

中國醫藥大學

碩士論文

編號：IEH-1951

多胺化合物對社區感染的甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌之抗菌作用機制研究

Antimicrobial effect of polyamine on
community-onset methicillin-
resistant *Staphylococcus aureus*

所 別：環境醫學研究所

指導教授：吳芳鵞 教授

林振文 教授

學 生：郭富美 Fu-Mei, Kuo

學 號：9665951

中 華 民 國 一 百 年 一 月

中文摘要

金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是院內及社區感染的主要致病菌，然而，金黃色葡萄球菌的抗藥性日益嚴重，特別是甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA)。MRSA 菌株帶有一個可移動的基因片段 Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC*mec*)，SCC*mec* 可區分為五個型別。本研究為探討 SCC*mec* 之型別、PVL 毒性因子、 β -lactam 類抗生素(含 spermine)最低抑菌濃度的測定以及 Bocillin 標示 penicillin-binding proteins(PBPs)。藉由多重聚合酶鏈鎖反應(multiplex polymerase chain reaction)進行毒性因子(PVL 基因)及 SCC*mec* 分型；利用微量瓊脂稀釋法(agar microdilution method)進行抗生素最低抑菌濃度測試以及用 PCR 進行標示 PBPs。結果發現 MRSA 多呈多重抗藥性，spermine 可降低 β -lactam 類抗生素的最低抑菌濃度，SCC*mec* 分型有 36.5%屬於 SCC*mec* IIIA，SCC*mec* II 及 IV 皆佔了 19.2%，佔了 9.6%的有 SCC*mec* III 及 V，PVL 毒性因子約有 9.5%，且 MRSA 及 MSSA 相差不多，在添加 spermine 後最低抑菌濃度未改變的 9 株菌株皆被標示為 PBP2a。

Abstract

Staphylococcus aureus is a major human pathogen that causes both nosocomial and community-onset infections worldwide. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) has a mobile genetic element, Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC*mec*). Up to now, five types of SCC*mec*(SCC*mec* I to V) and several variants have been reported. In this study, we tested Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC*mec*)typing and PVL virulence genes using PCR(multiplex polymerase chain reaction), and the MICs of β -lactam antibiotics(contain spermine) in *Staphylococcus aureus* by agar microdilution method and using Bocillin Labeling of PBPs.

The results showed that most of MRSA strains were multiple drugs resistance. We found that spermine can decrease the MICs of β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. The majority of SCC*mec* type are type IIIA(36.5%), 19.2% are type II and IV, and 9.6% are type III and V. Approximately 9.5% of the strains are with PVL gene, and MRSA is similar to MSSA. We found only 9 strains, for which the MICs of β -lactam antibiotics could not be decreased after adding spermine. They were all labeled as PBP2a.

目 錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目 錄.....	III
表目錄.....	V
圖目錄.....	V
第一章 緒論.....	1
第一節 研究背景.....	1
1、金黃色葡萄球菌.....	1
2、抗生素.....	3
3、polyamines.....	5
第二節 名詞界定.....	6
第三節 研究的重要性.....	8
第四節 研究動機.....	10
第五節 研究目的.....	11
第二章 文獻查證.....	12
第一節 polyamines的相關研究.....	12
第二節 如何抑制抗藥性金黃色葡萄球菌.....	13
第三節 Panton-Valentine Leukocidin(PVL)與MRSA的關聯性.....	14
第四節 MRSA對vancomycin 最低抑菌濃度的判讀標準與近期演變.....	15
第五節 研究架構.....	17
第三章 研究方法.....	19
第一節 研究設計.....	19
第二節 研究材料.....	21
第三節 實驗方法.....	22
1. 臨床檢體細菌資料收集.....	22
2. 比對醫療資訊系統(HIS)的資料.....	22
3. 細菌株確認.....	22
4. 抗生素敏感性試驗(antimicrobial susceptibility testing).....	22
5. 配製抗生素之Mueller-Hinton agar plate.....	23
6. 配製抗生素之Mueller-Hinton agar plate且添加 Spermine.....	23
7. 臨床菌株對抗生素最低抑菌濃度(MIC)的測試.....	24
8. 抽取菌株DNA.....	24
9. 臨床菌株SCCmec typing.....	24
10. 臨床菌株PVL detect.....	25
11. Bocillin Labeling of PBPs分析步驟.....	25
12. 統計與分析.....	26
第四章 研究結果.....	28
第一節 研究資料分析.....	28
1. 細菌庫資料初步統計分析.....	28
2. 醫療資訊系統資料收集與分析.....	28
3. 抗生素敏感性分析.....	29
4. Spermine與pH值對oxacillin的影響.....	30
5. Spermine與pH值對penicillin的影響.....	31

6. Spermine與pH值對ampicillin的影響	32
7. SCCmec typing	33
8. PVL毒性基因的結果	33
9. Bocillin Labeling of PBPs的結果	34
第五章 討論	35
1. 臨床資料分析	35
2. 抗生素抗藥性統計	35
3. SCCmec element與臨床資料的關聯性	36
4. PVL毒性基因與臨床資料的關聯性	37
第六章 結論與建議	38
第一節 結論	38
第二節 研究限制	39
第三節 建議	40
參考文獻	41



表目錄

表一 分類Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)感染定義.....	46
表二 抗生素感受性試驗(antimicrobial susceptibility testing)判讀標準.....	47
表三 SCCmec element分型之多重聚合酶連鎖反應引子一覽表.....	48
表四 細菌庫資料初步收案分類(2007 ~ 2008/06/30).....	49
表五 就診科別及抗藥性分類.....	50
表六 年齡分層及抗藥性分類.....	51
表七 性別及抗藥性分類.....	52
表八 CO-MRSA菌株抗生素感受性分析.....	53
表九 Spermine對oxacillin 的影響.....	54
表十 Spermine與pH值對oxacillin之MIC的比較.....	55
表十一 Spermine對penicillin的影響.....	56
表十二 Spermine與pH值對penicillin 之MIC 的比較.....	57
表十三 Spermine對ampicillin的影響.....	58
表十四 Spermine與pH值對ampicillin之MIC 的比較.....	59
表十五 SCCmec typing的結果.....	60
表十六 PVL毒性基因的結果.....	61
表十七 Bocillin標示與SCCmec typing的結果.....	62

圖目錄

圖一 配製抗生素之 MIC Mueller-Hinton agar plate.....	63
圖二 配製抗生素之 MIC Mueller-Hinton agar plate 且添加 Spermine.....	64
圖三 抗生素敏感性測試.....	65
圖四 CO-MRSA 添加 spermine 後對 oxacillin 的影響.....	66
圖五 CO-MRSA 添加 spermine 後對 penicillin 的影響.....	67
圖六 CO-MRSA 添加 spermine 後對 ampicillin 的影響.....	68
圖七 聚合酶連鎖反應進行金黃色葡萄球菌 SCCmec 分型.....	69
圖八 Bocillin Labeling of PBPs 的結果.....	70

第一章 緒論

第一節 研究背景

1、金黃色葡萄球菌

1 金黃色葡萄球菌的簡介

金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)屬於革蘭氏陽性球菌，無鞭毛，無芽胞，不具耐熱性，但其產生的腸毒素耐熱性佳，普遍存在於自然環境中，亦是定居於人體皮膚表面及上呼吸道黏膜的正常菌叢(normal flora)，但可伺機引起機緣性感染。

2 抗藥性金黃色葡萄球菌的產生

早在1940年，人類就使用penicillin來對抗金黃色葡萄球菌，但使用4年後就發現有些金黃色葡萄球菌可製造一種酵素penicillinase來破壞penicillin，因而對penicillin產生抗藥性。後來人類在1960年研發出一種不會被penicillinase破壞的抗生素methicillin，可用來殺死金黃色葡萄球菌，但methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*（簡稱MRSA）在同年就已經被發現，無論如何這一類藥物還是治療金黃色葡萄球菌感染最重要的抗生素(NHRI communications, 2007)⁽¹⁾。

3 抗藥性金黃色葡萄球菌的流行病學

金黃色葡萄球菌中以對甲氧苄青黴素具抗性之菌(methicillin-resistant *S. aureus*，簡稱MRSA)最被重視，跟歐洲相比較，北歐在5%以下，西歐在25%-50%，東歐為10%-25%，美國院內感染*S. aureus*中MRSA的比率也高至60% (NHRI communications, 2008)⁽²⁴⁾。根據國家衛生研究院「台灣地區抗生素抗藥性之監測計畫」(Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance; TSAR)之研究報告顯示，針對醫

院內感染的金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)裡，大約有 75-80%都是 MRSA，MRSA 占血液分離出的 *S. aureus* 約 50%。

4 抗藥性金黃色葡萄球菌的基因組

MRSA之產生是經金黃色葡萄球菌獲得一移動性的基因片段，稱為 staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)，而對methicillin產生抗性(Katayama Y, 2000)⁽¹⁷⁾。SCC*mec*包含*mec*基因複合體 (*mec* gene complex) 和*ccr*基因複合體 (*ccr* gene complex)。*mec* gene complex跟methicillin抗藥性有關，*ccr* gene complex 跟SCC*mec*基因片段之移動性有關，這兩個gene complex又各有不同型(Hajo G, 2006)⁽¹⁸⁾。*mec*與*ccr*合起來之後會形成很多不同的SCC*mec*類型，到目前為止有六種主型之SCC*mec* (SCC *mec*types I to VI) 及多種亞型 (subtypes) 被認定(NHRI communications, 2008)⁽²⁴⁾，其中最主要為*mecA* 基因(Hajo G, 2006; Jansen WTM, 2006)⁽¹⁸⁻¹⁹⁾。

當細菌與 β -lactams 接觸時，就會促使*mecA* 基因表現，而encode 出 PBP2a，與其他青黴素結合蛋白相較，PBP2a 與青黴素(β -lactam 抗生素)的親和力(affinity)極低，抗生素無法與細菌細胞膜上的transpeptidase 結合，抑制細菌細胞壁的合成而產生抗藥性(Hartman BJ, 1984)⁽²⁰⁾。

2、抗生素

1 抗生素的種類與功能

抗生素是微生物的分泌物，經純化後，可有效地用來抑菌或殺菌，即使在很低的濃度時，亦具有相當的抑菌能力。目前抗生素的種類繁多，依其抑菌的方式，可概分為細胞壁合成抑制劑、細胞膜功能抑制劑、核酸合成抑制劑、蛋白質合成抑制劑四大類。「細胞壁合成抑制劑」是在細胞壁上打洞，使得該處細胞膜因失去保護而破裂，最後因細胞質大量外漏而達到殺菌的目的，利用這個方式抑菌的藥物包括青黴素 (penicillins)、頭孢菌素類(cephalosporins)、萬古黴素(vancomycin)等。

「細胞膜功能抑制劑」如多烯類(polyenes)或多黏桿菌素類((polymyxins) 抗生素則是利用影響菌體細胞膜的通透性，達到抑菌的方式。「核酸合成抑制劑」的代表性藥物有磺胺類 (Sulfonamide)、喹酮類(Quinolones) 及立放平(Rifampin)，它們都是藉由抑制菌體核酸正常代謝而達到殺菌功效的藥物。「蛋白質合成抑制劑」則是選擇性地作用在菌體細胞的核糖體上抑制菌體合成蛋白質，進而殺死菌體，利用這種作用機轉的抗生素有胺基糖草類(aminoglycosides)、四環黴素類 (tetracycline)、綠黴素 (chloromycetin)等。

2 治療金黃色葡萄球菌的抗生素選擇

MRSA可製造一種對 β -lactam類抗生素之親和性都降低的蛋白質，導致MRSA對 β -lactam類抗生素幾乎全具抗性，包含所有青黴素類及頭孢子素類抗生素。同時，大多MRSA菌對非 β -lactam類之抗生素亦具抗藥性，包含 Erythromycin、Tetracycline、Clindamycin、Gentamicin、Ciprofloxacin、Trimethoprim-sulfamethoxazole。近年來日本、美國及其他國家對使用於治療嚴重MRSA感染病患的最後線抗生素萬古黴素 (vancomycin)已出現具有感受性降低(VISA)及具抗藥性的菌(VRSA)。

雖然近年來已有對MRSA的新抗生素被研發出來，但MRSA仍是全球臨床上極受重視的多重抗藥菌。

國衛院「台灣地區抗生素抗藥性之監測計畫」(Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance; TSAR)，依照脈衝電泳法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis; PFGE)分子流行病學研究方法，發現台灣的MRSA主要分為四群(Clones)，稱為A、B、C和D。這四個clones在基因型與表現型都有很明顯的差異；國內最常見的MRSA為Pulsotype A，其SCCmec為III，此菌群對ciprofloxacin、erythromycin、gentamicin、SXT抗藥性幾乎是100%。Pulsotype B和C則被認為是社區型的MRSA。Pulsotype C菌群幾乎全為PVL陽性，但是對ciprofloxacin和SXT全部為敏感性，且對gentamicin也大多呈敏感性。由此可見，社區型的MRSA與醫院型的MRSA有很大的差異。但是，現在社區型的MRSA也慢慢地在醫院裡被找到(NHRI communications, 2008)⁽²⁴⁾。

3、polyamines

polyamines 是一種聚胺化合物，DNA 活化的刺激素，可增加淋巴細胞之分裂，實際作用並不清楚，如果聚胺合成受到抑制，細胞生長會停止或受到阻礙，大多數真核細胞在細胞膜具有 polyamine transporter，可以內化外來的聚胺化合物，polyamines 可以提高 blood-brain barrier 的滲透，更參與調節衰老的器官，在植物視為植物荷爾蒙。



第二節 名詞界定

1 抗藥性金黃色葡萄球菌的名詞定義

翻查國內外文獻發現定義社區 methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌感染，除了以時間(如入院後 24、48 或 72 小時)做為切割點外，另以個案過去醫療相關暴露史做為研究篩檢的條件。個案定義的標準無論向上或向下修正，都有可能造成個案錯誤分類而影響研究結果。本研究主要根據 Salgado 針對發生在社區感染 methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌 (community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CO-MRSA) 感染定義的整合分析，發現有 15 篇文獻的作者，以入院後的 48 小時做為社區或醫院感染的切割點(Salgado CD, 2003)⁽³⁾，另外又根據 Klevens 在 2007 年 JAMA 文章中針對 MRSA 所做的分類來加以分析(Klevens RM,2007)⁽²⁾，此研究以病患過去一年內沒有健康照護相關的危險因子稱為社區相關 methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌感染(Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) Infection)，如病患過去一年有健康照護相關的危險因子則稱為健康照護相關 methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌感染 (Health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) Infection)，健康照護相關 MRSA 感染又依病患入院如在 48 小時內感染 MRSA 者，稱為社區型 MRSA 感染 (community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CO-MRSA)，病患入院如大於 48 小時內感染 MRSA 者，稱為醫院型 MRSA 感染 (hospital-onset methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; H-MRSA) (表一)。

