

計畫編號：MOHW112-CDC-C-315-134307

衛生福利部疾病管制署 112 年署內科技研究計畫

計畫名稱：抗藥腸桿菌 CRE 之監測與抗藥基因型別分析

112 年 度 研 究 報 告

執行單位：研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：慕蓉蓉

研究人員：林鈺棋

研究人員：蔡幸君、張仁哲

執行期間：112 年 1 月 1 日至 112 年 12 月 31 日

目	錄	
一、摘要：	中文摘要	3
	英文摘要	4
二、本文		
	(一)、前言	5
	(二)、材料與方法	8
	(三)、結果	10
	(四)、討論	13
	(五)、結論與建議	14
	(七)、參考資料	15
	(六)、圖表	16

共 (23) 頁

計畫中文摘要：

關鍵詞：抗藥基因

多重抗藥性病原菌快速大量的增加對人類健康及公共衛生嚴重威脅。過去十年來，多重抗藥(multidrug-resistant, MDR)、廣泛多重抗藥(extensively-drug resistant, XDR) 腸桿菌(Enterobacteriaceae) 造成的感染症顯著上升。其中以 carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE)感染症的出現，其治療更為棘手。Colistin resisitnat 之 MCR-1 發現，使得後線用藥 colistin 效用受到嚴重限制。carbapenease 與 MCR-1 均位於可移轉的抗藥質體上，近年同時帶有 carbapenease 與 MCR-1 的菌株遽增，世界各國皆在不同物種及不同菌種中發現此類菌株存在甚或傳播，導致人類面臨多重抗藥病原菌所造成的最緊迫威脅。

本計畫執行通報疾病管制署之 carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) 監測，針對國內醫療機構 CRE 陽性菌株中帶有可產生 carbapenemase 與 MCR 基因的类型分析與流行現況，除提供醫院應積極介入相關感染管制措施，並了解台灣 CRE 抗藥菌之流行病學，作為制定醫療機構防治多重抗藥菌相關政策之科學性證據(Evidence based policy making)。

計畫英文摘要：

keywords : antimicrobiol resistance

The dramatic increase of multi-drug resistant pathogen has been a great concern that may constitute a public health issue. The carbapenemase producing is particularly problematic when encountered in the selection of antibiotics for treatment. The use of colistin has been challenged by the discovery of MCR-1, colistin resistant gene. Carbapenemase and mcr-1 genes are located in mobile genetic elements (such as transposon, integron, plasmid) which make the emergence of coproducing carbapenemase and MCR-1 and global spreading.

The goal of this study is to perform surveillance of carbapenemase and mcr gene variants in reported CRE isolates from hospitals. The results will automatically feedback to staffs of the infection control department of hospitals to help them making decision in implementing appropriate infection control measures. Meanwhile, the results will be analyzed in epidemiological viewpoint in order to find out the high risk area of hospital and provide scientific evidence for making policy or guideline to combat multi-drug resistance from CRE.

本文

(一)前言

細菌抗藥性(antimicrobial resistance, AMR) 近年大量增加及快速傳播成為全球公衛的嚴重問題(1)，尤其針對臨床重要用藥，例如 carbapenems、extended spectrum β -lactams、fluroquinolones 等多重抗藥性細菌持續出現，讓世界衛生組織(world health organization, WHO)列出 3 種不同程度緊急需求新抗生素的細菌，其中最緊急的是多重抗藥的 carbapenem resistant 細菌，這些細菌在醫療機構、養護中心病患身上因用藥選擇的困難而造成嚴重感染之威脅。

2009 年 Yong et al 發現新型 carbapenemase, NDM-1(2)，疾病管制署(以下稱本署)於 2010 年 9 月 9 日將 NDM-1 列入第四類法定傳染病，隨即同步進行 CRE 抗藥性細菌之監測，目前 CRE 的監測，對於 CRE 感染之高危險群(如呼吸器依賴之病人、長期住院病人或曾發現 NDM、KPC 陽性病人之醫院等)病人之臨床檢體所培養出之 CRE 菌株，鼓勵醫院檢送至昆陽實驗室，進一步確認是否為帶 NDM、KPC 之菌株，以提醒醫院對於感染之高危險病室應積極介入感染管制措施，避免感染其他病人或造成群突發，同時也可以協助醫院對於介入措施後，作為持續監測以檢視防治工作成效的驗證。

