasmid was successfully reintroduced into an erythromycin sensitive strain and different serogroups of streptococci by the electroporation. The same antimicrobial resistant profiles as plasmid pA15 were detected in 30 of 113 (26.5%) of GAS, 12 of 177 (6.7%) of GBS, 5 of 12 (41.6%) of GCS, 2 of 11 (18.1%) of GFS, 1 of 35 (2.8%) of GGS. *ErmB* gene was amplified from plasmid pA15 which is known as responsible for methylation mechanism. The prevalence of *ermB* gene in group A and B *streptococci* were 57 and 6% , respectively. Moreover, the erythromycin-resistance gene was located in 1093 bp *Hind*III fragment of the plasmid pA15. However, there were not all detected the resistant gene in current screening method. The results suggest that there has a novel mechanism involving in this area.

Key word: erythromycin, resistance, streptococci

鏈球菌是一種革蘭氏陽性的球菌，會引起人類的菌血症、腦膜炎、肺炎、呼吸道及泌尿生殖道感染等疾病。A 群鏈球菌 (化膿性鏈球菌) 主要引起呼吸道感染的疾病，包括鏈球菌性喉痛、中耳炎 (Otitis media)、丹毒 (Erysipelas)、咽炎-扁桃腺炎 (Pharyngitis tonsillitis) 和一些膿皰症 (Impetigo) 等，嚴重時甚至會引起猩紅熱 (Scarlet fever) 及風濕熱 (Rheumatic fever)。一般若感染到這類細菌，多是以盤尼西靈治療，但對於有盤尼西靈過敏症狀的病人，則是採用紅黴素為替代的治療藥物。紅黴素 (圖 1) 為 14-巨環型抗生素的一種，主要用於治療革蘭氏陽性菌的感染，亦是呼吸道感染常用抗生素中較安全的藥物之一。紅黴素的作用原理是因其會與細菌的 50S 核糖體結合，尤其是 23S 核糖體 RNA (rRNA)。進而阻礙 peptide 的轉位與延伸，而抑制蛋白質的合成。一般對紅黴素及其它巨環型抗生素具有此種抗藥特性的，通常也會對 lincosamides 及 streptogramin type B 抗生素具有抗藥性，即所謂的 MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 抗藥性。MLS 抗藥性的機制現在已知有三種：target site modification、inactivation 和 active efflux²。(I) Target site modification 是 MLS 抗藥性中最常見的，主要在 23S rRNA 的 adenine 殘基發生 N⁶-重甲基化的現象，使紅黴素與 23S rRNA 結合的能力降低，抗藥性因而產生。(II) Inactivation 乃因細菌產生某種酵素分解抗生素，因而使抗生素失去效用。(III) Active efflux 則是細菌會自行把抗生素排出菌體外，不會讓抗生素進入細菌體內。就現在所發現的 A 群鏈球菌 MLS 抗藥性菌，以 target site modification 機制的情況最多，最近 active efflux 機制也已被發現²⁹，但至今為止在鏈球菌尚未發現有 inactivation 機制的情況。近年來，紅黴素抗藥性的病例逐漸在日本³、弗利曼特⁴、北美、歐洲、瑞典、法國¹ 等地被發表。台灣亦因抗生素的大量使用，使紅黴素抗藥性的比率大幅提升。以我們實驗室所收集的紅黴素抗藥性的 A 群鏈球菌來說，就高達 56%。先前有報告指出¹³，A 群鏈球菌 MLS 抗藥性基因多在質體內。因此本計劃擬深入探討：

1. 此地區所收集到抗紅黴素鏈球菌株之普遍性。
2. 探尋此高度抗紅黴素鏈球菌是否存在於質體內。
3. 確認此種質體是否可經由質體的轉換而至其它型的鏈球菌株。

4. 分析此種質體之抗藥特性.
5. 利用已知抗紅黴素的基因 (如 *erm B*, *mef*) 以 PCR 方式來確認此地區所收集菌株之抗藥機制.
6. 嘗試證實鏈球菌是否有其他可能的抗藥機制存在.

材料與方法

Bacterial strains

收集自成大醫院微生物室之臨床菌株，包括 348 株 A、B、C、F、G 群及草綠色鏈球菌，以及用來作為 electroporation 接受者大腸桿菌 (DH5 α) 與金黃色葡萄球菌。

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

紅黴素最小抑菌濃度值由感受性試驗 (E test) 來測定，其它抗生素的最小抑菌濃度值由培養基稀釋法¹³來測定。測定紅黴素最小抑菌濃度值是將菌液 (0.5 McFarland 標準) 塗滿於 Mueller-Hinton (MH) 培養基 (含 5% 綿羊血)，貼上紅黴素的 E-test 後置於 37°C 培養 18 h。阿立索黴素最小抑菌濃度值由含濃度 32、64 及 128 $\mu\text{g/ml}$ 的不同培養基來測定之。氯黴素最小抑菌濃度值由含濃度 4 及 32 $\mu\text{g/ml}$ 的培養基來測定之。四環黴素最小抑菌濃度值由含濃度 3.75、7.5、15、30、40、50 及 60 $\mu\text{g/ml}$ 的不同培養基來測定之。

Classification of resistance¹³

紅黴素抗藥性可藉由紅黴素 (擴散量 78 μg) 和刻令達黴素 (擴散量 25 μg) 之 double-disk test 來分類。將 37°C 下培養 18 h 之菌液調至 0.5 McFarland 標準，塗於含 5% 綿羊血之 MH 培養基上，兩種藥錠之間距為 15-20 mm，置於 35°C 培養 18-42 h。

Isolation of plasmid DNA

【1】Isolation of streptococci plasmid DNA^{1, 6}

菌株養在 30 ml TSBY (Tryptic soy broth, Yeast extract) 中 37°C 培養整夜。菌液先在 BAP 上 check，再以 KUBOTA 高速離心機 3,500 rpm 離心 10 分鐘。倒掉上層菌液，沉澱物以 1 ml 25% sucrose 懸浮之。接著加入 100 μl lysozyme (20 mg/ml) 及 20 μl mutanolysin (50 $\mu\text{g/ml}$)，混合均勻後於 37°C shaker 作用 1 h。再加入 800 μl 10% SDS (使最終濃度變成 4% SDS)，輕輕混合後置於 4°C 中放置整夜。然後加入 1.5 ml solution III (5M Potassium acetate, Glacial acetic acid)，置於冰上 10 分鐘。以 Beckman 超高速離心機在 4°C 下 12,000 rpm 離心

