



國立台灣大學醫學院微生物學研究所

博士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

台灣克雷伯氏肺炎桿菌抗克痢黴素機制之研究

Colistin-resistant mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* in
Taiwan

鄭伊翔

Yi-Hsiang Cheng

指導教授：王錦堂 教授

Advisor: Jin-Town Wang, Professor

中華民國 106 年 1 月

January 2017

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：台灣克雷伯氏肺炎桿菌抗克痢黴素機制之研究

英文題目：Colistin-resistant mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan

本論文係 鄭伊翔 君（學號 D00445004）在國立臺灣大學微生物學所完成之博士學位論文，於民國 105 年 12 月 29 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王錦堂

（簽名）

（指導教授）

黃信達

盛望徽

蔡中奇

張永祺

系主任、所長

鄭運輝

（簽名）

誌謝


回憶起 2011 年的入學考試，雖然只考了一科，但就足夠我寫一整
個上午，懵懵懂懂的我就是從這裡開始了博士班人生。進到了實驗室後
不知不覺已經過了五年半，這段時間說長不長說短不短，但已經讓當年
茫茫然的我成長許多。

如今能夠寫出這本博士論文，要感謝我的父母，如果沒有你們的支
持，我今天就沒有辦法達成這一點小小的成就。感謝我的指導老師王錦
堂老師，謝謝老師這幾年的教導，老師總是能在我們實驗遇到困難的時
候點出可能的問題。感謝林稚容老師，謝謝妳不厭其煩的跟我討論實驗，
讓我突破實驗的瓶頸，才讓我完成了這本論文。感謝董馨蓮老師、盛望
徽老師、蔡丰喬老師、張永祺老師，謝謝你們提供我不一樣的觀點，讓
這份論文更加豐富，也提供我未來研究的方向。感謝佩芳學姊、怡均學
姊、淳茹學姊，謝謝妳們總是在我有困難的時候給我建議，讓我學習如
何解決問題。感謝依吟學姊，謝謝妳不論在實驗還是生活上總是陪伴著
我，給我建議，伴我渡過漫漫的博士班人生。感謝實驗室的學弟妹們，
謹廷、涵如、青青、佳容、品瑄、柏安、俊堂、昀庭、詠晴、沛吟、一
瑋、艾琳、俐吟、芷華、曼華、怡柔、柏勳、婉婷、彥溥。謝謝你們這
幾年來的陪伴，你們給實驗室帶來許多歡樂，讓實驗室除了儀器的噪音
外多了一點歡笑聲，也替我的研究生時光帶來不一樣的色彩。

中文摘要



克痢黴素為治療多重抗藥性克雷伯氏肺炎桿菌感染的最後一線抗生素。為了研究台灣抗克痢黴素克雷伯氏肺炎桿菌的抗藥機制，本研究分析了 26 株抗克痢黴素臨床菌株。結果顯示 K64 和 ST11 分別為台灣抗克痢黴素菌株最主要的莢膜型和序列型。前人研究指出，細菌可以利用 *pmrHIJKLM* 和 *pmrC* 增加脂多醣 Ara4N 和 PEtN 兩種修飾，進而得到克痢黴素抗藥性。因此我們檢驗臨床菌株 *pmrH* 和 *pmrC* 的基因表現量，結果發現 *pmrHIJKLM* 和 *pmrC* 分別於 96.2% (25/26) 和 38.5% (10/26) 的抗藥性菌株中有顯著的上升。進一步研究 *pmrHIJKLM* 和 *pmrC* 之相關調控分子，在 26 株菌株中有 8 株之 *mgrB* 的編碼區或啟動子有外來插入序列 IS5-like 和 IS10R，並且有 2 株之 *mgrB* 序列被剔除。而後續也於其他 15 株中分別發現 MgrB、PhoP、PhoQ、PmrB 以及 CrrB 中有胺基酸的改變。將 MgrB C28Y、Stop48Y 和 PhoQ L26P 以及 CrrB Q10L、Y31H、W140R、N141I、P151S、S195N 轉移至感受性菌株後，使感受性菌株變成克痢黴素抗藥性菌株。由此可知台灣克痢黴素之抗藥性主要是藉由 *mgrB* 改變所導致 (14/26, 53.8%)，其次則為 *crrB* 的點突變所造成 (8/26, 30.8%)。而僅有菌株 Col5 既無 *pmrH* 和 *pmrC* 的表現量增加，且不帶有已知的突變位點，因此抗藥性產生的原因尚不清楚。由於 *crrAB* 為新發現之基因，因此我們進一步研究 *crrAB*



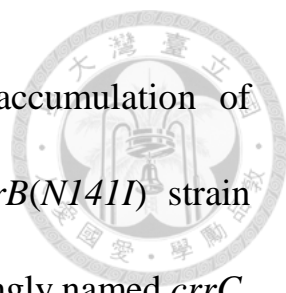
如何導致抗藥性的產生。結果顯示 *crrB* 的突變會導致下游基因 *H239_3062* 的表現量升高。而將 *H239_3062* 剔除後，克痢黴素抗藥性即大幅度下降，因此將 *H239_3062* 命名為 *crrC*。我們也發現 *crrC* 是藉由提升下游 *pmrAB* 的表現量，使 *pmrHIJKLM* 和 *pmrC* 表現量升高，進而產生抗藥性。此外 *crrB* 的突變不僅會增加 *crrC* 的表現，也會增加 *crrC* 下游基因 *H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 的表現量，而剔除 *H239_3063* 和 *H239_3064* 使得菌株對克痢黴素的抗藥性下降 8 倍。總結來說，台灣克痢黴素的抗藥性主要由調控子 (*mgrB*、*phoQ*、*pmrB* 和 *crrB*) 的突變，進而增加脂多醣的修飾所造成。除此之外，*crrB* 的突變會使 *H239_3063* 和 *H239_3064* 的表現量增加，進而使細菌增加對克痢黴素的耐受性。

關鍵字：克雷伯氏肺炎桿菌、克痢黴素、*mgrB*、*crrAB*、*crrC*

Abstract



Colistin is an important antibiotic for the treatment of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. To study the resistance mechanism(s) to colistin, 26 colistin-resistant *K. pneumoniae* strains in Taiwan were collected. The K64 (50%) and ST11 (53.9%) are the prevalent capsular and ST types in colistin-resistant strains of Taiwan. Previous studies indicated modification of lipid A with Ara4N or PEtN by *pmrHFIJKLM* or *pmrC* reduce susceptibility to colistin. In our 26 strains, expressions of *pmrHFIJKLM* and *pmrC* were significantly increased in 96.2% (25/26) and 38.5% (10/26) strains. Moreover, regulations of *pmrHFIJKLM* and *pmrC* were studied. Results showed IS5-like or IS10R element were inserted in promoter or coding region of *mgrB* in 8 strains, and *mgrB* was absence in 2 strains. Amino acid substitutions of MgrB, PhoP, PhoQ, PmrB and CrrB were detected in remaining 15 strains. Site-directed mutations in a colistin-susceptible strain demonstrated MgrB (C28Y and Stop48Y), PhoQ (L26P) and CrrB (Q10L, Y31H, W140R, N141I, P151S and S195N) contributed to colistin resistance. These data indicated *mgrB*-mediated resistance is a major mechanism (14/26) contributing to colistin resistance in Taiwan, and amino acid substitutions in CrrB (8/26) is secondary. Regulation of *crrAB* was



further studied. The *crrB* mutants showed increased accumulation of *H239_3062*. Deletion of *H239_3062* in the A4528 *crrB(N141I)* strain attenuated colistin resistance, and *H239_3062* was accordingly named *crrC*. Furthermore, expressions of *H239_3063*, *H239_3064* and *H239_3065* were increased in *crrB(N141I)* strain. Deletion of *H239_3063* and *H239_3064* could decrease colistin resistance in *crrB(N141I)* strain. In conclusion, elevated modifications of lipopolysaccharide due to mutations of regulators (*mgrB*, *phoQ*, *pmrB* and *crrB*) is a major mechanism of colistin resistance in Taiwan. Moreover, mutations of *crrB* induce expressions of *H239_3063* and *H239_3064*, and increased *H239_3063* and *H239_3064* enhance tolerance of colistin in *K. pneumoniae*.

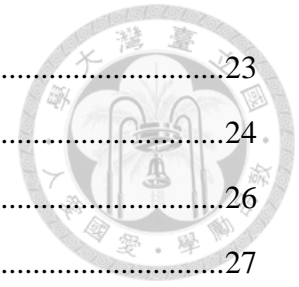
Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, colistin, *mgrB*, *crrAB*, *crrC*

目錄



口試委員審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
第一章 前言.....	1
克雷伯氏肺炎桿菌.....	1
克痢黴素.....	3
克痢黴素的抗藥性.....	4
研究目的.....	5
第二章 實驗材料與方法.....	7
菌株及培養條件.....	7
抗生素感受性測試.....	8
辨別莢膜型和序列分型.....	8
偵測基因表現量.....	9
序列分析.....	9
南方墨點法.....	10
定點突變.....	11
剔除株的建立.....	13
建立跳躍子突變株庫.....	14
半隨機聚合酶連鎖反應.....	14
第三章 實驗結果.....	16
莢膜型與序列型分佈.....	16
脂多醣修飾可能為主要克痢黴素抗藥性產生的原因.....	16
偵測 <i>mgrB</i> 基因的改變.....	18
PhoPQ 和 PmrAB 突變導致克痢黴素抗藥性的產生.....	20
CrrB 突變導致克痢黴素抗藥性的產生.....	21

CrrB 藉由 <i>H239_3062</i> 導致克痢黴素抗藥性.....	23
CrrC 藉由 PmrAB 調控 <i>pmrHFIJKLM</i> 操縱子	24
CrrB 突變導致較高克痢黴素的抗藥性.....	26
CrrB 突變導致 <i>H239_3064</i> 的表現量上升.....	27
<i>H239_3063</i> 和 <i>H239_3064</i> 大量表現導致克痢黴素抗藥性的產生.....	28
第四章 討論.....	30
多重抗藥型菌株之莢膜型.....	30
脂多醣修飾的比較.....	31
PhoPQ 利用 PmrD 調控 <i>pmrAB</i>	31
<i>crrAB</i> 及其鄰近序列的分析.....	32
<i>H239_3063</i> 和 <i>H239_3064</i> 增加四環黴素類抗生素耐受性.....	34
偵測臨床菌株是否帶有 <i>mcr-1</i> 基因	34
未來研究方向.....	35
第五章 結論.....	36
第六章 參考文獻.....	38



表目錄



表一、抗克痢黴素菌株之特徵與其在 MgrB、PhoP、PhoQ 和 PmrB 中偵測到的變異位置	47
表二、本研究所用之引子序列	49
表三、資料庫中用於比對 CrrAB 胺基酸序列之 46 株克痢黴素感受性菌株	52
表四、NTUH-K2044 菌株及其突變株之克痢黴素最小抑制濃度與 <i>pmrH</i> 基因表現量	54
表五、臨床菌株之克痢黴素最小抑制濃度及其 CrrB 胺基酸變異位置	55
表六、A4528 菌株及其 CrrB 點突變株之克痢黴素最小抑制濃度	56
表七、A4528 <i>crrB(N141I)</i> 及其 <i>crrC</i> 剔除與補回菌株之克痢黴素最小抑制濃度	57
表八、跳躍子所在位置及其突變株之數量和可能之功能描述	58
表九、A4528 <i>crrB(N141I)</i> 及 H239_3063、H239_3064 和 H239_3065 剔除菌株之克痢黴素最小抑制濃度	59

圖目錄



圖一、臨床菌株之 <i>pmrC</i> 基因表現量.....	60
圖二、於臨床菌株中偵測到 <i>mgrB</i> 區域的外來插入序列及突變位置.....	61
圖三、以聚合酶鏈鎖反應偵測 Col13、Col14 之 <i>mgrB</i> 序列.....	62
圖四、以南方墨點法證實菌株 Col13 和 Col14 不帶有 <i>mgrB</i> 區域之序列.....	63
圖五、以南方墨點法證實菌株 Col5、K2044、A9592、A5011 和 A4946 的基因體中不帶有 <i>crrA</i> 和 <i>crrB</i> 去氧核糖核酸序列.....	64
圖六、 <i>H239_3059</i> 和 <i>H239_3062</i> 之基因表現量在帶有 <i>crrB</i> 突變的菌株中有顯著的上升.....	65
圖七、A4528 菌株之 <i>crrB</i> 突變後，其 <i>pmrH</i> 之基因表現量即顯著的上升。而進一步剔除 <i>crrC</i> 或 <i>pmrAB</i> 後， <i>crrB</i> 突變株之 <i>pmrH</i> 表現量即顯著的下降.....	66
圖八、A4528 菌株之 <i>crrB(N141)</i> 突變後，其 <i>pmrA</i> 及 <i>pmrC</i> 之基因表現量即顯著的上升。進一步剔除 <i>crrC</i> 後， <i>crrB</i> 突變株之 <i>pmrA</i> 及 <i>pmrC</i> 表現量即顯著的下降，然而剔除 <i>pmrAB</i> 並不會影響 <i>crrC</i> 之基因表現量.....	67
圖九、A4528 菌株之 <i>H239_3063</i> 、 <i>H239_3064</i> 及 <i>H239_3065</i> 基因表現量均於 <i>crrB(N141)</i> 突變後有顯著的上升.....	68
圖十、以聚合酶鏈鎖反應確認 <i>crrC</i> 、 <i>H239_3063</i> 、 <i>H239_3064</i> 、 <i>H239_3065</i> 為同一操縱子.....	69
圖十一、克雷伯氏肺炎桿菌對克痢黴素產生抗藥性之機制與調控.....	70


第一章 前言



一、克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)


克雷伯氏肺炎桿菌屬於格蘭氏陰性桿菌、腸桿菌科。其特色為帶有大量多醣類交錯而成的莢膜層，故在電子顯微鏡的視野下可以看見豐富的莢膜層包覆於菌體外，且於瓊指平板上培養時可以觀察到光滑且具黏性的菌落型成。克雷伯氏肺炎桿菌為人體腸道的正常菌叢之一，同時存在於呼吸道及表皮上，為伺機性的病原菌。除此之外也能在植物、土壤和水中發現克雷伯氏肺炎桿菌的存在。克雷伯氏肺炎桿菌不僅可以造成院內感染，甚至可以造成社區感染，例如肺炎、化膿性肝膿瘍、尿道感染等疾病 (Lederman and Crum, 2005; Podschun and Ullmann, 1998; Siu *et al.*, 2012)。近年來在台灣更發現克雷伯氏肺炎桿菌所造成的原發性化膿性肝膿瘍有逐年增加的趨勢 (Pope *et al.*, 2011)。

為了治療克雷伯氏肺炎桿菌的感染，臨床上常使用第三代頭孢菌素 (third-generation cephalosporin) 做為治療 (Rapp and Urban, 2012)，然而 TEM、SHV 和 CTX-M 等廣效性乙內醯胺酶 (extended-Spectrum β -Lactamases, ESBL) 能分解第三代頭孢菌素，因此使得第三代頭孢菌素對帶有廣效性乙內醯胺酶的克雷伯氏肺炎桿菌失去效用。近年來的研究也發現台灣 75 % 的克雷伯氏肺炎桿菌均為帶有廣效性乙內醯胺



酶的菌株 (Mendes *et al.*, 2013) ，迫使我們必須使用後一線抗生素來治療感染。而臨床上通常使用碳青黴烯類 (carbapenems) 的藥物來治療對第三代頭孢菌素有抗藥性的克雷伯氏肺炎桿菌感染 (Pitout and Laupland, 2008) 。但在抗生素的篩選之下，對碳青黴烯類藥物產生抗藥性的克雷伯氏肺炎桿菌也逐年增加 (Gupta *et al.*, 2011; Munoz-Price *et al.*, 2013) 。細菌可以利用碳青黴烯分解酶 (carbapenemase) ，例如新德里金屬 β -內醯胺酶 (New Delhi metallo- β -lactamase, NDM-1) 和克雷伯氏肺炎桿菌碳青黴烯分解酶 (*K. pneumoniae* carbapenemase, KPC) 等酵素分解碳青黴烯類藥物，而產生抗碳青黴烯克雷伯氏肺炎桿菌 (carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, CRKP) 。同時也有研究指出帶有廣效性乙內醯胺酶的克雷伯氏肺炎桿菌加上細菌孔蛋白 (porin) 的缺陷，也能導致克雷伯氏肺炎桿菌對碳青黴烯類藥物產生抗藥性 (Tzouveleakis *et al.*, 2012; Webster *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009) ，而當克雷伯氏肺炎桿菌對碳青黴烯類藥物產生抗藥性之後臨床上通常僅剩最後一線抗生素可供使用。