2015 年 Liu, et al 報導新型抗藥基因，MCR-1，降低用於治療部分

carbapenem resistant 感染用藥，colistin 之效果，使得 carbapenem resistant 治療問題更加棘手(3)。本署 CRE 監測中亦檢測出台灣醫療機構病患檢體中同時帶有 MCR-1 及 NDM-9 之 *E. coli* 菌株(4)，carbapenem 類抗生素已是 β -lactam 類的後線用藥，且 CRE 通常同時攜帶其他 extended-spectrum β -lactamase(ESBL) 等抗生素的抗藥基因 (5)，加上 carbapenemase 以及 MCR-1 基因同時出現於同一菌株之現象遽增(6-8)，使得最後線 polymyxin 類抗生素之有效使用性無法確保，更限制 CRE 感染症的選擇用藥，將造成抗生素治療最後一道防線的一個重要突破口，而我們也將進入「後抗生素時代 (post-antibiotic era)」，如此，將對全球各國的醫療、公衛、甚至是經濟的影響將是非常嚴重的。

本計畫以分析各醫療機構通報之 CRE 菌株中五種主要之 carbapenemase (the big five) 為監測對象，除原本法傳系統中帶 NDM、KPC 基因外，另外增加分析包含其他主要之 carbapenemase: IMP、VIM 及 OXA-48 等。因應 MCR 基因之出現與快速傳遞，本計畫亦加入 MCR 基因之監測，以了解 carbapenemase 與 MCR 在台灣的流行現況。醫院可送檢相關的檢體，如菌株、環境檢體等，檢驗結果將回饋至院方感染管制單位及本署相關人員，據以收集相關流病資料進行分析，研判醫療機構高傳播性抗藥菌株可能之高風險場所(High risk region)，並分析抗藥基因流行與變異結果，了解可能之傳播途徑，以利對未來抗藥趨勢擬

定解決方針，降低多重抗藥性細菌之發生。

(二)材料與方法

1. 實驗菌株

收集來自通報疾病管制署之 CRE 送驗菌株，挑選帶 carbapenemase、MCR 基因之陽性菌株做進一步的抗藥基因型別分析。

2. 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)。

以非選擇性培養基隔夜培養細菌，萃取細菌 DNA。針對目前常見的 carbapenemase 基因 (KPC、VIM、IMP、NDM 及 OXA-48) 及 MCR 基因進行 multiplex PCR。於 1.5% agarose gel 中進行電泳分析。

3. 以 NGS 進行抗藥質體序列分析

本實驗方法分成兩部份，核酸萃取以及序列分析。

(1) 核酸萃取：以 Qiagen Midi Prep 試劑或自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science) 進行核酸萃取。

(2) 序列分析：以 Nextera DNA Flex Library Prep Kit (illumina, 美國) 進行建庫，採用 Illumina 系統進行高通量定序。NGS 定序資料以 BaseSpace Sequence Hub (illumina) 之 SPAdes Genome Assembler 進行 de novo

assembly 組裝。

(三) 結果

1. 分析 CRE 菌株之 carbapenemase 種類與分布情形:

CRE通報定義為主要對carbapenem類抗生素（doripenem、imipenem、meropenem或ertapenem等）任一種抗藥之腸道菌。103年至112(本)年，通報疾病管制署之CRE菌株共約 8300 株，其中3300株約39.8%為帶carbapenemase之CPE (carbapenem producing Enterobacteriaceae)。 *Klebsiella pneumoniae*為主要的CPE菌株(占比73.2%)，其次是*E. coli*(占比13.2%)、*Enterobacter* spp.(占比7.4%)、*Citrobacter* spp.(占比4.3%) 及其他(占比1.9%)(圖一)。

本年(112)年1月至10月底共通報779件CRE，其中590件帶有carbapenemaseru 基因。

分析10年中CPE中之carbapenemase基因，KPC仍為台灣主要流行的carbapenemase，占比為52.2% (圖二)，主要存在*Klebsiella pneumoniae* (圖三)；其次是 OXA-48 like，占比20.8%，主要亦存在 *Klebsiella pneumoniae*。第三為 IMP 占比10.7%，主要存在 *Enterobacter* spp.，接續為NDM，主要存在 *E. coli*，占比為 9.4%。VIM主要在 *Klebsiella pneumoniae*，占比 4.0 % (圖二及三)