20 分鐘使染色體 SDS/NaCl 完全沉澱。上清液加入 RNase 100 µg/ml，在 37°C 下作用 30 分鐘。接著以 0.6 倍 isopropanol 混合後靜置 1-2 h 來沉澱 DNA，在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 30 分鐘。以 70 % 酒精 1 ml 漂洗，經 12,000 rpm、4°C 離心 20 分鐘。使真空抽乾後溶解 DNA 於 1× TE 300 µl。

【2】 Isolation of *Staphylococcus aureus* plasmid DNA³²

菌株養在 15 ml LB (Yeast Extract, NaCl, Tryptone) 中 37°C 培養整夜。菌液以 3,500 rpm 離心 10 分鐘。倒掉上層菌液，以 1 ml 無菌水懸浮後放至 1.5 ml eppendorf 中。再以 microcentrifuge 離心 12,000 rpm 1 分鐘。沉澱物以 100 µl 50 mM Tris HCl-10 mM EDTA (pH 8.0) 懸浮後加入 50 µl lytic enzyme mixture (lysozyme 50 mg/ml, mutanolysin 200 U/ml, lysostaphin 0.3 mg/ml)，37°C 下搖盪作用 2 h。然後加入 200 µl 50 mM Tris HCl-10 mM EDTA (pH 8.0) 及 300 µl 0.2 N NaOH-1% SDS，立即上下顛倒混合，置於室溫作用 10 分鐘。加入 300 µl 3 M potassium acetate，立即上下顛倒混合後置於冰上作用 15 分鐘。離心 12,000 rpm 15 分鐘後取出上清液，分別以 650 µl phenol/chloroform (1:1, vol/vol) 及 chloroform 萃取。上清液以 isopropanol 沉澱 DNA，再離心 12,000 rpm 15 分鐘。以 70% 酒精 500 µl 漂洗，經 12,000 rpm 離心，真空抽乾後溶解 DNA 於 30 µl 無菌水中。

【3】 Isolation of *E. coli* plasmid DNA³³

採 Ish-Horowicz 和 Burke 之方法略加修改。取 5 ml 隔夜培養之菌液置於離心管中，離心 12,000 rpm 30 秒，倒去上清液，加入 solution I (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM glucose) 100 µl，用震盪器震勻，再加入 solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 µl，上下顛倒輕輕搖勻後，再加入 solution III 150 µl，上下顛倒搖勻，置於冰上 5 分鐘。離心 12,000 rpm 5 分鐘吸取上清液置入新的離心管中，然後以等體積 phenol:chloroform (1:1) 萃取一次 [12,000 rpm 5 分鐘]，取上層加入兩倍體積 95% 酒精沉澱 DNA，再以 70% 酒精洗過，真空抽乾後，溶於含有 RNase A (20 µg/ml) 的 TE buffer。

Restriction endonuclease digestion

將質體 DNA、十分之一體積的 buffer 及 1 unit 的酵素於 eppendorf 中混合，在適當溫度下作用 1-2 h。*Hind* III 作用於 37°C 水浴 1-1.5 h。

Curing experiments¹

菌株 A15 養在 5 ml TSBY 中，不同 TSBY 內分別含濃度 0、0.12、0.24、0.48、0.96 及 1.92 $\mu\text{g/ml}$ 的 novobiocin 於 37°C 下培養 18 h。隔天將 500 μl 的菌液養在新的 5 ml TSBY 培養液，培養液中亦含不同濃度的 novobiocin，於 37°C 下培養 18 h。如此連續三次培養。之後選擇含 0.24 $\mu\text{g/ml}$ novobiocin 濃度的菌液 100 μl ，以無菌水稀釋至 5000 倍。取 700 μl 塗於含 30 $\mu\text{g/ml}$ 紅黴素的 Todd-Hewitt (TH) 培養基（含 1.6% agar）及 blood agar plate（不含紅黴素）上篩選，並置於 37°C 下培養之。

Agarose gel electrophoresis

將 agarose 粉末和 0.5X TBE buffer（Tris Base，Boric Acid， $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）混合後，以微波方式使之溶解。待 agarose gel 溫度稍低時，將之倒至專用器皿中製作成 1% 的 gel。將樣品分別注入樣品槽中，以 0.5X TBE buffer 覆蓋 gel 並在 80 voltage 下跑 4 h。將 gel 放至含十分之一 ethidium-bromide (10 mg/ml) 的無菌水中染色數分鐘，以 UV 燈照射並觀察之。Marker 使用 λ /Hind III (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$)。

Electroporation

【1】Electroporation of streptococci^{1, 7, 8}

以 A15 的質體 (pA15) 分別送入以下四種菌株當作接受者：(1) 無質體存在的 A 群鏈球菌 No.20；(2) A 群鏈球菌 No.15 經由 novobiocin curing 後的菌株[稱之為 A148]；(3) 無質體存在的 B 群鏈球菌 No.83；(4) 無質體存在的 C 群鏈球菌 No.7。菌株養在 5 ml TSBY 中以 37°C 培養整夜，再將菌液 400 μl 移至新的 20 ml TSBY 以 37°C 培養 3 h。培養至菌液濃度於 560 nm 下的 O.D. 值為 0.25 (約 4×10^8 cfu/ml)。菌液以高速離心機 3,500 rpm、4°C 下離心 15 分鐘，倒掉上層菌液後之步驟皆在冰上操作。將沉澱物用 1 ml 冰的 0.5 M sucrose 懸浮之，移至 eppendorf 中。4°C 下 12,000 rpm 離心 2 分鐘，倒掉上清液後再以 1 ml 冰的 0.5 M sucrose 漂洗兩次。加入 100 μl 冰的 0.5 M sucrose 混合均勻置於冰上。將 40 μl 新鮮菌和 4 μl 質體 DNA (pA15) 混合，移至冰的 1 mm Gene Pulser cuvette 內。使用 ELECTROCELL MANIPULATOR ECM® 600 來作 electroporation，