為了治療抗碳青黴烯之克雷伯氏肺炎桿菌感染，臨床上通常僅剩克痢黴素 (colistin) 、老虎黴素 (tigecycline) 和磷霉素 (phosphomycin) 三種抗生素可以使用 (Munoz-Price *et al.*, 2013) 。世界衛生組織更把克雷伯氏肺炎桿菌列為世界主要抗藥性威脅 ESKAPE (*Enterococcus*




faecium、*Staphylococcus aureus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Enterobacter species*) 菌株的其中一員 (Santajit and Indrawattana, 2016) ，因此研究最後一線抗生素的抗藥性產生機制顯得更為重要。

二、克痢黴素

克痢黴素也稱為多粘菌素 E (polymyxin E) ，為多粘菌素之一。早在 1947 時，於多粘芽孢桿菌 (*Bacillus polymyxa* var. *colistinus*) 中就已經被發現，為非核醣體合成之抗生素。克痢黴素在 1950 年後被廣泛的使用，而由於克痢黴素會產生神經毒性以及腎毒性，1980 年後逐漸停用 (Biswas *et al.*, 2012) 。近年來，為了治療多重抗藥性革蘭性陰性菌 (multidrug-resistant Gram-negative bacteria) 的感染，克痢黴素成為僅存的最後一線藥物之一，因此克痢黴素的抗藥機制也受到世界的關注。

克痢黴素包含帶有正電的胍肽鏈和脂肪酸鏈，胍肽鏈形成環狀的結構與脂肪酸鏈以醯胺鍵 (α -amide linkage) 的方式連結。克痢黴素的分子量為 1750 Da。由於脂肪酸可能為 6-甲基辛酸 (6-methyloctanoic acid) 或者是 6-甲基庚酸 (6-methyleptanoic acid) 而分成硫酸粘菌素 (colistin sulfate) 和黏菌素甲磺酸鈉 (colistimethate sodium) 兩種結構，而兩者皆於臨床上被使用 (Biswas *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005) 。



帶有正電的克痢黴素會和帶有負電的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 進行交互作用。克痢黴素會取代細胞外膜上的鎂離子和鈣離子與脂多醣形成穩定的結合。而克痢黴素的累積使得細菌的外膜受到干擾，整個過程造成細胞膜的通透性的改變，最終使細胞膜破損最終導致細菌死亡 (Hancock, 1997)。

然而伴隨克痢黴素的使用，抗克痢黴素的克雷伯氏肺炎桿菌也逐年增加。國外近年來的研究已顯示抗碳青黴烯克雷伯氏肺炎桿菌同時具有克痢黴素抗藥性的比例約為 43 % (Monaco *et al.*, 2014)。而根據 2013 年的研究，台灣的抗碳青黴烯克雷伯氏肺炎桿菌約有 17 % 對克痢黴素具有抗藥性 (Chiu *et al.*, 2013)。因此也凸顯研究克雷伯氏肺炎桿菌對克痢黴素產生抗藥性機制的重要性。

三、克痢黴素的抗藥性


在克痢黴素的使用之下，抗克痢黴素的克雷伯氏肺炎桿菌逐漸產生。研究指出，細菌可以藉由改變脂多醣的負電性使其對克痢黴素的親和性下降，在部分菌種甚至演化出沒有脂多醣的突變株藉以逃避克痢黴素的結合 (Beceiro *et al.*, 2014; Garcia-Quintanilla *et al.*, 2014)。也有研究指出，部分輸出幫浦 (efflux pumps) 可以增加克痢黴素的耐受性，例如 *acrAB* (Padilla *et al.*, 2010)。儘管如此，在臨床上尚未發現因大量表



現輸出幫浦而產生克痢黴素抗藥性的臨床案例。

脂多醣主要藉由 4-氨基-4-脫氧-L-阿拉伯糖 (4-amino-4-deoxy-L-arabinose, Ara4N) 和磷酸乙醇胺 (phosphoethanolamine, PEtN) 兩種修飾來中和脂多醣上的負電荷 (Breazeale *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011; Gunn *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2007) 。而這兩種修飾分別是藉由基因 *pmrHFIJKLM* 操縱子 (operon) 和 *pmrC* 所達成 (Gunn *et al.*, 2000; Olaitan *et al.*, 2014) 。先前研究指出 *pmrHFIJKLM* 操縱子被兩套雙分子訊息調控系統 (two-components system) PmrAB 和 PhoPQ 所正向調控 (McPhee *et al.*, 2006) ，其中 PmrAB 更能同時調控 *pmrC* 的表現。而 PhoPQ 還有一個負向調控子 *mgrB* 。MgrB 為膜上的短胜肽鏈，在許多菌株中都發現有相似的基因存在，僅由 47 個胺基酸所組成，已知可以抑制 PhoQ 的自磷酸化，若 *mgrB* 被破壞或產生突變則無法抑制 PhoQ 的磷酸化，使其磷酸根傳遞至 PhoP 而使下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子大量表現，進而產生對克痢黴素的抗藥性 (Cannatelli *et al.*, 2013; Cannatelli *et al.*, 2014; Gaibani *et al.*, 2014) 。不僅是 *mgrB*，其下游 *pmrAB* 和 *phoPQ* 的胺基酸改變也可能增加脂多醣的修飾，進而導致克痢黴素抗藥性的產生 (Jayol *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2011) 。

四、研究目的



為了了解克痢黴素的抗藥性機制，本研究共收集 26 株抗克痢黴素之克雷伯氏肺炎桿菌，首先分析其莢膜型以及序列型，了解其在流行病學上的分佈。同時檢驗這些菌株是否有脂多醣修飾相關調控基因 (*mgrB*、*pmrA*、*pmrB*、*pmrD*、*phoP*、*phoQ*、*crrA* 和 *crrB*) 的突變，而導致脂多醣的修飾增加，使得菌株產生克痢黴素的抗藥性。並進一步了解調控子突變對下游基因的影響和調控，以及最終產生克痢黴素抗藥性的機制。

第二章 實驗材料與方法



一、菌株及培養條件

為研究抗克痢黴素之抗藥機制，我們與台北榮民總醫院林邑聰醫師合作，從 2013 年二月至八月共收集 26 株抗克痢黴素克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株 (表一)。26 株抗藥性菌株均來自於不同病房及病患，其中菌株 Col13 和 Col14 同時為碳青黴烯抗藥性菌株，且菌株 Col14 帶有雷伯氏肺炎桿菌碳青黴烯分解酶。在 26 個病人中，16 個病人曾經在台北榮民總醫院中進行過克痢黴素的治療，其餘則無法追蹤其用藥歷史。為了與抗藥性菌株進行基因序列和表現量比較，我們隨機挑選 8 株克痢黴素感受性菌株作為對照。並且使用大腸桿菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922 菌株做為抗生素感受性測試之品質管制組。大腸桿菌 DH10B 菌株則做為勝任細胞 (competent cell) 以方便進行去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 的剪輯和保存。所有菌株皆使用溶菌培養基 (Lysogeny broth, LB) 置於 37°C 培養箱中培養，且於固態培養基中添加 1.5% 瓊脂 (agar)。若進行菌株篩選則再分別於培養基中添加 100 µg/ml 氨苄青黴素 (ampicillin)、50 µg/ml 康黴素 (kanamycin) 或 100 µg/ml 氯黴素 (chloramphenicol)。



二、抗生素感受性測試

依據臨床與實驗室標準研究所 (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) 所發表的準則，我們使用瓊脂稀釋法 (agar dilution) 的方式分別稀釋克痢黴素或其他待測抗生素，並將其加入米勒-欣頓瓊脂培養基 (Müller-Hinton agar) 中。將待測菌株以生理食鹽水沖洗過後，把含有 10^4 菌落的點在含有抗生素的瓊脂培養基上。並於隔夜培養後判讀該抗生素之最小抑制濃度 (minimum inhibitory concentrations, MICs) 之實驗結果，每次實驗皆使用大腸桿菌 ATCC 25922 菌株做為品質管制組，以確認該次實驗步驟正確。

三、辨別莢膜型和序列分型

為了辨別臨床菌株之莢膜型，我們根據實驗室先前的研究，利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的方式增幅菌株的莢膜合成必須基因 *wzc* 的序列，定序反應產物後將其比對已發表的 80 種莢膜型 *wzc* 序列，以此決定出臨床菌株之莢膜型 (Pan *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2015)。

而辨認序列分型方面，我們根據法國巴斯德研究所提供的引子序列，分別增幅菌株的八個生長所需基因 (*rpoB*、*gapA*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*infB* 和 *tonB*) (Brisse *et al.*, 2009; Diancourt *et al.*, 2005)，同樣分別定序

反應產物後將其比對巴斯德研究所提供之資料庫
(<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>)，決定其菌株之序列分型。



四、偵測基因表現量

為了比較不同菌株間 *pmrH*、*pmrK*、*pmrA*、*pmrC*、*phoP*、*mgrB*、*H239_3059*、*H239_3062*、*H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 的基因表現量，我們將臨床菌株及突變株培養至生長指數期後，約取 3×10^8 的菌落並利用 RNeasy Mini Kit (Qiagen) 分別萃取其核糖核酸 (RNA)，再取其中 400 ng 的核糖核酸並使用 SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) 進行互補去氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 的合成。個別基因之互補脫氧核糖核酸再利用 Power SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 和 ABI 7900 Real-Time PCR (Applied Biosystems) 進行定量逆轉錄聚合酶連鎖反應 (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)，並利用 23S rRNA 的表現量做為內部控制組 (internal control)，其中聚合酶連鎖反應所需之引子皆列在表 2 中。基因的相對表現量則是利用 $\Delta\Delta C_t$ 的估計所計算，並使用 23S rRNA 的表現量進行標準化。


五、序列分析



為了分析 MgrB、PhoP、PhoQ、PmrD、PmrA、PmrB、CrrA 和 CrrB 等基因是否有胺基酸變異導致菌株產生克痢黴素抗藥性。我們利用聚合酶連鎖反應的方式分別放大這些基因片段，聚合酶連鎖反應所需的引子皆列於表二。反應產物經過定序後，分別將其轉譯成胺基酸序列並和克痢黴素感受性菌株進行序列比較。26 株抗藥性菌株之 MgrB、PhoP、PhoQ、PmrD、PmrA 和 PmrB 皆與 8 株感受性菌株進行比對，以剔除胺基酸的多型性，並將可能造成抗藥性產生的胺基酸位置列出。

而經過實驗驗證 MgrB、PhoP、PhoQ 和 PmrB 的部分胺基酸突變能導致抗藥性過後，仍有 9 株抗藥性菌株不清楚抗藥性產生的機制，因此進一步定序菌株 Col4、Col5、Col7、Col20、Col21、Col22、Col28、Col36 和 Col44 之 CrrA、CrrB 序列，其中 Col5 並無法利用聚合酶連鎖反應增幅 *crrAB* 之片段。而 8 株感受性菌株中也僅有 4 株 (A4528、ref. 64、N4252 和 N5906) 可以利用聚合酶連鎖反應增幅 *crrAB* 之片段，因此將 8 株抗藥性菌株之 *crrA*、*crrB* 序列與 4 株感受性菌株進行比對。由於只有比對 4 株感受性菌株之序列略顯不足，因此同時於與基因庫 (Genebank) 上帶有 *crrAB* 序列之 46 株克痢黴素感受性菌株做比較 (表三)，將可能造成抗藥性產生的胺基酸位置列出。


六、南方墨點法 (Southern blotting)



由於無法用聚合酶連鎖反應的方式增幅 Col13 和 Col14 菌株的 *mgrB* 序列，為了確認菌株中的 *mgrB* 是否不存在菌株 Col13 和 Col14 的基因體中，我們分別萃取 NTUH-K2044、Col13 和 Col14 菌株之去氧核糖核酸，並利用限制酶 HpaI 處理過後進行電泳分離不同大小之去氧核糖核酸片段。再將瓊脂糖凝膠 (agarose gel) 轉漬至 Hybond-N+ (Amersham) 上。而轉漬膜分別與專一序列之長葉毛地黃配質標記的去氧核糖核酸探針 (digoxigenin-labeled DNA probe) 進行雜交反應，長葉毛地黃配質標記的去氧核糖核酸探針則由聚合酶連鎖反應的方式所合成，反應所需的引子皆列於表二。雜交後的長葉毛地黃配質標記的去氧核糖核酸探針再與抗長葉毛地黃配質鹼性磷酸酶抗體 (anti-digoxigenin-alkaline phosphatase antibody) (Roche) 作用，並利用 CDP-Star 化學發光試劑 (chemiluminescence reagent) 進行呈色反應。


同樣為了偵測克痢黴素抗藥性菌株 Col5 和 4 株無法利用聚合酶連鎖反應增幅 *crrAB* 的克痢黴素感受性菌株是否帶有 *crrAB*，我們同樣萃取其基因體去氧核糖核酸並利用限制酶 PstI 進行處理。專一性之 *crrA* 和 *crrB* 長葉毛地黃配質標記去氧核糖核酸探針探針同樣使用聚合酶連鎖反應的方式合成，其餘步驟皆與 *mgrB* 相同。

七、定點突變 (Site-directed mutagenesis)



為了驗證在 *mgrB*、*phoP*、*phoQ* 和 *pmrB* 所找到胺基酸改變的位置是否真的能造成克痢黴素抗藥性的產生。我們利用融合聚合酶連鎖反應 (fusion PCR) 的方式製造單一點突變位點的聚合酶連鎖反應產物，並將帶有帶有點突變的去氧核糖核酸片段選殖進入經過限制酶 NotI 處理並補平的 pKO3-km 質體中 (Link *et al.*, 1997)。而後將帶有不同點突變片段的 pKO3-km 質體以電穿孔 (electroporation) 的方式送入克痢黴素感受性菌株 NTUH-K2044 當中，並將其培養在 30°C 培養箱中使 pKO3-km 質體在菌體中進行複製，同時使用康黴素進行篩選。之後將帶有質體之 NTUH-K2044 菌株轉移至 43°C 環境中進行培養，由於 pKO3-km 質體無法在高溫時進行複製，因此促使質體利用同源置換 (homologous recombination) 的方式嵌入基因體中。最後再將確認有 pKO3-km 質體嵌入基因體之菌株培養在含有 5% 蔗糖 (sucrose) 的瓊脂平板中，因 pKO3-km 質體中帶有 *sacB* 基因，因此將細菌培養在含有蔗糖的環境下會刺激細菌將質體從基因體中剔除。所得到的突變株再利用聚合酶連鎖反應的方式增幅欲突變的區域，並定序其序列以確認點是否得到帶有點突變的菌株。

而由於 NTUH-K2044 的基因體中並不存在 *crrAB* 的序列，因此為了驗證 *crrB* 特定的胺基酸改變是否真的能造成克痢黴素抗藥性的產生，我們將後續實驗更改置另一克痢黴素感受性菌株 A4528 中操作。我們



同樣利用融合聚合酶連鎖反應的方式創造帶有特定點突變的去氧核糖核酸片段並將其選殖進入 pKO3-km 當中，得到的質體同樣以電穿孔的方式送入感受性菌株 A4528 當中。後續的步驟則與於 NTUH-K2044 菌株相同，最後同樣以定序的方式確認是否得到正確點突變的 A4528 突變株。

