

某醫學中心 *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii* complex 院內菌血症菌株之分子流行病學分析

彭銘業^{1,2} 詹明錦¹ 張峰義^{1,2}

三軍總醫院 ¹感染管制室 ²感染科

摘 要

Acinetobacter calcoaceticus-*Acinetobacter baumannii* complex (簡稱Ac-Ab complex) 為革蘭氏陰性桿菌，造成的感染日益增加，近年來漸漸成為重要的院內致病菌。由於其天然的多重抗藥特性，對其他抗生素極容易產生抗藥性，故逐漸成為院內感染的主要菌株，為瞭解Ac-Ab complex菌株於本院院內血流感染之分子生物流行病學，以建立本院Ac-Ab complex院內血流感染資料庫，作為Ac-Ab complex爆發流行或群聚感染調查工具，而增加對Ac-Ab complex流行病學的研究將有助於防止Ac-Ab complex之擴散，依據美國CDC定義收集2005-2006年院內Ac-Ab complex血流感染菌株進行脈衝電泳分型法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis)，資料顯示所收集49株院內血流Ac-Ab complex感染其分子分型並不相同，也並未有明顯關聯性，由此可見某醫學中心院內血流Ac-Ab complex感染並無群聚情形發生或優勢菌株存在，探討原因應與醫護人員落實執行感染管制措施及抗生素使用管制的執行有關，本院洗手設置的便利性及數量可謂充分，而感控人員持續在職教育及稽核等因素亦有關，在抗生素敏感性試驗方面可以發現Ac-Ab complex院內血流感染對抗生素ampicillin、cephalothin、ceftriaxone、flomoxef皆呈抗藥性，但對ceftazidime、cefepime、gentamicin、amikacin、ciprofloxacin及trimethoprim-sulfamethoxazole之抗藥性大於四成以上，對於用來治療院內感染Ac-Ab complex最後一線藥物imipenem抗藥性則為6.1%。

關鍵詞：*Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex
院內感染
脈衝電泳分型法 (Pulsed-field gel electrophoresis analysis)
抗生素敏感性試驗
Imipenem

前言

Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex (簡稱Ac-Ab complex) 廣泛存在於各種物體表面及無生命的環境，是種生長條件只需少許營養即可存活的非發酵性革蘭氏陰性球桿菌，此特性使其得以長期存在醫院內乾燥或潮濕的環境中，成為伺機性致病菌^{1,2}，近幾年已成為院內感染的重要病原菌³。Ac-Ab complex可自正常人的皮膚、喉嚨及其他部位分離出來^{4,5}，對於一般健康的人很少引起嚴重感染，但卻容易造成住院病患伺機性的感染，尤以加護中心及免疫不全的病患為最，常引起重症及免疫不全病患嚴重的感染；而住院天數的延長、使用廣效性抗生素及接受化學治療的病患，則有較高的Ac-Ab complex菌移生率⁴。

在臺大醫院2000年的統計研究中發現，在短短的2年間Ac-Ab complex對所有抗生素感受性試驗均呈現抗藥性的比率由0%迅速攀升至6.5%⁶；在1999年7月至9月於紐約布魯克林區醫院收集419株Ac-Ab complex的研究中發現，Ac-Ab complex對於imipenem或meropenem呈現抗藥性比例在所有臨床分離菌中高達53%，而對於全部測試抗生素呈抗藥性比例也達12%，經由核糖體分型 (ribotyping) 顯示高達62%為單一型別而確定多重抗藥性不動桿菌已經造成該地區的流行⁷。

經研究發現Ac-Ab complex在院內感染中混合多種分子型別 (molecular heterogeneity) 的特性⁸，而鑑別菌株分型的方法有很多⁹，確認菌株分型可證實群突發事件，有助於決定治療及隔離的方式，進而阻斷群突發之繼續流行，Ac-Ab complex分子分型方法，有脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)，核糖體基因分型 (ribotyping)、全細胞蛋白分析 (whole cell protein analysis)、質體分析 (plasmid analysis) 等^{8,10,11}，而PFGE分型法近年來已成為Salmonella, Shigella 等多種腸道致病菌的標準分型法，其優越的再現性與敏感性已漸成為許多實驗室主要使用的分型工具。最近國內亦有利用PFGE作為Ac-Ab complex分型工具之研