施以 1.36 kV 的電壓約 3-6 ms。接著盡快加入 1 ml TSBY 放入 37°C shaker 中培養 2 h。之後取 500 μ l 菌液塗抹於含紅黴素 30 μ g/ml 的 TH 培養基，並置於 37°C 培養及篩選之。

【2】Electroporation of *E. coli*⁸

DH5 α 接種於 15 ml LB 中，37°C 下培養至菌液濃度於 600 nm 的 O.D. 值為 0.5-1.0 (約 10⁸ cell/ml 菌量)，4°C 下 4,000 rpm 離心 15 分鐘，倒掉上層菌液後之步驟皆在冰上操作。將沉澱物以 0.5 倍的冰無菌水懸浮之，離心 4,000 rpm 4°C 下 15 分鐘，此步驟再重覆一次。再次懸浮於 0.02 倍冰無菌水中，離心 4,000 rpm 4°C 下 15 分鐘。最後加入 0.002-0.003 倍冰無菌水中混合均勻。將 40 μ l 新鮮菌和 4 μ l 質體 DNA (pA15) 混合，移至冰的 2 mm Gene Pulser cuvette 內。使用 ELECTROCELL MANIPULATOR ECM® 600 來作 electroporation，施以 1.25 kV 的電壓約 5-6 ms。接著盡快加入 960 μ l SOC (2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄·7H₂O, 20 mM glucose, LB) 放入 37°C shaker 中培養 1 h (搖速不低於 225 rpm)。之後取 100 μ l 菌液塗抹於含紅黴素 30 μ g/ml 的 LB 培養基，並置於 37°C 培養及篩選之。

Polymerase Chain Reaction³⁰

以 A15 質體 DNA 作為母股，加入 10 pmol/ μ l 引子、2.5 mM dNTP、10X Taq buffer、1 unit Taq polymerase (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT) 作用於 94°C 1 分鐘，37°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，4 個循環，然後 94°C 1 分鐘，60°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，35 個循環，最後保持在 4°C。

Southern blotting hybridization

【1】探針的製備

依據 Taylor 的 random oligonucleotides primers 的原理製備探針，但操作步驟則依照 Amersham 的操作手冊進行。首先取欲標定的 DNA (pA15 經 *erm B* 引子放大之 PCR 產物) 稀釋至 25 μ g/ml 的濃度，取 10 μ l 的 DNA 置於 95-100°C 作用 10 分鐘，使其變性。再依序加入 10 μ l Labeling buffer (0.25 M Tris-HCl, pH 8.1; 10 mM DTT, 25 mM MgCl₂, 0.2 M KCl)，5 μ l 引子 (20 ng/ml)，5 μ l α -³²P

dCTP (3000 Ci/mmol ; 50 μ Ci) 及 2 μ l klenow fragment (5 units) , 並置於 37°C 反應 1 小時後存於 -20°C 備用。

【2】 Southern blotting and hybridization

2-1. 轉印

此步驟是依 PosiBlot Pressure Blotter & Pressure Control Station (Stratagene) 所附之步驟來進行。將經過電泳之洋菜膠取下置於塑膠盆中。倒入 0.25 N HCl 浸泡 30 分鐘, 使 DNA 的 purine base 去掉 (depurination), 並使 DNA 產生缺口。再移往另一盆中浸泡 0.5 N NaOH/1.5 M NaCl 混合液 45 分鐘, 讓 DNA 雙股分離。最後移往 0.1 M Tris pH 7.5/1.5 M NaCl 混合液 45 分鐘以中和 NaOH。另外剪下一張與膠體同大之 nylon membrane (Amersham) 及 Whatman 3 MM 濾紙, 浸於 10X SSC (NaCl, Sodium Citrate, dd H₂O, pH 7.0) 中約 15 分鐘。再將膠體、濾紙、membrane 及儀器零組件依操作手冊附圖組合並打開壓力幫浦 1 小時, DNA 自膠體移轉至 membrane 上。再以 Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker (Spectronics Corporation) 進行 cross linking, 將 DNA 固定在 membrane 上進行雜交作用。

2-2. 前雜交作用 (Prehybridization)

首先配置 20 ml 的 prehybridization buffer (5X Denhart's solution, 5X SSPE, 0.1% SDS, 200 μ g/ml herring sperm DNA), 再將固定好的 membrane、prehybridization solution 放入 hybrid tube 於 68°C 進行 prehybridization 約 2 小時。

2-3. 雜交作用 (Hybridization)

將配置好的探針置於 95-100°C 10 分鐘, 然後加入 5 μ l DNA 探針至 hybrid tube 進行 hybridization 反應 (68°C, 6-12 小時)。雜交完畢後, 依次以不同濃度的溶液清洗: ① 50 ml 的 solution I (2X SSC, 0.05% SDS) 於室溫洗滌 2-3 次, 每次 15 分鐘。② 50 ml 的 solution II (0.1X SSC, 0.1% SDS) 於 50°C 洗滌 30 分鐘。之後, 將 membrane 取出, 滴去多餘水份, 以保鮮膜覆蓋, 置於含 intensifying screen 的壓片夾中, 以 X-ray film 於 -70°C 感光呈像。

結果與討論

I. Curing experiments

一般 A 群鏈球菌 MLS 抗藥性基因多存在於質體，為了証實我們菌株的紅黴素抗藥基因是位在質體上，以抑制核酸合成的 novobiocin 來 curing 質體。未經處理前的菌株 A15，其紅黴素最小抑菌濃度值大於 256 $\mu\text{g/ml}$ 。經由 novobiocin curing 質體後的菌株 A148，其紅黴素最小抑菌濃度值變為 0.032 $\mu\text{g/ml}$ 。明顯可見，經 novobiocin curing 處理後，將會使菌株由對紅黴素具抗藥性（最小抑菌濃度值 $> 256 \mu\text{g/ml}$ ）降為敏感性（最小抑菌濃度值 $= 0.032 \mu\text{g/ml}$ ）。因此推論菌株 A15 的紅黴素抗藥基因是位於質體上。