八、剔除株的建立

為了建立 *pmrAB*、*H239_3059*、*H239_3062*、*H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 的剔除株。我們分別利用不同引子 (表二) 將 A4528 *crrB(N1411)* 菌株的 *pmrAB*、*H239_3059*、*H239_3062*、*H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 及其鄰近區域 (flanking region) 利用聚合酶連鎖反應增幅。並將反應所得到的產物選殖進入 CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) 當中。再分別利用不同引子 (表二) 進行反向聚合酶連鎖反應 (inverse PCR) 分別將 *pmrAB*、*H239_3059*、*H239_3062*、*H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 的基因編碼區 (coding region) 剔除。剔除後的基因片段利用聚合酶連鎖反應增幅後再將其選殖進入經過 NotI 處理並補平的 pKO3-km 質體之中。所得到的 pKO3-km 質體同樣利用電穿孔法送入 A4528 *crrB(N1411)* 菌株，後續步驟則與建立點突變菌株相同。最後利用聚合酶連鎖反應確認是否得到

pmrAB、*H239_3059*、*H239_3062*、*H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065*

的突變株。



九、建立跳躍子突變株庫 (transposon mutants library)

為了建立 *A4528 crrB(N141I)* 菌株之跳躍子突變株庫，我們將 *A4528 crrB(N141I)* 菌株與帶有 pUT-km1 質體之大腸桿菌 S17-1 隔夜培養之後各取 10^8 CFU 於 1ml 之 10mM $MgSO_4$ 中，並將此混合液滴至 0.22 μm 的薄膜上。將薄膜置於培養基上培養 4 個小時，再以 3ml 之 10mM $MgSO_4$ 將菌落沖下，將沖洗液塗於含有康黴素之基本培養基 (minimal media agar) 中，並置於 37°C 培養箱中培養。隔天長出的菌落即為帶有跳躍子之 *A4528 crrB(N141I)* 突變株。

十、半隨機聚合酶連鎖反應 (semi-random polymerase chain reaction)

為了知道跳躍子所插入基因體的位置，我們先利用跳躍子上的序列設計引子 (long-F 或 long-R) 搭配隨機序列引子 (CEKG2C) 對突變株進行第一次聚合酶連鎖反應。將得到的反應產物稀釋 100 倍後作為模板 (template)，配合跳躍子上的引子 (4647F 或 2921R) 及隨機序列引子 CEEKG2C 之確定序列 (CEKG4)，再進行第二次聚合酶連鎖反應 (Salama *et al.*, 2004)，所需的引子序列皆列於表二。而第二次聚合酶連

鎖反應所得到的產物再進行定序分析，即可得知跳躍子插入基因體的位置。



第三章 實驗結果




一、莢膜型與序列型分佈

根據歐盟標準，當最小抑制濃度大於 2 $\mu\text{g/ml}$ 時，即為抗藥性菌株。而在我們所收集的 26 株抗克痢黴素之克雷伯氏肺炎桿菌之中，有 30.8 % (8/26) 的菌株擁有高度抗藥性 ($\text{MICs} \geq 512 \mu\text{g/ml}$) (表一)，於前人研究中並不常見。其中菌株 Col14 及 Col40 同時具有碳青黴烯抗藥性，且 Col14 菌株帶有雷伯氏肺炎桿菌碳青黴烯分解酶。

進一步為了了解台灣抗克痢黴素之克雷伯氏肺炎桿菌莢膜型與序列型的分佈。我們利用 *wzc* 的序列以及 *rpoB*、*gapA*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*infB*、*tonB* 序列，比對資料庫後分別定出菌株之莢膜型與序列型。莢膜型的結果顯示，在 26 菌株中有 50 % (13/26) 為莢膜型 K64，11.5 % (3/26) 為莢膜型 K24，7.7 % (2/26) 為莢膜型 K54 (表一)。序列型則有 53.9 % (14/26) 的菌株為序列型 ST11，15.4 % (4/26) 為序列型 ST15，7.7 % (2/26) 為序列型 ST421 (表一)。結果顯示 K64 和 ST11 分別是台灣抗克痢黴素之克雷伯氏肺炎桿菌主要的莢膜型和序列型。而大部分莢膜型與序列型具有高度相關性，可能是由於菌株的演化所造成。

二、脂多醣修飾可能為主要克痢黴素抗藥性產生的原因



先前研究指出，克痢黴素的抗藥性是藉由增加脂多醣 4-氨基-4-脫氧-L-阿拉伯糖和磷酸乙醇胺的修飾所導致，而修飾的增加已知是藉由 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 的表現所達成 (Breazeale *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2007)。然而直接定量菌株的脂多醣修飾必須藉由質譜儀的分析才能達成。取而代之，我們利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應來檢測 *pmrH* 和 *pmrC* 的表現量是否有改變，以此方法比較脂多醣的修飾。我們將 26 株抗藥性菌株的 *pmrH* 表現量與 8 株克痢黴素感受性克雷伯氏肺炎桿菌比較。結果顯示 26 株抗藥性菌株中，有 23 株菌株的 *pmrH* 基因表現量相較於感受性菌株有顯著的上升 (表一)，而其中 3 株抗克痢黴素菌株與克雷伯氏肺炎桿菌之 *pmrH* 表現量與感受性菌株相比並無顯著差異。為了再確認 3 株 *pmrH* 表現量無顯著上升之菌株是否無 *pmrHFIJKLM* 操縱子的大量表現，因此我們同時檢測了基因組中的 *pmrK* 基因表現量，結果顯示未顯著增加 *pmrH* 表現量的三株菌株中，有兩株之 *pmrK* 表現量相較於感受性菌株有顯著的上升，僅有菌株 Col5 並無 *pmrH* 和 *pmrK* 顯著上升 (表一)。而 26 株抗克痢黴素菌株中，有 10 株菌株的 *pmrC* 基因表現量相較於 8 株感受性菌株有顯著的上升 (圖一)。然而菌株 Col5 不論是 *pmrH*、*pmrK* 或 *pmrC* 都沒有顯著的上升。因此我們推測，我們所收集的 26 株抗克痢黴素克雷伯氏肺炎桿菌中有 25 株可能是藉由增加脂多醣的 4-氨基-4-脫氧-L-阿拉伯糖修飾而


產生克痢黴素抗藥性，其中 10 株菌株同時增加磷酸乙醇胺的修飾。



三、偵測 *mgrB* 基因的改變

先前研究指出，*pmrHFIJKLM* 操縱子表現量上升，可能是由於上游的調控子 *mgrB* 突變或受到外來插入序列破壞所導致 (Cannatelli *et al.*, 2013; Cannatelli *et al.*, 2014)。因此我們利用聚合酶連鎖反應的方式將 26 株抗克痢黴素菌株的 *mgrB* 序列放大並定序來檢驗 *mgrB* 序列是否有改變。結果顯示 26 株菌株中有 3 株之 *mgrB* 編碼區域 (coding region) 中存在外來插入序列 (insertion sequences)，而其中 5 株之 *mgrB* 啟動子區域 (promotor region) 帶有外來插入序列 (圖二)(表一)，經過比對可知外來插入序列分別為 IS10R 和 IS5-like 序列 (DDBJ accession no. LC016697 to LC016704)。而相較於克痢黴素感受性菌株，有 4 株抗藥性菌株的 MgrB 有胺基酸的改變，其中包含先前報導過可以導致抗藥性的點突變位置 (C28Y) 和我們新發現的突變位點，MgrB 的停止碼 (stop codon) 改變 (Stop48Y)，因此導致 MgrB 的序列延長 15 個胺基酸 (DDBJ accession no. LC016506 to LC016508)。並且有 2 株抗藥性菌株無法利用聚合酶連鎖反應的方式放大 *mgrB* 的片段 (圖三)，南方墨點法也證實這兩株菌株之 *mgrB* 片段已經從基因體中被剔除 (圖四)。

mgrB 編碼區域被外來序列插入已知可以破壞 *mgrB* 的正常功能



(Cannatelli et al., 2013; Cannatelli et al., 2014) ，然而外來序列插入啟動子區域則尚未被證實可影響 *mgrB* 的基因表現量。為了了解外來插入序列插入啟動子區域是否影響 *mgrB* 基因的表現量，我們利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應檢視 *mgrB* 的基因表現量並且和感受性菌株比較。結果顯示相較於感受性菌株，*mgrB* 的基因表現量在 5 株 *mgrB* 啟動子區域帶有外來插入的臨床菌株有明顯的下降（表一）。實驗證實不論是 *mgrB* 的基因編碼區還是啟動子區域受到外來插入的破壞，皆可能因此導致克雷伯氏肺炎桿菌產生對克痢黴素的抗藥性。


另一方面，為了驗證 MgrB 的停止碼改變導致 MgrB 的序列延長 15 個胺基酸，可以導致克痢黴素抗藥性。我們將克痢黴素感受性的克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 之 *mgrB* 基因進行點突變，使停止碼變成酪氨酸 (tyrosine) 。結果使得原本對克痢黴素具感受性的 NTUH-K2044 菌株 (MICs = 1 $\mu\text{g/ml}$) 轉變成對克痢黴素產生抗藥性 (MICs = 32 $\mu\text{g/ml}$) (表四) 。*mgrB* 的突變已知可以藉由 PhoPQ 導致下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子表現量上升，因而產生克痢黴素抗藥性。而定量反轉錄聚合酶連鎖反應的結果顯示，MgrB Stop48Y 的改變造成 NTUH-K2044 菌株顯著的增加下游 *pmrH* 的基因表現 (表四) ，證實 MgrB Stop48Y 的改變是藉由 *pmrHFIJKLM* 操縱子表現量上升，增加脂多醣的修飾而導致克痢黴素抗藥性的產生。



總結上述的實驗結果可知，我們收集到的 26 株抗克雷伯氏肺炎桿菌之中，共有 8 株在 *mgrB* 區域有外來插入序列，而其中 2 株的 *mgrB* 被剔除，以及 4 株的 *mgrB* 序列帶有胺基酸的改變。整體來說，在台灣有 53.8 % (14/26) 的抗克痢黴素之克雷伯氏肺炎桿菌是藉由 *mgrB* 的改變 (包含被外來序列插入、點突變以及剔除等方式所造成) 而造成克痢黴素的抗藥性產生，為台灣主要抗藥性產生的機制。

四、PhoPQ 和 PmrAB 突變導致克痢黴素抗藥性的產生


除了 *mgrB* 之外，*pmrHFIJKLM* 操縱子已知可以被 PhoPQ 和 PmrAB 兩套雙分子訊息調控系統所調控，也有研究指出 PhoPQ 和 PmrAB 的胺基酸突變可以造成克痢黴素的抗藥性 (Cheng *et al.*, 2010; Jayol *et al.*, 2014)。因此我們利用聚合酶連鎖反應的方式分別放大 *phoPQ* 和 *pmrAB* 以及兩套系統之連接者 *pmrD* 的基因片段並且進行定序，再將其序列與 8 株對克痢黴素敏感菌株的序列做比較。結果發現抗藥性菌株在 PhoP 有兩個位置的胺基酸改變 (V3F 和 S86L)、PhoQ 有三個 (L26P、D150G 和 V258F)、PmrB 則有三個位置不同 (T157P、R256G 和 V280L)(表一)，而在 PmrA 和 PmrD 中則沒有發現可能導致克痢黴素抗藥性的胺基酸改變。在我們發現的胺基酸改變中，PmrB T157P 已經被指出和克痢黴素的抗藥性相關 (Jayol *et al.*, 2014)，而



PmrB V280L 因為改變同樣是支鏈胺基酸 (branched chain amino acid) 所以猜測這個胺基酸改變應不會導致抗藥性的產生。為了驗證其他胺基酸的改變是否造成克痢黴素抗藥性的產生，我們同樣將 NTUH-K2044 菌株中 PhoP、PhoQ 和 PmrB 的序列分別置換成不同的胺基酸，結果顯示僅有 PhoQ L26P 能造成菌株對克痢黴素的感受性改變 (表四)，PhoQ L26P 的改變使 NTUH-K2044 菌株產生對克痢黴素的抗藥性 (MICs = 32 µg/ml)。PhoPQ 的突變已知可以導致下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子表現量上升，因而產生克痢黴素抗藥性 (Miller *et al.*, 2011)。因此我們利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應檢驗 *pmrH* 的基因表現量，結果顯示，和 NTUH-K2044 野生型菌株相比，帶有 PhoQ L26P 突變的 NTUH-K2044 菌株顯著的增加 *pmrH* 基因的表現量 (表四)。因此證實 PhoQ L26P 的胺基酸改變可以造成下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子的大量表現，導致克雷伯氏肺炎桿菌產生克痢黴素的抗藥性。整體來說，扣除 *mgrB* 的變異以及被證實的 *pmrB* 和 *phoQ* 突變後，仍然有 9 個克痢黴素抗藥菌株不清楚抗藥性產生的分子機制。


五、CrrB 突變導致克痢黴素抗藥性的產生

近年來有研究指出，新發現的雙分子訊息調控系統 CrrAB 和克痢黴素的抗藥性有關。將正常的 *crrAB* 基因送入帶有點 CrrB 突變的克痢



黴素抗藥菌株，即使克痢黴素抗藥菌株轉變成感受性菌株 (Wright *et al.*, 2015)。該研究也利用次世代定序比較 CrrB 突變株之基因表現量，並觀察到 CrrB 的突變可以導致 *pmrHFIJKLM* 操縱子、*pmrC* 和 *crrAB* 鄰近的兩個基因 *H239_3059* 和 *H239_3062* 的基因表現量提升 (Wright *et al.*, 2015)。而 *H239_3059* 經過胺基酸序列比對，為一個帶有 TupA-like ATP grasp 相似序列的醣基轉移酶 (glycosyltransferase)。因此作者推測，CrrB 的突變會使的 *pmrHFIJKLM* 操縱子、*pmrC* 和 *H239_3059* 大量表現，這些基因進而增加酯多醣的修飾，而產生克痢黴素的抗藥性 (Wright *et al.*, 2015)。


為了了解尚未釐清抗藥性分子機制的 9 個菌株是否因為 *crrAB* 突變導致抗藥性的產生，我們將剩餘 9 個菌株中的 *crrAB* 基因片段利用聚合酶連鎖反應的方式增幅，並且進行定序，同時與感受性菌株之胺基酸序列進行比對，以剔除胺基酸的多型性。結果顯示，9 個抗藥性菌株和 8 個感受性菌株中，分別有 8 個抗藥性菌株和 4 個感受性菌株之 *crrAB* 序列可以利用聚合酶連鎖反應被增幅，而南方墨點法也證實抗藥性菌株 Col5 和 4 個克痢黴素感受性菌株的基因體中並不帶有 *crrAB* 的序列 (圖五)。在與 4 個感受性菌株以及資料庫上的 46 個感受性菌株進行胺基酸比對後，我們發現 8 個抗藥性菌株的 CrrA 胺基酸序列和全部 50 株感受性菌株之序列一致，但分別在 8 株抗藥性菌株中偵測到



CrrB 有 6 個不同的胺基酸改變 (Q10L、Y31H、W140R、N141I、P151S 和 S195N)(表五)。為了檢驗這 6 個胺基酸的改變是否真的會造成克痢黴素的抗藥性，我們分別將這 6 個胺基酸送入感受性菌株之一的 A4528 菌株之中製造基因體的點突變，結果顯示 6 個胺基酸的改變均可以造成克痢黴素的抗藥性 (表六)，其中 5 個位點的改變 (Q10L、W140R、N141I、P151S 和 S195N) 更可以造成高度克痢黴素抗藥性的產生 (MICs \geq 512 μ g/ml)(表六)。這些實驗證實，在 26 個抗藥性菌株之中，有 8 株克痢黴素抗藥性菌株是藉由 *crrB* 的突變導致克痢黴素抗藥性的產生。顯示 *crrAB* 突變所導致的克痢黴素抗藥性在台灣佔有重要的角色。

