

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-112126

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫

計畫名稱：多重抗藥腸桿菌之 carbapenemase 監測與分析

## 107 年 度/全 程 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：王秀貞、林鈺棋

執行期間： 107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

目	錄	
一、圖次		3
二、摘要：中文摘要		4
英文摘要		5
三、本文		
(一)、前言		6
(二)、材料與方法		9
(三)、結果		13
(四)、討論		16
(五)、結論與建議		17
(六)、參考資料		18
(七)、圖表		19

共 (25) 頁

圖次：

圖一、CPE 細菌種類佔比

圖二、CPE 之 carbapenemase 種類佔比

圖三、CPE 各菌株中 carbapenemase 佔比

圖四、各區域縣市 CRE 通報數及 CPE 陽性佔比

圖五、CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布

圖六、通報 NDM-5 *E.coli* 之分布情形

圖七、NDM-5 *E.coli* 親緣樹狀圖

計畫中文摘要：

**關鍵詞：**產碳氫黴烯酶，KPC

產碳氫黴烯酶 KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) 腸桿菌自 1996 年於美國首次發現後，迄今已散布至全世界，其抗藥基因(KPC)質體亦在不同的菌屬中傳播。另，NDM-1 ([New-Delhi metallo beta-lactamase](#)) 廣泛性抗藥菌的出現及迅速播散。引發醫界對 carbapenem 類抗藥菌 (CRE, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae) 的極度關注。由於 carbapenems 類之抗生素現今是腸道菌嚴重感染症的用藥首選，因著這些廣泛性抗藥菌的出現，醫界似乎即將面臨無藥可用的困境。為此，執行有效的管染管制措施以遏止 CRE 播散，也成為現今醫療的重要課題。

為了解國內 KPC 及 CRE 分布狀況，疾病管制署自 100 年設置 CRE 陽性菌株通報，利用 PCR 及定序分析抗藥基因種類、抗藥質體鑑定比對以及利用 PFGE (Pulse field gel electrophoresis) 親源樹狀圖分析菌株間之關聯性，並釐清醫院間群聚感染之關係。

結果顯示，100 年至 107 年 5430 株 CRE 菌株中，有 1463 株為 CPE。KPC 基因陽性最多佔全部 CPE 之 67.8%，IMP 基因陽性佔全部 CPE 之 17.6%，OXA-48 基因陽性佔全部 CPE 之 7.7%，VIM ([Verona Integron-Mediated Metallo-β-lactamase](#)) 基因陽性佔全部 CPE 之 5.7%，以及 NDM 基因陽性佔全部 CPE 之 2.5 %。OXA-48 ([oxacillinase \(OXA\)-48-like β-lactamases](#)) 菌株的快速成長，已超越 VIM 的數量，成為 CPE 中 carbapenemase 的第三位。

NDM-5 仍持續增加，除台北兩家及台南兩家醫院外，今年花蓮也出現 NDM-5 個案。需持續觀察 NDM-5 傳播情形，以擬訂防治政策。

計畫英文摘要：

**Keywords: carbapenemase, KPC**

Since *Klebsiella pneumonia* carbapenemase (KPC) was first discovered in USA in 1996, KPC has rapidly spread across hospitals worldwide in the past decade. The plasmid carried KPC gene has been also transmitted among different Gram-negative bacteria. Additionally, bacteria carried NDM-1 is shown to resist most antibiotics. The emergence of these pan-drug resistant bacteria has caused concerns of the limitations of present treatments and the paucity of new antibiotics in the pipeline.

In this study, we investigate the prevalence and molecular characteristics of carbapenem-resistance Enterobacteriaceae (CRE) clinical isolates. Detection of carbapenemase genes was performed by multiplex PCR. Genotypes of isolates possessing carbapenemase genes were identified by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis.

Among 5430 CRE isolates, a total of 1463 isolates carried genes encoding carbapenemase. *Klebsiella pneumonia* carbapenemase (KPC) was 67.8 %, IMP was 17.6 %, OXA-48 was 7.7%, VIM in 5.7% and NDM was 2.5% among all CPE isolates. OXA-48 spreads rapidly, it has come the third place among all CPE since 2015.