究成果發表於著名期刊¹²，其分型的效力可作為院內感控的有效佐証工具，藉由各實驗室間所建立之指紋資料庫的相互比對，亦可作為追蹤感染源的科學性証據。

本文之內容主要在探討北部某醫學中心Ac-Ab complex院內菌血症菌株之分子流行病學分析，以了解其院內感染分布情形及流行趨勢。

材料與方法

研究材料

本研究依據該醫學中心專任感染管制護理師依美國疾病管制中心公佈之院內感染定義¹³進行全院性監測，收集2005至2006年符合院內Ac-Ab complex血流感染定義者相關資料並加以統整分析，予以收案並將菌株保留，資料收集包含病患年齡、性別、潛在疾病因素、侵入性醫療措施、感染部位及抗生素敏感試驗結果，Ac-Ab complex菌株之鑑定方式為臨床病人送檢之血瓶經BaT/AlerT機器培養為陽性後，將陽性血瓶取出將瓶內血液混合物接種於Columbia agar with 5%sheep blood、MacConkey agar、Chocolate agar、Anaerobic blood agar培養於35°C隔夜培養，次日挑取菌落製成0.5 McFarland硫酸銨標準液，然後以VITEK 2 system自動化儀器鑑定為Ac-Ab complex後發出報告。

研究方法

一、將收集之院內血流感染Ac-Ab complex菌株，以脈衝式電泳分析法進行分子流行病學分析，方法敘述如下：

1. 細菌之包埋、酵素處理與清洗 (Bacterial Embedding, Enzyme Digesting, and Washing)

依據PFGE標準操作方法進行菌體之包埋、酵素處理及清洗，其過程簡述如下：第一天挑取單一菌落接種於MacConkey培養基於35°C溫箱培養16-18小時；第二天以棉棒刮取菌體，於Cell Suspension Buffer (100 mM Tris-Cl, 100 mM EDTA, pH 8.0)中做成懸浮液，以濁度計 (Turbidity Meter, Dade Microscan™) 測量，調整菌液濃度至0.68 - 0.72 (in Falcon 2054 tubes)，

取400 μ l菌液至1.5 ml微量離心管，加20 μ l proteinase K (20 mg/ml)，混合後加入400 μ l融化後回溫至56°C的1% SeaKem® Gold agarose/1% SDS，快速以微量吸管混均勻後注入模具中，放置於室溫15 min或4°C 5 min使充份凝固，再將膠體自模具中推入5 ml Cell Lysis Buffer (50 mM Tris.Cl; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% Sarcosine; 0.1 mg/ml proteinase K)，置於56°C水浴器振盪2小時；膠體經酵素處理後，加15 ml預熱至56°C的ddH₂O，置水浴器振盪15 min，重覆ddH₂O清洗一次，再以15 ml預熱至56°C的TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) 清洗四次，膠體最後保存於5 ml的TE中，置於4°C冷藏，以供PFGE電泳分析使用。

2. PFGE電泳分析 (PFGE Analysis)

以刀片切取約2-mm寬含chromosome DNA的膠薄片 (slice)，膠薄片先置入200 μ l的指定之限制酶 (ApaI) 緩衝液，室溫下放置5 min，以微量吸管吸出緩衝液，再注入200 μ l含20U限制酶之緩衝液，置於35°C下放置2小時，以微量吸管吸出緩衝液再注入200 μ l的0.5X TBE buffer (89 mM Tris borate, 2 mM EDTA)，放置5 min後，將膠薄片取出，用吸水紙儘量吸乾附著於膠薄片之緩衝液，再將膠薄片依序平貼於孔梳 (coomb) 上，15孔之膠片於第1、5、10、15孔位置，10孔之膠片於第1、5、10孔位置放置以XbaI切割之*S. enterica* serovar Braendrap H9812基因體DNA片斷做為標準量測標織 (reference size markers)，之後將孔梳放置於鑄膠台上，倒入融化回溫至56°C的1% SeaKem® Gold agarose，放置室溫20-30 min，待瓊膠凝固後，即可進行電泳。PFGE電泳使用Bio-Rad CHEF Mapper脈衝式電泳儀 (Bio-Rad Laboratories Inc.)，使用指定之跑膠條件完成跑膠後，膠片以0.5 μ g/ml的ethidium bromide染色15 min，再以ddH₂O退染2 h (過程更換水3-4次)，DNA圖譜影像再以數位影像處理系統AlphaEase™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) 拍照貯存成數位檔案，以供後續比對分析。