II. Plasmid isolation and electroporetic transfer of a streptococcal erythromycin resistance plasmid

將含紅黴素抗藥基因的質體 pA15 用 electrotransformation 的方式分別送入不同的鏈球菌 A148、A20、B83、C7 四株中（表 1），由含 30 $\mu\text{g/ml}$ 紅黴素的 TH 培養基來篩選之。篩選到具紅黴素抗藥性的菌株分別稱之為 A148E2、A20E7、B83E2、C7E4。確定這些 electroporation 後的菌株可以在含紅黴素（30 $\mu\text{g/ml}$ ）的培養基生長。此外從這些菌株抽出其質體分別以 *Hind* III 分解後與原始質體作一比較。結果發現其型態是相似的（圖 2）。因此此具有高度抗紅黴素特性的 pA15 可能經由 transformation 的方式而轉移至 A 群鏈球菌及其它種鏈球菌，如 B 及 C 群鏈球菌。

由我們實驗室收集到的鏈球菌株發現不少具有高度的紅黴素抗藥特性。以紅黴素最小抑菌濃度值 $> 128 \mu\text{g/ml}$ ，在 113 株 A 群鏈球菌中有 31 株（27.4%）；177 株 B 群鏈球菌中有 30 株（16.9%）；12 株 C 群鏈球菌中有 2 株（16.6%）；11 株 F 群鏈球菌中有 3 株（27.39%）；35 株 G 群鏈球菌中有 1 株（2.8%）。這些具高度抗紅黴素的鏈球菌是否皆具有此質體，仍待進一步研究。在台灣，由於在革蘭氏陽性球菌抗紅黴素的問題極為嚴重，因此我們也嘗試將質體 pA15 依不同的情況（如方法中所述）藉由 electroporation 之方式送入草綠色鏈球菌、金黃色葡萄球菌及肺炎雙球菌，甚至革蘭氏陰性之 *E. coli* (DH5 α) 中。除肺炎雙球菌外，其餘皆可將質體放入。肺炎雙球菌雖有對紅黴素具有抗藥性之菌落生長，卻一直無法抽到質體或抽出的質體型態不同於最初送入之 pA15。所以推

測是否因送入的種族不同，而造成送入的質體被該菌修改過(圖 3)。

III. Drug resistance

為了要了解 pA15 是否具有其它藥物的抗藥基因，我們利用培養基稀釋法來偵測其最小抑菌濃度值，經過 18-42 h 的培養後觀察發現 A15 經過 novobiocin curing 質體後對紅黴素、阿立索黴素及氯黴素的最小抑菌濃度值有下降，亦即此質體具有紅黴素、阿立索黴素及氯黴素的抗藥基因(表 2)。而由 A20 和 A20E7 的菌株來看，送入 pA15 後，四環黴素的最小抑菌濃度值由原來菌株 A20 的小於 3.25 $\mu\text{g/ml}$ 提升為 40 $\mu\text{g/ml}$ ，因此可看出 pA15 上亦具有四環黴素的抗藥基因。以 A15 及 A148 菌株而言，curing 質體後的 A148 與原來的 A15 之最小抑菌濃度值相差不多，此結果暗示著有可能在 A15 的染色體上同時具有四環黴素的抗藥基因存在；其它如 B83、C7 亦可能與 A15 相同的情況，同時在質體及染色體上均具有四環黴素的抗藥基因。綜合以上結果推論：可轉移至不同種族的 pA15 具有紅黴素、阿立索黴素、氯黴素及四環黴素的抗藥基因。在不同種族中，與 pA15 同樣具有那四種藥物抗藥性的比率如下：113 株 A 群鏈球菌中有 30 株 (26.5%)；177 株 B 群鏈球菌中有 12 株 (6.7%)；12 株 C 群鏈球菌中有 5 株 (41.6%)；11 株 F 群鏈球菌中有 2 株 (18.1%)；35 株 G 群鏈球菌中有 1 株 (2.8%)。抗藥標準值係依 1998 年 NCCLS 的規範：紅黴素 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ ；阿立索黴素 $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ；氯黴素 $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ；四環黴素 $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ 視為具有抗藥性。

IV. Classification of resistance

紅黴素抗藥性可以分為三種：誘導型 (Inducible Resistance, IR)、持續型 (Constitutive Resistance, CR) 及新型 (Novel Resistance, NR)。IR 是屬於在紅黴素存在的情況下，刻令達黴素會被誘導而造成抗藥性並使 double disks 中的刻令達黴素藥錠呈現『D』型抑制環。CR 是屬於對紅黴素和刻令達黴素都有抗藥性，刻令達黴素藥錠並不會因紅黴素的存在而有『D』型抑制環出現。NR 是屬於對紅黴素有抗藥性，但對刻令達黴素為敏感性。此實驗所選用的 A15 為 CR，即對紅黴素及刻令達黴素都具有抗藥性。而就我們實驗室收集之具紅黴素抗藥性 [最小抑菌濃度 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$] A 群鏈球菌株依此方法所做的分型如表 3。

V. Restriction enzyme analysis

Strain A15 的質體 (pA15) 經限制酶每 *Hind* III 分解後，可於 0.8% (或 1%) gel 上看到 5 個片段 (如圖 2)。其片段大小分別為 8190、3417、2153、1860 及 1093 bp。因此，pA15 的質體大小可能為 16.7 kb。

VI. Physical mapping¹⁶

採用 double digest 之方式，經各種酵素處理後電泳片上之片段來兜出此質體 (pA15) 之 restriction map。由於試了多種質體純化方法仍無法完全或將染色體之干擾減至最低，故判讀上產生不確定的情況，無法確定出現的片段是否參雜了染色體被分解後之片段。因此 mapping 尚待覓得更有效之純化方法後再進一步探討。

VII. Polymerase Chain Reaction

為了解質體 pA15 之紅黴素抗藥機制是否和先前發表的鏈球菌所屬之紅黴素抗藥基因 (*erm*) 相同，以 A15 抽出之質體為模版，利用 Joyce et al 所發表的 *erm B* 序列為引子 (表 5)，進行 PCR 反應³⁴。結果發現 A15 不僅在質體，且在染色體都有增幅到 *erm B* 基因之產物 (圖 4)。由此得知 A15 之紅黴素抗藥機制歸屬於 *erm B* 類。此外，鏈球菌目前已發現有甲基化及 active efflux 之抗藥機轉，但也有可能具有其它種抗藥機制。為證實此假設，故針對 A、B 及 C 群鏈球菌之菌株，以 *erm B* 及 *mef* (active efflux 機制所具之基因序列) 為引子，經 PCR 結果觀察這些菌株中不同機轉所佔的比率 (表 4)。除了甲基化及 active efflux 之外，亦有不屬於這兩類者，雖然這些菌株之紅黴素抗藥性並非相當高，但仍無法排除鏈球菌尚有其它抗紅黴素機轉之可能性。