There were 5 hospitals reported NDM-5 since 2014, two in Taipei, two in Tainan and one in Hualien. The spread of NDM-5 needs to be monitored for the policy making of infection control measure.

## 本文

### (一)前言

腸道菌是存在於人類腸道中的正常菌叢、也常在居住環境裡被發現，但也是造成嚴重感染症的主因之一，如大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 引發尿道感染而導致腎盂腎炎、膀胱炎；克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 也常在 ICU 及長期照護中心的環境中出現，導致病患的嚴重伺機性感染及感染管制上的問題。這些感染症需使用抗生素治療，間接也促成某些抗藥性菌株經由 selection pressure 等演化機制而被篩選出來，若再加上本身具有的生長優勢，就會留存於環境中，造成醫療上的難題。

2000 年首見來自社區感染的 *E. coli* 分離株，攜帶 ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) 抗藥性基因，調查發現此菌可水解 carbapenems 外的大部分  $\beta$ -lactams 類的抗生素 [1]。迄今，攜帶 ESBL 的腸道菌造成的感染症，不僅在世界各地出現，也成為盛行的菌株。甚且，ESBL 腸道菌不只可對抗第三代廣效性的頭芽孢素 (cephalosporins，如 ceftazidime、cefotaxime)、cephamycin、aztreonam；也常同時攜帶抵抗其他種類抗生素 (如 quinolones、aminoglycosides、TMP-SMX) 的抗藥性基因，致使 carbapenems 類之抗生素如 imipenem、meropenem、doripenem 及 ertapenem 成為腸道菌嚴重感染症的用藥首選。因此，隨著 carbapenems 使用量增加，對抗此類抗生素的抗藥性細菌也明顯的逐年增加。

腸道菌產生對抗 carbapenem 類抗生素的抗藥機制 [2、3、4]，常見以下兩種：1. 染色體上或質體上攜帶抗藥基因，產生

carbapenemase 水解 carbapenem；2. 抗藥菌株質體攜帶 ESBL 或 AmpC 的基因，加上細菌外套膜蛋白通透性的改變（如 porin loss）。其中以第二種機制引起的抗藥最為重要，因其抗藥基因通常位於可移動的質體、跳躍子（transposon, Tn）、或 integrons 上，可藉由 horizontal gene transfer 的機制，將抗藥基因傳遞至鄰近的同種或不同種的細菌上，如最近新發現的攜帶 NDM-1 基因的抗藥腸道菌在自然環境中可輕易的與其他種類細菌（如 *K. pneumoniae*、*P. aeruginosa*、*A. baumannii*、*E. coli*、*Vibrio cholerae*、*Shigella boydii*、*Aeromonas caviae*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Pseudomonas spp.*、*Achromobacter spp.*、*Kingella spp.* 等等）藉由 conjugation 進行 horizontal gene transfer，致使含 NDM-1 基因抗藥質體就廣泛地散佈至環境中〔5〕。

但 KPC producing *K. pneumoniae* (KPC-KP) 引發的 outbreaks 是臨床上最常見的，且分布最為廣泛〔6〕。1996 年 KPC 首先在美國東岸發現，數年內已散佈至全美各州及其他國家如波多黎各、哥倫比亞、希臘、以色列、中國大陸及南非。產生 KPC 的抗藥菌株大多為易造成院內感染的 *K. pneumoniae*，少數為 *E. coli*，其他腸道菌（*Salmonella enterica*、*K. oxytoca*、*Enterobacter spp.*、*C. freundii*），或是 *P. aeruginosa* 也曾發現攜帶 KPC 基因。並且，研究顯示這些在歐美各國造成 outbreaks 的 *K. pneumoniae* 大多來自特定的 clone，如 Multi-Locus Sequence Type ST 258，且 KPC 基因位於 transposon Tn4401 上；中國大陸則以 ST11 為主，KPC 基因位於 transposon Tn3 上，這些研究結果顯示攜有 KPC 基因的菌株因其 clonal spreading 及相關質體特性，易由 horizontal gene transfer 的機制，將抗藥的 KPC 基因傳遞至鄰近的同種或不同種