3. 脈衝式電泳法圖譜解讀 (Interpretation of PFGE

Patterns)

菌株間任何一DNA片斷的差異皆可能具有流行病學上的意義，菌株PFGE圖譜只要與既有之圖譜存有一DNA片斷的差異，即視為不同的PFGE圖譜，給與PFGE圖譜編號。有關判讀標準與菌株間相關性之綜合判定依Tenover所發表之PFGE判定準則¹⁴判定之。

4. 電腦輔助式電泳帶模式分析 (Banding pattern Analysis and Dendrogram Construction by Computer-aided Method)

脈衝場電泳法產出之電泳帶模式以電腦軟體AlphaEase™ (Applied Math, Kortrijk, Belgium) 數位化後以Tiff檔儲存，電泳帶模式隨後可利用 BioNumerics software (Applied Math, Kortrijk, Belgium) 進行菌株間相似度之分析與比對。以Jaccard-complete linkage法將欲分析菌株群組化 (clustering)，並以樹狀圖 (dendrogram) 呈現。

二、抗生素敏感性試驗

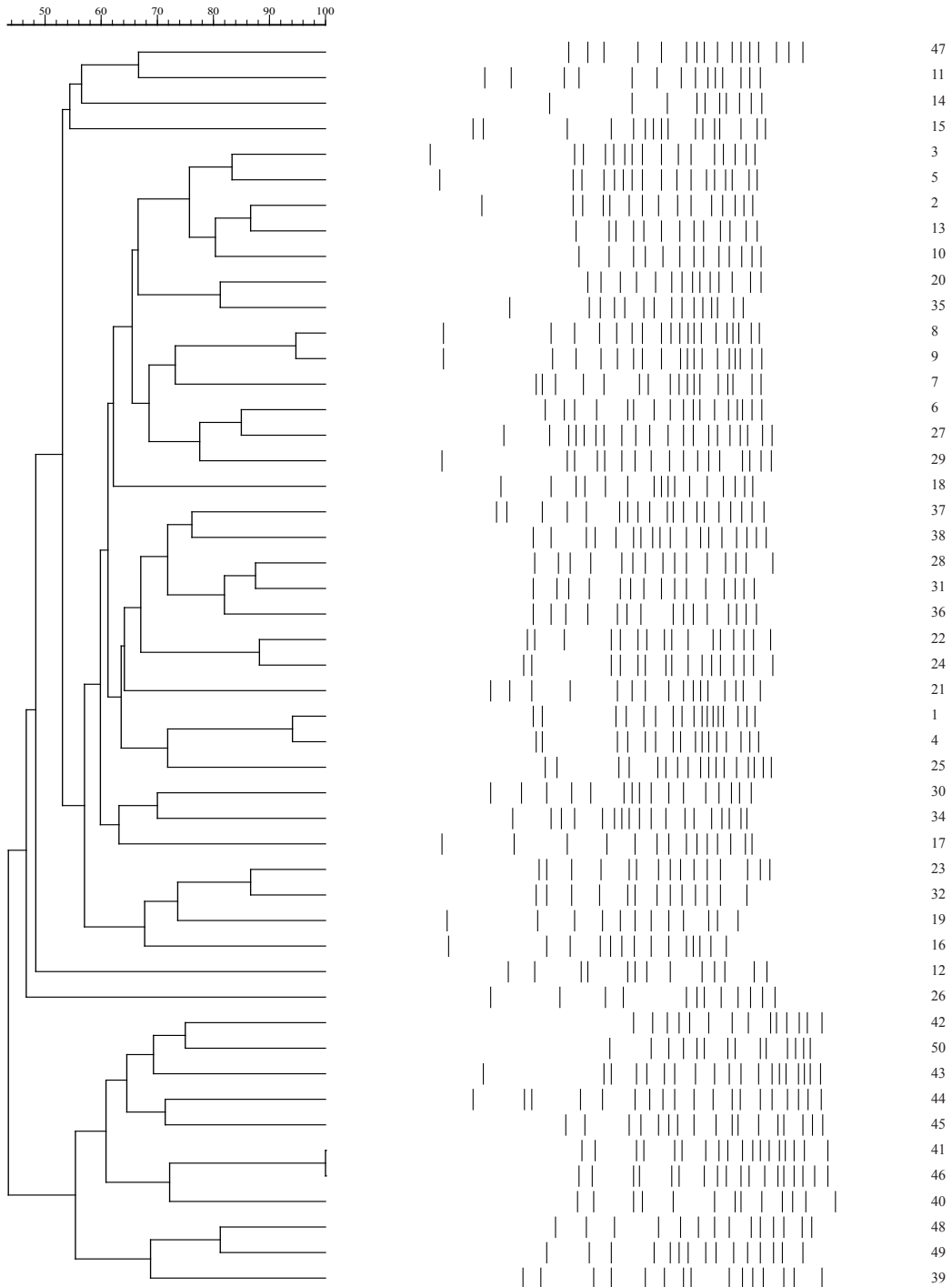
依據美國臨床實驗室標準機構 (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) 之操作指引，以抗生素紙錠擴散法 (disk diffusion) 針對鑑定為Ac-Ab complex操作敏感性試驗，其測試方法簡要說明如下：挑取Ac-Ab complex菌株2-3個菌落，種入含2 mL TSB 之試管，培養在35°C直至渾濁度相當於0.5 McFarland硫酸鋇標準液，平均塗抹在Mueller-Hinton agar 培養基的表面，再分別貼上ampicillin (AM)、cephalothin (CF)、gentamicin (GM)、amikacin (AN)、trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)、ceftazidime (CAZ)、ceftriaxone (CRO)、imipenem (IPM)、ciprofloxacin (CIP)、cefepime (FEP)、flomoxef (FLX) 抗生素紙錠於瓊脂的表面，置於35°C，一般培養箱隔夜培養後判讀，觀察並測量抑制環的直徑大小 (mm)²¹。