以分年趨勢看，103年開始KPC一直為主要流行之carbapenemase，直至今112年OXA-48 like超越KPC成為該年

主要之 carbapenemase。OXA-48 like 自 103 年開始出現後排名第四，之後快速增加，至 109 年正式超越 IMP 上升至第二，之後急遽上升成為 112 年最主要之 carbapenemase。NDM 近年也快速增加，109 年與 IMP 並列第三，110 年起開始超越 IMP (圖四)。

2. CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布:

總體 CPE 菌株中最大的 KPC 主要分布北中南部。IMP 於 2001 年報導開始出現於台灣南部，迄今仍以南部居多。東部地區趨勢與北中南較不同，主要以近年快速增加的 OXA-48 like 與 NDM 為主 (圖五)。

3. MCR 基因於通報 CRE 菌株之分布

103-112 年間通報 CRE 且 colistin ≥ 2 菌株中，檢測帶有 MCR-1 至 MCR-8 之菌株共 21 株，17 株帶 MCR-1，9 株為 *E. coli*，8 株為 *Klebsiella pneumoniae*。4 株帶 MCR-8，均為 *Klebsiella pneumoniae* (圖六)，107 年菌株通報自台東，108 年來自台南，111 年兩株來自桃園同一家醫院。初步分析 8 株帶 MCR 之 *Klebsiella pneumoniae*，由於 MCR-8 為新出現之 MCR variant，因此下述段落細部分析兩株帶 MCR-8 之 *Klebsiella pneumoniae*。

4. 分析 107 及 108 年兩株帶 MCR-8 質體

以 MinION 全基因定序長片段，輔以較精準 Illumina 短片段作校

正，完成107及108年兩個帶MCR-8質體；pKP18287-MCR8和pKP19288-MCR8組裝分析，兩質體全長分別為143 Kb與97.8Kb (accession no.: OM146019，OM311153)。

兩質體之mcr-8基因均包含在IS903B-orf-ISEcl1-mcr-8-orf-ISKpn26 cassette，兩端為IS903B及ISKpn26 insertion sequences。以pairwise sequence alignment比對，與中國臨床株pKP32558-2-mcr8完全相同。與p2019036D-mcr8-345kb(動物的菌株)相差一段ORF，與pKP91 及 pKA2-3(皆動物的菌株)相似，差異主要在其cassette兩端insertion sequences均為IS903B，且另有部分ORF差異(圖七)。

5. CPE菌株中急速增加之OXA-48 like carbapenemase

OXA-48 like 今(112)年成為 CPE 菌株中最高占比的 carbapenemase，且數量快速增加，以 OXA-48 及 OXA-181 兩種 variants 為主。本計畫去(111)年曾分析 7 株帶 OXA-48 質體，推測有 2 種傳播模式：同源菌株傳播及不同菌種間同源質體傳播。由於通報系統之改變，目前 CRE 經由 LIMS 系統通報，通報資訊欄位較少，需花費較長時間取得流病等資訊，待資訊收集分析完畢，將採取分菌種、分地地區以及不同基因等變數選取菌株做後續實驗分析。

(四) 討論

1. 近十年收集之 CPE 菌株，整體以 KPC 為占比最高的 carbapenemase，109 年開始，OXA-48 like 與 NDM 有增加之趨勢，尤其 OXA-48 like 於 112 年已躍昇當年度主要之 carbapenemase，超越 KPC，應為在台灣東部占比超過一半之緣故，後續需分析抗藥傳遞方式與機制，提供群聚事件之探討。
2. 目前計畫收集之帶 MCR 質體有 MCR-1 及 MCR-8 兩種基因，由於帶 MCR-1 之質體已於先前分析且有論文產出(9)，因此本年度分析 2 株來自不同地區帶 MCR-8 之質體。雖然質體大小不同，分別為 143 Kb 與 97.8Kb，但攜帶 MCR-8 基因 cassette 相同。由於 insertion sequence 組成之 gene cassette，在基因的傳播上亦可能扮演重要角色(10,11)，未來搭配 111 年之 MCR-8 質體，進一步細部分析，以了解 MCR-8 在台灣流行之型態，並監測新型 MCR 基因之出現。