2 HA-MRSA 與 CO-MRSA 的流行病學

依據 1998 年國衛院 TSAR 之研究報告顯示，台灣院內 Methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌感染(hospital-acquired methicillin resistant

Staphylococcus aureus; HA-MRSA)的盛行率從 1993 年的 16.3%增加到 1998 年的 82.0%，其中以醫學中心最為明顯(何曼德, 2000)⁽³⁹⁾。國內醫學中心加護病房 HA-MRSA 的概況，從疾病管制局 2005、2006、2007 年院內感染監視資訊系統分析報告中得知，感染率分別為 85.4%、84.2%、85.1%。而發生在社區感染 methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌 (community-onset methicillin-resistant Staphylococcus aureus; CO-MRSA)的感染，一直到 1980 年才被美國發現(CDC, American MMWR, 1981)⁽⁹⁾。國外學者發現 CO-MRSA 不同於 HA-MRSA 的是 CO-MRSA 對某些非 β -lactams 類的抗生素仍保有很好的感受性，如 aminoglycosides、clindamycin、quinolones 等，且不像 HA-MRSA 具有明顯的感染危險因子，如長期住院、長期使用廣效性抗生素、使用侵入性醫療措施、潛在疾病等(Fergie JE ,2001; Lin JC,2004; Herold BC,1998)⁽¹⁰⁻¹²⁾。國內外研究調查顯示，CO-MRSA 的盛行率約為 9.0%-40.0%，已漸成為社區感染新興的致病菌之一(Lin JC, 2004; Herold B, 1998; Hussain FM, 2001; Voss A, 1995; Rosario-Rosado RV, 2004)⁽¹¹⁻¹⁵⁾。

第三節 研究的重要性

由國衛院臨床研究組進行之「全國微生物抗藥性監測計劃(TSAR)」的數據顯示，金黃色葡萄球菌為國內醫學中心及區域醫院病人第二項最常見之致病細菌，僅次於大腸桿菌。由這些醫院病人分離出的MRSA菌株，佔金黃色葡萄球菌的比率，在一般病房為58%，在門診病人為42%，在加護病房則高過70%。而造成院內感染之金黃色葡萄球菌中亦有70%以上之菌是MRSA，這些菌株除了對所有 β -lactam（乙內醯氨酶）類抗生素幾乎全具抗藥性，對很多非 β -lactam種類的抗生素也有抗藥性(NHRI communications, 2007)⁽¹⁾，故治療選則有限。

因MRSA可寄居於人體不同部位，包含鼻腔內及皮膚上，MRSA帶菌者(carrier)是造成此菌傳播之主要途徑之一，醫院中之醫療工作人員亦可能因照顧帶此菌者或被此菌感染之病人而經由接觸或醫療器具將MRSA傳給其他病人，醫療機構抗生素使用之增加也是造成MRSA增加之原因之一，而醫院則會對分離出MRSA之住院病人實施隔離與接觸防護(contact precaution)等感染控制措施。

MRSA原較多與住院病人及醫院感染相關，然近幾年來包含美國、澳洲、南美國家等許多地區，發現社區感染之個案遽增，且有群突發案例，如美式足球隊員、監獄犯人等群体感染之案件。一般引起社區感染之MRSA與院內感染之MRSA有不同之基因型，且抗藥性較低，但近幾年來引起社區感染之MRSA中多數是帶有PVL(Panton-Valentine leukocidin)毒素之菌。PVL是一種能破壞白血球之毒素，被具有此PVL毒素MRSA感染之病狀，從局部皮膚感染至嚴重疾病包含壞死性肺炎(necrotizing pneumonia)，甚至死亡(Vandenesch F, 2003)⁽³⁴⁾。國內近年來亦有社區MRSA感染個案之多起報告，包含孩童被具PVL毒性因子菌感染之個案，足見MRSA之影響已逐漸擴大(Katayama Y, 2000; Hajo G,

2006)⁽¹⁷⁻¹⁸⁾。

國內亦有研究發現(黃高彬, 2005)⁽¹⁶⁾, CO-MRSA 菌血症者較 CO-MSSA 感染者年老和行動不便需要使用助行器或長期臥床;而醫院發現的 CO-MRSA 感染者,大都與過去的醫療暴露經驗有關,包括居住在長期照護機構、過去曾使用抗生素和住院。換言之,在醫院感染或移生的 MRSA 可以在出院後持續存在很久。因此,醫院對於曾經感染 MRSA 者在下次住院時,應評估其潛藏的散播力,儘早實施感染控制措施才能避免醫院交互感染的發生。



第四節 研究動機

由以上的背景介紹得知以下幾個重點：

- 1 社區型 methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌(CO-MRSA)，較常為 Pulsotype B 和 C。其中 Pulsotype C 菌群幾乎全為 PVL 陽性，但是對 ciprofloxacin、SXT、gentamicin 大多呈敏感性。而國內最常見的 MRSA 為 Pulsotype A，是醫院型 Methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌感染 (HA-MRSA)，其 SCCmec 為 III，此菌群對 ciprofloxacin、erythromycin、gentamicin、SXT 抗藥性幾乎是 100%。由此可見，社區型的 MRSA 與醫院型的 MRSA 在基因型與表現型上有很大的差異。
- 2 金黃色葡萄球菌為國內醫院病人第二常見之致病細菌，且 MRSA 約有 75-80%，通常醫院會對分離出 MRSA 之病人實施隔離與接觸防護等措施，並從積極管控抗生素的濫用及加強醫護人員照護前後的洗手遵從性來著手控制。
- 3 然而是不是能有另外一種面向，比如說如何利用細菌蛋白質的特性與 polyamines 的作用，來降低細菌對某些抗生素抗藥性的濃度，而達到感染控制的效果，則有待進一步實驗證實。

第五節 研究目的

綜合以上的文獻背景，使我們有興趣想要探討 polyamines 是不是可以用來降低金黃色葡萄球菌對 penicillins 類抗生素抗藥性的濃度，另外藉由分析 polyamines 在金黃色葡萄球菌對抗藥性的改變強弱，來了解該細菌的何種蛋白質是最重要的影響關鍵，本論文將探討以下幾個問題：

- 1 探討 CO-MRSA 與 CO-MSSA 對抗生素之感受性表現，有什麼樣的差異。另外 CO-MRSA 與 CO-MSSA 在基因型的表現又有什麼樣的不同。
- 2 探討 polyamines 是不是可以用來降低金黃色葡萄球菌對 penicillin，oxacillin，ampicillin 抗生素抗藥性的濃度。
- 3 探討 polyamines 是否因為改變金黃色葡萄球菌的 penicillin-binding proteins(PBPs)，進而影響抗藥性改變的差異。



第二章 文獻查證

第一節 polyamines 的相關研究

polyamines是一種聚胺化合物，DNA活化的刺激素，可增加淋巴細胞之分裂，有研究顯示polyamines可以分別在*E. coli*，*Salmonella enteric serovar Typhimurium* LT2，臨床株的*P. aeruginosa*及*S. aureus*增加抗生素的感受性，包括大部分的 β -lactam 抗生素及其他常用的抗生素，特別是 β -lactam 抗生素抗藥性濃度下降的幅度最為強烈，雖然該篇研究尚未了解到當中的作用機制，但推論有可能與penicillin-binding proteins(PBPs)有關，因為當細菌與 β -lactams 接觸時，促使mecA 基因表現，而產生出PBP2a，PBP2a 與 β -lactam 抗生素的親和力極低，抗生素無法與細菌細胞膜上的transpeptidase 結合，而polyamines有可能是藉由增加PBP acylation(醞基)或減少PBPs的表現來達到降低抗藥性的結果 (Lu CD, 2007) ⁽⁴⁰⁾。

第二節 如何抑制抗藥性金黃色葡萄球菌

在眾多文獻中有幾篇對抑制 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)有比較新的見解，可以提供這次的論文一些思維，首先，中研院王惠鈞教授發表在Science雜誌中指出MRSA會形成葡萄金黃色素 (staphyloxanthin)，藉此逃脫人體白血球的毒殺，而此合成與人類膽固醇合成有些類似，因此利用X-光繞射方法解開形成色素關鍵酵素 dehydroqualene synthase (CrtM) 之蛋白質結構，此酵素與人類squalene synthase (SQS) 相似，SQS在人體內負責參與膽固醇的合成。而有一種SQS抑制劑(BPH-652)，可抑制金黃色葡萄球菌色素形成並較容易被人類白血球獵殺。這是一個全新的治療方式，非直接殺死細菌，而是讓免疫系統能有效地清除感染，使細菌不易因在選擇性壓力 (selective pressure) 下而產生抗藥性 (Wang HJ, 2008)⁽²¹⁾。另外也有作者指出有些香精油 (檸檬草、桃金娘、山薄荷、肉桂等) 可以抑制MRSA，往後提供應用於治療長期感染MRSA的替代療法 (Chao S, 2008)⁽²²⁾。在2010年也有學者指出將感染MRSA的兔子經藥物治療5天後，取其兔血清和Qingre granules (QRKL) 或和抗生素合併使用皆有助於降低MRSA對cefuroxime and vancomycin MIC90的濃度，可以提供另外一種治療的方向 (Yu YY, 2010)⁽²³⁾。

第三節 Panton-Valentine Leukocidin(PVL)與

MRSA的關聯性

PVL 由噬菌體所攜帶，與 γ -毒素相同皆由兩個分泌蛋白 S(LukS-PV) 和 F(LukF-PV) 組成，此兩個蛋白具有協同作用一起破壞宿主的白血球及紅血球的細胞膜，被具有此 PVL 毒素 MRSA 感染之病狀，從局部皮膚感染至嚴重疾病包含壞死性肺炎(necrotizing pneumonia)，甚至死亡 (Vandenesch F, 2003)⁽³⁴⁾，從國衛院第二期與第三期 TSAR (2000 及 2002 年)MRSA 所做的研究，則發現國內 MRSA 主要之菌群為 ST239:SCCmec type III 及國外少見之 ST59:SCCmec type V，而這些 ST59:SCCmec type V 之菌種大部份是社區型的 MRSA 且幾乎全具 PVL 毒素因子(Wang JL, 2007; Chen FJ, 2005)^(33,35)。國內近年來報告 C-MRSA 個案亦多為具 PVL 毒性因子感染的孩童(Wang CC, 2004; Chen CJ, 2005)⁽³⁶⁻³⁷⁾。而外國學者 Labandeira-Rey 等人更證明了帶有 PVL 的菌可以造成壞死性肺炎的證據，該篇研究中說到感染能產生 PVL 的葡萄球菌 (staphylococcus) 者，會快速的發展成壞死性肺炎，PVL 會改變基因的轉錄功能，並在細菌的細胞壁上嵌入肺部發炎因子 staphylococcal protein A (Spa) (Bowden MG, 2007)⁽³⁸⁾。

第四節 MRSA 對 vancomycin 最低抑菌濃度的判讀標準與近期演變

MRSA 除了對 β -lactam 的抗生素幾乎全有抗藥性之外，對非 β -lactam 的抗藥比率也很高，迫使醫師在遇到 MRSA 感染重症的病人，最後大多是選擇萬古黴素 (vancomycin) 來治療。可是早在 1997 年，第一株對萬古黴素敏感度下降的金黃色葡萄球菌 Mu50 (MIC 8 mg/L) 就在日本出現 (Hiramatsu K, 1997)⁽²⁸⁾，而全球首例對 vancomycin 具有抗藥性的金黃色葡萄球菌 (VRSA) 的臨床個案，則是 2002 年 6 月在美國密西根州一個長期洗腎的患者身上所培養出來的 (MMWR, 2002)⁽²⁹⁾。美國 2006 年對 CLSI 定義 *S. aureus* 之 vancomycin 最低抑菌濃度 (MIC) 的 breakpoint (抗敏性判讀標準) 從 4 μ g/ml 改到 2 μ g/ml (CLSI, 2006)⁽²⁶⁾。但近年有許多文獻報告有對 vancomycin 感受性降低 (reduced susceptible) 及具混合抗藥性 (hetero-resistance) 之 *S. aureus* (Appelbaum PC, 2007; Cui L, 2006)^(25,27)，一般來說，這些 hetero-VRSA 都不是直接由臨床採集的檢體所分離出來的菌株，而是在實驗室裡經 selective medium 篩選出來的，所以 hetero-VRSA 在臨床的重要性不得而知，此感受性降低的機制還不是很清楚，但不是經由 enterococci (vanA) 抗藥基因，電子顯微鏡的觀察發現，VISA 的細胞壁是其他金黃色葡萄球菌的兩倍厚，分泌較多的細胞壁物質如 peptidoglycan，且自體溶解 (autolysis) 的速度較快 (Cui L, 2000)⁽³⁰⁾。這樣的改變可使得 VISA/VRSA 的細胞壁將 vancomycin 隔離開來，以此解釋 VISA/VRSA 對 vancomycin 的抗藥機轉 (Avison MB, 2002)⁽³¹⁾。

有一篇研究報告，比較病人感染 *S. aureus* 其 vancomycin MIC 高過 1.5 μ g/ml 的個案臨床失敗率 (clinical failure) 比低於 1.5 μ g/ml 還來的要高，因此，該研究人員建議 CLSI 應該要把 vancomycin MIC breakpoint

改為 1 μ g/ml；雖然 CLSI 目前不會更改 *S. aureus* 之 vancomycin MIC 判讀標準，但也說明 vancomycin MIC 太高在臨床治療失敗率上的關聯(Lodise TP, 2008)⁽³²⁾。

