

次世代定序技術於公共衛生領域之應用— 以分析2014–2017年帶NDM-5抗藥基因之菌株為例

林鈺棋¹、魏欣怡²、陳筱蓉¹、慕蓉蓉^{1*}

摘要

次世代定序(Next-Generation Sequencing, NGS)具有高輸出量及不受限檢測標的數目之優點，常運用於細菌抗藥基因研究。疾病管制署收集 2014–2017 年 8 株檢出帶 NDM-5 基因之 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) 通報菌株，分別來自北部 2 家 (HH 及 TH) 與南部 1 家 (CH) 醫院。在 HH 醫院 5 株 CRE 中，以脈衝膠電泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)親緣分析、質體圖譜及 NDM-5 所在質體大小均相近，且 NDM-5 之 NGS 組裝片段相同，顯示其來源具流行病學關聯。來自 TH 醫院的 TH1 及 TH2，其 PFGE 親緣分析、質體圖譜及 NDM-5 所在質體大小均相異，但 NDM-5 之 NGS 組裝片段相同，推測與傳播抗藥基因的插入序列 IS26 有關。而 CH 菌株的 NDM-5 質體則與國際間流行的 NDM-5 質體序列相近，顯示該質體可能為境外移入。本文彙整 NGS 技術用於解序重要抗藥質體之經過，以提供 CRE 抗藥機制之分子流行病學參考運用。建議未來持續監測國內 CRE，以掌握國內抗藥細菌分布及流行情形。

關鍵字：次世代定序、NGS、CRE、NDM-5、IS26

前言

近年來次世代定序(Next-Generation Sequencing, NGS)的問世，相較於傳統第一代定序(Sanger sequencing)，除具有低錯誤率及高輸出量的優點外，更已將人類全基因體定序所需成本，從 2001 年的一億美元大幅降低至 2017 年僅需一千美元[1]。目前 NGS 已廣泛運用於包括全基因體定序(whole-genome sequencing)、總體基因體學(metagenomics)、傳染病檢驗、微生物分型[2]及群聚疫情調查[3]等，成為公共衛生界及臨床微生物領域上的一項利器。

¹衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

投稿日期：2018 年 06 月 12 日

²衛生福利部疾病管制署臺北區管制中心

接受日期：2018 年 08 月 31 日

通訊作者：慕蓉蓉^{1*}

DOI：10.6524/EB.201910_35(20).0001

E-mail：jjmu@cdc.gov.tw

由於 NGS 具有不受限於檢測標的數目之優勢，因此在臨床微生物上常用於解析細菌各種抗藥基因，供預測對各類抗生素之感受性[4]。目前細菌抗藥性問題日益嚴重，已衝擊全球衛生醫療。世界衛生組織在 2017 年 2 月底公布對人類健康造成最嚴重威脅的 12 種細菌名單[5]，並依據對新型抗生素需求之急迫程度分成三組，依序為極重要、高度重要及中度重要。其中極重要的細菌包括 *Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa* 及 *Enterobacteriaceae*。這 3 種細菌皆常見於醫院及照護機構內，且已對大多數的抗生素具有抗藥性，包括治療多重抗藥細菌最有效的 carbapenem 類抗生素。

Carbapenem 類抗生素是目前治療 *Enterobacteriaceae* 嚴重感染症之後線用藥[6]，然而，近年來 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*(CRE)快速增加，例如帶有可水解 carbapenem 類抗生素的 New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) CRE 的出現，已嚴重衝擊臨床治療，使醫師面臨無藥可用的窘境。NDM 最早於 2008 年自 1 名久居瑞典的印度人尿液檢體中發現[7]。帶有 NDM 的細菌以腸道菌為主，其中又以 *Escherichia coli* 及 *Klebsiella pneumoniae* 最常見。依據美國 Lahey hospital and medical center 資料顯示，目前已發現 16 種不同的 NDM 基因型別。臺灣境內首次發現帶有 NDM 的細菌，是 2010 年從 1 名自印度就醫返國的國人身上檢出[8]。因應 CRE 問題日趨嚴重，因此衛生福利部疾病管制署（以下簡稱疾管署）設置通報項目「CRE 抗藥性檢測」，供國內各醫療院所志願通報送檢分離自病人臨床檢體之 CRE，以進行 NDM 及 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)基因監測。送驗條件為(1)對 carbapenem 類抗生素，如 imipenem 或 meropenem 等任一種抗藥之腸道菌；或(2)產生 carbapenemase 之腸道菌。