六、CrrB 藉由 *H239_3062* 導致克痢黴素抗藥性

儘管上述實驗證實 CrrB 的突變可以導致克痢黴素抗藥性，但其詳細分子機制尚不清楚。而前人研究指出，CrrB 的突變可以造成鄰近的兩個基因 *H239_3059* 和 *H239_3062* 基因表現量大幅上升，更推測可能是藉由 *H239_3059* 增加脂多醣的修飾而產生克痢黴素的抗藥性 (Wright *et al.*, 2015)。為了驗證前人研究，我們利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應偵測臨床菌株中 *H239_3059* 和 *H239_3062* 的基因表現量，結果顯示相較於克痢黴素感受性菌株，8 株帶有 CrrB 突變的抗克痢黴素




臨床菌株都有顯著提升 *H239_3059* 和 *H239_3062* 的基因表現量 (圖六)。而相較於 A4528 野生型菌株，分別帶有 6 個 CrrB 胺基酸改變的 A4528 突變株，*H239_3059* 和 *H239_3062* 的基因表現量也有顯著的升高 (圖六)。

為了證實 *H239_3059* 和 *H239_3062* 基因表現量的提升是否造成克痢黴素抗藥性，我們在帶有 CrrB N141I 胺基酸改變的 A4528 突變株分別將 *H239_3059* 和 *H239_3062* 進行基因剔除。實驗結果顯示，剔除 *H239_3059* 並不影響 *crrB* 突變所造成的克痢黴素抗藥性，而剔除 *H239_3062* 意外的造成克痢黴素抗藥性大幅下降 (MICs = 2 µg/ml) (表七)。由於實驗證實 *H239_3062* 和克痢黴素抗藥性相關，因此我們也將 *H239_3062* 命名為 *crrC*。

七、CrrC 藉由 PmrAB 調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子


最開始的實驗已指出，帶有 CrrB 胺基酸改變的 8 株抗藥性菌株可能也是藉由 PmrHFIJKLM 調控 4-氨基-4-脫氧-L-阿拉伯糖的修飾而產生克痢黴素的抗藥性，加上我們證實 *crrC* 與克痢黴素抗藥性相關，所以推測 CrrAB 可能是藉由 CrrC 調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子的表現量。為了驗證這個理論，我們先利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應比較 A4528 野生型以及其 CrrB 點突變株之 *pmrH* 的基因表現量。結果顯示，6 個



CrrB 的胺基酸突變均會造成 *pmrH* 基因表現量顯著的上升 (圖七)。然而 *crrC* 的剔除則使得原本被 CrrB 點突變所誘導的 *pmrH* 基因表現量回到接近 A4528 野生型的基因表現量 (圖七)。因此推斷 CrrAB 可以藉由 CrrC 調控下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子的表現量。

pmrHFIJKLM 操縱子已知可以藉由 PmrAB 和 PhoPQ 兩套雙分子訊息調控系統所調控。因此我們利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應分別定量 *pmrA* 和 *phoP* 的表現量。結果顯示相較於 A4528 野生型菌株，帶有 CrrB N141I 胺基酸改變的 A4528 突變株明顯的增加 *pmrA* 的表現量，而 *phoP* 的表現量則沒有顯著的改變 (圖八)。然而 *crrC* 的剔除則使得原本被 CrrB 點突變所誘導的 *pmrA* 表現量接近 A4528 野生型的基因表現量，而補回 *crrC* 基因可以使 *pmrA* 表現量回復 (圖八)，因此證實 CrrC 可以藉由 *pmrAB* 調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子的表現量。

為了印證 CrrC 調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子必須藉由 *pmrAB*，我們也在帶有 CrrB N141I 突變的 A4528 菌株中建構了 *pmrAB* 剔除菌株。將 *pmrAB* 剔除後，帶有 CrrB N141I 突變的 A4528 菌株顯著的降低對克痢黴素的抗藥性 (MICs = 1 µg/ml) (表七)。分別定量 *crrC* 和 *pmrH* 的基因表現量結果顯示，*pmrAB* 的剔除不會使得 CrrB N141I 胺基酸改變所誘導的 *crrC* 基因表現量下降 (圖八)，證實 *pmrAB* 應為 *crrC* 的下游，而 *pmrH* 的基因表現量也因為 *pmrAB* 被剔除有顯著的下降 (圖七)。




同樣受到 *pmrAB* 所調控的基因 *pmrC* 也和 *pmrH* 一樣，在 *crrC* 和 *pmrAB* 剔除後顯著的下降，且接近 A4528 野生型菌株的基因表現量（圖八）。這些實驗證明 CrrC 調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子是藉由 *pmrAB* 所導致，而 CrrC 無法直接調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 的基因表現，必須透過 *pmrAB*。

八、CrrB 突變導致較高克痢黴素的抗藥性

在 26 株抗克痢黴素的菌株之中，其中 14 株因為 *mgrB* 有外來插入序列、缺失、以及點突變造成 *mgrB* 表現量減少甚至無法轉譯出正確核醣核酸導致下游大量表現 *pmrHFIJKLM* 操縱子。而分別有 2 株和 1 株為 PmrB 或 PhoQ 突變造成 *pmrC* 和 *pmrHFIJKLM* 操縱子表現量提升而導致克痢黴素的抗藥性。然而 8 株 CrrB 突變的抗藥性菌株雖然也同樣利用 *pmrC* 和 *pmrHFIJKLM* 操縱子表現量提升而導致克痢黴素的抗藥性，但有 CrrB 突變的臨床菌株的對克痢黴素的最小抑制濃度明顯較其他臨床菌株高（MICs $\geq 512\mu\text{g/ml}$ ）（表一）。因此我們推測 CrrAB 不僅可以調控 *pmrC* 和 *pmrHFIJKLM* 操縱子表現量，同時還調控其他可以產生克痢黴素抗藥性的分子機制。

為了了解除了利用 *pmrC* 和 *pmrHFIJKLM* 操縱子之外的抗藥機制，我們利用建構跳躍子突變株庫的方式來尋找其他可能的抗藥機制。將



帶有 CrrB N141I 胺基酸改變的 A4528 菌株與帶有 pUT-Km1 的大腸桿菌 S17-1 進行接合作用後，即可得到帶有跳躍子的 A4528 *crrB(N141I)* 突變株。在利用 1024 $\mu\text{g/ml}$ 的克痢黴素篩選 2976 個跳躍子突變株之後，我們共得到 49 株克痢黴素抗藥性下降的跳躍子突變株，而我們再利用半隨機聚合酶連鎖反應以及定序的方式確認突變株中跳躍子所插入的位置及辨認其所破壞的基因。在 49 個突變株中，其中 20 個突變株的跳躍子分別位於 *crrC*、*crrA* 和 *crrB* 之間，而 3 個突變株的跳躍子分別位於 *pmrH* 和 *pmrF* 的啟動子區域和編碼區中。其餘 24 個突變株的跳躍子則位於基因體的不同區域中，例如脂多醣合成相關基因、排出幫浦 (efflux pump) 等 (表八)。而其中 2 株跳躍子突變株經過半隨機聚合酶連鎖反應以及定序後發現其跳躍子旁的序列仍然是質體 pUT-km1 的區域，推測應為原本提供質體的大腸桿菌。

九、CrrB 突變導致 H239_3064 的表現量上升

為了區別跳躍子突變株的克痢黴素抗藥性下降是藉由 CrrB 胺基酸的改變，或者是藉由其他途徑所導致，例如藉由影響脂多醣生合成或細菌生長而導致的克痢黴素抗藥性下降。我們利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應比較受到跳躍子影響的基因之基因表現量，並排除已知和 CrrB 突變有關的基因 (*crrC*、*crrA*、*crrB*、*pmrH* 和 *pmrF*)。比較 A4528 野




生型菌株和帶有 CrrB N141I 胺基酸改變的突變株後發現，僅有一個基因，*H239_3064* (putative RND-type efflux pump) 在 CrrB N141I 胺基酸改變後基因表現量有顯著的上升 (圖九)。

經過基因體的序列比對後，我們發現 *H239_3064* 的基因位置於 *crrC* 的下游，由於鄰近的 *H239_3063* 和 *H239_3065* 與 *H239_3064* 均為同一個轉譯方向，而且間隔不超過 75 bp，因此我們推測 *H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 可能屬於同一個轉錄單位 (transcription unit)。而我們利用互補去氧核糖核酸進行聚合酶連鎖反應實驗也證實 *H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 屬於同一個轉錄單位 (圖十)。再利用定量反轉錄聚合酶連鎖反應定量 *H239_3063* 和 *H239_3065* 的基因表現量，結果發現 *H239_3063* 和 *H239_3065* 的表現量也在帶有 CrrB N141I 突變的 A4528 菌株中升高，與 *H239_3064* 一致 (圖九)。

十、*H239_3063* 和 *H239_3064* 大量表現導致克痢黴素抗藥性的產生

為了驗證 *H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 是否和克痢黴素的抗藥性相關。我們在帶有 CrrB N141I 改變的突變株分別剔除 *H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065*。結果顯示剔除 *H239_3063* 和 *H239_3064* 分別會使菌株對克痢黴素的最小抑制濃度下降 2 倍 (MICs = 1024 $\mu\text{g/ml}$) 和 4 倍 (MICs = 512 $\mu\text{g/ml}$) (表九)，而剔除 *H239_3065*



則不會造成抗藥性的改變 (MICs = 2048 $\mu\text{g/ml}$) (表九)。由於 *H239_3063* 和 *H239_3064* 屬於同一個操縱子又與克痢黴素抗藥性相關，我們推測 *H239_3063* 和 *H239_3064* 有可能會有協同作用，因此我們同時剔除 *H239_3063* 和 *H239_3064*，結果顯示同時剔除 *H239_3063* 和 *H239_3064* 可以使菌株對克痢黴素抗藥性下降 8 倍 (MICs = 256 $\mu\text{g/ml}$) (表九)。顯示 *H239_3063* 和 *H239_3064* 的表現量增加使細菌會增加細菌對克痢黴素的耐受性。

第四章 討論



一、多重抗藥型菌株之莢膜型

以莢膜型分類我們所收集的 26 株抗克痢黴素抗藥性菌株，其中 K64 為主要的莢膜型，其次為 K24 和 K54 (表一)。然而根據先前的研究指出，在台灣抗碳青黴烯克雷伯氏肺炎桿菌的主要莢膜型為 K64，而其次為 K62 和 K24 (Pan *et al.*, 2015)。由此資料顯示 K64 莢膜型的克雷伯氏肺炎桿菌可能較容易產生抗藥性，而 K62 莢膜型儘管為抗碳青黴烯克雷伯氏肺炎桿菌主要莢膜型，但在 26 株克痢黴素抗藥性菌株中，僅有 1 株為莢膜型 K62，顯示不同的莢膜型菌株可能有較容易產生特定的抗藥性的趨勢。

若特定莢膜型菌株較容易產生抗藥性，未來我們也可以選擇抗生素以外的方式來治療多重抗藥性克雷伯氏肺炎桿菌的感染。以莢膜型 K64 菌株為例，我們可以從對莢膜型 K64 菌株具專一性的噬菌體中找到專一胞外多醣解聚合酶 (extracellular polysaccharide depolymerase)。若使用此解聚合酶分解莢膜型 K64 菌株，則使菌株較容易被嗜中性球所吞噬。若於動物實驗中使用胞外多醣解聚合酶進行克雷伯氏肺炎桿菌感染的治療，更能增加小鼠的存活率 (Pan *et al.*, 2015)。




二、脂多醣修飾的比較

為了知道哪些菌株是藉由增加脂多醣的修飾產生抗藥性，我們比較 *pmrH* 和 *pmrC* 的基因表現量。儘管大部份抗藥性菌株的 *pmrH* 表現量相較於克痢黴素感受性菌株都有顯著的上升，但仍有 3 株抗藥性菌株沒有顯著的上升，而其中兩株最後也被證明是藉由 *mgrB* 的改變導致下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子大量表現所產生的抗藥性（表一）。因此也說明比較 *pmrH* 的相對基因表現量並不能完全代表最後脂多醣修飾的多寡。若要用 *pmrH* 的基因表現量比較脂多醣的修飾，必需比較產生抗藥性前的原始菌株 (parental strains) 和產生抗藥性後的菌株之基因表現量，或者更進一步使用質譜儀 (mass spectrometry) 的分析才能反應出臨床菌株中脂多醣修飾的真實情況。

三、PhoPQ 利用 PmrD 調控 *pmrAB*

研究顯示，*mgrB* 的變異無論在國內外均為主要的抗藥機制 (Cannatelli *et al.*, 2013; Cannatelli *et al.*, 2014)。由於 *MgrB* 的改變導致 *MgrB* 無法抑制 *PhoQ* 的磷酸化，以及我們也發現 *PhoQ* L26P 的改變也會使得下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子大量表現，讓菌株產生抗藥性。然而根據先前的研究指出，*MgrB* 會影響 *PhoPQ* 的活化，而 *PhoPQ* 的訊號可以經由 *PmrD* 傳遞至 *PmrAB* (Cheng *et al.*, 2010)。但在我們的研究




結果中顯示，相較於克痢黴素感受性菌株，僅 PmrB 和 CrrB 有突變的抗藥性菌株有顯著 *pmrC* 的表現量上升 (*pmrC* 受到 *pmrAB* 所調控)(表一)(圖一)，即顯示儘管 PmrD 可以連接 PhoPQ 和 PmrAB 兩套雙分子訊息調控系統，但 MgrB 和 PhoPQ 的突變在真實的情況下可能無法使 *pmrC* 基因表現量顯著的上升。

四、*crrAB* 及其鄰近序列的分析

在我們所收集的抗藥性菌株中，CrrB 的突變為台灣次要的克痢黴素抗藥性產生原因，然而僅有半數的感受性菌株在基因中帶有 *crrAB* 的序列，比對 NCBI 資料庫中克雷伯氏肺炎桿菌的序列也顯示，*crrAB* 及其鄰近基因常常被噬菌體或跳躍子所破壞或取代，因此代表 *crrAB* 和鄰近 *crrC*、*H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 並不是生長所必需的基因，所以經過演化後逐漸從基因體中被剔除。

而以 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic *et al.*, 2015; Schultz *et al.*, 1998) 分析本研究中所偵測到的 6 個可以導致克痢黴素抗藥性產生的 CrrB 突變位置，電腦模擬蛋白質結構後發現，其中 4 個胺基酸位置 (第 140、141、151 和 195 個胺基酸) 都位於 CrrB 的組氨酸激酶區 (histidine kinase domain)，而第 31 個胺基酸位於穿膜區 (transmembrane domain)，以及第 10 個胺基酸無法歸類於任何區域之



中，這些結果發現組氨酸激酶區對抗藥性的產生扮演了重要的角色。然而 CrrAB 已知可以調控 *H239_3059* 和 *crrC*，儘管先前研究推測 *H239_3059* 可能和克痢黴素抗藥性相關，但經過實驗證實剔除 *H239_3059* 不影響 CrrB 突變所導致的克痢黴素抗藥性。因此大量表現 *H239_3059* 是否能造成細菌的其他改變及其生理意義並不清楚。然而 CrrAB 儘管可以藉由 CrrC 調控 *pmrAB*，但 CrrAB 是否直接調控 CrrC 的啟動子或者 CrrC 是否能直接調控 *pmrAB* 的啟動子，都還需要更進一步實驗驗證。


後續我們也發現 *H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 會受到 CrrAB 所調控，而 CrrB 的突變使得 *H239_3063*、*H239_3064* 和 *H239_3065* 大量表現。而這三個基因經過比對分別可能是 ABC 轉運蛋白 (ABC transporter)、RND 排出幫浦 (RND efflux pump) 和乙醯轉移酶 (acetyltransferase)，其中 *H239_3063* 和 *H239_3064* 證實和克痢黴素的抗藥性相關。由於 *H239_3063* 和 *H239_3064* 為可能的運輸蛋白，因此也顯示 *H239_3063* 和 *H239_3064* 即有可能和其他抗生素的抗藥性相關。然而 *H239_3065* 的大量表現是否可以增加胞外多醣 (exopolysaccharide) 的修飾或有其他生理意義則需要更進一步研究來證實。