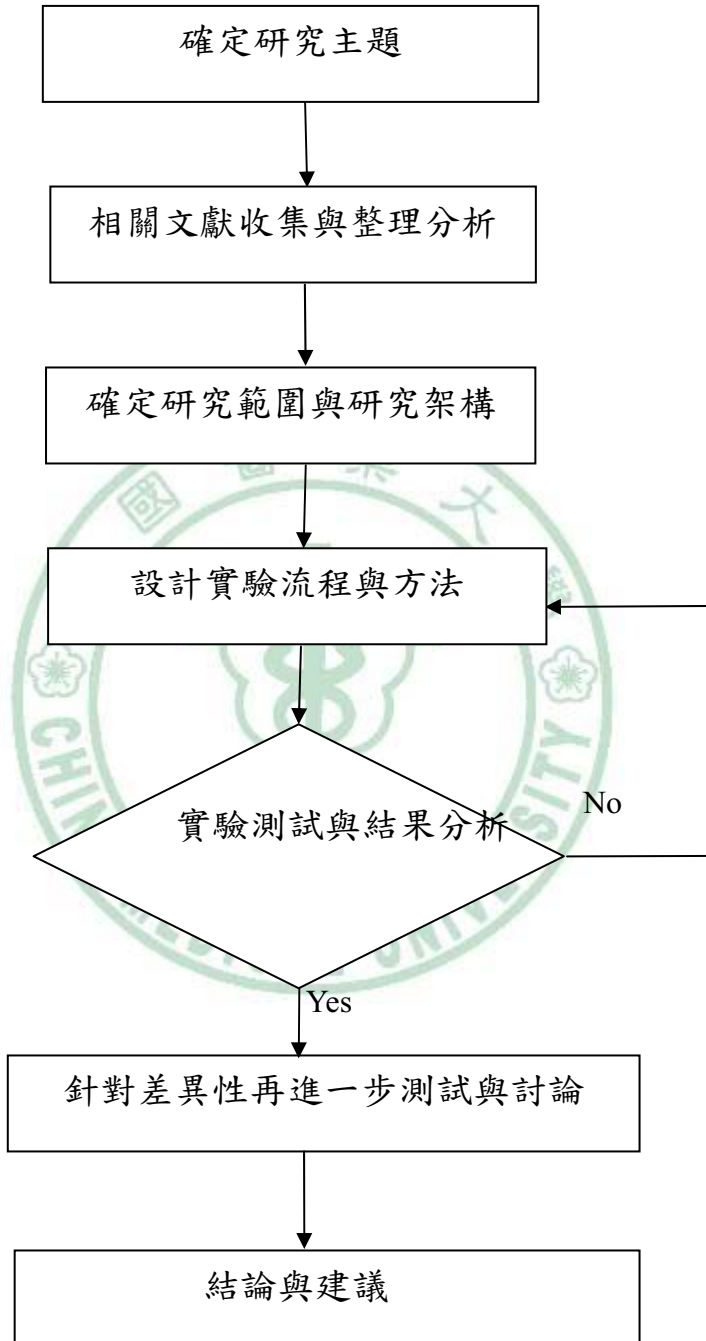


第五節 研究架構

經上述的文獻探討後，國內外都顯示 CO-MRSA 的盛行率愈來愈高，雖然對某些非 β -lactams 類的抗生素仍保有很好的感受性，但由於多數是帶有 PVL(Panton-Valentine leukocidin)毒素，所以預後不良或突發性的惡化常令醫療單位措手不及，本研究針對研究族群篩選符合 CO-MRSA 的定義，先針對 *S. aureus* 所使用的常規檢驗的抗生素進行分析比較，再利用 polyamines 可以增加抗生素的感受性的特性，針對臨床分離株對三種 β -lactam 類之抗生素加以測試，並跟據測試結果差異分層，尋找與 penicillin-binding proteins(PBPs)有關的改變，說明 polyamines 可以增加抗生素的感受性的可能機轉。



以下為本研究之研究架構圖：



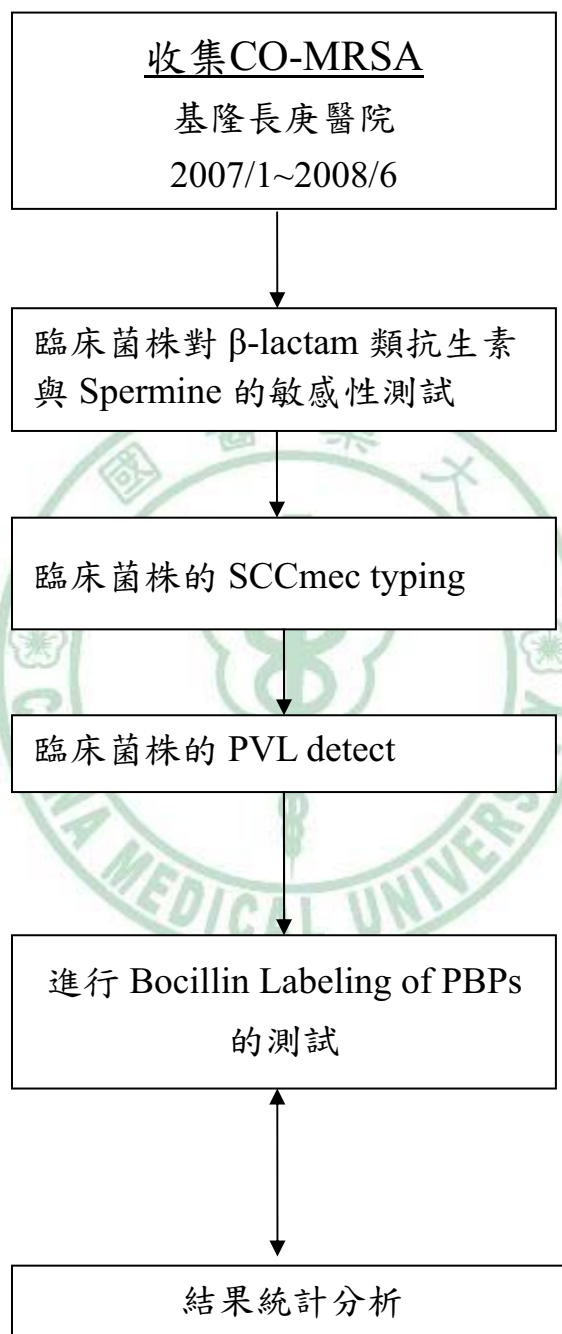
第三章 研究方法

第一節 研究設計

基於本研究的研究目的，我們收集自 2007 年 1 月 1 日起到 2008 年 6 月 30 日在基隆長庚從病人血液所分離得到之金黃色葡萄球菌，並符合定義為社區感染型(community onset)。

先利用臨床菌株對 Kirby-Bauer method (濾紙片瓊脂擴散法) 的藥物敏感性試驗結果，將菌株分為 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (簡稱 MRSA) 與 methicillin-sensitivity *Staphylococcus aureus* (簡稱 MSSA)，再測試臨床菌株對 β -lactam 類之抗生素與 Spermine 的藥物敏感性試驗，並分析 Spermine 與 pH 值對 β -lactam 類之抗生素的最低抑菌濃度的影響，同時探討 SCCmec 型別與毒力因子(PVL)和最低抑菌濃度改變有無關連，最後依據最低抑菌濃度差距分層，分別以 Bocillin 標示 PBPs，分析討論實驗結果。

以下為本研究之研究流程圖：



第二節 研究材料

1. 研究族群篩選

本研究採橫斷性研究法，研究對象以醫院族群為主 (hospital-based)。凡於 2007 年 1 月 1 日至 2008 年 6 月 30 日在基隆長庚醫院門、急診或住院 48 小時內採得之血液檢體，其培養結果為金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 者定義為社區感染型 (community onset)。無論個案在研究期間重複血液培養多少次，均以個人為一研究單位，且以第一次培養結果為收案依歸。

2. 細菌株來源

於 2007 年 1 月 1 日至 2008 年 6 月 30 日病人血液所分離得到之 *Staphylococcus aureus*，並從基隆長庚醫院微生物組細菌庫取得 126 株臨床分離株。

3. 抗生素種類及判讀標準

根據基隆長庚醫院血液培養的 *S. aureus* 所使用的常規檢驗的抗生素種類有 Penicillin、Erythromycin、Clindamycin、Teicoplanin、Trimethoprim-sulfamethoxazole、Vancomycin、Gemtamicin，感受性試驗及判讀依據是遵照 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2006 制定之國家標準濃度 (表二)，所用的培養基是 Mueller Hinton Ager (MHA) 含 NaCl (4% W/V; 0.68 mol/L)。

第三節 實驗方法

1. 臨床檢體細菌資料收集

首先查詢基隆長庚微生物組細菌庫資料，依據細菌庫的菌種清單內容在研究期間內所收集到從病人血液分離得到之 *Staphylococcus aureus* 的病患病歷號及收件編號，並予以記錄之。

2. 比對醫療資訊系統(HIS)的資料

將上述紀錄的病患收件號逐一比對醫療資訊系統 (Hospital Information System, HIS) 是否符合門、急診或住院 48 小時內採得之血液檢體，且以第一次培養結果為收案依歸，且記錄病患基本資料如年齡、性別及就診科別，並依據病人藥敏檢驗報告初步分類為社區感染 methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌(CO-MRSA)及社區感染 methicillin 感受性金黃色葡萄球菌(CO-MSSA)，同時記錄檢驗報告中其他非 β -lactam 類之抗生素的藥敏結果。

3. 細菌株確認

凝固酶試驗(coagulase test)的 tube method 主要偵測 free coagulase，可用來確認 *Staphylococcus aureus*，首先取 0.5mL coagulase 置於試管內，以接種環刮取 3~5 顆菌落至試管中，培養於 35°C 溫箱 2 小時後作第一次觀察，如未凝集則將之放置室溫繼續觀察，試管中 coagulase 有凝固為陽性反應，液體狀為陰性反應，並同時參考菌落型態、顏色、有無溶血等特性。

4. 抗生素敏感性試驗(antimicrobial susceptibility testing)

臨床上利用 Kirby-Bauer 試驗法也就是俗稱的紙錠擴散法 (disc agar diffusion) 來了解化學治療劑之抗微生物作用，取菌落 1-3 顆至 TSB 中，37°C、震盪培養直到 MacFarland 達 0.5，以棉枝均勻塗抹在 Mueller Hinton Ager(MHA) 上，使用抗生素紙錠共 8 種，penicillin(10 μ g)、oxacillin(1 μ g)、erythromycin(15 μ g)、clindamycin(2 μ g)、Trimethoprim- sulfamethoxazole (23.75/1.25 μ g)、teicoplanin(30 μ g)、vancomycin(30 μ g)、gentamycin(10 μ g)，將貼妥抗生素紙錠的培養基置入 33°C 培養箱中，隔夜培養後量取紙錠周圍的抑制環直徑。參照標準為 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) 2006 之國家標準濃度。

5. 配製抗生素之 Mueller-Hinton agar plate (圖一)

為了測試菌株是否對 β -lactam 類之抗生素具抗藥性，因而選取 penicillin、oxacillin、ampicillin 三種 β -lactam 類之抗生素進行下列步驟所述之敏感性測試。penicillin、oxacillin、ampicillin 採購自廠商 (Sigma 公司)，將 penicillin、oxacillin、ampicillin 做系列稀釋而泡製成帶有不同濃度之 Mueller-Hinton agar plate (Mueller-Hinton agar 購自 BBL 公司)，抗生素的濃度由 256 μ g/ml 至 0.06 μ g/ml。

6. 配製抗生素之 Mueller-Hinton agar plate 且添加 Spermine (圖二)

為了測試菌株是否對添加有 Spermine 後之 β -lactam 類之抗生素具抗藥性，同樣選取 penicillin、oxacillin、ampicillin 三種 β -lactam 類之抗生素進行下列步驟所述之敏感性測試。penicillin、oxacillin、ampicillin 採購自廠商 (Sigma 公司)，Spermine 也是採購自廠商 (Sigma 公司)，將 penicillin、oxacillin、ampicillin 做系列稀釋且同時添加 Spermine 使之最後濃度為 1

mM，而泡製成帶有不同濃度之 Mueller-Hinton agar plate 且 Spermine 最後濃度為 1 mM，抗生素的濃度由 256 µg/ml 至 0.06 µg/ml。同時調整添加 Spermine 後之 Mueller-Hinton agar plate 的 pH 值，分兩種 pH 值的 MIC Mueller-Hinton agar plate：pH6.5 及 pH7.4。

7. 臨床菌株對抗生素最低抑菌濃度(MIC)的測試

前一天將 *Staphylococcus aureus* 菌株接種於綿羊血瓊脂 (sheep blood agar plate) 上，經過夜培養長出之細菌，挑選 3 ~ 5 個菌落，接種於 TSB 中(購自 BBL 公司)，經 3~5 小時的培養後，以 Trypticase Soy Broth (TSB) 將菌液適當稀釋至 McFarland 0.5 的標準濃度，而後以接種器將稀釋好的菌液接種於前述分別含有 penicillin、oxacillin、ampicillin 系列稀釋濃度之 Mueller-Hinton agar plate 上及添加 Spermine 之 Mueller-Hinton agar plate。待接種之菌液乾燥後，置入 35°C 之溫箱中培養 16~18 小時，再取出觀察，以最低可抑制細菌生長之抗生素濃度判讀為該抗生素對此菌株之最低抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, 簡稱 MIC)。

8. 抽取菌株 DNA

前一天將 *Staphylococcus aureus* 菌株接種於綿羊血瓊脂 (sheep blood agar plate) 上，取 3-5 顆菌落，將菌落置於裝有 100~300µl 無菌去離子水的 eppendorf 中，混合均勻，置於加熱器上設定 90~95°C、10 分鐘，再以 4500~5000 rpm 離心 5 分鐘，取 80~180µl 上清液置於新的 eppendorf 中，儲存於 -80°C 備用。

9. 臨床菌株 SCCmec typing

依據 SCCmec element 結構的差異，利用九對引子 primer(CIF2 F2、CIF2 R2、KDP F1、KDP R1、MECI P2、MECI P3、DCS F2、DCS R1、RIF4 F3、RIF4 R9、RIF5 F10、RIF5 R13、IS431 P4、pUB 110 R1、IS431 P4、pT181 R1、MECA P4、MECA P7)(表三)進行多重聚合酶連鎖反應，多重聚合酶連鎖反應條件為取 0.5 μ l 細菌 total DNA 模板，2u DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase) 0.5 μ l，200mM 之 primer 取 2 μ l，400mM 之 primer 取 10 μ l，800mM 之 primer 取 8 μ l，2mM dNTP 4 μ l，10x PCR 緩衝劑 5 μ l，最後加入無菌去離子水使最終反應體積為 50 μ l。進行聚合酶連鎖反應條件為先進行 94 $^{\circ}$ C 4 分鐘變性反應，循環條件 94 $^{\circ}$ C 30 秒，53 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘延長反應，共 30 循環，最後在 72 $^{\circ}$ C 4 分鐘。PCR 產物以 2% agarose 電泳分析。

10. 臨床菌株 PVL detect

取 2 μ l 細菌 total DNA 模板，2u DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase) 0.5 μ l，16S-F1(5'-GCAAGCGTTATCCGGAATTATTG-3')之 primer 取 5 μ l，16S-R1(5'-GGCGGAGTGCTTAATGCGTTAG-3')之 primer 取 5 μ l，2mM dNTP 4 μ l，10x PCR 緩衝劑 5 μ l，最後加入無菌去離子水使最終反應體積為 50 μ l。進行聚合酶連鎖反應條件為先進行 94 $^{\circ}$ C 2 分鐘變性反應，循環條件 94 $^{\circ}$ C 15 秒，55 $^{\circ}$ C 15 秒，72 $^{\circ}$ C 15 秒，共 25 循環。PCR 產物以 2% agarose 電泳分析。如果帶有 PVLgene 則會出現 luk-PV 為 433 及 341bp 兩個片段，如果未帶有 PVL 基因則只會出現 luk-PV 為 341bp 一個片段。