VIII. Southern blotting hybridization

質體 pA15 為甲基化的抗藥機轉，因此想藉由南方墨漬雜配進一步得知其紅黴素抗藥基因位於質體何處。首先將 pA15 的質體以 *Hind* III 處理後跑電泳，再依材料與方法中所述進行轉移及雜交作用，以 pA15 經甲基化基因增幅後之產物為探針。結果顯示 A15 具甲基化的抗藥基因位於質體 1093 bp 片段(經 *Hind* III 處理後)。接下來可利用酵素將此一片段切下，接至載體上以進一步得

知該抗藥基因之序列，提供未來發展抑制此類具紅黴素抗藥性菌株之相關資訊。

IX. Conclusion

一般紅黴素抗藥基因 (*erm*)可粗分為八類 (Table. 6⁹)，亦可細分如 Table. 7。對於質體是否具 *erm* 基因，即機制是否為 target site modification 的確定可由幾種 *erm* 基因共有的兩段 conserved regions 為引子經 polymerase chain reaction (PCR)後的結果來判別¹¹。亦有報告指出，誘導(IR)及持續型(CR)的菌株可藉由 PCR 的方式偵測到 *erm* 基因，卻無法適用於新型(NR) 菌株¹³。也就是說誘導及持續型菌株為 target site modification 的機轉，新型菌株則為非 target site modification 的不確定機轉所控制¹³。至於此次選用的 A15，知道其為持續型抗藥性，進一步用 PCR 及南方墨漬雜配的方法確定其屬於 *erm B* 類，也就是 target site modification 機制。同時，從收集之菌株的 PCR 結果亦發現，我們的新型菌株多具 *mef* 基因，即 active efflux 機制。雖質體純化的問題尚無完善的解決之道而暫時無突破性的發展，但根據南方墨漬雜配的結果，也可進一步找出抗藥基因之序列，建立此種菌株的部份基因庫。就已發表的質體大小及抗藥種類 (Table. 8)來看，尚未發現如 pA15 同樣具巨環型抗生素、四環黴素及氣黴素抗藥基因與大小相仿的質體被發表，因此這有可能是一值得探討的質體，可朝其 restriction maps 及基因序列的方向深入研究。除此之外，我們針對三種族群的鏈球菌經由二種引子做的 PCR 結果來看，不僅有已知的 target site modification (*erm B* 基因)或 active efflux (*mef* 基因)機制，還可發現不歸屬於這兩類者，極有可能鏈球菌尚有其它抗藥機制存在，例如在其它屬常見卻未發現於鏈球菌的 inactivation 機制，因此可考慮採用跳躍子來篩選這些可能的菌株，亦不失為一未來的發展方向。同時亦嘗試是否能將來自革蘭氏陽性鏈球菌的質體 (pA15) 送至革蘭氏陰性的 *E. coli* (如 DH5 α)中，不過卻無法由送入的質體來確認其可信度，因為抽出的質體並未如預期的有類似 pA15 的型態；亦可試著將 pA15 送至機轉尚不明瞭的 NR 菌株，觀察 pA15 的送入能否讓 NR 菌株的刻令達黴素由敏感性變成抗藥性菌株。這些都是需要深入探討的。若帶有 *erm* 基因的質體也能被發現具有能運作的 replicons，對於在鏈球菌的轉移將會是個有用的載體。甚至可朝紅黴素抗藥性之新的可能抗藥機制發展，加以証實在鏈球菌確實有第三種型的紅黴素抗藥機制存在。

結論與建議

收集自嘉南地區 144 株具有抗紅黴素能力之 A、B、C、F、G 群及草綠色鏈球菌依 double disks 方法可將抗紅黴素機轉分為三種表現型: 61% 是持續型; 2% 是誘導型; 37% 是新型。在持續型的菌株中, A 群鏈球菌有一株, A15, 具有高度紅黴素抗藥性 ($MIC > 256 \mu\text{g/ml}$)。利用 A15 之質體 (pA15) 進行特性分析時, 發現此質體不僅可傳送至其它同群鏈球菌, 而且也可傳送至 B、C、F 和 G 群鏈球菌。質體, pA15, 同時具紅黴素、阿立索黴素、四環黴素、氯黴素之多種抗藥性。藉 PCR 技術及南方墨漬法可知 pA15 所增幅之 *erm B* 基因屬於甲基化的抗藥機制, 由此吾人推斷嘉南地區抗紅黴素 A 群鏈球菌病例之增加, 可能大多數與菌株甲基化後所造成高度抗藥性菌株有關。除此之外, 利用已知抗紅黴素基因的 PCR 篩選發現在我們所收集之鏈球菌株, 有些並不能被偵測出, 此結果暗示著我們的菌株中可能存在著其他未經發現的抗紅黴素機制。

因此, 有鑑於國內濫用抗生素(如紅黴素), 近年來抗藥菌株的發現率驟增。且帶有抗藥基因的質體若可以經由菌株與菌株間傳遞, 將造成愈來愈多的抗藥菌株產生。如此一來, 不僅增加臨床醫師治療這些新種菌株的難度, 亦會花費更多的醫療費用。所以, 應建議衛生單位加強管控抗生素的使用。

- ¹ Claes S, Daniel G, Sten S. Characterization of an erythromycin resistance (*erm*) plasmid in *Streptococcus pyogenes*. APMIS 1995, 103:59-68.
- ² Roland L, Patrice C. Intrinsic and unusual resistance to macrolide、lincosamide、streptogramin antibiotics in bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1991, 35:1273-1276.
- ³ Koro F, Koichi M, Teiko M. Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan. Pediatr Infect Dis 1994, 13:1075-1078.
- ⁴ Neil S, Graham RJ, Michael T, David BM. The emergence of erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Fremantle、Western Australia. Med J Aust 1989, 150:626-631.
- ⁵ Bernard Weisblum. Inducible resistance to macrolides、lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity - A review. J Antimicrob Chemother Suppl A 1985, :63-90.
- ⁶ R.JD. Scott, J. Naidoo, R.C. George. A community outbreak of group A beta haemolytic streptococci with transferable resistance to erythromycin. Epidem Inf 1989, 102:85-91.
- ⁷ Daniel S, Joseph JF. Electrotransformation of *Streptococcus pyogenes* with plasmid and liner DNA. FEMS Microbiol Lett 1991, 82:219-224.
- ⁸ Electrocell Manipulator ECM600 Electroporation System Operation Manual.
- ⁹ Roland L, Patrice C. Minireviews - Bacterial resistance to macrolide、lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob Agents Chemother 1991, 35:1267-1272.
- ¹⁰ Bernard W. Minireview - erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother 1995, 39:577-585.