五、H239_3063 和 H239_3064 增加四環黴素類抗生素耐受性

為了了解 H239_3063 和 H239_3064 是否會影響克痢黴素之外的抗生素的抗藥性，我們測試 A4528 野生型菌株和其 CrrB 突變株以及 H239_3063 和 H239_3064 的剔除菌株對氯霉素、環丙沙星 (ciprofloxacin)、四環黴素 (tetracycline) 和頭孢黴素 (cefotaxime) 的最小抑制濃度。結果顯示，H239_3063 和 H239_3064 的剔除對氯霉素、環丙沙星和頭孢黴素的感受性並無差異。而相較於 A4528 野生型菌株，CrrB 的突變能造成對四環黴素抗藥性上升兩倍，剔除 H239_3064 後則使得 CrrB 突變造成對四環黴素的抗藥性下降，然而剔除 H239_3063 則不會改變對四環黴素的感受性。老虎黴素同樣為四環黴素類的抗生素，因此我們也測試了 A4528 野生型及其突變菌株對老虎酶素的感受性，結果顯示 CrrB 的突變使得菌株對老虎酶素的抗藥性上升兩倍，剔除 H239_3064 後使得菌株對老虎酶素的抗藥性下降，並回到野生型菌株的感受性。實驗結果證實 CrrB 的突變不但能造成克痢黴素抗藥性的產生，同時也能藉由 H239_3064 使克雷伯氏肺炎桿菌對最後一線抗生素老虎酶素的耐受性上升。

六、偵測臨床菌株是否帶有 *mcr-1* 基因

除了基因的變異造成抗藥性的產生之外，近年也第一次發現可以



轉移的克痢黴素抗藥性基因 *mcr-1* (Liu *et al.*, 2016; Xavier *et al.*, 2016) , *mcr-1* 為磷酸乙醇胺轉移酶類酵素 (phosphoethanolamine transferase enzyme family) 並且位於質體上，因此可以藉由水平轉移的方式，在於不同細菌之間轉移，而 *mcr-1* 能使脂多醣進行磷酸乙醇胺的修飾而產生抗藥性。近年來的研究也指出 *mcr-1* 廣泛的存在大腸桿菌和克雷伯氏肺炎桿菌當中，使得克痢黴素抗藥性的問題日趨嚴重 (Gao *et al.*, 2016; Liakopoulos *et al.*, 2016) 。然而我們利用聚合酶連鎖反應偵測我們 26 個克痢黴素抗藥菌株是否帶有 *mcr-1* 基因，結果顯示所有菌株皆不帶有 *mcr-1* 基因，因此也推測我們唯一不清楚抗藥性機制的菌株 Col5，並不是利用 *mcr-1* 基因而產生抗藥性。

七、未來研究方向

不論是 *mgrB* 的改變或是 *crrB* 的突變，最終都造成脂多醣的修飾增加，而脂多醣的結構改變很可能使得菌株對其他種類的抗生素產生交叉抗藥性，甚至使部分抗生素的感受性下降。而經過實驗，我們已經知道 *crrB* 的突變對氯霉素、環丙沙星和頭孢黴素的感受性並無改變，然而我們並未測試碳青黴烯類藥物的感受性。因此後續我們會觀察這些突變造成脂多醣修飾的增加後，是否會改變菌株對碳青黴烯類藥物的感受性。


第五章 結論



本研究收集台灣 26 株抗克痢黴素克雷伯氏肺炎桿菌，研究其莢膜型與序列分型的分佈，並了解其抗藥性產生的分子機制。結果顯示，莢膜型 K64 和序列型 ST11 分別為台灣抗克痢黴素克雷伯氏肺炎桿菌最主要的莢膜型和序列型。

而抗藥性產生的機制方面，在 26 株抗克痢黴素抗藥菌株中，其中 14 株是藉由 *mgrB* 的變異而導致下游 PhoPQ 無法正常調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子，使得 *pmrHFIJKLM* 操縱子大量表現；其中 1 株則是藉由 *phoQ* 突變導致 PhoPQ 無法正常調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子；其中 2 株是藉由 *pmrB* 的突變導致下游大量表現 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC*；其中 8 株是藉由 *crrB* 突變，使下游 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 表現量增加。*pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 表現量增加，使得脂多醣 4-氨基-4-脫氧-L-阿拉伯糖和磷酸乙醇胺的修飾增加，最終產生克痢黴素抗藥性。然而在 26 株抗藥性菌株中，仍然有 1 菌株 (Co15) 無 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 表現量增加，也無已知調控子的突變，因此尚未了解其抗藥性產生的機制。

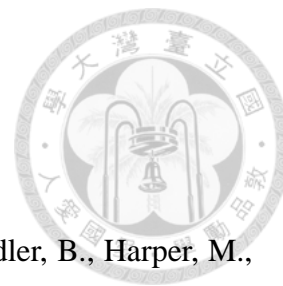
進一步我們也證實，*crrB* 的突變會使得下游 *crrC*、*H239_3063*、*H239_3064* 以及 *H239_3065* 的表現量大幅升高。其中 *CrrC* 可以藉由



pmrAB 調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 的表現量，使得脂多醣的修飾增加，為導致克痢黴素抗藥性產生的主要原因（圖十一）。而 *H239_3063* 和 *H239_3064* 的剔除同樣可以使得克雷伯氏肺炎桿菌對克痢黴素的感受性下降，推測 *H239_3063* 和 *H239_3064* 的大量表現可以增加細菌對克痢黴素耐受性（圖十一）。

總結來說，台灣克雷伯氏肺炎桿菌對克痢黴素的抗藥性主要藉由調控子 *mgrB* 的改變所導致 (53.8%、14/26)，其次則為 *crrB* 的點突變所導致 (30.8%、8/26)。不論是 *mgrB*、*crrB*、*phoQ* 還是 *pmrB* 的改變，皆造成 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 表現量上升，最終使脂多醣的修飾增加而導致克痢黴素抗藥性的產生。除此之外，*crrB* 的突變也會使 *H239_3063* 和 *H239_3064* 的表現量增加，進而使細菌增加對克痢黴素的耐受性。

第六章 參考文獻



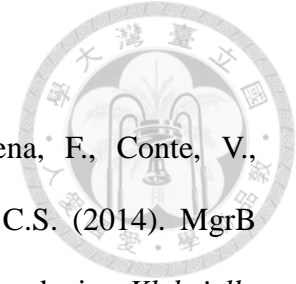
Beceiro, A., Moreno, A., Fernandez, N., Vallejo, J.A., Aranda, J., Adler, B., Harper, M., Boyce, J.D., and Bou, G. (2014). Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 518-526.

Biswas, S., Brunel, J.M., Dubus, J.C., Reynaud-Gaubert, M., and Rolain, J.M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10, 917-934.

Breazeale, S.D., Ribeiro, A.A., McClerren, A.L., and Raetz, C.R. (2005). A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *J Biol Chem* 280, 14154-14167.

Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., and Grimont, P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4, e4982.

Cannatelli, A., D'Andrea, M.M., Giani, T., Di Pilato, V., Arena, F., Ambretti, S., Gaibani, P., and Rossolini, G.M. (2013). In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 5521-5526.



Cannatelli, A., Giani, T., D'Andrea, M.M., Di Pilato, V., Arena, F., Conte, V., Tryfinopoulou, K., Vatopoulos, A., Rossolini, G.M., and Group, C.S. (2014). MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 5696-5703.

Chen, Y.Y., Ko, T.P., Lin, C.H., Chen, W.H., and Wang, A.H. (2011). Conformational change upon product binding to *Klebsiella pneumoniae* UDP-glucose dehydrogenase: a possible inhibition mechanism for the key enzyme in polymyxin resistance. *J Struct Biol* 175, 300-310.

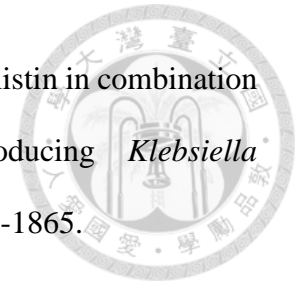
Cheng, H.Y., Chen, Y.F., and Peng, H.L. (2010). Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci* 17, 60.

Chiu, S.K., Wu, T.L., Chuang, Y.C., Lin, J.C., Fung, C.P., Lu, P.L., Wang, J.T., Wang, L.S., Siu, L.K., and Yeh, K.M. (2013). National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS One* 8, e69428.

Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A., and Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 43, 4178-4182.

Gaibani, P., Lombardo, D., Lewis, R.E., Mercuri, M., Bonora, S., Landini, M.P., and

Ambretti, S. (2014). In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J Antimicrob Chemother* 69, 1856-1865.



Gao, R., Hu, Y., Li, Z., Sun, J., Wang, Q., Lin, J., Ye, H., Liu, F., Srinivas, S., Li, D., *et al.* (2016). Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog* 12, e1005957.

Garcia-Quintanilla, M., Pulido, M.R., Moreno-Martinez, P., Martin-Pena, R., Lopez-Rojas, R., Pachon, J., and McConnell, M.J. (2014). Activity of host antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* acquiring colistin resistance through loss of lipopolysaccharide. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 2972-2975.

Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K., and Miller, S.I. (2000). Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica serovar typhimurium*. *Infect Immun* 68, 6139-6146.

Gupta, N., Limbago, B.M., Patel, J.B., and Kallen, A.J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 53, 60-67.

Hancock, R.E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet* 349, 418-422.

Jayol, A., Poirel, L., Brink, A., Villegas, M.V., Yilmaz, M., and Nordmann, P. (2014). Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among



Klebsiella pneumoniae isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4762-4766.

Lederman, E.R., and Crum, N.F. (2005). Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. *Am J Gastroenterol* 100, 322-331.

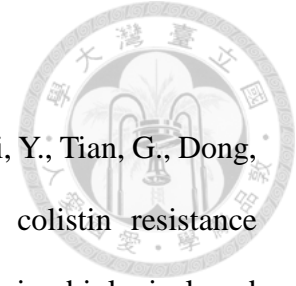
Lee, Y., Kim, B.S., Chun, J., Yong, J.H., Lee, Y.S., Yoo, J.S., Yong, D., Hong, S.G., D'Souza, R., Thomson, K.S., *et al.* (2014). Clonality and Resistome analysis of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in Korea using whole genome sequencing. *Biomed Res Int* 2014, 352862.

Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* 43, D257-260.

Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D., and Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 25, 11-25.

Liakopoulos, A., Mevius, D.J., Olsen, B., and Bonnedahl, J. (2016). The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *J Antimicrob Chemother* 71, 2335-2336.

Link, A.J., Phillips, D., and Church, G.M. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* 179, 6228-6237.



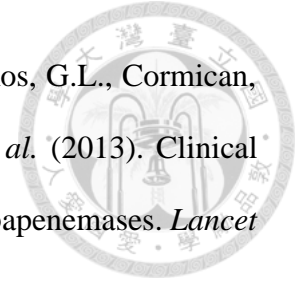
Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., *et al.* (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16, 161-168.

McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S., and Hancock, R.E. (2006). Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 3995-4006.

Mendes, R.E., Mendoza, M., Banga Singh, K.K., Castanheira, M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Lin, S.S., and Jones, R.N. (2013). Regional resistance surveillance program results for 12 Asia-Pacific nations (2011). *Antimicrob Agents Chemother* 57, 5721-5726.

Miller, A.K., Brannon, M.K., Stevens, L., Johansen, H.K., Selgrade, S.E., Miller, S.I., Hoiby, N., and Moskowitz, S.M. (2011). PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 5761-5769.

Monaco, M., Giani, T., Raffone, M., Arena, F., Garcia-Fernandez, A., Pollini, S., Network Eu, S.-I., Grundmann, H., Pantosti, A., and Rossolini, G.M. (2014). Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill* 19.



Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M.K., *et al.* (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13, 785-796.

Olaitan, A.O., Morand, S., and Rolain, J.M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 5, 643.

Padilla, E., Llobet, E., Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Bengoechea, J.A., and Alberti, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 177-183.

Pan, Y.J., Lin, T.L., Chen, Y.H., Hsu, C.R., Hsieh, P.F., Wu, M.C., and Wang, J.T. (2013). Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing. *PLoS One* 8, e80670.

Pan, Y.J., Lin, T.L., Lin, Y.T., Su, P.A., Chen, C.T., Hsieh, P.F., Hsu, C.R., Chen, C.C., Hsieh, Y.C., and Wang, J.T. (2015). Identification of capsular types in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by *wzc* sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 1038-1047.

Pitout, J.D., and Laupland, K.B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8, 159-166.

Podschun, R., and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens:

epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11, 589-603.



Pope, J.V., Teich, D.L., Clardy, P., and McGillicuddy, D.C. (2011). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging problem in North America. *J Emerg Med* 41, e103-105.

Rapp, R.P., and Urban, C. (2012). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy* 32, 399-407.

Rose, R.E. (1988). The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res* 16, 355.

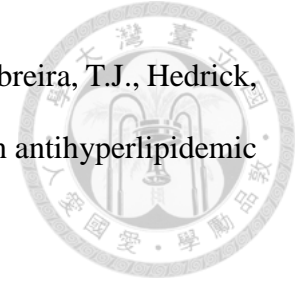
Salama, N.R., Shepherd, B., and Falkow, S. (2004). Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 186, 7926-7935.

Santajit, S., and Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int* 2016, 2475067.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5857-5864.

Siu, L.K., Yeh, K.M., Lin, J.C., Fung, C.P., and Chang, F.Y. (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect Dis* 12, 881-887.

Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M.F., Hamed, M.I., Sobreira, T.J., Hedrick, V.E., Paul, L.N., and Seleem, M.N. (2015). Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. *Sci Rep* 5, 16407.



Tran, A.X., Lester, M.E., Stead, C.M., Raetz, C.R., Maskell, D.J., McGrath, S.C., Cotter, R.J., and Trent, M.S. (2005). Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *J Biol Chem* 280, 28186-28194.

Tzouveleakis, L.S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P.T., and Daikos, G.L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 25, 682-707.

Webster, D.P., Gaulton, T., Woodford, N., Pike, R., Turton, J., Perry, C., and Bowler, I.C. (2010). Emergence of carbapenem resistance due to porin loss in an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strain during meropenem therapy. *Int J Antimicrob Agents* 36, 575-576.

Wright, M.S., Perez, F., Brinkac, L., Jacobs, M.R., Kaye, K., Cober, E., van Duin, D., Marshall, S.H., Hujer, A.M., Rudin, S.D., *et al.* (2014). Population structure of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from midwestern U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4961-4965.

Wright, M.S., Suzuki, Y., Jones, M.B., Marshall, S.H., Rudin, S.D., van Duin, D., Kaye, K., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., and Adams, M.D. (2015). Genomic and transcriptomic

analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 536-543.



Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., and Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 21.

Yan, A., Guan, Z., and Raetz, C.R. (2007). An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 282, 36077-36089.

Yang, D., Guo, Y., and Zhang, Z. (2009). Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. *Curr Microbiol* 58, 366-370.