結果

本研究共計收集2005至2006年符合院內Ac-Ab complex血流感染定義之菌株共50株，經

表一： *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex院內血流感染統計表 (n=49)

性別		年齡		病房別	
男性	女性	<65	≥65	一般病房	加護病房
35	14	24	25	38	11



圖一： *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex院內血流感染菌株脈衝電泳 (PFGE) 分析圖

表二： *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex 院內血流感染抗生素感受性統計表

	AM	CF	GM	AN	SXT	CAZ	FLX	CRO	IPM	CIP	FEP
抗生素感受性% (N=49)	0.0	0.0	57.1	67.3	49.0	65.3	2.0	4.3	93.9	61.2	59.2

ampicillin(AM)、cephalothin(CF)、gentamicin(GM)、amikacin(AN)、trimethoprim-sulfamethoxazole(SXT)、ceftazidime(CAZ)、ceftriaxone(CRO)、imipenem(IPM)、flomoxef(FLX)、ciprofloxacin(CIP)、cefepime(FEP)

進一步實驗分析時發現編號第33號菌株有雜菌汙染故予以剔除，其餘49株細菌之病人性別、年齡與住院病房分布（如表一）；以PFGE進行分析所得結果（如圖一），資料顯示所收集49株院內血流Ac-Ab complex感染其分子分型並不相同也並未有明顯關聯性，其中菌株編號41與46在圖譜上可見具有100%相似度，進一步分析抗生素敏感性試驗相同，但是病人分屬不同病房，編號41來自內科加護病房（位於4樓）收集時間為2006年9月19日，編號46來自61病房（位於6樓）收集時間為2006年10月22日，照顧醫護人員也不相同，排除直接關聯性，除此之外，編號8、9及編號1、4雖分別具有90%以上相似度但其抗生素敏感性並不相同，由此可見某醫學中心院內血流Ac-Ab complex感染並無群聚情形發生或優勢菌株存在，雖然病人得到院內血流感染可能與病人本身免疫能力及身上管路等諸多因素有關，醫護人員照顧病人是否嚴格執行感控措施對於減少病人得到院內感染的機會有一定的相關，由此次研究結果推測經由醫護人員而導致院內血流Ac-Ab complex交互感染的機會相對不高，與該院醫護人員照護病人落實執行院內感染管制措施有關聯。

在抗生素敏感試驗方面可以發現 Ac-Ab complex 院內血流感染對抗生素ampicillin、cephalothin、ceftriaxone、flomoxef皆呈抗藥性，但對ceftazidime、cefepime、gentamicin、amikacin、ciprofloxacin及trimethoprim-sulfamethoxazole之抗藥性大於四成以上，對於用來治療院內感染Ac-Ab complex最後一線藥物imipenem抗藥性則為6.1%，如表二。