¹¹ Michel A, Catherine M, Claude M, Patrice C. Detection of erythromycin resistance by the polymerase chain reaction using primers in conserved regions of *erm* rRNA methylase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1990, 34:2024-2026.

¹² Ping Z, Steven DP, Rohinton PE, Karl AW, Thomas FH, Annapur GS, Leonard K. Substrate requirements for *erm* C methyltransferase activity. *J Bacteriol* 1995, 177: 4327-4332.

¹³ Helena S, Antti N, Quan Yu, Pentti H. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother* 1993, 32:885-891.

¹⁴ Jeanettel LR, David AO, Francis LM. Complete nucleotide sequence and transcription of *ermF*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 1986 168:523-533.

¹⁵ H. Westh, D.M. Hougaard, J. Vuust, V.T. Rosdahl. Prevalence of *erm* gene classes in erythromycin resistance *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39:369-373.

¹⁶ Werner R, Horst M. Sequence relationships between plasmids associated with conventional MLS resistance and zonal lincomycin resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Gen Genet* 1982 187:310-315.

¹⁷ Tobian JA, Macrina FL. Helper plasmids cloning in *Streptococcus sanguis*: cloning of a tetracycline resistance determinant from the *Streptococcus mutans* chromosome. *J Bacteriol* 1982, 152:215-222.

¹⁸ Michel A, Patrice C. Contribution of two different mechanisms to erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986, 30:694-700.

¹⁹ J.I. Ross, E.A. Eady, J.H. Cove, W.J. Cunliffe, S. Baumberg, J.C. Wootton. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 1990, 4:1207-1214.

-
- ²⁰ Gerald WT, John BL, Lynette M, Hugh C, Soren TA, Andrew AM, Todd RK. Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (*erm* GT) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. *Plasmid* 1994, 31:60-71.
- ²¹ Jean CS, Gerard B, Jacques L. Involvement of a *Spiroplasma citri* plasmid in the erythromycin-resistance transfer. *Plasmid* 1989, 22:151-159.
- ²² Antoine A, Guy G, Patrice C. Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986, 29:515-518.
- ²³ Louis BR, Lenore LC, Steven HM. Tn 5384, a composite enterococcal mobile element conferring resistance to erythromycin and gentamicin whose ends are directly repeated copies of IS 256. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1147-1153, 1995.
- ²⁴ Annie, B.H., Chantal, L.B., and Thea, H.: Genetic basis of antibiotic resistance in *Aerococcus viridans* . *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:529-534, 1989.
- ²⁵ Jacques, T., Roland, L., and Jean, D.: Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:789-792, 1993.
- ²⁶ Nadja, B.S., Colin, G., Jeffrey, F.G., and Abigail, A.S.: Tn 4351 transposes in *Bacteroides* spp. and mediates the integration of plasmid R751 into the *Bacteroides* chromosome. *J Bacteriol* 1986, 165:929-936.
- ²⁷ Marilyn CR, Rebecca BL, Ann B, Fritz DS, Marie BC. Characterization of antibiotic-resistance *Corynebacterium striatum* strains. *J Antimicrob Chemother* 1992, 30:463-474.
- ²⁸ Tauch A, Kassing F, Kalinowski J, Puhler A. The erythromycin resistance gene of the *Corynebacterium xerosis* R-plasmid pTP10 also carrying chloramphenicol, kanamycin and tetracycline resistance is capable of transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* 1995, 33:168-179.
- ²⁹ Joyce S, Amelia TK, Lillian W. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistance to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40:1817-1824.

³⁰ Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.

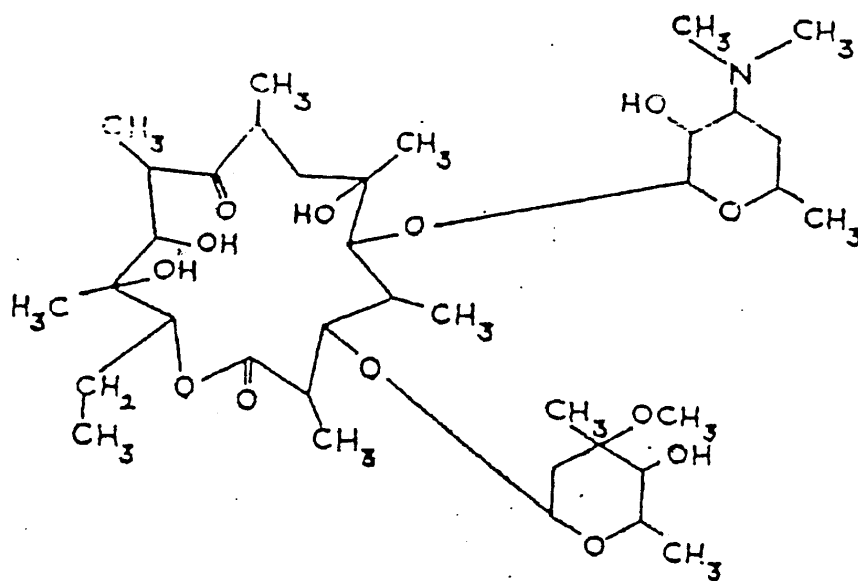
³¹ A. JM. Vriesema, S. AJ. Zaat, J. Dankert. A simple procedure for isolation of cloning vectors and endogenous plasmids from viridans group streptococci and *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol 1996, 62:3527-3529.

³² Ish HD, Burke JF. Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res 1981, 9:2989-2998.

³³ Taylor JM, Illmensee R, Summers J. Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. Biochim Biophys Acta 1976, 442:324-328.