表一、(接續前頁) 抗克痢黴素菌株之特徵與其在 MgrB、PhoP、PhoQ 和 PmrB 中偵測到的變異位置

Strain	Source	Colistin usage in VGH	MICs (µg/ml)	Capsular type	MLST	<i>pmrH</i> mRNA	<i>pmrK</i> mRNA	<i>mgrB</i> mRNA	Insertion sites on the <i>mgrB</i> region ^d	MgrB ^e		PhoP ^e		PhoQ ^e		PmrB ^e			
						relative fold (mean ± SD) ^a	relative fold (mean ± SD) ^b	relative fold (mean ± SD) ^c											
Col14	Blood	+	128	K47	ST11	2.83±0.12			Deletion ^f	28	48	3	86	26	150	258	157	256	280
Col19	Urine	+	64	K28	ST37	3.69±0.06		0.05 ± 0.004	IS10R in promoter region (-27)										
Col26	Sputum	+	32	K3	ST13	17.97±0.44		0.19 ± 0.02	IS5-like in promoter region (-34) ^g										
Col32	Sputum		64	K1	ST23	21.02±1.85			IS5-like in coding region (+75 to +83) ^g										
Col24	Sputum		32	Unknown K-type	ST421	0.22±0.01	10.63±0.69				Tyr								
Col31	Sputum	+	128	Unknown K-type	ST421	0.42±0.07	12.72±0.02	0.01 ± 0.001	IS5-like in promoter region (-35) ^g										
Col5	Pus		8	KN3	ST11-like	0.34±0.02	4.34±1.31												Gly

^a *pmrH* 相對基因表現量 (與 NTUH-K2044 相比) , 其他克痢黴素感受性菌株之表現量分別為 0.6 ± 0.02 , 1.11 ± 0.02 , 1.68 ± 0.11 , 0.59 ± 0.04 , 1.65 ± 0.07 , 0.37 ± 0.01 and 0.9 ± 0.04 。

^b *pmrK* 相對基因表現量 (與 NTUH-K2044 相比) , 其他克痢黴素感受性菌株之表現量分別為 4.74 ± 0.69 , 0.79 ± 0.28 , 1.14 ± 0.51 , 6.98 ± 0.82 , 0.85 ± 0.08 , 3.77 ± 0.78 and 2.01 ± 0.18 。

^c *mgrB* 相對基因表現量 (與 NTUH-K2044 相比) , 其他克痢黴素感受性菌株之表現量分別為 0.41 ± 0.06 , 1.19 ± 0.17 , 1.67 ± 0.64 , 0.52 ± 0.11 , 1.04 ± 0.13 , 0.51 ± 0.03 and 0.66 ± 0.11 。

^d 與 NTUH-K2044 序列比對後之去氧核糖核酸相對位置以及其外來插入序列。

^e MgrB, PhoP, PhoQ, PmrB 之突變胺基酸位置。

^f 無法偵測到 PCR 產物或確切剔除位置未知。

^g 為 IS5-like elements , 菌株 Col11、Col26、Col32 和 Col31 之序列分別與 IS5 element 有 95%、99%、95%和 95%的相似度。

表二、本研究所用之引子序列

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose	Reference
pmrH-RT-F	ccgcatccgtagcctgaa	qRT-PCR	This study
pmrH-RT-R	cgtagggtcggcgatcat	qRT-PCR	This study
pmrK_F2	cgctgaatatgctcgaccagaag	qRT-PCR	(Cannatelli <i>et al.</i> , 2013)
pmrK_R2	gctggcggtaatcgtctgtacg	qRT-PCR	(Cannatelli <i>et al.</i> , 2013)
mgrB-RT-F	gttgctgtggactcagatgctt	qRT-PCR	This study
mgrB-RT-R	tgccgctgaaaaactgaaca	qRT-PCR	This study
pmrC-RT-F	aacgctccccgtaagaacct	qRT-PCR	This study
pmrC-RT-R	gttatccgctcgcgaagtct	qRT-PCR	This study
H239_3059-RT-F	cctaaagaggcaacttaaatcac	qRT-PCR	This study
H239_3059-RT-R	gcaagagacagatcccacatactg	qRT-PCR	This study
H239_3062-RT-F2	cattcggtctggttttagtgtttataca	qRT-PCR	This study
H239_3062-RT-R2	aaacataaaggtagtccgcaaaaga	qRT-PCR	This study
pmrD-R	ccagtgctgaaatagatgcttc	pmrD PCR and sequencing	This study
pho5-F	Tcgagggtcatatcctg	phoPQ PCR and sequencing	This study
phoP-seqF1	caaagtgtcagcaaaagattc	phoPQ PCR and sequencing	This study
phoQ-deF1	Cggtgacccttatctac	phoPQ PCR and sequencing	This study
kp2135-seqR1	gtcgggccagttaagcgta	phoPQ PCR and sequencing	This study
pmr5-F	Gataatctgttctccac	pmrAB PCR and sequencing	This study
pmrb5-com-F	Aaatcgcggatccgcac	pmrAB PCR and sequencing	This study
pmrb3-com-R	Atcaatgggtgctgacg	pmrAB PCR and sequencing	This study
pmr3-R	Tgctggtgggatcaac	pmrAB PCR and sequencing	This study
mgrB-48Y-ST-F	tttattccgtggtatgacattttctgcc	MgrB-48Y fusion PCR and cloning	This study
mgrB-clone-R	Ctttctctggcgcattagc	MgrB-48Y fusion PCR and cloning	This study
mgrB-clone-F	gcaactgctgacgccgatc	MgrB-48Y fusion PCR and cloning	This study
mgrB-48Y-ST-R	ggcagaaaaatgcataccacggaataaa	MgrB-48Y fusion PCR and cloning	This study
phop3-F	tggccagcccggggcacc	PhoP-V3F cloning	This study
phop3-R	agcaccggcagcgcacgctcg	PhoP-V3F cloning	This study
phop86-F	tggccagcccggggcacc	PhoP-S86L cloning	This study
phop86-R	ccgctgttacggcgcagcag	PhoP-S86L cloning	This study
phoq26-F	tgcgctgatgaagggactg	PhoQ-L26P cloning	This study
phoq26-R	cctgttcgcgatagcgtc	PhoQ-L26P cloning	This study
phoq150-F	tgcgctgatgaagggactg	PhoQ-D26G cloning	This study
phoq150-R	ctgcgagatgcggcttatc	PhoQ-D150G cloning	This study
phoq258-F	cgacgactctgagatgacct	PhoQ-V258F cloning	This study
phoq258-R	cttacaggcgttatcaagaac	PhoQ-V258F cloning	This study
pmrB256-F	tgcaggacgaactggaggc	PmrB-R256G cloning	This study
pmrB256-R	cgagctgtttatcggccgc	PmrB-R256G cloning	This study
CEKG2C	ggccactcgtactgacnnnnnnnnngatat	semi-random PCR	(Salama <i>et al.</i> , 2004)

表二、(接續前頁) 本研究所用之引子序列

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose	Reference
longR	gcgcgctgcgcagggctttattgattccattttac	semi-random PCR	(Salama <i>et al.</i> , 2004)
CEKG4	ggccactcgcactagtagc	semi-random PCR	(Salama <i>et al.</i> , 2004)
longF	ccttgccatcacgactgtgctggtcattaaacgcg	semi-random PCR	(Salama <i>et al.</i> , 2004)
TupA-F	aagtcceaaaagaggcaaac	<i>crrAB</i> PCR and sequencing	This study
H236-2575-R	gtgagccatcaaattctcg	<i>crrAB</i> PCR and sequencing	This study
CrrAB-seqF1	ctcccacgtaagatagtagc	<i>crrAB</i> PCR and sequencing	This study
CrrB-ST-R	gagcctgtgtattatgccc	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
Q10L-F	gattctgagccgtctgatttgacatatg	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
Y31H-F	caatactcgggtcccactattttatag	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
W140R-F	agcgaaatttaaggaatgctgcaattg	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
N141I-F	cgaatttatggattgctgcaattgctc	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
P151S-F	gaactccggacgctcggtagctac	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
S195N-F	ccgctgctgtaattcgtcaggagg	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
CrrB-ST-F	cattcacggcctttaagaacgc	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
Q10L-R	catatatgtcaaaatcagacggctcagaatc	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
Y31H-R	actataaaataagtgggaaccgagtattg	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
W140R-R	caattgcagcattcctaaatttcgct	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
N141I-R	gagcaattgcagcaatccataaatttcg	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
P151S-R	gatagtcaccgacgtccggagttc	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
S195N-R	cctcctgacgaattcacgacgcgg	<i>crrB</i> site-directed mutagenesis	This study
H239_3062-OF-F	cacgcatcgagtaactcttcacg	Southern blotting	This study
crrA-RT-F	tgccatactgacaggctatttacg	Southern blotting	This study
H239_3059-OF-R	ccgggtggaatgaacgaagg	Southern blotting	This study
gapA173	tgaatatgactccactcacgg	Southern blotting	(Diancourt <i>et al.</i> , 2005)
gapA181	cttcagaagcggctttgatggctt	Southern blotting	(Diancourt <i>et al.</i> , 2005)
H239_3059-flank-F	aaatcaatggggaacagcgt	<i>H239_3059</i> deletion construction	This study
H239_3059-flank-R	ggaaaccttagtgccagagc	<i>H239_3059</i> deletion construction	This study
pmrAB-flank-F	cctcttcggcgcacc	<i>pmrAB</i> deletion construction	This study
pmrAB-flank-R	gaggggctggatagcc	<i>pmrAB</i> deletion construction	This study
H239_3062-flank-F	ggtggttaatactggcgtgg	<i>H239_3062</i> deletion construction	This study
H239_3062-flank-R	agccgtctgtagaatgtctc	<i>H239_3062</i> deletion construction	This study
pmrAB-inverse-F	tcaaccagcctctctac	<i>pmrAB</i> deletion construction	This study
pmrAB-inverse-R	tggaagaaggcaacaataatg	<i>pmrAB</i> deletion construction	This study
H239_3059-inverse-F	ttaaacaggccatgagagtttg	<i>H239_3059</i> deletion construction	This study
H239_3059-inverse-R	aacacctccgggttcagaagg	<i>H239_3059</i> deletion construction	This study
H239_3062-inverse-F	tattatgcaatgtcaatatgatacataacc	<i>H239_3062</i> deletion construction	This study
H239_3062-inverse-R	aaaactccttagacaaagtacatattgc	<i>H239_3062</i> deletion construction	This study

表二、(接續前頁) 本研究所用之引子序列

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose	Reference
H239_3062-com-F2	attttccacagtgcctgatg	<i>H239_3062</i> complementation construction	This study
H239_3062-com-R	ctcactcctgaggttatgtatc	<i>H239_3062</i> complementation construction	This study
H239_3063-flank-F	atgaccggtacattcgtttcc	<i>H239_3063</i> deletion construction	This study
H239_3063-flank-R	caactctgccagtgacc	<i>H239_3063</i> deletion construction	This study
H239_3064-flank-F	gtgactgtagtattatcccagcg	<i>H239_3064</i> deletion construction	This study
H239_3064-flank-R	gtcgtgctgtgtcctc	<i>H239_3064</i> deletion construction	This study
H239_3065-flank-F	tcgggttcagcaggttatcg	<i>H239_3065</i> deletion construction	This study
H239_3065-flank-R	caagtgggtccgcagtc	<i>H239_3065</i> deletion construction	This study
H239_3063-inverse-F	actttaccctttgtatgttgactg	<i>H239_3063</i> deletion construction	This study
H239_3063-inverse-R	gataaattatattaacatctgtgtgtaaaggg	<i>H239_3063</i> deletion construction	This study
H239_3064-inverse-F	tctctgccctgtgttccg	<i>H239_3064</i> deletion construction	This study
H239_3064-inverse-R	caggtgtactccagtcacatac	<i>H239_3064</i> deletion construction	This study
H239_3065-inverse-F	aggacgaagaaaaatgtccg	<i>H239_3065</i> deletion construction	This study
H239_3065-inverse-R	aatgtccttgataatgtaatgccag	<i>H239_3065</i> deletion construction	This study
CrrCAB-seqR4	agaggaacaacagcatgac	cDNA PCR	This study
3062-3063-F	ctttgctggactacctttatgtttatg	cDNA PCR	This study
3062-3063-R	catgaacagaacctcaggc	cDNA PCR	This study
3063-3064-F	cttgatgacgaccacaa	cDNA PCR	This study
3063-3064-R	gagtttgatgtcggtagccg	cDNA PCR	This study
3064-3065-F	atgcgattggtagcggg	cDNA PCR	This study
3064-3065-R	ctgtgtgggtcagagg	cDNA PCR	This study
3065-3066-F	ggtaaggcaaggtatgacga	cDNA PCR	This study
3065-3066-R	acagaggttcttcacagagtg	cDNA PCR	This study

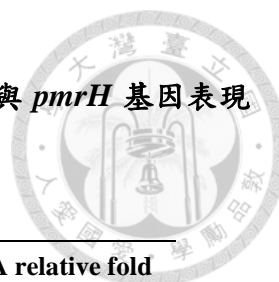
表三、資料庫中用於比對 CrrAB 胺基酸序列之 46 株克痢黴素感受性菌株

Strains	Taxids in NCBI	Reference
MP14	1341693	(Lee <i>et al.</i> , 2014)
ATCC BAA-2146	1263871	(Thangamani <i>et al.</i> , 2015)
120_1020	1304918	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
140_1040	1304916	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
160_1080	1304917	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
361_1301	1304920	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
440_1540	1304921	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
500_1420	1304922	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
540_1460	1304923	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
646_1568	1304924	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
DMC0526	1284796	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
DMC1097	1284798	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
KP-11	1284834	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
KP-7	1284833	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC01	1284811	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC02	1284809	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC04	1284823	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC05	1284790	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC09	1284810	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC17	1284805	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC18	1284806	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC22	1284820	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC23	1284788	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC24	1284815	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC27	1284813	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC29	1284821	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC31	1284807	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC32	1284822	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC33	1284802	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC40	1284787	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC47	1284791	(Wright <i>et al.</i> , 2014)

表三、(接續前頁) 資料庫中用於比對 CrrAB 胺基酸序列之 46 株克痢黴素感受性

菌株

Strains	Taxid in NCBI	Reference
UHKPC48	1284801	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC59	1284803	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC61	1284800	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC67	1284792	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC69	1284793	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC77	1284794	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
UHKPC96	1284795	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC252	1284824	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC254	1284825	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC269	1284826	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC270	1284829	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC276	1284830	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC278	1284827	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC297	1284831	(Wright <i>et al.</i> , 2014)
VAKPC309	1284832	(Wright <i>et al.</i> , 2014)



表四、NTUH-K2044 菌株及其突變株之克痢黴素最小抑制濃度與 *pmrH* 基因表現量

Strain	MICs to colistin ($\mu\text{g/ml}$)	<i>pmrH</i> mRNA relative fold (mean \pm SD)
NTUH-K2044 wild-type	1	1
NTUH-K2044 <i>mgrB</i> (<i>Stop48Y</i>)	32	5.30 \pm 1.32
NTUH-K2044 <i>phoP</i> (<i>V3F</i>)	1	
NTUH-K2044 <i>phoP</i> (<i>S86L</i>)	1	
NTUH-K2044 <i>phoQ</i> (<i>L26P</i>)	32	39.64 \pm 6.64
NTUH-K2044 <i>phoQ</i> (<i>D150G</i>)	1	
NTUH-K2044 <i>phoQ</i> (<i>V258F</i>)	1	
NTUH-K2044 <i>pmrB</i> (<i>R256G</i>)	1	
ATCC 25922 ^a	1	

^a ATCC 25922 之克痢黴素最小抑制濃度為品質控制組。



表五、臨床菌株之克痢黴素最小抑制濃度及其 CrrB 胺基酸變異位置

Strain	CrrB ^a						MICs ($\mu\text{g/ml}$)
	10	31	140	141	151	195	
Col4				Ile			> 2048
Col7					Ser		1024
Col20				Ile			2048
Col21	Leu						512
Col22						Asn	2048
Col36			Arg				2048
Col44		His					512
Col28	Leu						>2048

^aCrrB 之胺基酸位置。



表六、A4528 菌株及其 CrrB 點突變株之克痢黴素最小抑制濃度

Strains	MICs to colistin ($\mu\text{g/ml}$)
A4528 wild-type	1
A4528 <i>crrB(Q10L)</i>	512
A4528 <i>crrB(Y31H)</i>	64
A4528 <i>crrB(W140R)</i>	512
A4528 <i>crrB(N141I)</i>	1024
A4528 <i>crrB(P151S)</i>	512
A4528 <i>crrB(S195N)</i>	512
ATCC 25922 ^a	1