(五) 結論與建議

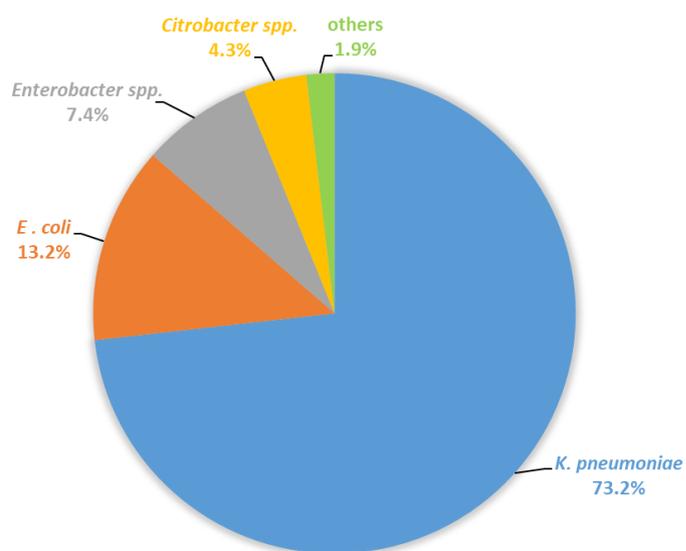
1. 帶 MCR 質體之菌株雖然為少數，但若與帶 carbapenemase 之質體轉至同一菌株內，將使多重抗藥性情況增加。104 年經通報系統通報第一株同時帶有 MCR-1 與 NDM-9 基因之菌株 (12)，倘未來同時帶有 carbapenemase 及 MCR-1 的菌株持續增加，將嚴重衝擊臨床治療，使醫師面臨無藥可用的困境，因此除持續加強監測分析，並需建置抗藥質體基因資料庫以供比對，提供感染管制措施之施行，以避免蔓延實為當務之急。
2. OXA-48 like 近年在全世界都有增加之趨勢，依去年結果顯示，可能透過質體交換或 gene cassette 的 transposition 傳播抗藥基因，因此若單以傳統 MLST 進行菌株分型，僅能掌握同源菌株之傳播方式，難以瞭解其他如抗藥質體或抗藥基因易位等傳播方式。本計畫明年度將分析 OXA-48 like 快速傳播之區域與醫院，利用 NGS 解序抗藥基因，可獲得更細緻的分子生物資訊以釐清菌株及抗藥基因之來源，掌握抗藥菌株傳播與流行演化趨勢。

(六) 參考資料

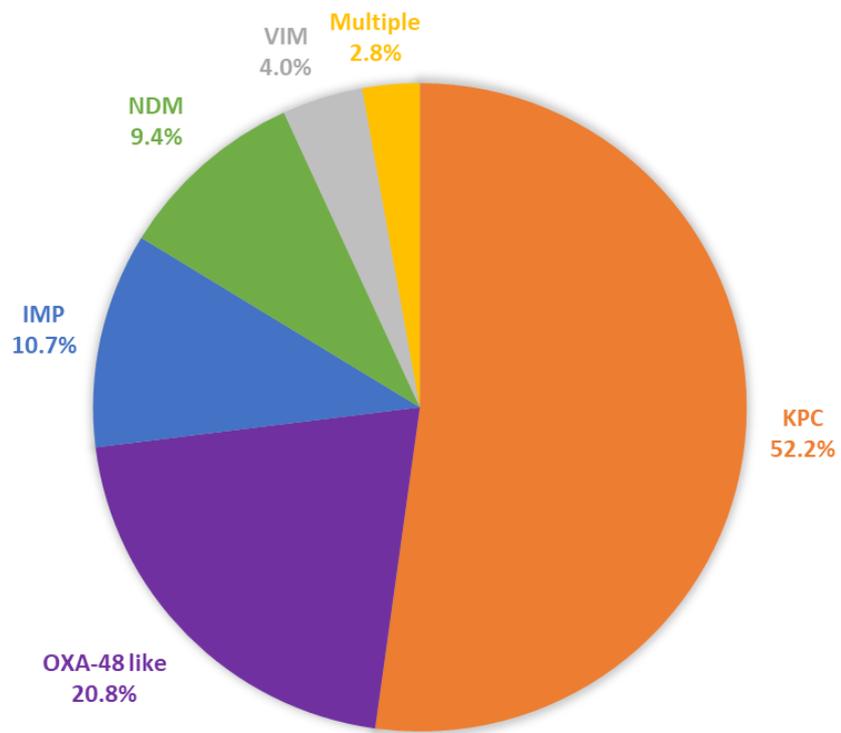
1. Anonymous. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Accessed 16 March 2018.
2. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. 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* 53:5046-54.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 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* 16:161-8.
4. Lin YC, Kuroda M, Suzuki S, Mu JJ. 2019. Emergence of an *Escherichia coli* strain co-harboring *mcr-1* and *bla*NDM-9 from a urinary tract infection in Taiwan. *J Glob Antimicrob Resist* 16:286-290.
5. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. 2016. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents* 48:598-606.
6. Arabaci C, Dal T, Basyigit T, Genisel N, Durmaz R. 2019. Investigation of carbapenemase and *mcr-1* genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Infect Dev Ctries* 13:504-509.
7. Jin L, Wang R, Wang X, Wang Q, Zhang Y, Yin Y, Wang H. 2018. Emergence of *mcr-1* and carbapenemase genes in hospital sewage water in Beijing, China. *J Antimicrob Chemother* 73:84-87.
8. Liu BT, Song FJ. 2019. Emergence of two *Escherichia coli* strains co-harboring *mcr-1* and *bla* NDM in fresh vegetables from China. *Infect Drug Resist* 12:2627-2635.
9. Lin Y, Kuroda M, Suzuki S, Mu J. 2021. Emergence of the **mcr-1** colistin resistance gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *J Glob Antimicrob Resist*. 24:278-284.
10. Liu L, Feng Y, Long H, McNally A, Zong Z. 2018. Sequence Type 273 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carrying *bla*NDM-1 and *bla*IMP-4. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
11. Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. 2010. Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4914-6.