³⁴ Joyce S, Thorsten G, Amelia TK, Lillian W. Detection of Erythromycin-Resistance Determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother 1996, 40:2562-2566.

圖 1 Structure of erythromycin.



2 Agarose gel electrophoresis of plasmids isolated from streptococci strains and erythromycin resistance plasmids digest with *Hind* III. Lanes A-K ; A: maker λ /*Hind* III ; B: pA15 from GAS No.15 ; C: pA15 digest with *Hind* III ; D: pA148E2 from strain A148E2 ; E: pA148E2 digest with *Hind* III ; F: pA20E7 from strain A20E7 ; G: pA20E7 digest with *Hind* III ; H: pB83E2 from strain B83E2 ; I: pB83E2 digest with *Hind* III ; J: pC7E4 from strain C7E4 ; k: pC7E4 digest with *Hind* III.

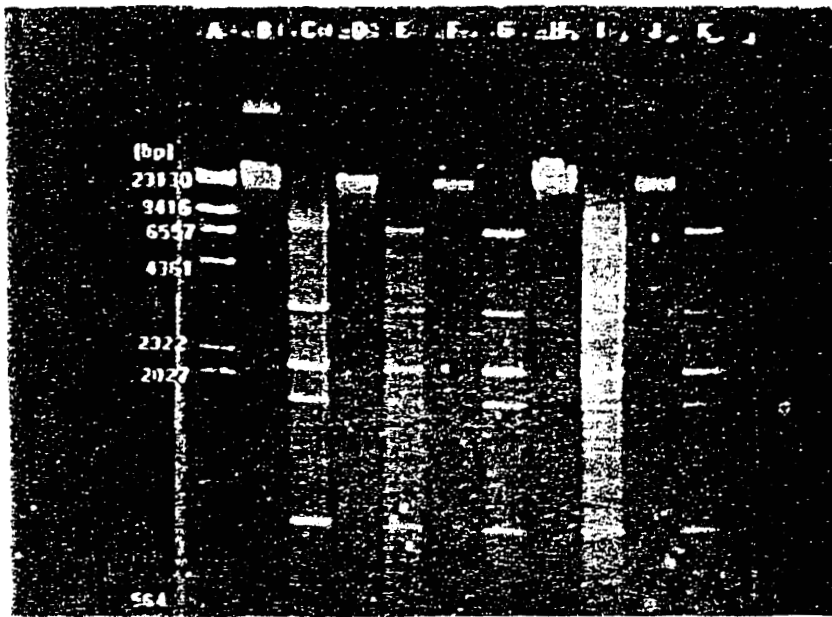


圖 3 Agarose gel electrophoresis of plasmids isolated from DH5 α and erythromycin resistance plasmids digest with *Hind* III. Lanes 1-9: plasmid isolate from different electroporation colony and digest with *Hind* III ; M: maker λ /*Hind* III ;

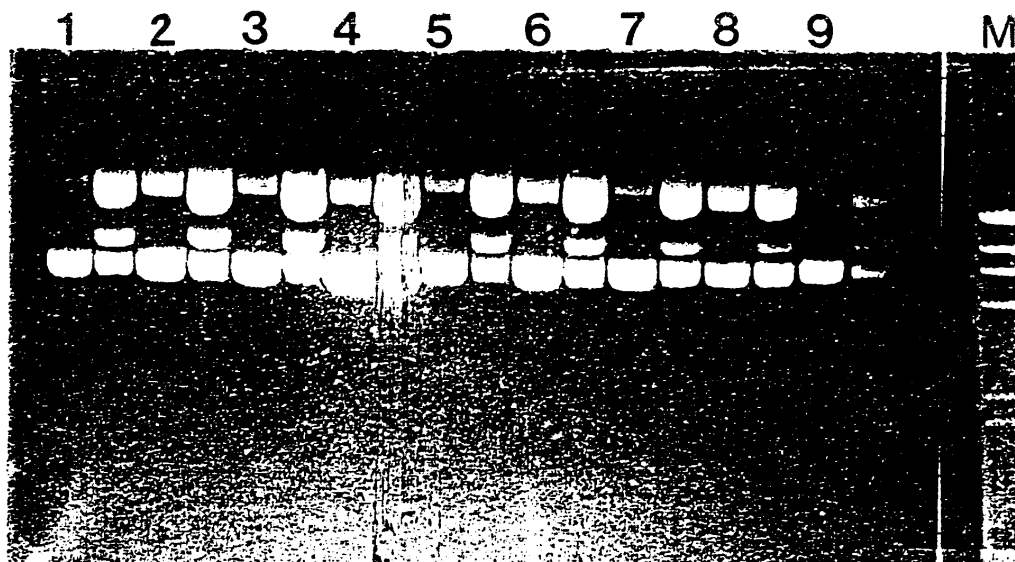


圖 4 Agarose gel (2%) electrophoresis of PCR products with *erm B* primer. Lane M : 100 bp marker ; P15: template DNA is A15 plasmid ; C15: template DNA is A15 chromosome.



表 1 Bacteria strains.

strain	Erythromycin MIC ($\mu\text{g/ml}$)	properties
A15	> 256	group A streptococci No.15
A20	0.047	group A streptococci No.20
A20E7		將 A15 的質體送入 A20 中
A148	0.032	A15 經 novobiocin curing 質體
A148E2		將 A15 的質體送入 A148 中
B83	0.023	group B streptococci No.83
B83E2		將 A15 的質體送入 B83 中
C7	0.125	group C streptococci No.7
C7E4		將 A15 的質體送入 C7 中
DH5 α		內無質體的 competent cell
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 30	*
<i>Viridans streptococcus</i>	< 30	**

* chloramphenicol MIC 值小於 25 $\mu\text{g/ml}$ ，tetracycline MIC 值大於 15 $\mu\text{g/ml}$

** chloramphenicol MIC 值小於 25 $\mu\text{g/ml}$ ，tetracycline MIC 值小於 15 $\mu\text{g/ml}$

表 2. MICs of several antibiotics for erythromycin resistance and susceptible streptococci strains.

strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of antimicrobial agents			
	Erythromycin	Azithromycin	Tetracycline	Chloramphenicol
A15	>256	>128	60	32
A148	0.032	32	60	4
A148E2	>256	>128	60	32
A20	0.047	32	3.25	4
A20E7	>256	>128	60	32
B83	0.023	32	40	4
B83E2	>256	>128	40	32
C7	0.125	32	>60	4
C7E4	>125	>128	>60	32

表 3 Erythromycin-resistance phenotypes for 57 erythromycin resistance *S. pyogenes* isolates.