^a ATCC 25922 之克痢黴素最小抑制濃度為品質控制組。

表七、A4528 *crrB(N141I)* 及其 *crrC* 剔除與補回菌株之克痢黴素最小抑制濃度

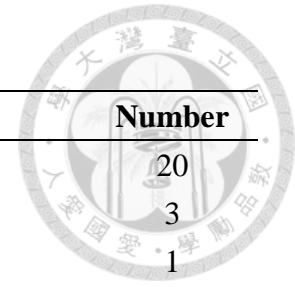
Strains	MICs to colistin ($\mu\text{g/ml}$)
A4528 wild-type	1
A4528 <i>crrB(N141I)</i>	1024
A4528 <i>crrB(N141I) \Delta H239_3059</i>	1024
A4528 <i>crrB(N141I) \Delta crrC</i>	2
A4528 <i>crrB(N141I) \Delta pmrAB</i>	1
pACYC184/A4528 <i>crrB(N141I) \Delta crrC</i> ^a	1
pACYC184-3062/A4528 <i>crrB(N141I) \Delta crrC</i> ^b	>2048

^a A4528 *crrB(N141I) \Delta crrC* 帶有 pACYC184 質體 (Rose, 1988) 之菌株。

^b A4528 *crrB(N141I) \Delta crrC* 帶有 pACYC184-3062 質體之菌株，pACYC184-3062 質體為帶有 *crrC* 基因之 pACYC184 質體。

表八、跳躍子所在位置及其突變株之數量和可能之功能描述

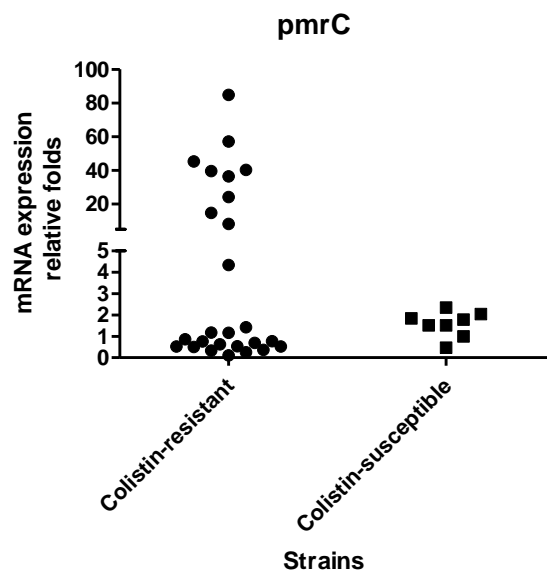
Transposon location	Description	Number
<i>crrCAB</i>	Regulator of <i>pmrHFIJKLM</i>	20
<i>pmrHFIJKLM</i>	Ara4N modification	3
<i>glf</i>	UDP-galactopyranose mutase	1
<i>wbbM</i>	glycosyl transferase	5
<i>wzt</i>	sugar ABC transporter ATP-binding protein	6
<i>uge</i>	uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase	1
<i>KP1_3958</i>	putative semialdehyde dehydrogenase	1
<i>KP1_3956</i>	putative integral membrane protein	1
<i>H239_3064</i>	multidrug transporter	2
<i>tolA</i>	membrane anchored protein	1
<i>kdsA</i>	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	1
<i>rbsK</i>	carbohydrate kinase	2
<i>ompR</i>	osmolarity response regulator	1
<i>AGX39934.1</i>	peptidase M37	1
<i>AEJ99441.1</i>	hypothetical protein	1
pUT-Km1	transposon carried plasmid	2



表九、A4528 *crrB*(N141I)及 H239_3063、H239_3064 和 H239_3065 剔除菌株之克痢黴素最小抑制濃度

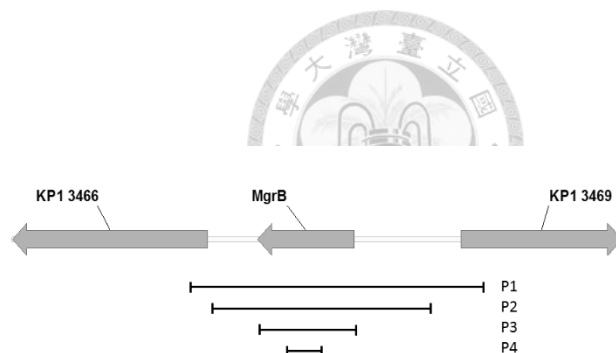
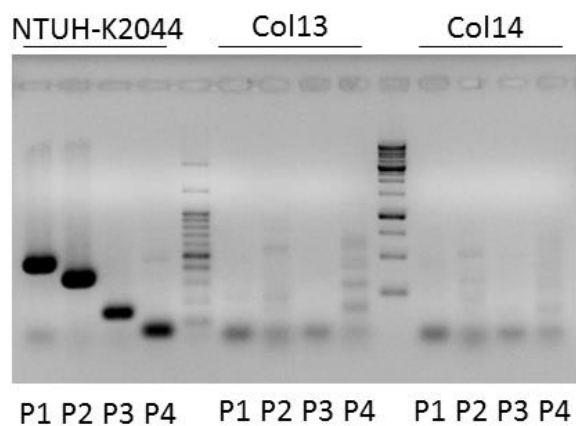
Strains	MICs to colistin (µg/ml)
A4528 wild-type	0.5
A4528 <i>crrB</i> (N141I)	2048
A4528 <i>crrB</i> (N141I) Δ H239_3063	1024
A4528 <i>crrB</i> (N141I) Δ H239_3064	512
A4528 <i>crrB</i> (N141I) Δ H239_3065	2048
A4528 <i>crrB</i> (N141I) Δ H239_3063 - H239_3065	256
A4528 <i>crrB</i> (N141I) Δ H239_3063 - H239_3064	256
ATCC 25922 ^a	0.5

^a ATCC 25922 之克痢黴素最小抑制濃度為品質控制組。



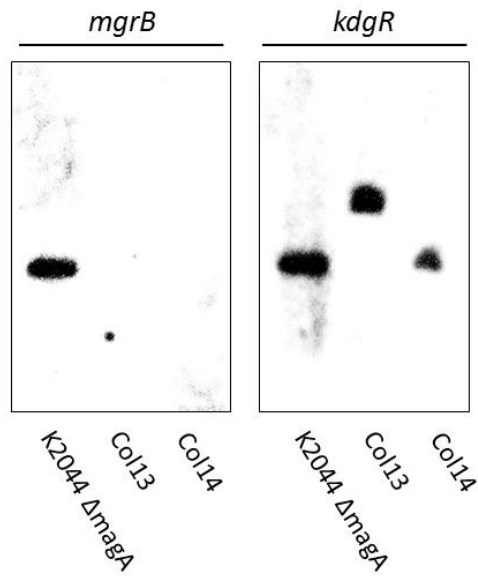
圖一、臨床菌株之 *pmrC* 基因表現量

利用定量逆轉錄聚合酶連鎖反應分別偵測克痢黴素抗藥性菌株和感受性菌株之 *pmrC* 基因表現量。並以 NTUH-K2044 菌株之表現量做為對照組，計算出其他菌株之 *pmrC* 相對表現量。



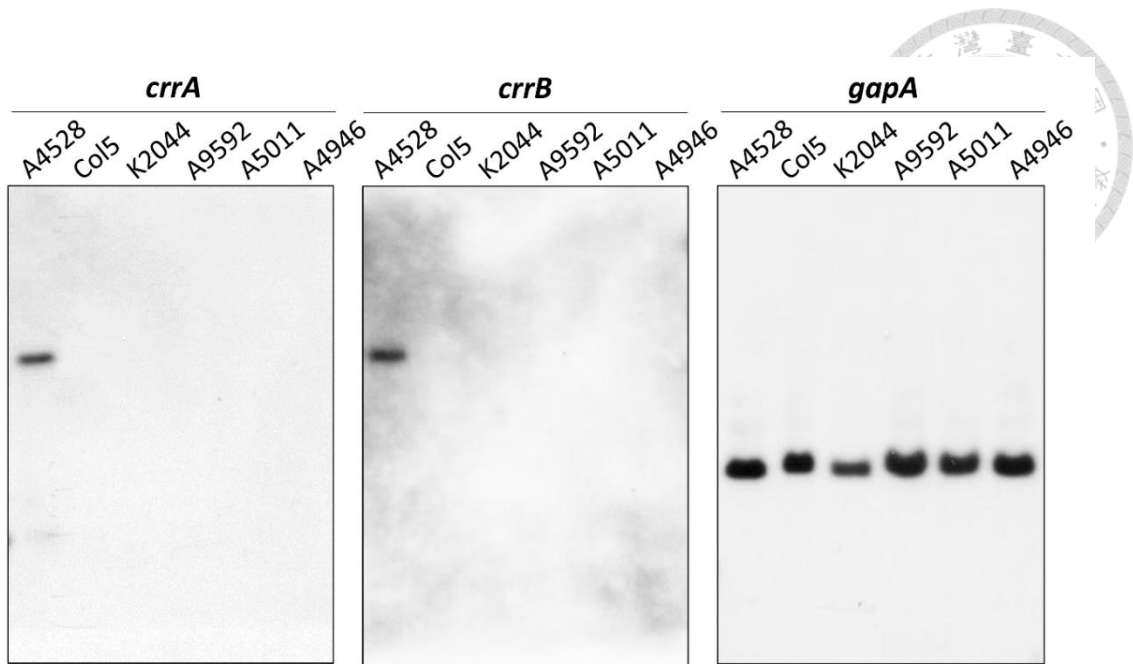
圖三、以聚合酶鏈鎖反應偵測 Col13、Col14 之 *mgrB* 序列

分別以 4 對引子進行聚合酶鏈鎖反應增幅菌株 NTUH-K2044、Col13 和 Col14 之 *mgrB* 序列，4 對引子分別為 P1 (*mgrB*-outer-F and -R)、P2 (*mgrB*-F and -R)、P3 (*mgrB*+1F and +144R) 和 P4 (*mgrB*-inF and -inR)，且菌株 NTUH-K2044 為對照組。



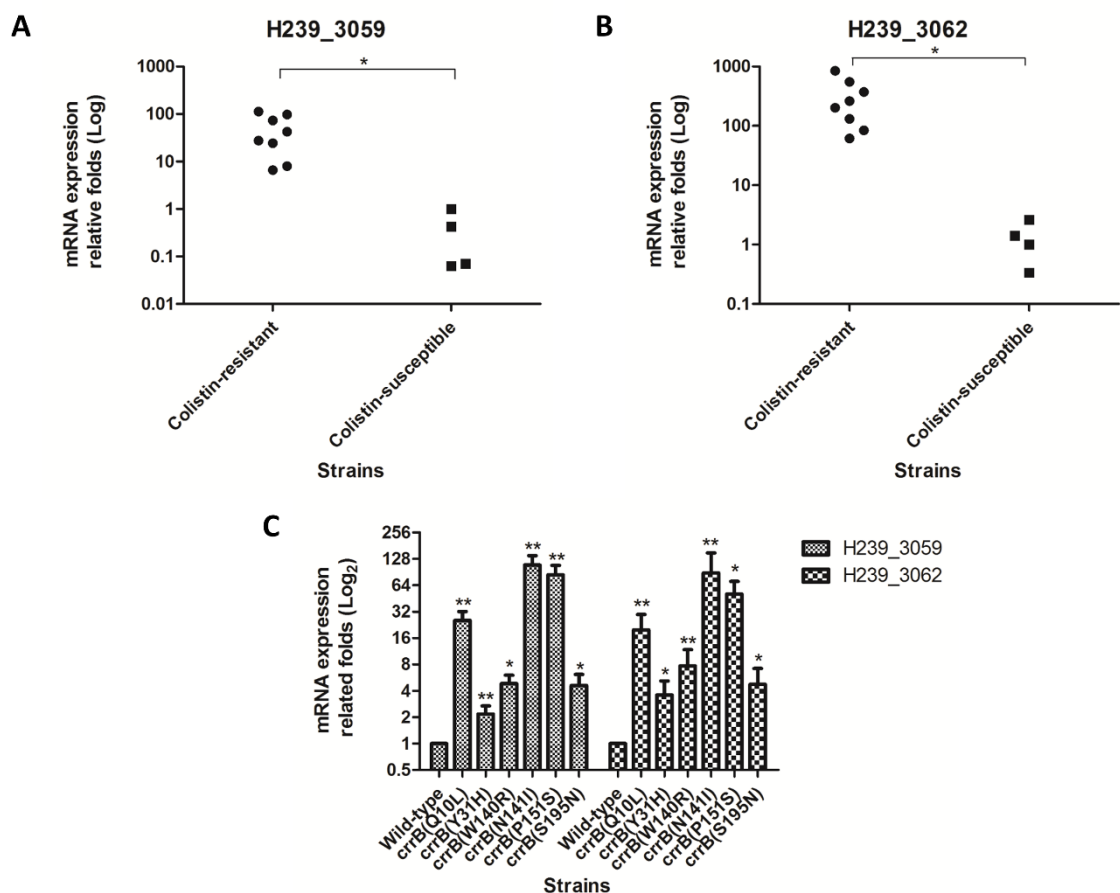
圖四、以南方墨點法證實菌株 Col13 和 Col14 不帶有 *mgrB* 區域之序列

以南方墨點法分別偵測 NTUH-K2044、Col13 以及 Col14 菌株之 *mgrB* 序列，*kdgR* 為 *mgrB* 之鄰近序列，因此作為內部控制組。而 *mgrB* 和 *kdgR* 均利用特定長葉毛地黃配質標記的去氧核糖核酸探針探針偵測，且菌株 NTUH-K2044 為對照組。



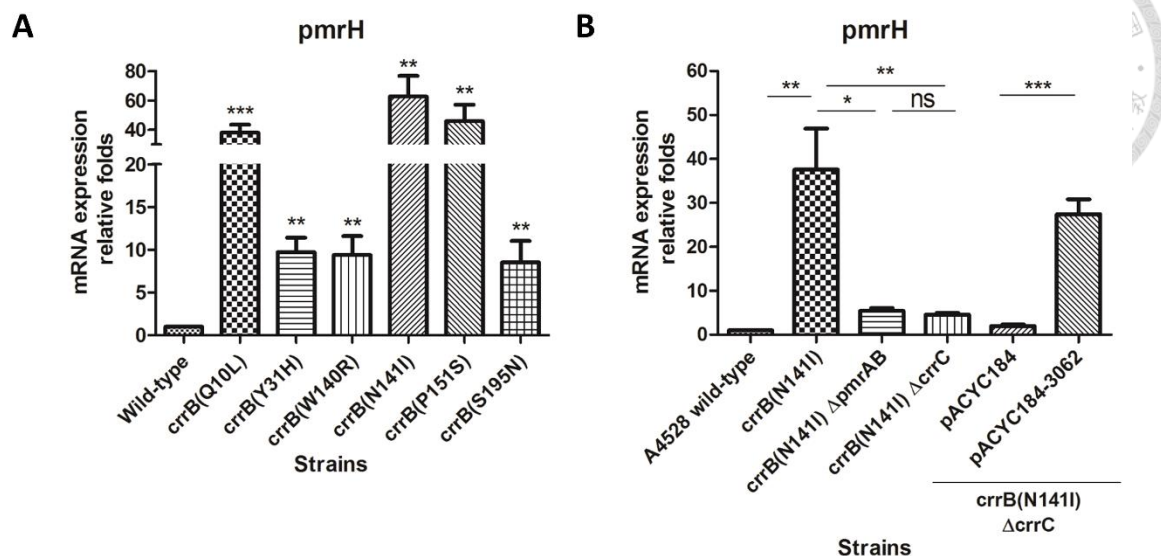
圖五、以南方墨點法證實菌株 Col5、K2044、A9592、A5011 和 A4946 的基因體中不帶有 *crrA* 和 *crrB* 去氧核糖核酸序列

以南方墨點法分別偵測 A4528、Col5、K2044、A9592、A5011 和 A4946 菌株之 *crrA* 和 *crrB* 序列，*gapA* 作為內部控制組。而 *crrA*、*crrB* 和 *gapA* 均利用專一性長葉毛地黃配質標記的去氧核糖核酸探針探針偵測，且菌株 A4528 為對照組。