11. Bocillin Labeling of PBPs 分析步驟

- A. 將細菌養在 15 mL 的 LB broth(或任何滋養培養基)中 37°C，持續震盪，直到 OD600 達 1-2。將之離心 5000 rpm、10 min、4°C，取沉澱物並保持低溫(插在碎冰上)。
- B. 將沉澱物放入 0.25mL 的 suspension buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 50mMNaCl, 10mM MgCl₂)，混和。
- C. 準備溶解細胞:加 10μL 的 DNaseI(stock conc. 10U/ul)、10μL 的 RNase A (10mg/mL)、25-50μL 的 lysostaphin(stock conc. 6.25mg/mL) 並且培養在 37°C 溫箱 30min-1h 。
- D. 用 Bocillin FL 直接標示溶解物 (取步驟 3 的 35μL 的 lysate 加入 5μL 的 40uM Bocillin FL) 放入 37°C 溫箱 30min。
- E. 加入 loading dye 來停止反應，混合並煮沸 5 min。
- F. 取步驟 E 的「標示後混合物」10-15μL 跑 10% SDS-PAGE。
- G. 跑完電泳後直接用去離子水來潤濕膠片。
- H. 掃描膠片(for fluorescence with excitation at 488 nm and emission at 530 nm)。

12. 統計與分析

使用 SPSS 17.0 統計軟體，分別將 SCCmec element 和 PVL 毒性基因與病人就診科別及性別以卡方統計方式作檢定，p 值小於等於 0.05 即定義為具有顯著差異。另外將 SCCmec element 與年齡、分別只添加 3 種抗生素(oxacillin、penicillin、ampicillin)的最低抑菌濃度、同時添加抗生素和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度、同時添加抗生素和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度，做 ANOVA 變異數分析，p 值小於等於 0.05 即定義為具有顯著差異。PVL 毒性基因與年齡、分別只添加 3 種抗生素(oxacillin、penicillin、ampicillin)的最低抑菌濃度、同時添加抗生素和 spermine(pH 6.5)

的最低抑菌濃度、同時添加抗生素和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度，
做獨立樣本 t 檢定，p 值小於等於 0.05 即定義為具有顯著差異。



第四章 研究結果

第一節 研究資料分析

1. 細菌庫資料初步統計分析

2007年1月1日到2008年6月30日基隆長庚血流感染陽性結果者共有3167株，血液培養結果為*S. aureus*的有274株，占全院血流感染8.7%。收案期間血流感染為*S. aureus*，依入院發病時間分為兩類，入院小於48小時有158位，佔57.7%，即符合本研究定義的社區型血流感染，入院大於48小時有116位，佔42.3%，即為本研究定義的醫院型血流感染。由於本研究主要是探討CO-MRSA抗藥性流行病學分析，所以針對入院小於48小時的158株細菌來做分析，而其中有32株因為遺失、汙染或菌種留存清單資料不全，所以予以扣除，此研究全部菌株數為126株，針對發生在社區感染methicillin抗藥性金黃色葡萄球菌 (community-onset methicillin-resistant *S. aureus*; CO-MRSA)有52位，佔41.3%，發生在社區感染methicillin感受性金黃色葡萄球菌 (CO-MSSA)有74位，佔58.7%。(表四)

2. 醫療資訊系統資料收集與分析

以符合入院小於48小時的126株細菌來做分析，針對就診科別、年齡、性別分別作統計分析。

A、 就診科別及抗藥性分類：126位菌血症病人，其中就診科別集中在內科有109人(佔87%)：CO-MSSA有63人(58%)，CO-MRSA有46人(42%)；外科有14人(佔11%)：CO-MSSA有10人(71%)，CO-MRSA有4人(29%)；其他專科有2人(佔2%)：CO-MSSA有1人(50%)，CO-MRSA有1人(50%)；兒童專科有1人(佔1%)為CO-MRSA。(表五)

B、 年齡分層及抗藥性分類：126 位菌血症病人平均年齡 63.6 歲，最小年齡 4 歲，最大年齡 98 歲。多數病人集中在 41 歲到 80 歲(佔 65%)其中 60 歲以下 CO-MSSA 均多於 CO-MRSA 的比率，但 60 歲以上則反之。

(表六)

C、 性別及抗藥性分類：126 位菌血症病人，男女比率為 1.47，當中男性有 75 位佔 60%，女性有 51 位佔 40%。(表七)

3. 抗生素敏感性分析

對所有測試菌株進行藥物敏感性試驗(圖三)，依照實驗結果得知 126 株金黃色葡萄球菌對於 penicillin 抗藥性高達 96.8%，而對甲氧苯青黴素的抗藥性達 41.3%。MSSA 對於大多數抗生素皆具有抗性，除了 penicillin(94.6%)。且由統計得知 MRSA 相對於 MSSA 是具有多重抗藥性特徵，除了 teicoplanin(100%)及 vancomycin(100%)(表八)。

符合 CO-MRSA 的 52 株金黃色葡萄球菌，除了對 penicillin 之感受性表現最差外(0%)，對其他抗生素的感受性也降低，感受性小於 30%的有 Erythromycin (17.3%)、Clindamycin (19.2%) 以及 Gemtamicin (21.2%)，對於 Trimethoprim-sulfammethoxazole 也只有 67.3%具感受性。僅對 Teicoplanin (100%)以及 Vancomycin (100%)完全有效(表八)。

符合 CO-MSSA 的 74 株金黃色葡萄球菌，除了 penicillin 僅有 5.4%有效，對其它抗生素如 Erythromycin (83.8%)、Clindamycin (83.8%)、Gemtamicin (94.6%)、Trimethoprim-sulfammethoxazole (97.3%)、Teicoplanin (100%)以及 Vancomycin (100%)皆有大於 80%以上的敏感性(表八)。

從研究得知，無論是 CO-MRSA 或 CO-MSSA 對 vancomycin 和 Teicoplanin 之感受性表現，在本研究中尚未有抗藥性出現。

4. Spermine 與 pH 值對 oxacillin 的影響(圖四)

126 株測試菌株中，Mueller-Hinton agar plate 若只添加 oxacillin，在 74 株的 MSSA 中有 72 株對 oxacillin 為感受性(97.3%)，有 1 株對 oxacillin 為抗藥性(1.4%)，但多添加了 spermine 1mM(且 pH 為 6.5)後，則在 MSSA 中有 73 株(98.6%)對 oxacillin 為感受性，僅有 1 株對 oxacillin 為中間型(1.4%)；如添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，則在 MSSA 中有 74 株(100%)對 oxacillin 為感受性，完全沒有對 oxacillin 為抗藥性(0%)；相反的；Mueller-Hinton agar plate 若只添加 oxacillin，在 52 株的 MRSA 有 1 株對 oxacillin 為感受性(1.9%)，有 49 株對 oxacillin 為抗藥性(94.2%)，但多添加了 spermine 1mM (且 pH 為 6.5)後，則在 MRSA 有 21 株(40.4%)對 oxacillin 為感受性，有 22 株對 oxacillin 為抗藥性(42.3%)；如添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，則在 MRSA 有 41 株(78.8%)對 oxacillin 為感受性，有 9 株對 oxacillin 為抗藥性(17.3%)(表九)。

為了進一步分析測試菌株對 oxacillin 在添加 spermine 前後的最低抑菌濃度(MIC)的比較，先將最低抑菌濃度的測試結果予以 log₂ 後，再進行差異比較，在 MSSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 6.5，則與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異小於 2 的有 41 株(55.4%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 31 株(41.9%)，MIC 對數差異大於 5 的有 2 株(2.7%)，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異小於 2 有 4 株(5.4%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 67 株(90.5%)，MIC 對數差異大於 5 的有 3 株(4.1%)；在 MRSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 6.5，則與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異小於 2 有 16 株(30.7%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 11 株(21.2%)，MIC 對數差異大於 5 的有 25 株(48%)，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異小於 2 有 7 株

(13.4%)，MIC 對數差異介於 2~4 之間的有 3 株(5.8%)，MIC 對數差異大於 5 的有 42 株(80.7%)(表十)。

5. Spermine 與 pH 值對 penicillin 的影響(圖五)

126 株測試菌株中，Mueller-Hinton agar plate 若只添加 penicillin，在 74 株的 MSSA 中有 4 株對 penicillin 為感受性(5.4%)，有 70 株對 penicillin 為抗藥性(94.6%)，但多添加了 spermine 1mM(且 pH 為 6.5)後，則在 MSSA 中有 19 株(25.7%)對 penicillin 為感受性，有 55 株對 penicillin 為抗藥性(74.3%)；如添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，則在 MSSA 中有 70 株(94.6%)對 penicillin 為感受性，僅有 4 株對 penicillin 為抗藥性(5.4%)；相反的；Mueller-Hinton agar plate 若只添加 penicillin，在 52 株的 MRSA 完全沒有對 penicillin 為感受性(0%)，52 株(100%)對 penicillin 為抗藥性，但多添加了 spermine 1mM (且 pH 為 6.5)後，則在 MRSA 有 7 株(13.5%)對 penicillin 為感受性，有 45 株對 penicillin 為抗藥性(86.5%)；如添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，則在 MRSA 有 34 株(65.4%)對 penicillin 為感受性，有 18 株對 penicillin 為抗藥性(34.6%)(表十一)。

為了進一步分析測試菌株對 penicillin 在添加 spermine 前後的最低抑菌濃度(MIC)的比較，先將最低抑菌濃度的測試結果予以 \log_2 後，再進行差異比較，在 MSSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 6.5，則與單純只添加 penicillin 的 MIC 對數差異小於 2 的有 5 株(7.2%)，MIC 對數差異介於 2~4 之間的有 19 株(25.7%)，MIC 對數差異大於 5 的有 50 株(67.1%)，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 penicillin 的 MIC 對數差異小於 2 有 4 株(5.4%)，MIC 對數差異介於 2~4 之間的有 9 株(12.2%)，MIC 對數差異大於 5 的有 61 株(82.4%)；在 MRSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 6.5，則與單純只添加 penicillin 的 MIC 對

數差異小於 2 有 7 株(13.4%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 16 株(30.8%)，MIC 對數差異大於 5 的有 29 株(55.8%)，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 penicillin 的 MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 7 株(13.5%)，MIC 對數差異大於 5 的有 45 株(86.5%)(表十二)。

6. Spermine 與 pH 值對 ampicillin 的影響(圖六)

126 株測試菌株中，Mueller-Hinton agar plate 若只添加 ampicillin，在 74 株的 MSSA 中僅有 1 株對 ampicillin 為感受性(1.4%)，有 73 株對 ampicillin 為抗藥性(98.6%)，但多添加了 spermine 1mM(且 pH 為 6.5)後，則在 MSSA 中有 19 株(25.7%)對 ampicillin 為感受性，有 55 株對 ampicillin 為抗藥性(74.3%)；如添加了 spermine 1mM(且 pH 為 7.4)後，則在 MSSA 中有 51 株(68.9%)對 ampicillin 為感受性，有 23 株(31.1%)對 ampicillin 為抗藥性；相反的；Mueller-Hinton agar plate 若只添加 ampicillin，在 52 株的 MRSA 對 ampicillin 為抗藥性的有 100%，但多添加了 spermine 1mM(且 pH 為 6.5)後，則在 MRSA 中僅有 1 株(1.9%)對 ampicillin 為感受性，有 51 株對 ampicillin 為抗藥性(98.1%)；如添加了 spermine 1mM(且 pH 為 7.4)後，則在 MRSA 有 26 株(50%)對 ampicillin 為感受性，另外也有 26 株對 ampicillin 為抗藥性(50%)(表十三)。

為了進一步分析測試菌株對 ampicillin 在添加 spermine 前後的最低抑菌濃度(MIC)的比較，先將最低抑菌濃度的測試結果予以 \log_2 後，再進行差異比較，在 MSSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 6.5，則與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異小於 2 的有 6 株(8.5%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 52 株(68.6%)，MIC 對數差異大於 5 的有 16 株(22.8%)，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異小於 2 有 2 株(2.8%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有

22 株(29.7%)，MIC 對數差異大於 5 的有 50 株(67.6%)；在 MRSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 6.5，則與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異小於 2 有 15 株(26.8%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 25 株(44.6%)，MIC 對數差異大於 5 的有 16 株(28.9%)，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異小於 2 有 8 株(15.4%)，MIC 對數差異介於 2 ~ 4 之間的有 7 株(13.5%)，MIC 對數差異大於 5 的有 37 株(71.2%)(表十四)。

7. SCCmec typing

利用 SCCmec element 結構上的差異將 52 株 CO-MRSA 細菌利用分子生物技術區分為院內感染型 (SCCmec 第一型到第三型) 或社區感染型 (SCCmec 第四型及第五型)，採用九對引子進行多重聚合酶連鎖反應，依據電泳分析 PCR 產物，mecA gene 為 internal control，大小為 162bp，SCCmec I 具有 162、342、495bp 三個片段、SCCmec II 具有 162、209、284、342、381bp 五個片段、SCCmec III 具有 162、209、243、303、414bp 五個片段、SCCmec IV 具有 162、342bp 兩個片段、SCCmec IA 具有 162、342、381、495bp 四個片段、SCCmec IIIA 具有 162、209、243、414bp 四個片段、SCCmec IIIB 具有 162、209bp 兩個片段、V_T 具有 162、243、414 三個片段(圖七)。

在 52 株 CO-MRSA 中，有 36.5% 屬於 SCCmec IIIA，SCCmec II 及 IV 皆佔了 19.2%，佔了 9.6% 的有 SCCmec III 及 V，其它型別則佔了 5.7%。由分子生物技術結果顯示院內感染型共有 37 株(71.2%)，社區感染型共有 15 株(28.8%)(表十五)。

8. PVL 毒性基因的結果

帶有 PVLgene 則會出現 luk-PV 為 433 及 341bp 兩個片段，如果未帶有 PVL 基因則只會出現 luk-PV 為 341bp 一個片段。

在 74 株 MSSA 中有 7 株帶有 PVL 陽性佔 MSSA 的 9.5%，MRSA 共有 52 株，其中 SCCmec II 有 1 株帶有 PVL 陽性佔 MRSA 的 1.9%，SCCmec IIIA 有 4 株帶有 PVL 陽性佔 MRSA 的 7.7%(表十六)。

9. Bocillin Labeling of PBPs 的結果

為了探討 penicillin-binding proteins(PBPs)是否是金黃色葡萄球菌與 spermine 有無抗藥性改變的關鍵，將在 MRSA 中僅有 9 株對 Mueller-Hinton agar plate 添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，仍為抗藥性，來進行 Bocillin 標示 penicillin-binding proteins(PBPs)，這當中全部皆被標示為 PBP2a，但有 3 株同時被標示為 PBP4 (圖八)。

這 9 株中沒有任何一株是帶有 PVL gene，而其中有 5 株為 SCCmec IIIA，有 3 株為 SCCmec III，有 1 株屬於 SCCmec IV (表十七)。

第五章 討論

1. 臨床資料分析

本研究在定義社區型金黃色葡萄球菌感染是以入院時間做為切割點，但根據 Klevens 針對 MRSA 所做的分類必須加上個案過去有無健康照護危險因子同時做為研究篩檢的條件，因為個案定義的標準無論向上或向下修正，都有可能造成個案錯誤分類而影響研究結果，由於台灣地區的病人可能到過多家醫院接受治療，過去病史資料取得有困難，本研究在此方面所得資料仍顯不足，所以就區分院內感染或社區感染而言，仍以入院時間 48 小時來區分，往後若能針對基隆地區做長期且徹底的臨床資料收集和感染調查，相信可以建立一個良好的感染控制監測系統。