Number (%) of phenotype			
NR	IR	CR	Total
16 (28%)	1 (2%)	40 (70%)	57 (100%)

表 4 Distribution of *erm B* and *mef* genes among streptococci.

group of streptococci	number of strain	number (%) of positive by PCR	
		<i>erm B</i>	<i>mef</i>
GAS	56	32 (57%)	17 (30%)
GBS*	54	3 (6%)	2 (4%)
GCS	10	0	5 (50%)

* : GBS No.30 both *erm B* & *mef* genes positive.

表 5 Detection of erythromycin-resistance determinants by PCR.

Primer	sequences	size
<i>erm B</i>	5' GAAAAGGTACTCAACCAAATA 3' 5' AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC 3'	639 bp
<i>msrA/msrB</i> (<i>mef</i>)	5' GCAAATGGTGTAGGTAAGACA ACT 3' 5' ATCATGTGATGTAAACAAAAT 3'	399 bp

表 6 Classes of *erm* genes.

Gene	Bacterial species	Localization
<i>erm A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tn554
<i>erm AM</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>	pAM77
<i>erm C</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	pE194
<i>erm D</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	Chromosome
<i>erm E</i>	<i>Streptomyces erythreus</i>	Chromosome
<i>erm A'</i>	<i>Arthrobacter sp.</i>	Chromosome
<i>erm F</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	pBF4
<i>erm G</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	Chromosome

表 7 Distribution of *erm* genes in clinically important bacterial species.

Gene	Bacterial species	Reference
<i>erm A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	10
	Coagulase-negative staphylococci	9
<i>erm AM</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>	10
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	9
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	9
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9
<i>erm B</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	10
	<i>Bacillus subtilis</i>	9
	<i>Lactobacillus spp.</i>	9
<i>erm BC</i>	<i>E. coli</i>	10
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	9
<i>erm B-like</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	9
<i>erm C</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	9
	Coagulase-negative staphylococci	9
	<i>E. coli</i> (BM694)	11
<i>erm CD</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	9
<i>erm D</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	9
<i>erm E</i>	<i>Streptococcus erythraeus</i>	9
	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	12
<i>erm F</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	9
	<i>Bacteroides ovatus</i>	9
<i>erm FS</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	9
<i>erm FU</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	9
<i>erm G</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	9
	<i>Bacillus subtilis</i> (BD1146)	11
<i>erm GT</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	9
<i>erm IM</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	9
<i>erm J</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	9
<i>erm K</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	9
<i>erm M</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9

續表 7

Gene	Bacterial species	Reference
<i>erm Q</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	9
<i>erm R</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	9
(<i>erm A'</i> , <i>erm AR</i>)	<i>Arthrobacter sp.</i>	9
<i>erm SF</i>	<i>Streptomyces fradiae</i>	9
<i>erm P</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	9
<i>erm Z</i>	<i>Clostridium difficile</i>	9
	<i>Enterococcus Faecalis</i>	9

表 8 Plasmids and their drug resistance.

Plasmid size	Drug resistance	Bacterial species	Reference
25.5 Kb (17 MD)	erythromycin	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1
17 MD	MLS	<i>Streptococcus pyogenes</i> (pAC-1)	5
4.5 MD	MLS	<i>Streptococcus sanguis</i> (pAM77)	5
6 Kb	erythromycin	<i>Lactococcus lactis</i> (pIL252)	7
26.5 Kb (<i>erp A</i>)	erythromycin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
3.7 Kb (29 MD)	erythromycin	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.4 Kb 、 2.5 Kb 、 3.3 Kb 、 4.2 Kb (<i>erm C</i>)	erythromycin	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
20 MD	MLS	GAS (pEL1)	16
15 MD	lincomycin	GAS (pSM10419)	16
5.0 MD	erythromycin	<i>Streptococcus sanguis</i>	17
9.0 MD 、 9.5 MD 、 9.8 MD	tetracycline	<i>Streptococcus sanguis</i>	17
2.3 Kb (<i>erm M</i>)	MLS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
41 Kb	MLS	<i>Bacteroides fragilis</i>	9
82 Kb	MLS	<i>Bacteroides ovatus</i>	9
15 Kb	MLS	<i>Bacteroides fragilis</i>	14
18.7 Kb	erythromycin	<i>E. coli</i> (BM2573)	18
31.5 Kb (<i>msr A</i>)	MS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19
9.8 Kb	MLS	<i>Lactobacillus reuteri</i>	20
8 Kb	erythromycin	<i>S. citri</i> M4+	21
12.3 Kb	erythromycin	<i>S. citri</i> M4 Er-1	21
25 Kb	erythromycin gentamycin	<i>Enterococcus Faecalis</i>	23
46 Kb	MLS	<i>Pediococcus acidilactici</i>	25
34 Kb (<i>erm AM</i>)	erythromycin vancomycin teicomycin	<i>Enterococcus Faecalis</i> (pIP819)	25
25.5 Kb (<i>erm AM</i>)	MLS	<i>Enterococcus Faecalis</i> (pAMβ1)	25
41 Kb	erythromycin clindamycin	<i>Bacteroides fragilis</i> (Tn4351)	26
9.6 MD (<i>erm CD</i>)	erythromycin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	27

續表 8

Plasmid size	Drug resistance	Bacterial species	Reference
50 Kb	clindamycin erythromycin kanamycin tetracycline	<i>Corynebacterium rerosis</i> (M828)	28
30 Kb (<i>erm B</i>)	chloramphenicol erythromycin chloramphenicol fusidic acid rifampin	<i>Enterococcus Faecalis</i>	24
6 Kb 、 150 Kb	erythromycin chloramphenicol tetracycline ampicillin streptomycin sulfonamide trimethoprim	<i>E. coli</i> (BM2570)	18
61 Kb	ampicillin erythromycin tetracycline chloramphenicol streptomycin gentamycin sulfonamide trimethoprim	<i>E. coli</i> (BM2195)	22