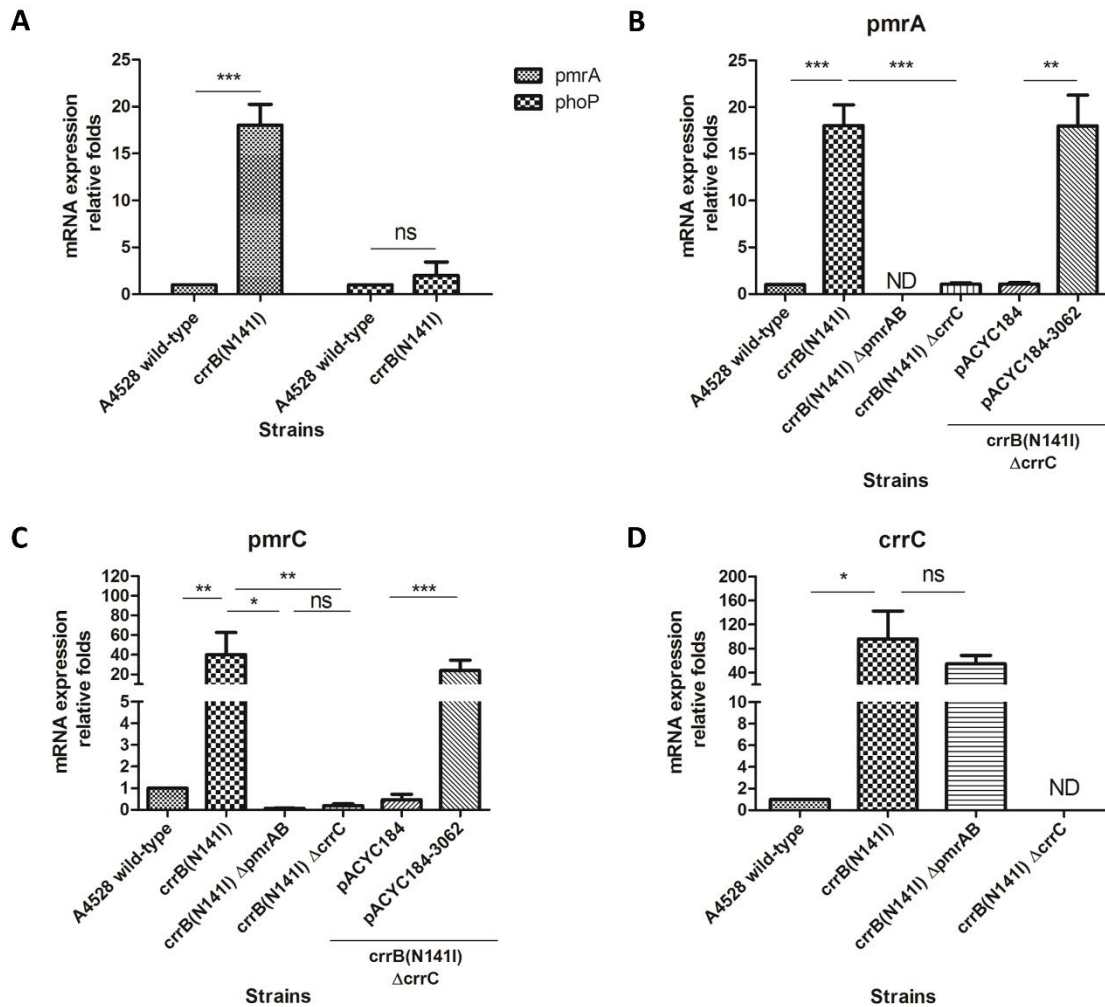
圖六、*H239_3059* 和 *H239_3062* 之基因表現量在帶有 *crrB* 突變的菌株中有顯著的上升

利用定量逆轉錄聚合酶連鎖反應分別偵測克痢黴素抗藥性菌株和感受性菌株之 (A) *H239_3059* 和 (B) *H239_3062* 之相對表現量。 (C) A4528 菌株及其 *crrB* 突變株 (*crrB* Q10L、Y31H、W140R、N141I、P151S 和 S195N) 之 *H239_3059* 和 *H239_3062* 基因表現量。兩菌株間之統計使用 Student's *t* test 做計算 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)，誤差線則為標準差 (standard deviations, SD)。



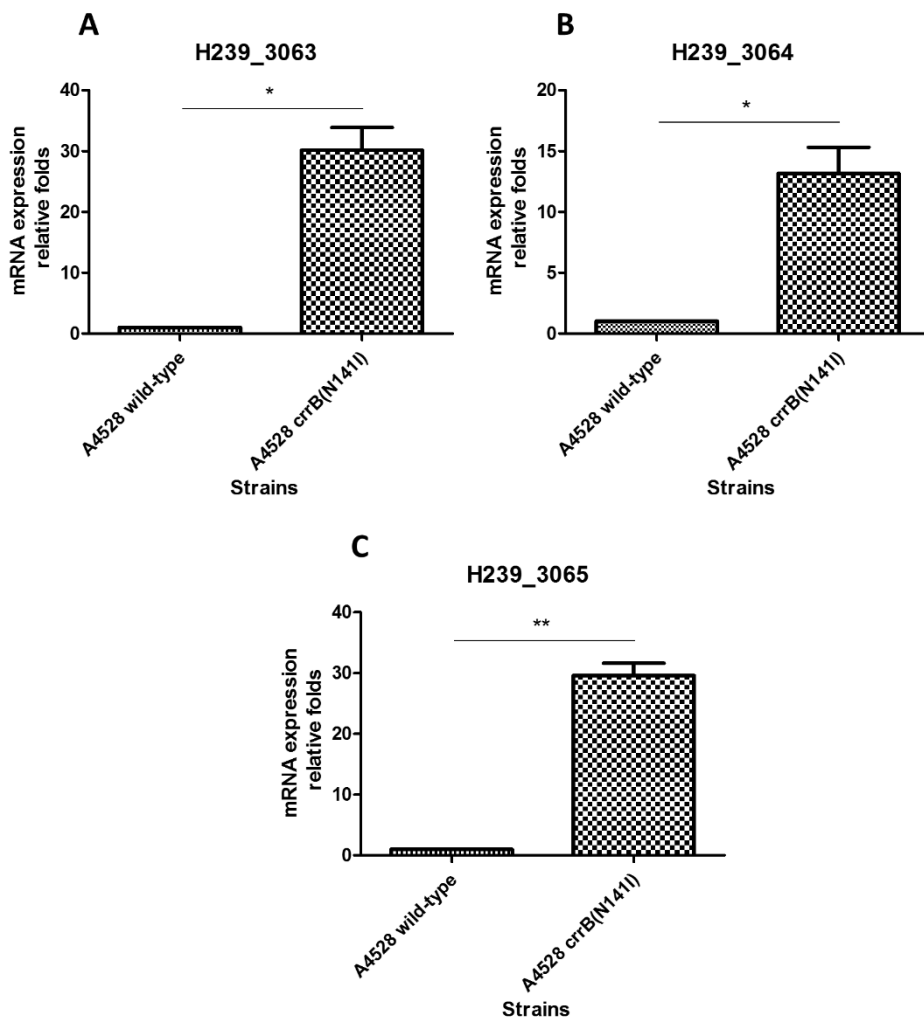
圖七、A4528 菌株之 *crrB* 突變後，其 *pmrH* 之基因表現量即顯著的上升。而進一步剔除 *crrC* 或 *pmrAB* 後，*crrB* 突變株之 *pmrH* 表現量即顯著的下降

利用定量逆轉錄聚合酶連鎖反應分別偵測 (A) A4528 菌株及其 *crrB* 突變株 (CrrB Q10L、Y31H、W140R、N141I、P151S 和 S195N) 之 *pmrH* 基因表現量。(B) A4528 *crrB(N141I)* 突變菌株及其 *pmrAB*、*crrC* 剔除及補回菌株之 *pmrH* 基因表現量。兩菌株間之統計使用 Student's *t* test 做計算 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, $P > 0.05$)，誤差線則為標準差 (standard deviations, SD)。



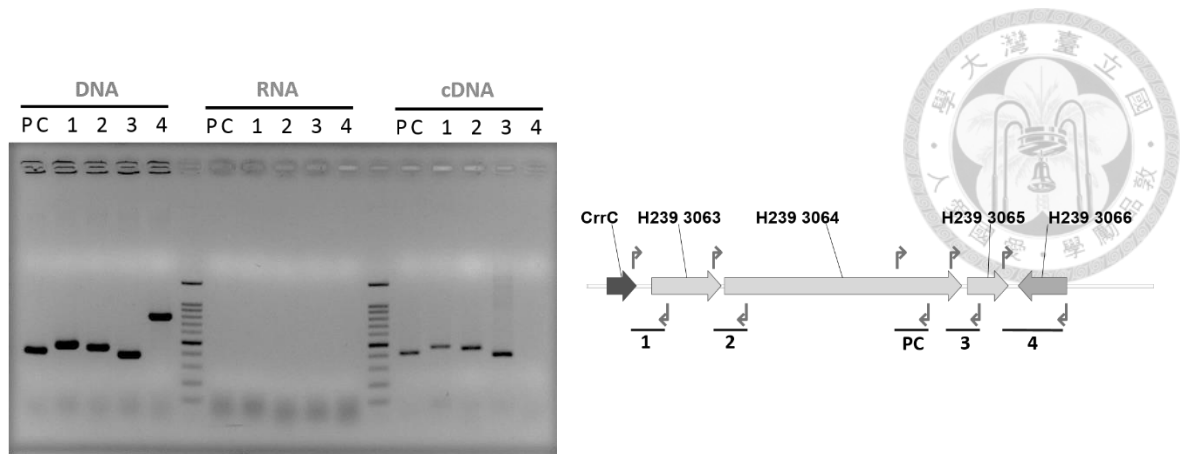
圖八、A4528 菌株之 *crrB(N141)* 突變後，其 *pmrA* 及 *pmrC* 之基因表現量即顯著的上升。進一步剔除 *crrC* 後，*crrB* 突變株之 *pmrA* 及 *pmrC* 表現量即顯著的下降，然而剔除 *pmrAB* 並不會影響 *crrC* 之基因表現量

利用定量逆轉錄聚合酶連鎖反應分別偵測 (A) A4528 與其 *crrB(N141)* 突變株之 *pmrA* 和 *phoP* 基因表現量。(B) A4528 野生型菌株、*crrB(N141)* 突變株、*pmrAB* 剔除株及 *crrC* 剔除及補回菌株之 *pmrA* 基因表現量，(C) A4528 野生型菌株、A4528 *crrB(N141)* 突變株、*pmrAB* 剔除株及 *crrC* 剔除及補回菌株之 *pmrC* 基因表現量。(D) A4528 野生型菌株、A4528 *crrB(N141)* 突變株及 *pmrAB* 剔除株之 *crrC* 基因表現量。兩菌株間之統計使用 Student's *t* test 做計算 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ND, 無法偵測)，誤差線則為標準差 (standard deviations, SD)。



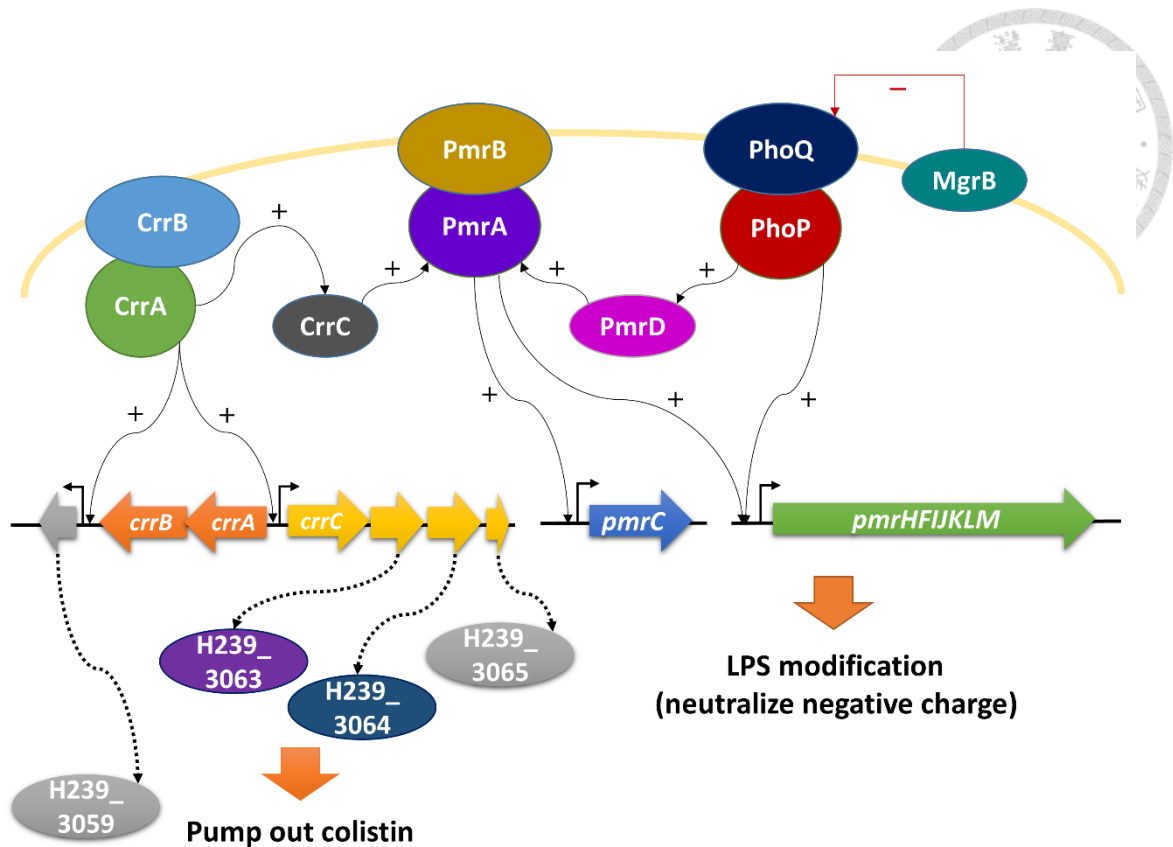
圖九、A4528 菌株之 *H239_3063*、*H239_3064* 及 *H239_3065* 基因表現量均於 *crrB(N141)* 突變後有顯著的上升

利用定量逆轉錄聚合酶連鎖反應分別偵測 A4528 野生型菌株及其 CrrB N141 突變株之 (A) *H239_3063*、(B) *H239_3064* 及 (C) *H239_3065* 基因表現量。兩菌株間之統計使用 Student's *t* test 做計算 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)，誤差線則為標準差 (standard deviations, SD)。



圖十、以聚合酶鏈鎖反應確認 *crrC*、*H239_3063*、*H239_3064*、*H239_3065* 為同一操縱子

分別使用去氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 及互補去氧核糖核酸 (cDNA) 搭配不同引子配對進行聚合酶鏈鎖反應。5 對引子分別為 PC (*H239_3065*-flank-F 和 *CrrCAB-seqR4*)、1 (*3062-3063-F* 和 *3062-3063-R*)、2 (*3063-3064-F* 和 *3063-3064-R*)、3 (*3064-3065-F* 和 *3064-3065-R*) 和 4 (*3065-3066-F* 和 *3065-3066-R*)。



圖十一、克雷伯氏肺炎桿菌對克痢黴素產生抗藥性之機制與調控

pmrHFIJKLM 操縱子受到兩套雙分子訊息調控系統 PmrAB 和 PhoPQ 正向調控，其中 PmrAB 更能同時調控 *pmrC* 的表現。PhoPQ 可以透過 PmrD 將訊號傳遞至 PmrAB，而 PhoPQ 還有一個負向調控子 *mgrB*。不論是 *pmrB*、*phoQ* 或 *mgrB* 的突變，皆被證實會造成脂多醣的修飾增加而導致抗藥性的產生。此外，CrrB 的突變會使得下游 *H239_3059*、*crrC*、*H239_3063*、*H239_3064* 以及 *H239_3065* 的表現量大幅升高。其中 CrrC 可以藉由 *pmrAB* 調控 *pmrHFIJKLM* 操縱子和 *pmrC* 的表現量，使得脂多醣的修飾增加，為導致克痢黴素抗藥性產生的主要原因。而 *H239_3063* 和 *H239_3064* 的大量表現可能使細菌排出克痢黴素，使細菌增加對克痢黴素的耐受性。