從就診科別來觀察，可以了解內科佔了快九成的比率，為主要菌血症的來源，而其中又以腎臟科及胸腔內科佔了五成以上，推測此兩科的病人可能在社區時就已是金黃色葡萄球菌的帶菌者或受感染者，所以在入院 48 小時內就已發病。

2. 抗生素抗藥性統計

本研究所有的金黃色葡萄球菌做抗藥性敏感性測試的結果發現，除了 teicoplanin 及 vancomycin 還未出現抗藥性菌株，其餘藥物皆出現抗藥性菌株，而以 MSSA 菌株方面，除了 penicillin 只有 5% 的感受性以外，其餘藥物皆有 80% 以上的敏感性，所以在臨床用藥的選擇上空間較大，但在 MRSA 方面，就不這麼樂觀，由於 MRSA 多為多重抗藥性菌株，所以臨床治療用藥選擇上，可以使用的藥物僅剩 teicoplanin 及 vancomycin 比較有較高的治療效果，但如果該病人本身患有其他疾病，如代謝藥物之器官功能不佳等狀況，那麼在抗生素治療的策略上即受到極度的限制，相對死亡率也會升高，有感於此現象嚴重影響治癒率的提升，近幾年醫

院陸續引進例如：Fusidic acid、Tigercyclin、Linezolid 等抗生素，在實驗室的敏感性測試上都發現很高的感受性，可用以解決 MRSA 病人無藥可用的窘境。

3. SCCmec element 與臨床資料的關聯性

若以 SCCmec element 分型區分感染型別，則本研究中 52 株的 MRSA 中，醫院感染型的佔 71%，社區感染型的佔 29%，所以雖然我們已經將入院後大於 48 小時發病的病人排除掉，但在入院小於 48 小時的感染菌株中仍以醫院感染型為多，顯見台灣地區無法用單一定義確切區分醫院感染型或社區感染型。

本研究將病人就診科別與 SCCmec element 做卡方檢定，由於有些科別個案數比預期個數 5 還小，所以在統計上並未發現有顯著的差異($p = 0.133$)。同時再將病人性別與 SCCmec element 做卡方檢定，發現統計上也未有顯著的差異($p = 0.252$)。另外將 SCCmec element 與年齡、分別只添加 3 種抗生素(oxacillin、penicillin、ampicillin)的最低抑菌濃度、同時添加一種抗生素和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度、同時添加一種抗生素和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度，做 ANOVA 變異數分析，發現病人年齡與 SCCmec element 沒有顯著的差異($p = 0.065$)，但分別與只添加 oxacillin 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)、只添加 penicillin 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)、只添加 ampicillin 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)，同時添加 oxacillin 和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)，同時添加 penicillin 和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)、同時添加 ampicillin 和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)、同時添加 oxacillin 和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)、同時添加 penicillin 和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)、同時添加 ampicillin 和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度($p < 0.01$)，皆達統計上的顯著意義，但

由於測試數值過少，如要深入了解哪一型的 SCCmec element 影響最低抑菌濃度最多，則需要更多數值來佐證。

4. PVL 毒性基因與臨床資料的關聯性

本研究帶有 PVL 基因以 MSSA 有七株為最多，另外 SCCmec IIIA 有四株，SCCmec II 有一株，就本研究而言，PVL 基因攜帶與否可能不足以作為判斷社區感染型別上的依據。本研究中，9.5%的社區感染型金黃色葡萄球菌帶有 PVL 基因，且 MRSA 和 MSSA 分別的比率相去不遠，高於 1995 年學者所提出的 5%的臨床分離菌株帶有 PVL 基因。

本研究將病人就診科別與 PVL 基因做卡方檢定，由於有些科別個案數比預期個數 5 還小，所以在統計上雖發現有顯著的差異($p = 0.003$)，但可能未必有相關意義。同時再將病人性別與 PVL 基因做卡方檢定，發現統計上未有顯著的差異($p = 0.546$)。將 PVL 基因與年齡、分別只添加 3 種抗生素(oxacillin、penicillin、ampicillin)的最低抑菌濃度、同時添加一種抗生素和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度、同時添加一種抗生素和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度，做獨立樣本 t 檢定，發現病人年齡與 PVL 基因沒有顯著的差異($p = 0.964$)，與只添加 oxacillin 的最低抑菌濃度($p = 0.087$)、只添加 penicillin 的最低抑菌濃度($p = 0.130$)、只添加 ampicillin 的最低抑菌濃度($p = 0.509$)，同時添加 oxacillin 和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度($p = 0.199$)，同時添加 penicillin 和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度($p = 0.196$)、同時添加 ampicillin 和 spermine(pH 6.5) 的最低抑菌濃度($p = 0.215$)、同時添加 oxacillin 和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度($p = 0.408$)、同時添加 penicillin 和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度($p = 0.599$)、同時添加 ampicillin 和 spermine(pH 7.4) 的最低抑菌濃度($p = 0.890$)，皆未達統計上的顯著意義。

第六章 結論與建議

第一節 結論

1. 在基隆長庚醫院社區型血流感染金黃色葡萄球菌中，以 MSSA 約佔六成，MRSA 則佔四成，比醫院感染型的金黃色葡萄球菌還有較高的抗生素敏感性，唯 MRSA 仍屬多重抗藥性，須特別留意用藥的選擇。
2. MRSA 菌株中，醫院感染型(SCCmec I ~ III)的佔 71%，社區感染型(SCCmec IV ~ V)的佔 29%。
3. 9.5%的社區型血流感染金黃色葡萄球菌帶有 PVL 基因，PVL 基因攜帶與否可能不足以作為判斷社區感染型別上的依據。
4. SCCmec element 與病人就診科別、性別、年齡皆無顯著上的差異，但與三種抗生素的最低抑菌濃度有顯著上的差異，但需要更多的資料數據來佐證。
5. PVL 基因與病人就診科別、性別、年齡及三種抗生素的最低抑菌濃度皆無顯著上的差異。
6. 本研究中發現 PBP2a(penicillin-binding proteins2a) 為主要影響 spermine 與抗生素能不能改變細菌最低抑菌濃度的關鍵。
7. 日後感染研究應加強在病人入院時間、病歷收集、過去病史調查等以提供資料的完整性。

第二節 研究限制

這次實驗只針對 β -lactam 類之抗生素進行測試，之後研究可以針對非 β -lactam 類之抗生素來進行，另外由於這次挑選的族群為社區感染型 (community onset)，並未針對醫院感染型來做測試，未來也可以將這方面的數據補齊來做為比對與參考。

由於醫院抗藥性菌種很多，可以針對更多醫院常見的革蘭氏陽性菌的抗藥性細菌先來做測試，例如：vancomycin resistant enterococci (VRE)、*S. pneumoniae* 對盤尼西林 (Penicillin) 抗藥、對氟化恩莖類 (fluoroquinolone) 有抗藥性之 Gr. B Streptococci，如果我們可以了解 polyamines 適用於哪些抗藥性細菌的話可能對臨床更有其效益。



第三節 建議

台灣醫院感染金黃色葡萄球菌是非常普遍，若沒有給予妥善治療則會造成嚴重的併發症，此菌已經被研究出許多的致病毒力因子，以及對抗宿主攻擊的防衛結構，其毒力因子主要分為兩類：一類為細菌體表面的結構性物質，另一類為細菌分泌至菌體外之毒素。雖然已經有許多致病因子被發現，但金黃色葡萄球菌在感染的過程中，應該還有許多未知的致病機轉參與其中，未來期盼有更多的實驗室致力於相關的研究，以期日後有助於發展更有效的預防、治療及控制的方法。

由於有相關的文獻證明 vancomycin 用於治療金黃色葡萄球菌的最低抑菌濃度如果太高與臨床治療失敗率上的關聯，所以可以盡速測試 vancomycin 與 spermine 是否可以降低臨床菌株對 vancomycin 的最低抑菌濃度。

另外針對台灣醫院常見的抗藥性菌株也可以進行與 spermine 的測試，以助於了解抗藥性菌株的防衛機轉及與之相抗的關鍵。

參考文獻

- [1]NHRI communications. (國家衛生研究院電子報第 188 期 2007-02-07)
<http://enews.nhri.org.tw/index.php>
- [2]Klebens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. JAMA 2007;298(15):1763-1771
- [3]Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and riskfactors. Clin Infect Dis 2003;36:131-139.
- [4]Morin CA, Hadler JL. Population-based incidence and characteristics of community-onset *Staphylococcus aureus* infections with bacteremia in 4 metropolitan Connecticut areas, 1998. J Infect Dis 2001;184(8):1029-1034.
- [5]Schramm GE, Johnson JA, Doherty JA, et al. Increasing incidence of sterile-site infections due to non-multidrug-resistant, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospitalized patients. Infect Control Hosp Epidemiol 2007;28(1):95-97.
- [6]Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. Clin Infect Dis 42:647–656.
- [7]Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. J Am Med Assoc 2003;290:2976–2984
- [8]Ho M, McDonald LC, Lauderdale TL, et al. Surveillance of antibiotic resistance in Taiwan. J Microbial Immunol Infect 1999;32:239-249.
- [9]Centers for Disease Control: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections-Michigan. MMWR 1981;30: 185-187.

- [10]Fergie JE, Purcell K. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in south Texas children. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:860-883.
- [11]Lin JC, Yeh KM, Peng MY, et al. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in Taiwan: risk factors for acquisition, clinical features and outcome. *J Microbial Immunol Infect* 2004;37:24-8.
- [12]Herold BC, Immnergluck LC, Maranan MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children with no identified predisposing risk. *JAMA* 1998;279:593-598.
- [13]Hussain FM, Boyle-vavars, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in healthy children attending an outpatient pediatric clinic. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:763-767.
- [14]Voss A, Doebbeling BN. The worldwide prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Int J Antimicrob Agents* 1995;5:101-106.
- [15]Rosario-Rosado RV, Rene AA, Jones B. Descriptive analysis of patients with community-onset and hospital-onset methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:171-3.
- [16]黃高彬.黃樹樺.曾綉婷:發生在社區之 Methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌菌血症之流行病學分析。 *感染控制雜誌* 2005;15(6):353-364
- [17] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1549-1555
- [18]Hajo G, Marta AS, John B, Edine T. Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. *Lancet* 2006;368:874-885.
- [19]Jansen WTM, Beitsma MM, Koeman CJ, et al. Novel Mobile Variants of

Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2072-2078

[20] Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984;158:513-516.

[21] Wang HJ, Liu CI, Liu GY, et al. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* 2008;319:1391-1394.

[22] Chao S, Young G, Oberg C, et al. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour Fragr J* 2008;23(6):444-449.

[23] Yu YY, Wang H, Zhang SW, et al. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by the compound Qingre granules. *Chin Med J* 2010;123(8):1017-1020

[24] NHRI communications. (國家衛生研究院電子報第 278 期 2008-11-20)
<http://enews.nhri.org.tw/index.php>

[25] Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(5):398-408

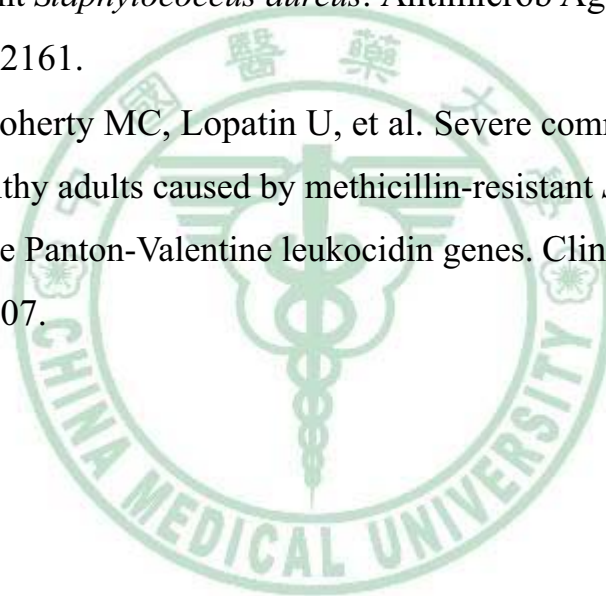
[26] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement. M100-S16 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard. Vol 26. No 3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.

[27] Cui L, Iwamoto A, Lian JQ, et al. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(2):428-38.

[28] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135-6.

- [29] CDC: Staphylococcus aureus resistant to vancomycin - United States, 2002. *MMWR* 2002;51:565-7
- [30] Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, et al. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by Staphylococcus aureus Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2276-85.
- [31] Avison MB, Bennett PM, Howe RA, et al. Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in Staphylococcus aureus strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:255-60.
- [32] Lodise TP, Graves J, Evans A, et al. Relationship between Vancomycin MIC and Failure among Patients with Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Bacteremia Treated with Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(9):3315-3320.
- [33] Wang JL, Wang JT, Chen SY, et al. Adult methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in Taiwan: clinical significance of non-multi-resistant antibiogram and Panton-Valentine leukocidin gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59:365-371.
- [34] Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al: Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9:978-984.
- [35] Chen FJ, Lauderdale TL, Huang IW, et al: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1760-1763.
- [36] Wang CC, Lo WT, Chu ML, et al: Epidemiological typing of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from children in Taiwan. *Clin Infect Dis* 2004;39:481-487.
- [37] Chen CJ, Huang YC, Chiu CH, et al: Clinical features and genotyping analysis of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Taiwanese children. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:40-45.

- [38] Bowden MG, Maria LR, Couzon F, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valent Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science* 2007;315:1130-1133.
- [39] 何曼德, LC McDonald, 楊采菱等: 1998年台灣地區之抗生素抗藥性監測。 *感控雜誌* 2000;10:277-93。
- [40] Kwon DH, Lu CD. Polyamine Effects on Antibiotic Susceptibility in Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(6):2070-2077.
- [41] Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(7):2155-2161.
- [42] Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis* 2005;40(1):100-107.