12. Lin Y, Kuroda M, Suzuki S, Mu J. 2019. Emergence of an *Escherichia coli* strain co-harboring **mcr-1** and bla_{NDM-9} from a urinary tract infection in Taiwan. *J Glob Antimicrob Resist*. 16:286-290.

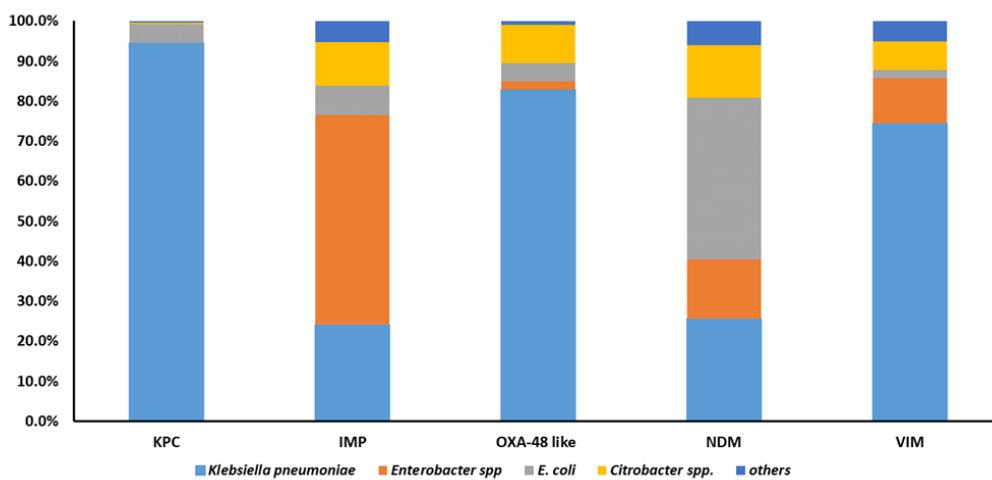
(七) 圖表



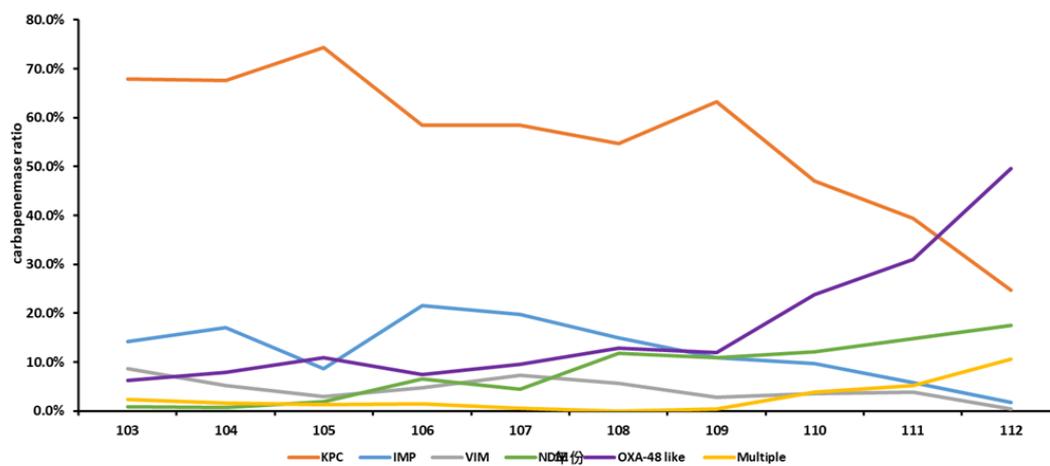
圖一：帶carbapenemase菌株之分布



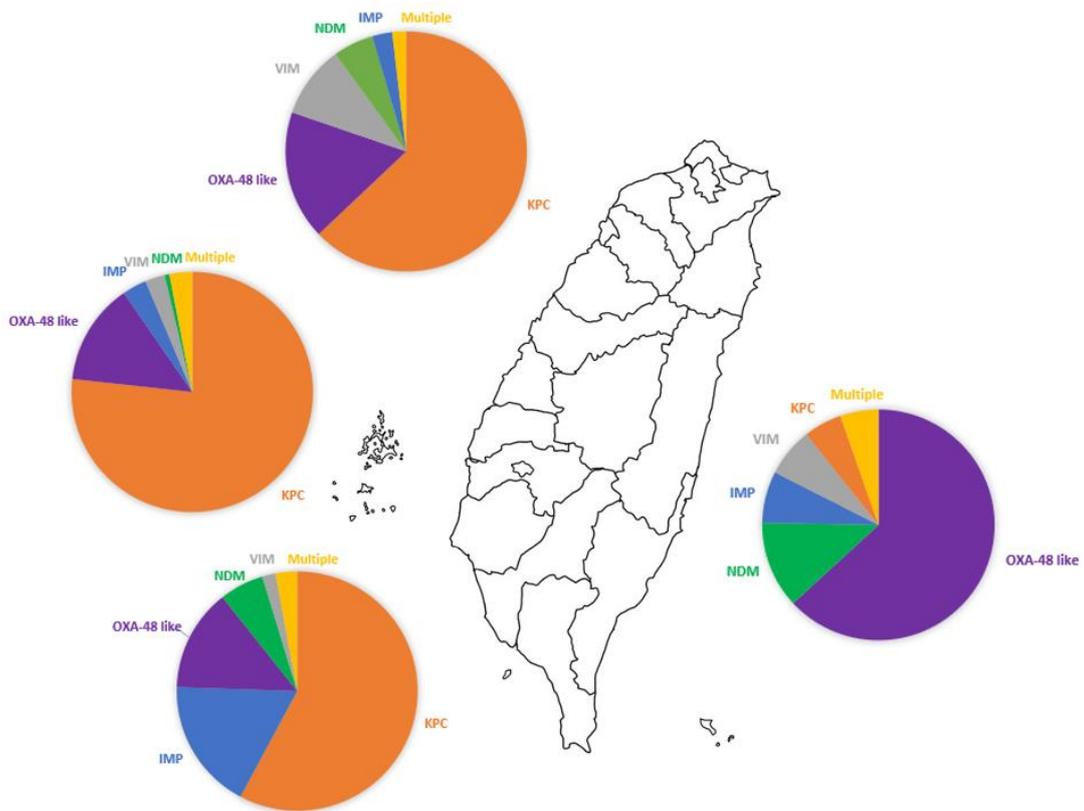
圖二: 103 年至 112 年 CPE 菌株中 carbapenemase 之占比