的細菌上〔6、7、8〕。如此，KPC-KP 抗藥菌株造成醫療照護相關的院內感染的威脅實不容小覷，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。

## (二)材料與方法

### 一、檢體收集

1. 本署目前對於醫療機構於院內或委外檢驗單位所檢出之 CRE 菌株中，符合以下情形者，鼓勵將菌株送驗昆陽實驗室，並於「法定傳染病監視通報系統」之「其他」項，通報 CRE，並將病人之基本資料及臨床相關症狀等資料鍵入系統：

A. 自病人臨床檢體培養出之 CRE 菌株者。

B. 曾出現帶 KPC 或 NDM-1 腸桿菌之醫療機構，如在 6 個月之嚴密監測期間內，發現該醫療機構再出現感染 CRE 之個案，係與過去之陽性個案有流行病學之關聯者(如同住院於研判為高危險區域的病室或有相同的醫療照護者)。

C. 醫療機構從未出現帶 KPC 或 NDM 腸桿菌，倘首次發現 CRE，或院方想進一步確認該抗藥菌是否帶有 KPC 或 NDM 等抗藥基因者。

2. 確認感染 KPC 或 NDM 腸桿菌之個案，待出院後完成其周邊環境清潔與消毒，以 cary blair 拭子擦拭陽性個案或照護人員可能接觸之病床和其周圍環境、醫療器材等 2 至 5 個點後，於「法定傳染病監視通報系統」「其他」項下該名 CRE 陽性個案之接觸者檢體送驗單，填入相關欄位之資料後(請註明該 cary blair 拭子之擦拭點名稱)，送至昆陽實驗室進行清消確認之檢驗。

### 二、檢驗方法

CRE 菌株執行下列檢測:

1. Carbapenem 類藥物及 tigecycline、colistin 的藥物敏感性試驗依美國臨床與實驗室標準研究所 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 的規範執行，針對 carbapenem 類及 tigecycline、colistin 等藥物進行抗藥性判定。

首先，使用 Phoenix 自動化系統進行送驗 CRE 菌株的鑑別及藥物敏感性試驗 (Antimicrobial Susceptibility Testing)，此系統可同時進行細菌鑑定及抗生素感受性試驗。在測試匣中含有多種抗生素 (包含 carbapenem 類藥物如 ertapenem、imipenem、meropenem 及 colistin) 並以 2 倍稀釋的方式置入於孔洞中，如此可針對細菌是否生長進行偵測，而提供每種抗生素最低抑制濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的結果。

至於，確認為 CPE 的菌株則會以商業產品 E test 進行更詳盡的藥物敏感性試驗，含括  $\beta$ -lactam， $\beta$ -lacta 及抑制劑，aminoglycoside，quinolone，colistin 及 Tigecycline 抗生素，詳列於下：Amikacin，Amoxicillin，Amoxicillin/clavulanic acid，Ampicillin，Ampicillin/sulbactam，Aztreonam，Cefaclor，Cefepirome，Cefixime，Cefoperazone/sulbactam，Cefotaxime，Cefotetan，Cefoxitin，Cefpirome，Cefpodoxime，Ceftazidime，Ceftizoxime，Ceftriaxone，Cefuroxime，Cephalothin，Ciprofloxacin，Colistin，Doripenem，Ertapenem，Fosfomycin，Gentamicin，Imipenem，Kanamycin，Levofloxacin，Meropenem，Moxifloxacin，Ofloxacin，Piperacillin，Piperacillin/tazobactam，Polymix B，Streptomycin，Ticarcillin/clavulanic acid，Tigecycline，Tobramycin，Trimethoprim，Trimethoprim/sulfamethoxazole。約略使用量各為

500 個，評估數依照 102 年的 212 株 CPE 及此商品包裝狀況(以 100 片為購買之基本單位)。

2. 以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)及核酸序列分析法(DNA sequencing)，來研究抗藥基因及相關機制與毒性因子之調查。