表一 分類 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)感染定義

分類	定義
Health care-associated Community-onset	最少有下面一項的健康照護危險因子：(1)入院時有侵入性的裝置；(2)過去有過 MRSA 的感染或移生的紀錄(3)有開刀、住院、洗腎的經驗或過去一年內在長照機構曾經有培養出來過。
Hospital-onset	入院>48 小時後，在無菌部位培養出來 MRSA，且出現 \geq 一種 Community-onset 的健康照護危險因子。
Community-associated	完全沒有 Community-onset 的健康照護危險因子。

擷取自 JAMA, 2007;298(15):1763-1771



表二 抗生素感受性試驗(antimicrobial susceptibility testing)判讀標準

Chemotherapeutic drugs	Disk Content	Zone Diameter(mm)		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Penicillin	10 μ g	≤ 28	-	≥ 29
Oxacillin	1 μ g	≤ 10	11-12	≥ 13
Erythromycin	15 μ g	≤ 13	14-22	≥ 23
Clindamycin	2 μ g	≤ 14	15-20	≥ 21
Trimethoprim-sulfamethoxazole	23.75/ 1.25 μ g	≤ 10	11-15	≥ 16
Teicoplanin	30 μ g	≤ 10	11-13	≥ 14
Vancomycin	30 μ g	-	-	≥ 15
Gemtamicin	10 μ g	≤ 12	13-14	≥ 15

判讀依據是遵照 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) 2006 所頒布的標準，依據抑制環大小可區分為抗性(Resistant)、中間型(Intermediate)、及敏感性(Susceptible)。

表三 SCCmec element 分型之多重聚合酶連鎖反應引子一覽表

mecA 為 internal control, SCCmec I 具有 162、342、495bp 三個片段, SCCmec II 具有 162、209、284、342、381bp 五個片段, SCCmec III 具有 162、209、243、303、414bp 五個片段, SCCmec IV 具有 162、342bp 兩個片段, SCCmec IA 具有 162、342、381、495bp 四個片段, SCCmec IIIA 具有 162、209、243、414bp 四個片段, SCCmec IIIB 具有 162、209bp 兩個片段, V_T 具有 162、243、414 三個片段。

Locus	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Location	Amplicon size (bp)	Specificity* (SCCmec type)
A	CF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	18398-18419 ^a	495	I
	CF2 R2	ATTTACCCACAAGGACTACCAGC	18892-18871 ^a		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTTGGTGATGC	10445-10467 ^b	284	II
	KDP R1	CGAATGAAAGTGAAAAGAAAGTGG	10728-10707 ^b		
C	MECI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	42428-42447 ^b	209	II, III
	MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTG	42636-42617 ^b		
D	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	38011-37992 ^a	342	I, II, IV
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG	37670-37689 ^a		
E	RIF4 F3	GTGATTGTTCCGAGATATGTGG	45587-45607 ^c	243	III
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCCG	45829-45809 ^c		
F	RIF5 F10	TTCCTAAGTACACGCTGAATCG	59573-59594 ^c	414	III
	RIF5 R13	GTCACAGTAAATCCCATCAATGC	59986-59965 ^c		
G	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	49963-49982 ^b	381	I
	pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC	50343-50323 ^b		
H	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	29654-29673 ^c	303	Internal control
	pT181 R1	GAAGAAATGGGGAAGCTTCAC	29976-29956 ^c		
<i>mecA</i>	MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCAOCCAGG	1190-1211 ^d	162	Internal control
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAAACG	1351-1332 ^d		

表四 細菌庫資料初步收案分類(2007 ~ 2008/06/30)

	MSSA n(%)	MRSA n(%)	Total
2007 Jan ~ Jun	27(61.4%)	17(38.6%)	44(34.9%)
2007 Jul ~ Dec	19(51.4%)	18(48.6%)	37(29.4%)
2008 Jan ~ Jun	28(62.2%)	17(37.8%)	45(35.7%)
Total	74(58.7%)	52(41.3%)	126(100%)



表五 就診科別及抗藥性分類

Disease classification	科別	抗藥性分類		MSSA		MRSA		Total	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
內科	一般內科	0	0%	4	100%	4	3%		
	胸腔內科	9	39%	14	61%	23	18%		
	血液腫瘤科	2	40%	3	60%	5	4%		
	新陳代謝科	7	78%	2	22%	9	7%		
	胃腸科	5	83%	1	17%	6	5%		
	腎臟科	25	60%	17	40%	42	33%		
	心臟內科	5	63%	3	38%	8	6%		
	風濕免疫科	4	100%	0	0%	4	3%		
	急診內科	5	83%	1	17%	6	5%		
	感染科	1	50%	1	50%	2	2%		
	小計	63	58%	46	42%	109	87%		
外科	一般外科	2	67%	1	33%	3	2%		
	腦神經外科	1	50%	1	50%	2	2%		
	整形外科	1	100%	0	0%	1	1%		
	骨科	4	80%	1	20%	5	4%		
	急診外科	1	50%	1	50%	2	2%		
	泌尿科	1	100%	0	0%	1	1%		
	小計	10	71%	4	29%	14	11%		
其他專科	神經科	1	100%	0	0%	1	1%		
	復健科	0	0%	1	100%	1	1%		
	小計	1	50%	1	50%	2	2%		
兒童專科	兒科	0	0%	1	100%	1	1%		
Total		74	59%	52	41%	126	100%		

就診科別以內科共 109 株(佔 87%)為最多，其中腎臟科和胸腔內科分別為 33%及 18%。

表六 年齡分層及抗藥性分類

年齡分層	抗藥性分類		MSSA		MRSA		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<20	1	50%	1	50%	2	2%		
20-40	14	82%	3	18%	17	13%		
41-60	24	71%	10	29%	34	27%		
61-80	23	48%	25	52%	48	38%		
>80	12	48%	13	52%	25	20%		
Total	74	59%	52	41%	126	100%		

多數病人集中在 41 到 80 歲(佔 65%)，60 歲以下 CO-MSSA 均多於 CO-MRSA 的比率，但 60 歲以上則反之。



表七 性別及抗藥性分類

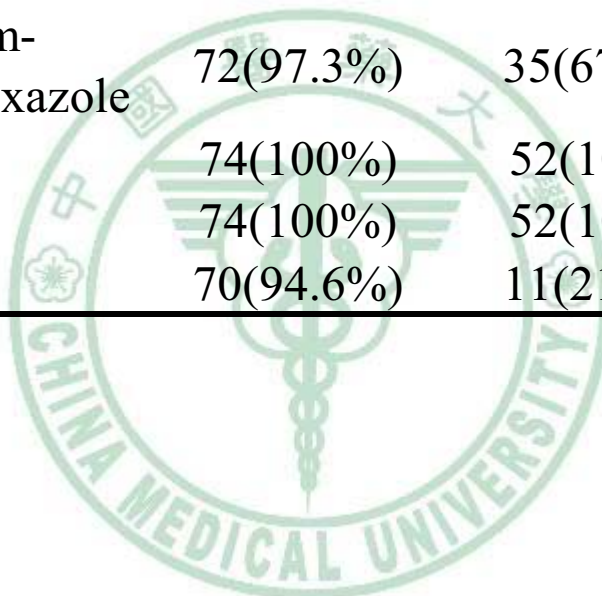
性別	抗藥性分類		MSSA		MRSA		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Male	48	64%	27	36%	75	60%		
Female	26	51%	25	49%	51	40%		
Total	74	59%	52	41%	126	100%		

男女比率為 1.47。



表八 CO-MRSA 菌株抗生素感受性分析

菌株總數		Community-onset(n=126) No. of strains(%)	
抗生素	抗藥性分類	CO-MSSA (n=74)	CO-MRSA (n=52)
Penicillin		4(5.4%)	0(0%)
Erythromycin		62(83.8%)	9(17.3%)
Clindamycin		62(83.8%)	10(19.2%)
Trimethoprim- sulfamethoxazole		72(97.3%)	35(67.3%)
Teicoplanin		74(100%)	52(100%)
Vancomycin		74(100%)	52(100%)
Gentamicin		70(94.6%)	11(21.2%)



表九 Spermine 對 oxacillin 的影響

	MSSA(n=74)				MRSA(n=52)			
	< 2 $\mu\text{g/mL}$ (S)	2 - 4 $\mu\text{g/mL}$	> 4 $\mu\text{g/mL}$ (R)	< 2 $\mu\text{g/mL}$ (S)	2 - 4 $\mu\text{g/mL}$	> 4 $\mu\text{g/mL}$ (R)	n(%)	n(%)
oxacillin	72(97.3%)	1(1.4%)	1(1.4%)	1(1.9%)	2(3.8%)	49(94.2%)	n(%)	n(%)
oxacillin + spermine(pH6.5)	73(98.6)	1(1.4%)	0(0%)	21(40.4%)	9(17.3%)	22(42.3%)		
oxacillin + spermine(pH7.4)	74(100%)	0(0%)	0(0%)	41(78.8%)	2(3.8%)	9(17.3%)		

126 株測試菌株中，Mueller-Hinton agar plate 若多添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，則在 MSSA 中 100%對 oxacillin 為感受性；相反的，在 MRSA 中僅有 9 株對 oxacillin 為抗藥性(17.3%)。

表十 Spermine 與 pH 值對 oxacillin 之 MIC 的比較

對數差異	MSSA(n=74)						MRSA(n=56)					
	0	<2	2~4	5~8	>9		<2	2~4	5~8	>9		
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
oxacillin-[oxacillin + spermine(pH6.5)]	9(12.2%)	32(43.2%)	31(41.9%)	2(2.7%)	0(0%)	14(26.9%)	2(3.8%)	11(21.2%)	19(36.5%)	6(11.5%)		
oxacillin-[oxacillin + spermine(pH7.4)]	0(0%)	4(5.4%)	67(90.5%)	2(2.7%)	1(1.4%)	6(11.5%)	1(1.9%)	3(5.8%)	15(28.8%)	27(51.9%)		

測試菌株先將最低抑菌濃度的測試結果予以 log2 後，再進行差異比較，在 MSSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異介於 2~4 之間的有 67 株(90.5%)；在 MRSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 42 株(80.7%)。

表十一 Spermine 對 penicillin 的影響

	MSSA(n=74)		MRSA(n=52)	
	<0.12 µg/mL(S)	>0.25 µg/mL(R)	<0.12 µg/mL(S)	>0.25 µg/mL(R)
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
penicillin	4(5.4%)	70(94.6%)	0(0%)	52(100%)
penicillin + spermine(pH6.5)	19(25.7%)	55(74.3%)	7(13.5%)	45(86.5%)
penicillin + spermine(pH7.4)	70(94.6%)	4(5.4%)	34(65.4%)	18(34.6%)

126 株測試菌株中，Mueller-Hinton agar plate 若多添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，在 MRSA 中則有 18 株對 penicillin 為抗藥性(34.6%)。

表十二 Spermine 與 pH 值對 penicillin 之 MIC 的比較

	MSSA(n=74)					MRSA(n=52)				
	0 n(%)	<2 n(%)	2~4 n(%)	5~8 n(%)	>9 n(%)	0 n(%)	<2 n(%)	2~4 n(%)	5~8 n(%)	>9 n(%)
penicillin-[penicillin + spermine(pH6.5)]	2(2.9%)	3(4.3%)	19(25.7%)	49(65.7%)	1(1.4%)	1(1.9%)	6(11.5%)	16(30.8%)	25(48.1%)	4(7.7%)
penicillin-[penicillin + spermine(pH7.4)]	2(2.7%)	2(2.7%)	9(12.2%)	32(43.2%)	29(39.2%)	0(0%)	0(0%)	7(13.5%)	14(26.9%)	31(59.6%)

測試菌株先將最低抑菌濃度的測試結果予以 log2 後，再進行差異比較，在 MSSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 penicillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 61 株(82.4%)；在 MRSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 penicillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 45 株(86.5%)。

表十三 Spermine 對 ampicillin 的影響

	MSSA(n=74)		MRSA(n=52)	
	<0.25 µg/mL(S)	>0.5 µg/mL(R)	<0.25 µg/mL(S)	>0.5 µg/mL(R)
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
ampicillin	1(1.4%)	73(98.6%)	0(0%)	52(100%)
ampicillin + spermine(pH6.5)	19(25.7%)	55(74.3%)	1(1.9%)	51(98.1%)
ampicillin + spermine(pH7.4)	51(68.9%)	23(31.1%)	26(50%)	26(50%)

126 株測試菌株中，Mueller-Hinton agar plate 若多添加了 spermine 1mM (且 pH 為 7.4)後，則在 MSSA 中有 51 株(68.9%) 對 ampicillin 為感受性；相反的；在 MRSA 有 26 株對 ampicillin 為抗藥性(50%)。

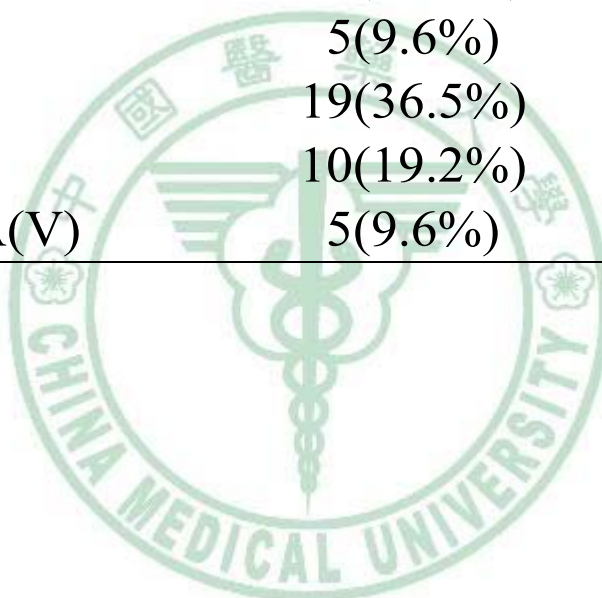
表十四 Spermine 與 pH 值對 ampicillin 之 MIC 的比較

	MSSA(n=74)						MRSA(n=52)							
	0	<2	2~4	5~8	>9	0	<2	2~4	5~8	>9	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
對數差異	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
ampicillin-[ampicillin + spermine(pH6.5)]	1(1.4%)	5(7.1%)	52(68.6%)	15(21.4%)	1(1.4%)	9(16.1%)	6(10.7%)	25(44.6%)	16(28.9%)	0(0%)				
ampicillin-[ampicillin + spermine(pH7.4)]	1(1.4%)	1(1.4%)	22(29.7%)	33(44.6%)	17(23%)	4(7.7%)	4(7.7%)	7(13.5%)	21(40.4%)	16(30.8%)				

測試菌株先將最低抑菌濃度的測試結果予以 log2 後，再進行差異比較，在 MSSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 50 株(67.6%)；在 MRSA 族群中，如添加 spermine 1mM 且 pH 為 7.4，則與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 37 株(71.2%)。

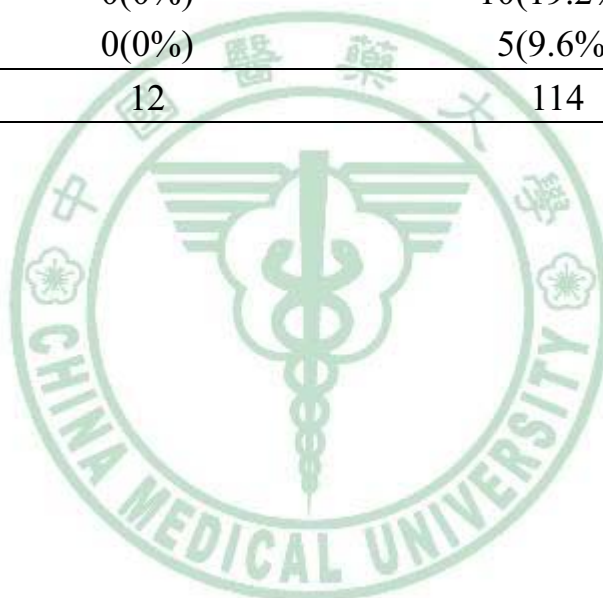
表十五 SCCmec typing 的結果

菌株總數	Community-onset MRSA(n=52)
SCC分型	No. of strains(%)
I	1(1.9%)
IA	2(3.8%)
II	10(19.2%)
III	5(9.6%)
IIIA	19(36.5%)
IV	10(19.2%)
only mecA(V)	5(9.6%)