本文由疾管署收集 2014–2017 年檢出帶 NDM-5 之 CRE 通報菌株，進行藥敏 (antimicrobial susceptibility testing)及分型試驗。同時利用 NGS 解序 NDM-5 質體，以進一步瞭解抗藥質體的構造及差異性。

材料與方法

一、抗藥基因檢測分析

疾管署收集 CRE 通報菌株後經萃取細菌核酸，針對常見 carbapenemase 基因，例如 NDM 及 KPC 基因等進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)[9]。PCR 增幅產物經電泳分析後進行定序，完成定序之序列再上傳至美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)網站進行序列比對。

二、藥敏試驗

利用 Phoenix 自動化系統進行 CRE 菌株之藥敏試驗，試驗卡匣內包含多種抗生素（如 amikacin、ceftazidime、imipenem 及 ciprofloxacin 等），以 2 倍稀釋方式加入孔洞中，偵測細菌是否生長，以提供對各種抗生素之最低抑制濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)。前述藥敏試驗結果參照美國

臨床及實驗室標準研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)指引進行抗藥性判定。

三、脈衝電泳分析(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)

為進行菌株分型試驗，於 0.5 倍 TBE buffer 內將 *Xba*I 限制酶切割處理片段以脈衝電泳儀 CHEF Mapper (Bio-Rad, USA)進行電泳分析，並使用經 *Xba*I 限制酶切割處理之 *Salmonella enterica* serotype Braenderup H9812 參考菌株作為片段大小參考指標。待脈衝電泳完成後，將電泳圖譜以電腦掃描儲存為圖檔，並運用分析軟體 Phoretix 1D gel analysis advanced version 5.01 (Nonlinear Dynamics, UK)進行親緣性分析並繪製樹狀圖，以對應之相似指數 (similarity)作為鑑別不同菌株間分子關連性。

四、S1-PFGE

為分析菌株所帶質體之數量及大小，於 0.5 倍 TBE 緩衝液內將 S1 核酸酶處理後的片段以脈衝電泳儀 CHEF Mapper (Bio-Rad, USA)進行 20 小時電泳分析，變換時間 0.5–30 秒，電場值 $6\text{V}/\text{cm}^2$ ，電壓 200V。

五、Southern hybridization

為確認 NDM-5 所在之質體，待 S1-PFGE 電泳完成後，將電泳膠分別以 HCl depurination、NaOH denature 以及 Tris-HCl (pH 7.5) neutralization 處理，並轉漬至 Nylon membrane 上，再與 DIG 標定的 NDM-5 探針進行 20 小時雜交反應，經清洗後加入受質並以化學冷光偵測儀 (ChemiDoc, BioRad)偵測反應訊號，以確認 NDM-5 所在質體位置。

六、以 NGS 進行抗藥質體序列分析

經確認 NDM-5 質體於電泳膠之位置後，將質體自電泳膠切出，並利用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)純化電泳膠內質體核酸。已純化之質體核酸以 QIAseq FX Single Cell DNA Library kit (Qiagen, Germany)建庫，並以 Illumina MiSeq 平臺進行 NGS。定序資料以 BaseSpace Sequence Hub (illumina)之 SPAdes Genome Assembler 進行 de novo assembly，組裝完成的片段分別利用 PlasmidFinder 1.3[10]及 ResFinder 3.0[11](Center for Genomic Epidemiology, DTU, Denmark)分析質體型別及抗藥基因，再將序列上傳至 NCBI 資料庫進行序列比對。