A. 針對目前常見的 carbapenemase 基因如 KPC、VIM、IMP、NDM 等進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)及 multiplex PCR: 以非選擇性培養基隔夜培養細菌，之後萃取細菌 DNA。首先利用 multiplex PCR 內含多對 primers，同時偵測數個基因。PCR 增幅的產物，於 1.5% agarose gel (Promega, 的膠片中進行電泳分析。將 agarose 取出，用 EtBr 染色，以紫外光照射觀察並照相，並純化 PCR 增幅的產物進行 DNA 序列定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

B. 核酸序列分析 (DNA sequencing): 由於 carbapenemase 基因可因單點或多點突變，造成胺基酸的改變及其結構的改變，改變其水解能力，導致抗藥性的增強，故 DNA sequencing 是必須的。單一 PCR 反應放大 carbapenemase 基因，PCR 產物經純化，置定序送件溶液，序列分析後，即可與 NCBI 上之標準菌株或相關報告中的菌株之 DNA 序列比對。

3. 分子流行病學(Molecular studies)方法簡述

脈場膠電泳分析(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE):  
使用限制酶進行菌株分型實驗，以脈衝電泳儀 CHEF-MAPPER (BIO-RAD, USA )，在 0.5x TBE buffer 將切斷的片段以電泳槽 CHEF-Mapper 跑膠質，不同菌使用之菌液濃度、buffer、限制酶、電泳變換時間、及電泳時間不同，其分子量指標亦不同；以 H9812 菌株 (*Xba*I 限制酶切割) 當作片段大小指標。使用限制酶之脈衝圖譜，利用電腦將圖片掃描儲存成圖片檔，接著以套裝軟體 Phoretix 1D gel analysis advanced version 5.01 (Nonlinear Dynamics, UK) 對菌株進行親緣性樹狀圖分析，其原理是利用不同 DNA 片段電泳圖譜進行分析，以 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages ) 的方式畫出樹狀圖 (dendrogram)，由樹狀圖對應出相似指數，分析菌株間分子關聯性。

### (三) 結果

#### 1. 分析 CPE 菌株之 carbapenemase 種類與分布情形

CRE 通報定義已於 106 年改為(1)對 carbapenem 類抗生素 (doripenem、imipenem、meropenem 或 ertapenem 等) 任一種抗藥之腸道菌, 或 (2) 會產生 carbapenemase 之腸道菌。100 年至 107 年 9 月年疾病管制署共收到 5430 株 CRE 菌株, 其中 1463 株為帶 carbapenemase 之 CPE。 *Klebsiella pneumoniae* 為主要的 CPE 菌株(佔 81%), 其次是 *Enterobacter* spp.(佔 10%)、*E. coli* (佔 5%)、*Citrobacter* spp. (佔 2%)及其他 (佔 2%) (圖一)。

分析 CPE 中之 carbapenemase 基因, KPC 仍為台灣主要流行的 carbapenemase, 佔全部 CPE 之 67.8%, 包括 KPC-2(圖二), 主要存在 *Klebsiella pneumoniae* (圖三 A); 其次是 IMP, 佔全部 CPE 之 17.6% (圖二), 主要存在 *Enterobacter* spp. (圖三 B)。排名第三的是 OXA-48, OXA-48 自 103 年開始出現, 有快速增加的趨勢, 從排名第四, 至 104 年超越 VIM 上升至第三, 主要出現在 *Klebsiella pneumoniae*, 佔全部 CPE 之 7.7%。VIM 佔全部 CPE 之 5.7% 主要存在 *Citrobacter* spp. (圖三 D)。NDM 在台灣已出現 4 種不同型別, NDM-1、NDM-4、NDM-5 及 NDM-9 佔全部 CPE 之 2.5% (圖二), 主要出現在 *E. coli* 中(圖三 C)。

#### 2. CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布

以北中南東區分, 通報 CRE 數量以南部最多、東部最

少，CPE 陽性佔比亦同 (圖四 A)。中部地區通報數量雖然較北部少 700 株左右，但 CPE 陽性佔比有近 30%，高於北部之近 25% (圖四 A)。以縣市別區分，中部五縣市普遍通報數量偏低，但陽性佔比高。(圖四 B)