表十六 PVL 毒性基因的結果

菌株分型	PVL(+) No. of strains(%)	PVL(-) No. of strains(%)	Total
MSSA	7(9.5%)	67(90.5%)	74
MRSA	I	0(0%)	1(1.9%)
	IA	0(0%)	2(3.8%)
	II	1(1.9%)	9(17.3%)
	III	0(0%)	5(9.6%)
	IIIA	4(7.7%)	15(28.8%)
	IV	0(0%)	10(19.2%)
V	0(0%)	5(9.6%)	
Total	12	114	126

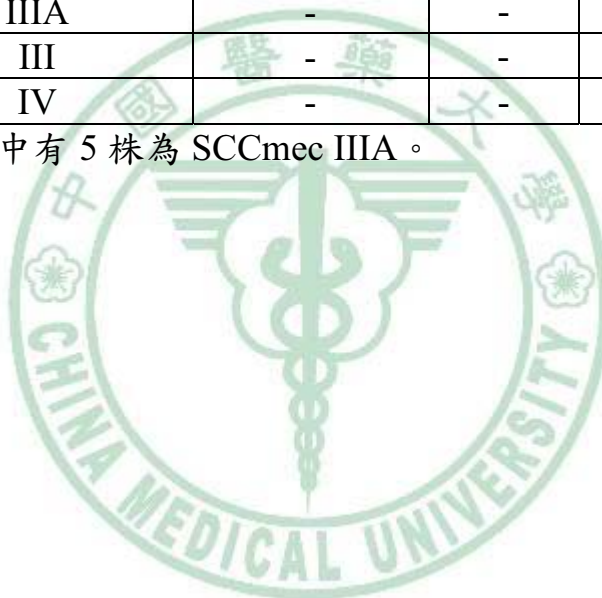


表十七 Bocillin 標示與 SCCmec typing 的結果

這 9 株中沒有任何一株是帶有

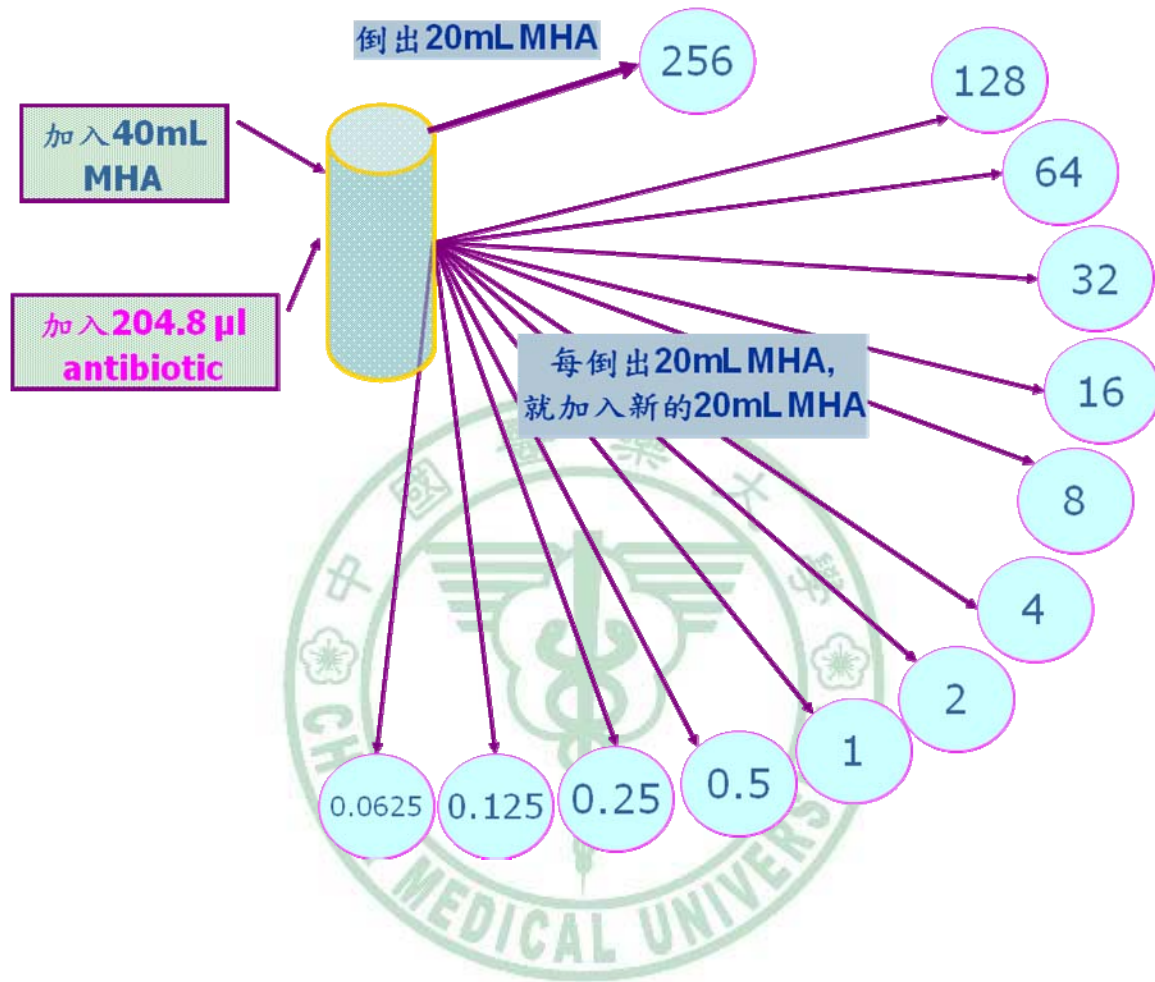
序號	SCCmec type	PVL gene	PBP1	PBP2a	PBP4
1	IIIA	-	-	+	-
2	III	-	-	+	-
3	III	-	-	+	-
4	IIIA	-	-	+	-
5	IIIA	-	-	+	-
6	IIIA	-	-	+	-
7	IIIA	-	-	+	+
8	III	-	-	+	+
9	IV	-	-	+	+

PVL gene，而其中有 5 株為 SCCmec IIIA。



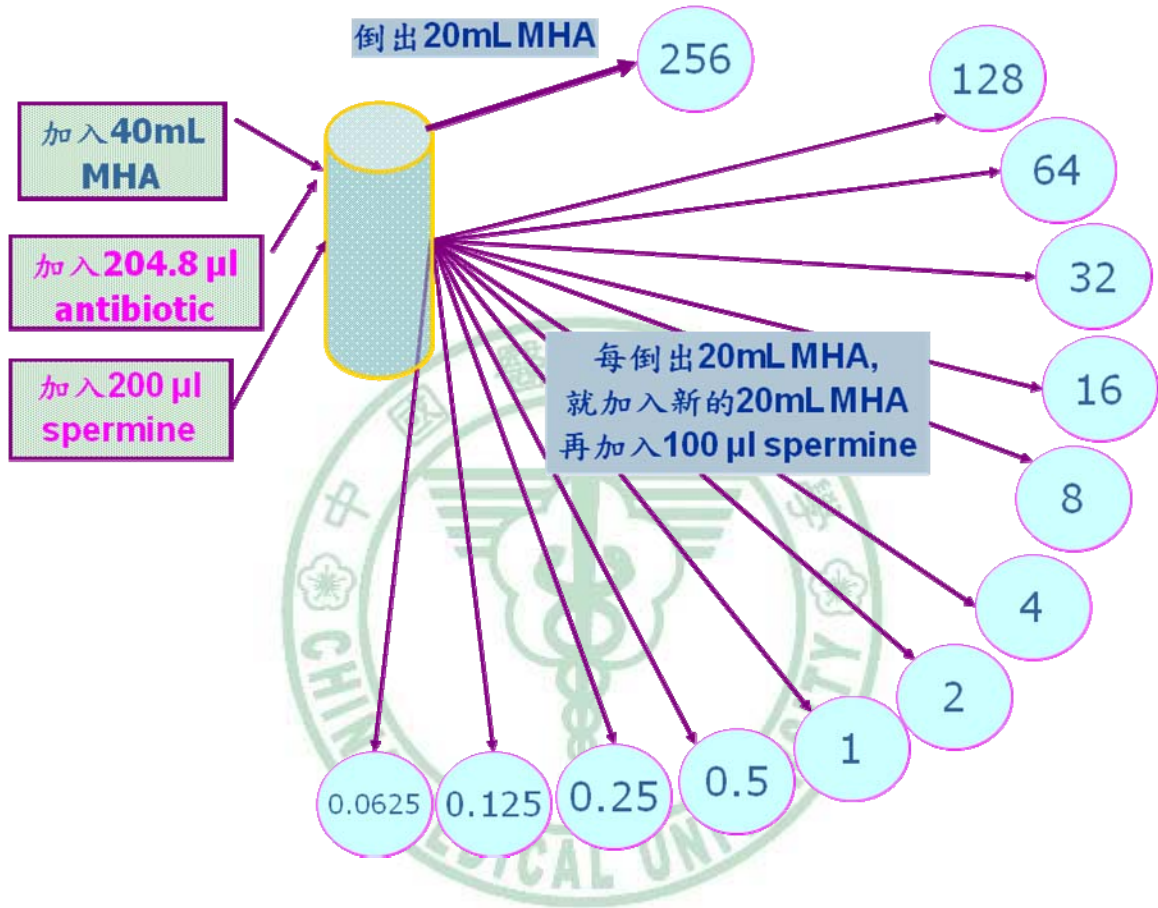
圖一 配製抗生素之 MIC Mueller-Hinton agar plate

配製不同濃度 β -lactam 類之抗生素的 Mueller-Hinton agar，抗生素的濃度由 256 $\mu\text{g/ml}$ 至 0.06 $\mu\text{g/ml}$ 。



圖二 配製抗生素之 MIC Mueller-Hinton agar plate 且添加 Spermine

配製不同濃度 β -lactam 類之抗生素的 Mueller-Hinton agar(Spermine 最後濃度為 1 mM)，同時須調整 pH 值為 6.5 及 7.4。



圖三 抗生素敏感性測試

利用紙錠擴散法 (disc agar diffusion) 來了解抗生素敏感性的作用，將 MacFarland 達 0.5 的菌液，塗抹在 MHA 上，貼上抗生素，放入 33°C 培養箱中，隔夜培養後量取紙錠周圍的抑制環直徑。

圖 a



圖 b



- a) 該菌株為 MRSA：sensitive for Vancomycin、Teicoplanin、Trimethoprim-sulfamethoxazole
- b) 該菌株為 MSSA：sensitive for Vancomycin、Teicoplanin、Trimethoprim-sulfamethoxazole、Erythromycin、Clindamycin、Oxacillin

圖四 CO-MRSA 添加 spermine 後對 oxacillin 的影響

圖 a

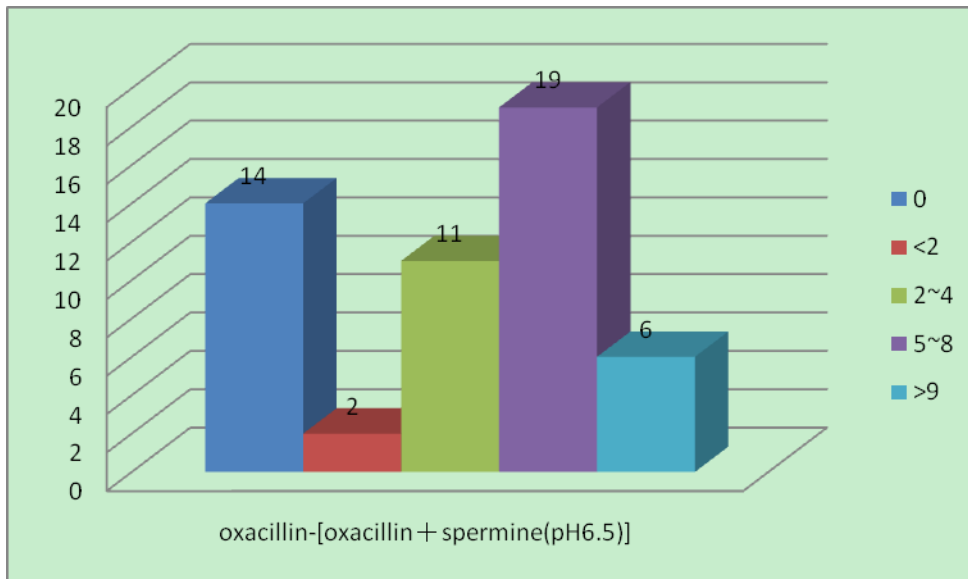
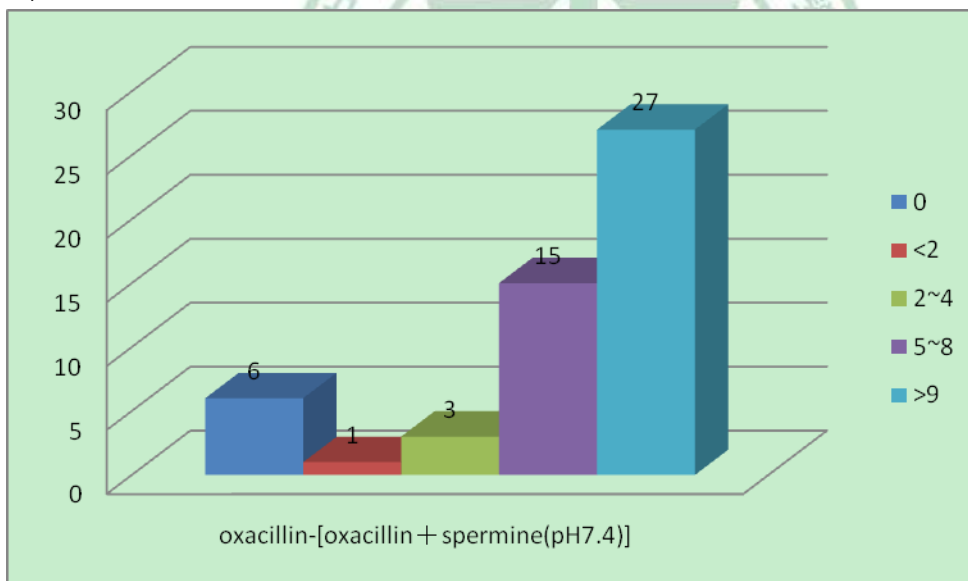