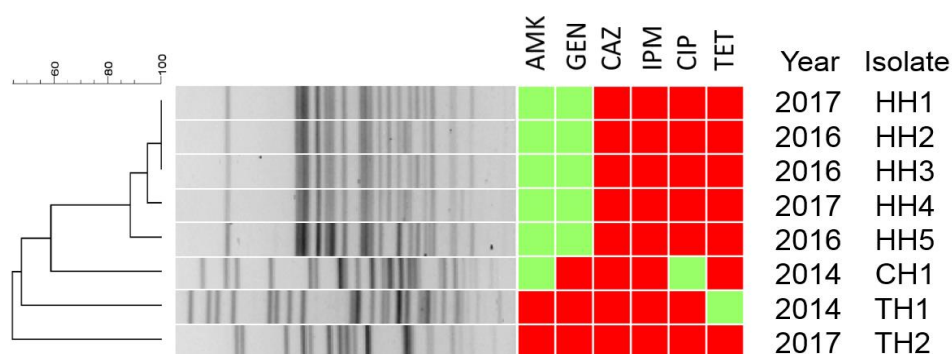
結果

一、帶 NDM-5 菌株之親緣關係及藥敏試驗分析

疾管署自 2014 年至 2017 年 1 月底總計收集 8 株帶 NDM-5 之 CRE 通報菌株，經菌種鑑定均為 *E. coli*，分別來自 8 個不同個案，由 3 家醫療院所通報。其中 2 家位於北部，分別通報 5 株(HH1–5)及 2 株(TH1–2)，另 1 家位於南部，通報 1 株(CH1)。該 8 株 CRE 菌株之 PFGE 親緣關係圖及藥敏試驗結果如圖一所示。通報自 HH 醫院之 5 株菌株(HH1–5)，通報年份介於

2016–2017 年，彼此相似指數高於 85%。然而，其他 3 株(CH1、TH1 及 TH2) 之相似指數均低於 60%。

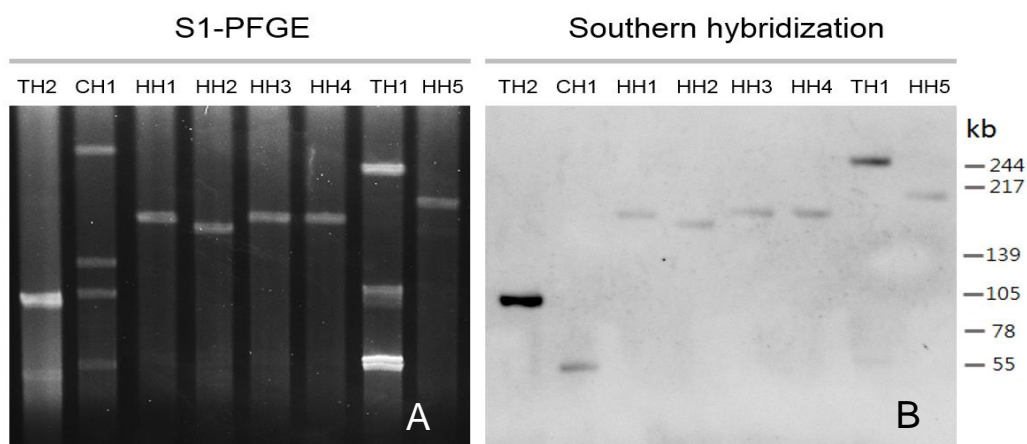
依據藥敏試驗結果，8 株 CRE 菌株對 ceftazidime 及 imipenem 均具抗藥性。其中 HH1–5 對 ciprofloxacin 及 tetracycline 亦有抗藥性，但對 aminoglycoside 類抗生素 amikacin 及 gentamicin 具敏感性。CH1 對 amikacin 及 ciprofoxacin 具敏感性。TH1 僅對 tetracycline 具有敏感性。TH2 則對上述抗生素均具抗藥性。



圖一、2014–2017 年 8 株 CRE 之 PFGE 親緣關係及藥敏試驗分析(AMK: amikacin, GEN: gentamicin, CAZ: ceftazidime, IPM: imipenem, CIP: ciprofloxacin, TET: tetracycline)

二、NDM-5 質體分析

為瞭解 8 株 CRE 菌株間質體之差異性，以 S1-PFGE 將菌株之染色體及質體進行大小片段區分 (圖二 A)，結果顯示 HH 醫院之 5 株菌株(HH1–5)均僅具單一大小約 180 kb 的質體，而其他 3 株 (CH1、TH1 及 TH2) 則分別具有 2 至 4 個質體。接續利用 Southern hybridization 確認 NDM-5 位置，結果顯示 HH1–5 之 NDM-5 確實位於大小約 180 kb 質體中，CH1、TH1 及 TH2 之 NDM-5 則分別位於大小約 50 kb、90 kb 及 240kb 質體中 (圖二 B)。