各種 Carbapenemase 於不同區分佈情形不盡相同，KPC 在北中南(西半部)區佔最多數，IMP 則以南部為主。急速攀升的 OXA-48 以中部分布最多，南部、北部及東部亦有少數個案。NDM 則北南東都有個案出現，NDM-5 在北區有群聚事件，因此，北部佔比偏高。東部因 CPE 數量少，且各種 carbapenemase 出現數量差不多，因此每種 carbapenemase 佔比相去不遠(圖五)。

### 3. NDM-5 密集出現以及群聚事件

NDM-5 於 103 年起零星出現於台北(TH)及台南(CHA)各一家醫院，自 105 年出現於台北第二家醫院(HH)後，則密集出現於該醫院通報菌株中，106 年台南同體系之另一家醫院(CHB，與 CHA 為同一集團)通報 NDM-5 菌株、107 年花蓮某醫院(TzHH) 通報 NDM-5 (圖六)。截至本(107)年 9 月，共 5 家醫院通報本署 20 株 NDM-5 菌株分屬 17 個案，除 CHB 之第二株為 *Enterobacter cloacae* 外，其餘均為 *E. coli*。北部 HH 醫院通報 11 株，來自 8 個案，該醫院某一個案於 5 個月內送驗 4 個菌株。TH 醫院通報 4 株，台南 CHA 通報 1 株，CHB 通報 2 株，花蓮 TzHH 醫院於本 107 年 3 個月內通報 2 株。

以 PFGE 圖譜分析四家醫院 16 個案之 NDM-5 *E. coli*，

圖譜顯示 8 株來自 HH 醫院之菌株具 80%以上 similarity，屬於一個 cluster(圖七)，顯示該醫院有群聚現象的發生。107 年 TH 醫院通報之第 3 株(TH3)也屬該群聚之 cluster。TH 醫院 106 及 107 年通報之 TH2 與 TH4 形成另一 cluster。花蓮 2 株幾乎完全相同，亦形成一獨立 cluster。其餘來自 CHA 及 CHB 醫院之菌株，皆不屬於這三個 cluster，應為零星個案。

#### (四) 討論

1. KPC、IMP 仍然分佔通報 CRE 中 carbapenemase 基因之第一及第二位。OXA48 則自 104 年急速攀升至第三位迄今。NDM-5 自 103 年起亦有增加與漫延之趨勢。各種 carbapenemase 基因之出現，代表台灣 carbapenemase 基因型別之多樣化，若有基因重組或帶有多重基因，對於臨床用藥選擇將為一大挑戰。
2. KPC-2 及 VIM-1 以北台灣居多，OXA-48 則以中部為最多，IMP 則多集中在南部。以 KPC-2 為例，幾年監測結果發現已經慢慢向中南部漫延，105 年花蓮也出現群聚案例。NDM-5 從台北，台南，107 年亦漫延至花蓮。因此，這些基因的地域分布在時空因素下是否再向其他區域蔓延，如何有效抑制其拓展，將會是目前感染管制重要的課題之一。
3. 16 株 NDM-5 *E. coli* 已有 3 種 cluster 形成，是帶 NDM-5 質體 conjugation frequency 高，在不同菌株中轉移，抑或是質體多樣性，傳播速率高，需待質體序列解密。