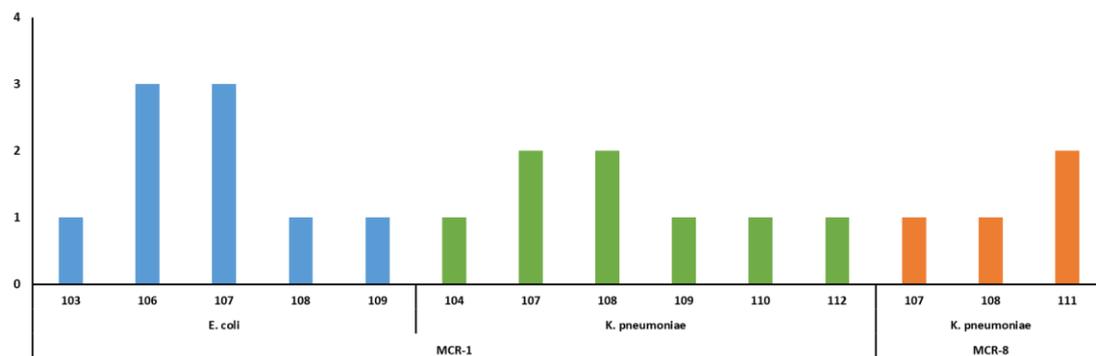
圖三: 103 年至 112 年 CPE 菌株帶 carbapenemase 之占比



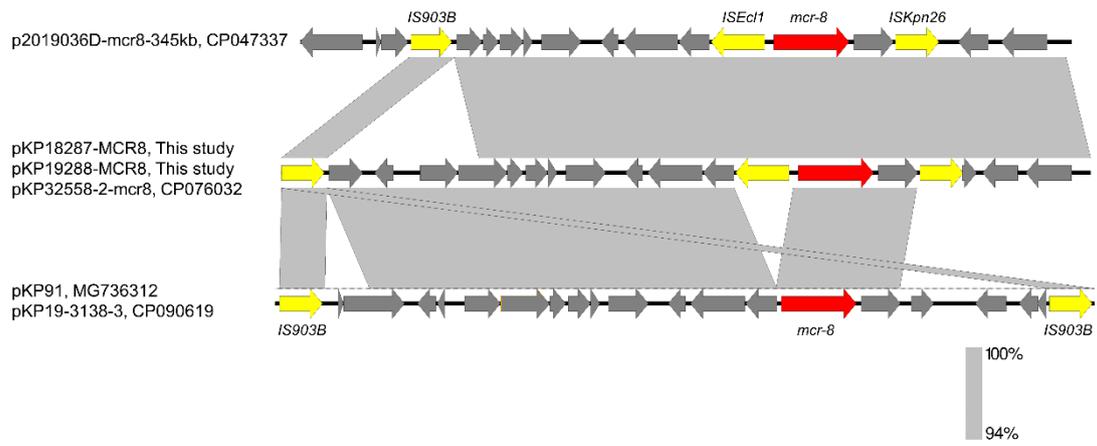
圖四: carbapenemase之分年趨勢



圖五、台灣各區帶 Carbapenemase 菌株之分布



圖六、CPE 菌株中帶 MCR 基因情形



圖七、帶 MCR-8 基因 cassette 之比對

112 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：抗藥腸桿菌 CRE 之監測與抗藥基因型別分析

計畫主持人：慕蓉蓉

填報日期：112.12.18

*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
1	在台灣有太多類似的 研究	謝謝委員指教，將努力與其他研究做區別。	
2	Carbapenemase 基因的種類沒有完全研究	本計畫分析全球主要流行的 carbapenemase 基因，KPC, NDM, IMP, VIM 以及 OXA-48。每種基因之 variants 型別在每年細部分析中，略有提到。	
3	創意性不足	謝謝委員指教，本計畫基本為監測計畫，未來盡量提升其創意與防疫重要性。	
4	研究方法正確適當，結論及建議具實用價值，具創新及可行性，對施政有明顯助益	謝謝委員指教。	
5	建議下期計畫能加強說明回饋重要資訊給送驗單位，利於院內感染控制部分	謝謝委員指教。	
6	期末報告請補充今年檢驗之菌株總數以及實際執行質體基因序列分析之數目，是否有與計畫書中之目標相符	分別修訂於 p10 及 p11，紅字表示。均達到計畫書中目標。	P10 及 p11

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
7	未見於報告中呈現投稿情形	目前文章 Characterization of mobile colistin resistance gene <i>mcr-8</i> in <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Taiwan。初步撰寫完畢，待潤飾完畢後投稿。	

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 112 年 12 月 22 日前至 GRB 系統完成資料抽換。