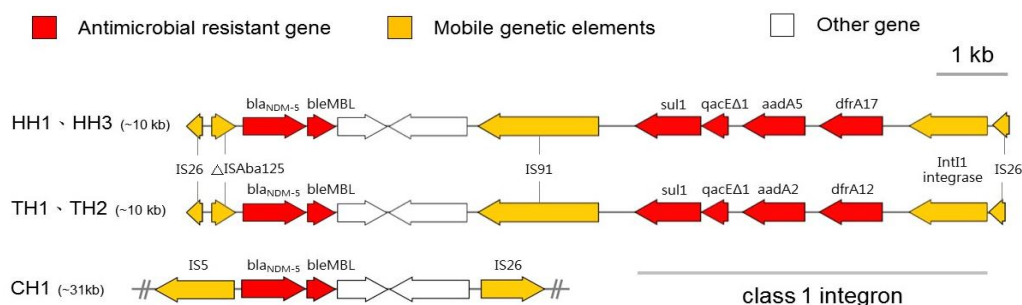
圖二、2014–2017 年 8 株 CRE 之質體圖譜(A)及 NDM-5 質體定位(B)

三、NGS 分析 NDM-5 質體

為瞭解菌株所攜 NDM-5 之質體的差異性，遴選 5 株(HH1、HH3、TH1、TH2 及 CH1)NDM-5 所在之質體進行 NGS。經 *de novo* assembly 後進行質體分型，結果顯示 HH1、HH3、TH1 及 TH2 之 NDM-5 質體型別均為 IncFII，而 CH1 之 NDM-5 質體型別則為 IncX3。此外，5 株 NDM-5 質體均組裝出包含 NDM-5 的片段，將 NDM-5 片段進行比對，並依序列相同程度可分成 3 類(圖三)：

- (一)HH1 及 HH3 均組裝出長度約 10kb 的片段，經比對兩者為相同序列，包含 2 組抗藥基因結構，分別為 bla_{NDM-5}-bleMBL (bleomycin resistance gene)及 class 1 integron。bla_{NDM-5} 及 bleMBL 已被證實為共用同一個啟動子(promoter)的基因結構，該啟動子位在上游 IS_{Aba125} 之 3'端部分序列 [12]。class 1 integron 除 integrase 外，亦包含可分別抵抗 trimethoprim (*dfrA17*)、streptomycin (*aadA5*)及 sulfonamide (*sul1*)等抗生素的抗藥基因，以及具多重抗藥功能的 efflux pump (*qacE*Δ1)。此外，片段兩端為組裝不完全的插入序列(insertion sequence, IS)26，並形成正向重複序列(direct repeat)。
- (二)TH1 及 TH2 組裝出長度約 10kb 且序列相同的片段，同樣包含 bla_{NDM-5}-bleMBL 及 class 1 integron 等 2 組抗藥基因結構。其中除 TH1 片段之 *aadA2* 及 *dfrA12* 相異於 HH1 片段之 *aadA5* 及 *dfrA17*，以及 Int1 與 IS26 間序列部分差異外，其他序列皆與 HH1 片段相同。
- (三)CH1 則組裝出約 31kb 的片段，其中僅包含一組抗藥基因結構 bla_{NDM-5}-bleMBL，且 bla_{NDM-5} 上游為 IS5 序列，異於 HH1 及 TH1 的 ΔIS_{Aba125} 序列。此外，bla_{NDM-5}-bleMBL 下游為 IS26，亦不同於 HH1 及 TH1 的 IS91 序列。

將各包含 NDM-5 片段上傳至 NCBI 資料庫進行序列比對，結果顯示 HH1 片段與南韓 pKBN10P04869A(CP026474)及中國 pNDM5-020007 (CP025626)之序列相近，質體型別均為 IncFII。TH1 片段與中國 pLZ135-NDM (MF353156)、美國 pNDM-d2e9 (CP026201)及丹麥 pAMA1167-NDM-5 (CP024805)序列相近，質體型別同為 IncFII。此外，CH1 片段則與印度 pNDM-MGR194 (KF220657)及中國 pNDM-QD29 (KU167609)[13]相近，質體型別均為 IncX3。