討論

早期利用Ac-Ab complex是否於44°C生長來

鑑定*Acinetobacter baumannii*，後來發現即使是44°C仍無法分辨*Acinetobacter baumannii*及*Acinetobacter genomic species 13TU*¹⁵，近年來Ac-Ab complex感染已廣泛增加，尤其對於住院病患所造成的威脅日益嚴重，多篇文獻報告Ac-Ab complex易造成加護中心病患伺機性的感染及群突發^{16,17}，文獻報導醫院中常同時存在多種分子型之Ac-Ab complex，都有可能造成院內感染¹⁸，PFGE分型法的優點，即為其單一基因的變異具有解釋的標準¹⁴，PFGE分型法具有四種單一的基因變異，會分別造成PFGE型別的微小（1-3個band）差異，分別為：1.產生限制酶切割位（gain of restriction site）；2.失去限制酶切割位（loss of restriction site）；3.插入一段DNA片段（insertion of a DNA fragment）；與4.刪除一段DNA片段（deletion of a DNA fragment）。此外，PFGE分型法亦有與流行病學資料結合的四種判定準則（The criteria for interpreting PFGE patterns）：1.當此菌株之PFGE型別與群突發菌株（outbreak strain）之PFGE型別完全相同時，則判定為無差異（indistinguishable），而應將此菌株歸為群突發菌株（isolate is part of the outbreak）；2.當此菌株之PFGE型別與群突發菌株（outbreak strain）之PFGE型別相差2-3個bands時，則判定為與群突發菌株極相似（closely related），而應視此菌株極可能為群突發菌株（isolate is probably part of the outbreak）；3.當此菌株之PFGE型別與群突發菌株（outbreak strain）之PFGE型別相差4-6個bands時，則判定為與群突發菌株可能相似（possibly related），而應視此菌株為可能是群突發菌株（isolate is possibly part of the outbreak）；4.當此菌株之PFGE型別與爆發流行菌株（outbreak strain）之PFGE型別相差

6個bands以上時，則判定為與群突發菌株不同（different），而應視此菌株不是群突發菌株（isolate is not part of the outbreak）。因此，基因變異的解釋標準與流行病學結合的判讀準則構成了PFGE分型法被廣泛使用的重要因素。此次研究發現本院Ac-Ab complex對imipenem抗藥性比例僅為6.1%，與Landman等人1999年的調查發現12%Ac-Ab complex對所有測試抗生素感受性試驗均呈現抗藥性¹⁹結果相對要好，推測與本院2004年起即施行一旦發現病患患有Ac-Ab complex對所有測試抗生素感受性試驗均呈現抗藥性的感染或移生時，為避免接觸感染需嚴格執行感染管制措施，病患單獨隔離，並掛上警示牌，提醒醫護人員注意，進入病室前先洗手穿隔離衣，離開病室脫去隔離衣也需確實洗手，而2005年臺北榮總陳孟娟等人亦發表類似之感染管制措施²⁰；除此之外，本院對於二線以上之抗生素開立需經會診感染專科醫師，也大大降低抗生素不適當使用率，減少抗藥性細菌發生，不過臨床上Ac-Ab complex對所有測試抗生素感受性試驗均呈現抗藥性日益增加帶來的治療窘境已值得大家省思及重視。

此次調查發現Ac-Ab complex院內血流感染其基因型並未有集中趨勢亦無優勢菌株存在，雖然病人得到院內血流感染可能與病人本身免疫能力與因素很多，由此次研究結果推測經由醫護人員而導致院內血流Ac-Ab complex交互感染的機會相對不高，探討原因應與醫護人員落實執行感染控制措施及抗生素使用管制的執行有關，而在該院洗手設備設置的便利性及數量可謂充分，除此之外與感控人員持續在職教育及感控措施稽核等因素亦有關係。

誌謝

本研究由三軍總醫院民診研究計畫（計畫編號TSGH-C96-56）經費補助。

參考文獻

1. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-65.

2. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüdén H. Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. J Clin Microbiol 1997; 35: 1394-7.
3. 嚴小燕、彭銘業、楊美紅、陳依雯、張靜美、張峰義。某醫學中心Acinetobacter baumannii院內感染調查。感控雜誌2001; 11: 216-25.
4. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Ch 2003; 47: 1681-8.
5. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant Acinetobacter infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother 2004; 38: 1449-59.
6. Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, et al. Pandrugresistance Acinetobacter baumannii causing nosocomial infection in a university hospital, Taiwan. Emerg Infect Dis 2002; 8: 827-32.
7. Landman D, Quale JM, Mavorqa D, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. Arch Intern Med 2002; 162: 1515-20.
8. 鄭舒倬、莊意芬、朱芳業、彭成立。某醫院加護病房Acinetobacter baumannii群突發調查。感控雜誌2001; 11: 205-15.
9. Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for Acinetobacter baumannii. Res Microbiol 1999; 150: 317-22.
10. Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, et al. Nosocomial Acinetobacter baumannii infections: microbiological and clinical epidemiology. Ann Intern Med 1998; 129: 182-9.
11. Debast SB, Meis J, Melchers WJ, Hoogkamp-Korstanje JA, Voss Aet. Use of interrepeat PCR fingerprinting to investigate an Acinetobacter baumannii outbreak in an intensive care unit. Scand J Infect Dis 1996; 28: 577-81.
12. Kuo LC, Teng LJ, Yu CJ, Ho SW, Hsueh PR. Dissemination of a clone of unusual phenotype of Pandrug-Resistant Acinetobacter baumannii at a University hospital in Taiwan. J Clin Microbiol 2004; 42: 1759-63.
13. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 1988; 16: 128-40.
14. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.
15. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 1199-201.
16. 曾寶慧、蘇玲慧、黃玉成、呂學重、邱月璧。兒科加護病房Acinetobacter baumannii院內血流感染群突發的調查及處理。感控雜誌2002; 12: 1-8。

- 17.張雅雯、湯雅芬、林孟志、蘇玲慧、劉建衛。呼吸加護病房泛抗藥性Acinetobacter baumannii群突發的調查及處理。感控雜誌2005; 15: 1-13。
- 18.Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, et al. Nosocomial Acinetobacter baumannii infections: microbiological and clinical epidemiology. Ann Intern Med 1998; 129: 245-7.
- 19.Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant Acinetobacter species in Brooklyn, New York. Clin Infect Dis 2000; 31: 101-6.
- 20.陳孟娟、張智華、王復德。泛抗藥性Acinetobacter baumannii感染管制措施：台北榮總之建議。感控雜誌2005; 15: 111-6。
21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement (M100-S16), Clinical and Laboratory Standards Institute 2006, Wayne Pa.

A Molecular Epidemiological Analysis on the Nosocomial Bacteremia Strain *Acinetobacter Calcoaceticus-Acinetobacter Baumannii* Complex in A Medical Center

Ming-Yieh Peng^{1,2}, Ming-Chin Chan¹, and Feng-Yee Chang²

¹Infection Control Office,

²Division of Infectious Diseases, Tri-Service General Hospital

Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex (Ac-Ab complex) is a gram-negative bacilli that causes increasing numbers of infections; in recent years it has become an important nosocomial pathogen. Its intrinsic multi-drug resistance makes enables the fast development of resistance against other antibiotics. Therefore, it has gradually become the main strain for nosocomial infections. In order to understand the molecular epidemiology of Ac-Ab complex strain that causes nosocomial bacteremia infection in the selected hospital, an Ac-Ab complex nosocomial haemopoetic infection database was established; the database may be used as reference in investigating the epidemic outbreaks or group infections of Ac-Ab complex. Increased studies on Ac-Ab complex epidemiology will help prevent the prevalence of Ac-Ab complex. Based on the nosocomial definition of CDC (USA), nosocomial Ac-Ab complex hemopoetic infection strains were collected during the period of 2005-2006 for pulsed-field gel electrophoresis analyses (PFGE). Data showed that the 49 Ac-Ab complex strains collected that can cause nosocomial bacteremia infection are different in PFGE patterns, and no significant correlation was detected among them, suggesting that the Ac-Ab complex bacteremia found in the medical center did not result in clustered infection and there was no dominant strain. It is believed that the cause was related to the execution of infection control policies and the antibiotic control. The hand washing facilities in the hospital were convenient and sufficient in quantity; additionally, the continuous education and assessment for infection control were also related to the infection events. On the aspect of antibiotics susceptibility tests, it was found that Ac-Ab complex collected from nosocomial bacteremia infection was resistant to ampicillin, cephalothin, ceftriaxone, and flomoxef; however, the bacterial resistance to ceftazidime, cefepime, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole was greater than 40%. Regarding the last-resort treatment of nosocomial Ac-Ab complex infection, imipenem, the resistance found was 6.1%. (J Intern Med Taiwan 2008; 19: 516-522)