圖 b



- a) 在 MRSA 中添加 spermine 且 pH 為 6.5，與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 25 株(48%)。
- b) 在 MRSA 中添加 spermine 且 pH 為 7.4，與單純只添加 oxacillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 42 株(80.7%)。

圖五 CO-MRSA 添加 spermine 後對 penicillin 的影響

圖 a

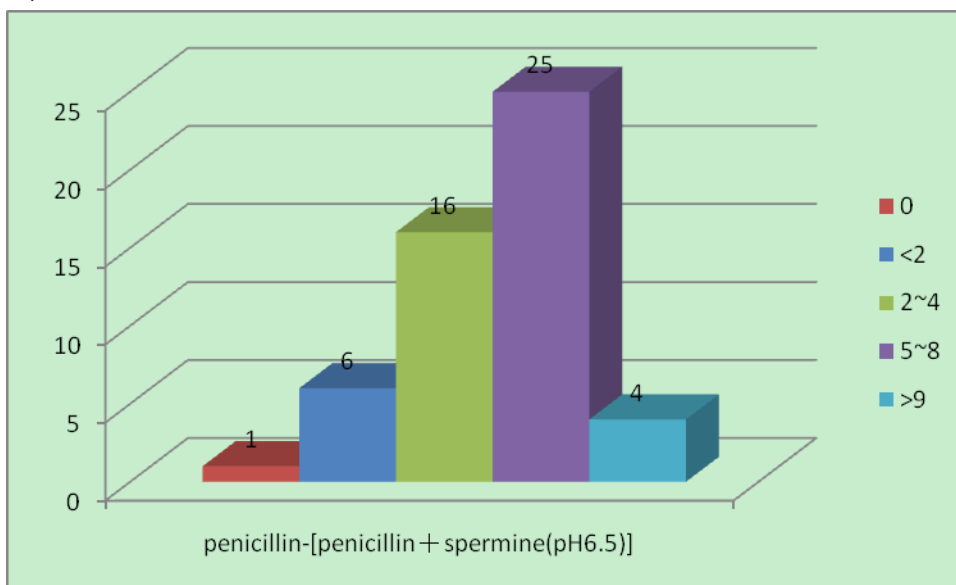
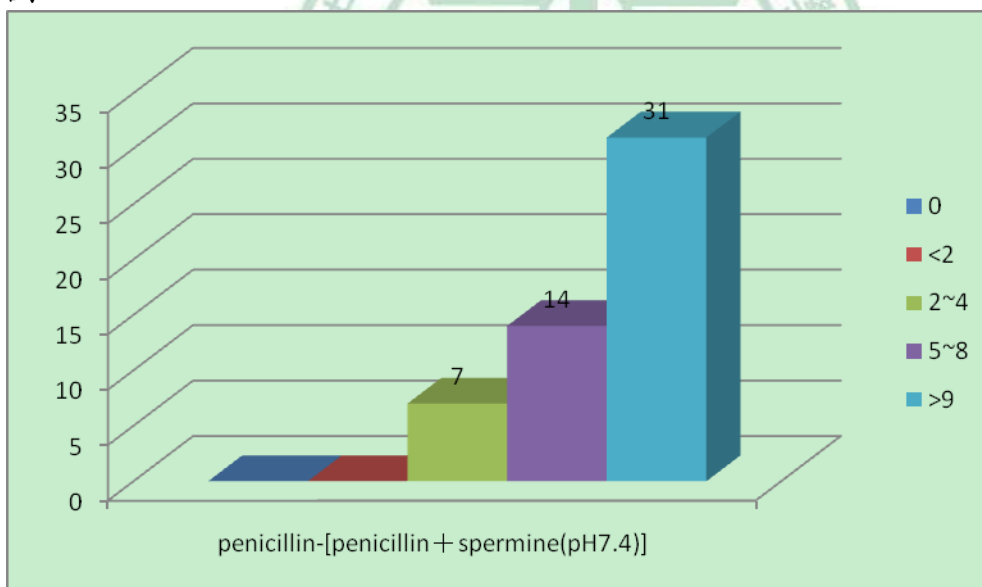


圖 b



- a) 在 MRSA 中添加 spermine 且 pH 為 6.5，與單純只添加 penicillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 29 株(55.8%)。
- b) 在 MRSA 中添加 spermine 且 pH 為 7.4，與單純只添加 penicillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 45 株(86.5%)。

圖六 CO-MRSA 添加 spermine 後對 ampicillin 的影響

圖 a

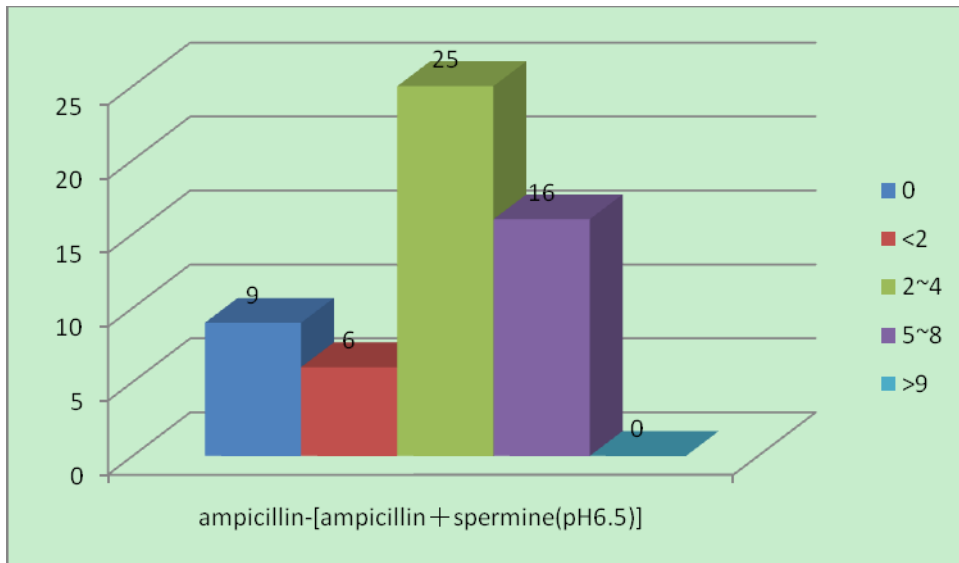
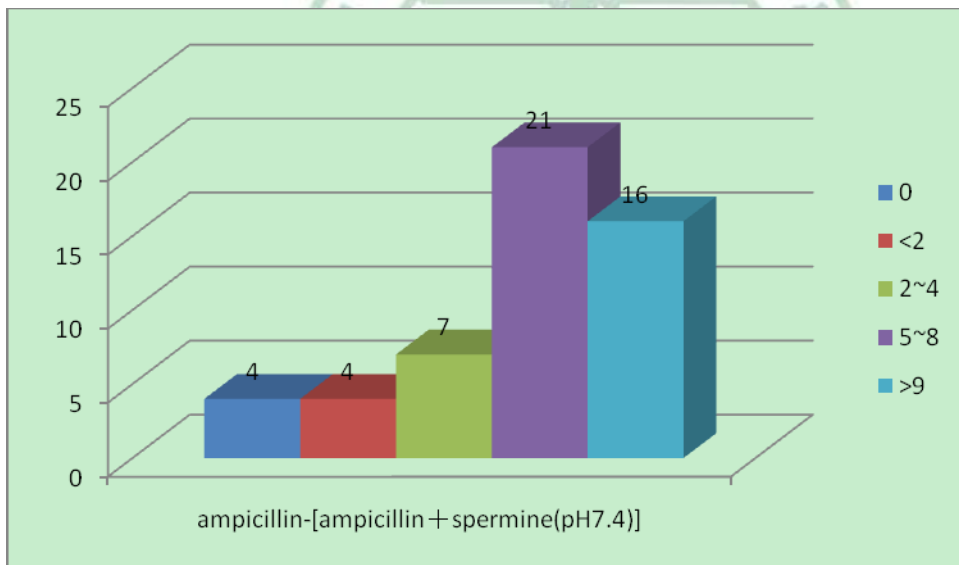
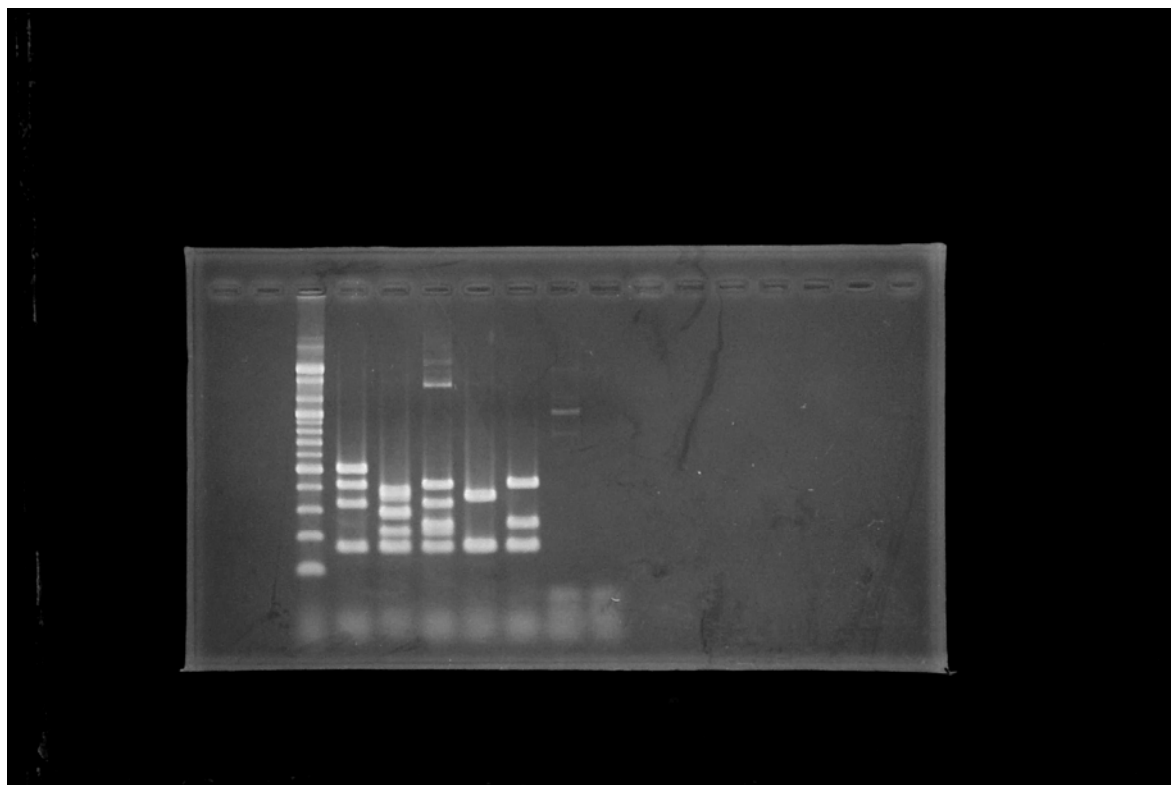


圖 b



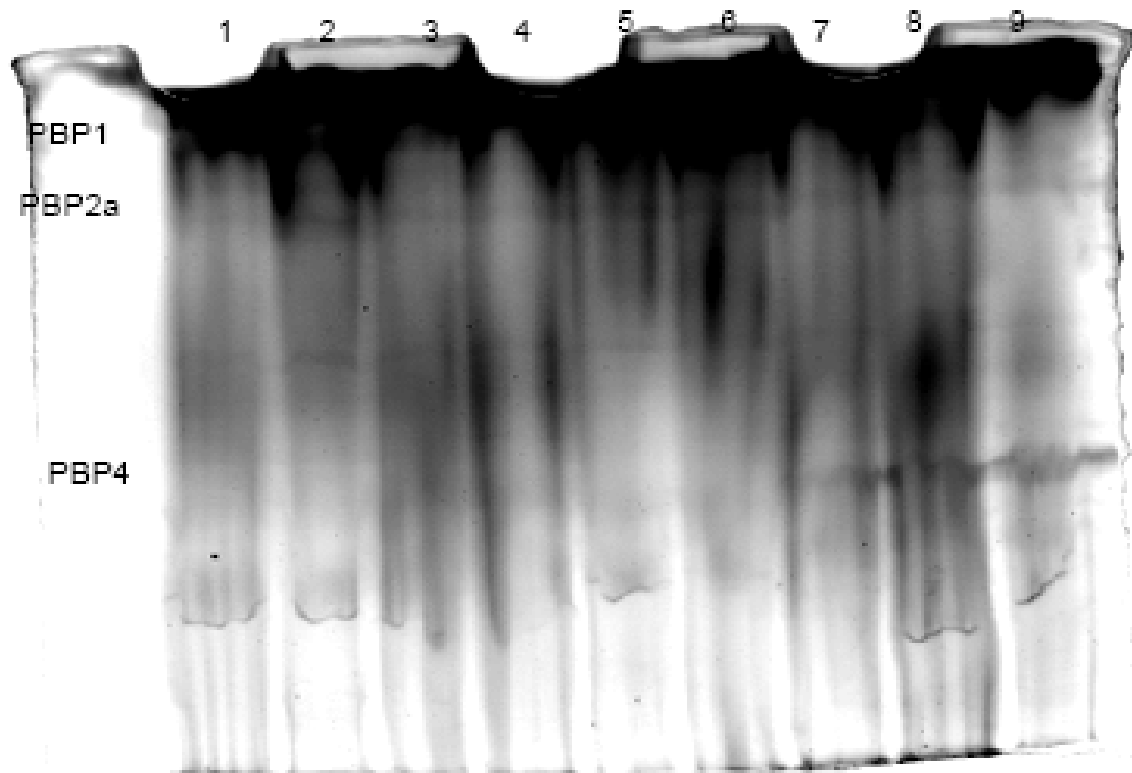
- a) 在 MRSA 中添加 spermine 且 pH 為 6.5，與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異介於 2~4 之間的有 25 株(44.6%)。
- b) 在 MRSA 中添加 spermine 且 pH 為 7.4，與單純只添加 ampicillin 的 MIC 對數差異大於 5 的有 37 株(71.2%)。

圖七 聚合酶連鎖反應進行金黃色葡萄球菌 SCCmec 分型



mecA 為 internal control 位置在 162bp，第一株 SCCmec IA 具有 162、342、381、495bp 四個片段，第二株 SCCmec II 具有 162、209、284、342、381bp 五個片段，第三株 SCCmec IIIA 具有 162、209、243、303、414bp 五個片段、第四株 SCCmec IV 具有 162、342bp 兩個片段、第五株 V_T 具有 162、243、414 三個片段(此為台灣特有型)，第六株為 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 作為 internal negative control，第七順位為 Dist. water。

圖八 Bocillin Labeling of PBPs 的結果



將 9 株對添加了 spermine (且 pH 為 7.4) 後，仍為抗藥性，來進行 Bocillin 標示 penicillin-binding proteins(PBPs)，這當中 No.1 ~ 9 皆被標示為 PBP2a，但 No7 ~9 同時被標示為 PBP4。