圖三、NDM-5 質體組裝片段之比較

討論

本文利用 NGS 分析國內帶有 NDM-5 質體之 CRE，得知來自 HH 醫院 HH1-5 由於 PFGE 親緣分析高度相似，具有類似的質體圖譜及 NDM-5 質體，亦組裝出相同的 NDM-5 片段，因此 HH1-5 可能來自相同的 CRE 菌株。此結果對比於同樣來自同一家醫院的 TH1 及 TH2 菌株，其 PFGE 親緣分析低度相關，且質體圖譜及 NDM-5 質體大小皆有明顯差異，故可知兩菌株來源不同。但兩者卻具有相同的 NDM-5 片段，此意外結果可能與組裝片段兩端的 IS26 有關。目前在各種抗藥質體中常見 IS26 的蹤跡，且大多位於抗藥基因附近。IS26 由一個 Tnp26 轉位酶及兩端各 14bp 反向重複序列(indirect repeat)組成，具有稱為 translocatable units 的新型易位機制，可攜帶一個或多個抗藥基因，甚至是 class 1 integron，插入至其他同樣具有 IS26 的地方，因此被認為是傳播抗藥基因的重要角色[14]。在本文可從 TH1 與 TH2 兩者在不同質體上卻發現相同的 NDM-5 片段獲得證實。

此外，除 CH1 外，其他片段皆組裝至 IS26 附近中斷。由於 IS26 長度達 820bp，大於 Illumina MiSeq 平臺最大讀取長度 600bp (2x300 bp)，又質體可能包含一個以上的 IS26，皆增加序列組裝的困難度。因此未來如面對新型抗藥質體等需完整解序之時，使用組裝長片段序列的第三代定序（如 Nanopore 及 Pacbio），將可提升序列組裝效率。

CH1 的 NDM-5 質體型別為 IncX3。已有文獻指出帶有 NDM-5 之 IncX3 質體已陸續在中國、印度、澳洲及丹麥被發現[13]。質體大小皆為 46kb，且序列均相近於印度的 pNDM-MGR194 質體，其中在澳洲及丹麥發現帶有 NDM-5 之 IncX3 質體的 2 名病例，均有印度的旅遊史，顯示 IncX3 質體可能為印度帶有 NDM-5 基因之主要質體型別。然而，在中國發現帶有 NDM-5 之 IncX3 質體，其病例均無國外旅遊史，且細菌型別主要為 *E. coli* ST167，顯示該帶有 NDM-5 的菌株可能已在地化成為中國本土主要流行株。本文 CH1 片段之序列與印度 pNDM-MGR194 質體相似度最高，兩者質體型別同為 IncX3，大小亦相近，顯示 CH1 之 NDM-5 質體可能為境外移入之國際間流行的質體。然而該病例無國外旅遊史，但國內尚無其他 NDM-5 文獻可供進一步比較，因此未來仍應持續監測 CRE，以掌握國內抗藥細菌分布及流行情形。

過去進行細菌抗藥性相關研究，常受限於檢測標的數目及技術限制，僅能聚焦於某些已知的抗藥基因，但對於其他與抗藥基因相關部分，如抗藥質體型別、IS 序列及未知的新型抗藥基因等，多難以同時有效釐清。再者，因腸道細菌可直接交換質體的情況，單以傳統 PFGE 進行菌株分型，實難確認其質體或抗藥基因是否同源。藉由 NGS 技術解序抗藥基因，可獲得更細緻的分子生物資訊以釐清菌株來源，並掌握特定抗藥性菌株流行演化之趨勢。本文利用 NGS 加速瞭解抗藥質體之變異，可提供未來分子流行病學研究之參考運用。

參考文獻

1. Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). Available at: www.genome.gov/sequencingcostsdata.
2. 邱乾順、劉儼毅、廖盈淑：細菌基因分型技術在食媒疾病分子流行病學上的應用。疫情報導 2017；33(2)：22–30。
3. Kong Z, Zhao P, Liu H, et al. Whole-Genome Sequencing for the Investigation of a Hospital Outbreak of MRSA in China. *PLoS One* 2016; 11: e0149844.
4. Metcalf BJ, Chochua S, Gertz RE Jr, et al. Using whole genome sequencing to identify resistance determinants and predict antimicrobial resistance phenotypes for year 2015 invasive pneumococcal disease isolates recovered in the United States. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 1002 e1-1002. e8.
5. World health organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at: <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
6. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 489–95.
7. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046–54.
8. 黃繼慶、簡麗蓉、顏哲傑等：NDM-1 腸道菌感染症的省思。疫情報導 2010；26(26)：346–50。
9. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 119–23.
10. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 3895–903.
11. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2640–4.
12. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1693–7.
13. Zhu YQ, Zhao JY, Xu C, et al. Identification of an NDM-5-producing *Escherichia coli* Sequence Type 167 in a Neonatal Patient in China. *Sci Rep* 2016; 6: 29934.
14. Harmer CJ, Moran RA, Hall RM. Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26. *MBio* 2014; 5: e01801–14.