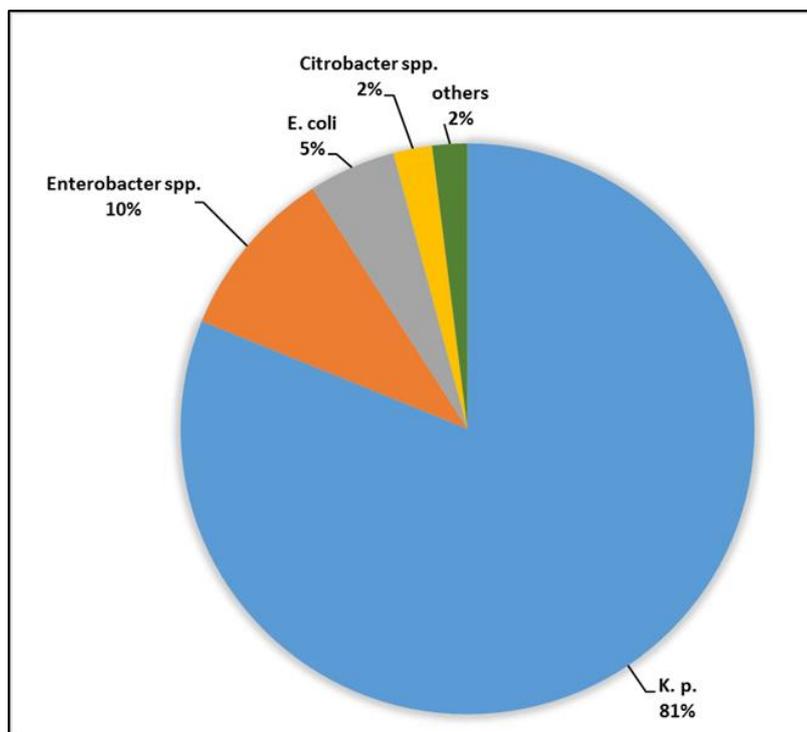
## (五) 結論與建議

1. OXA-48 菌株的快速成長，已超越 VIM 的數量，成為 CPE 中 carbapenemase 的第三位；而 NDM-5 密集出現於院感檢體中，已造成醫院群聚事件。最新通報之 NDM-5 與前波群聚已分屬不同 cluster，因此，是否帶來下一波的疫情？值得觀察。
2. 本計畫歷年來提供 PFGE 親緣樹狀圖予各醫院進行群聚事件的分析，協助醫院釐清感染源。由於抗藥質體有菌株間移轉之特性，詳細分析抗藥質體基因序列，將能提供感染管制更多訊息。

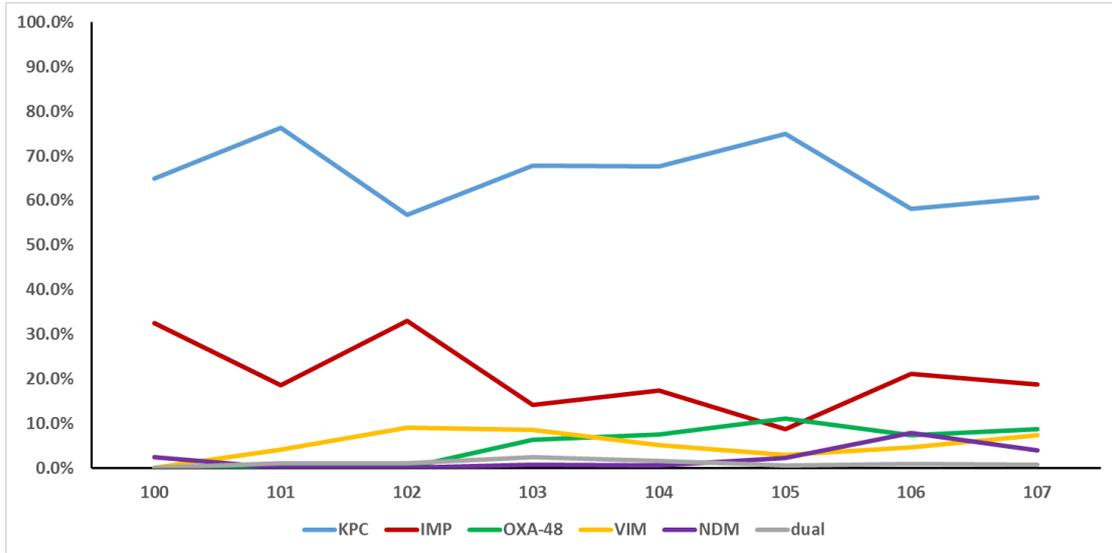
## (六) 參考資料

1. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18:657-86.
2. Livermore DM, Woodford N. 2006. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol.* 14:413-20.
3. Thomson KS. 2010. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol.* 48:1019-25.
4. Bennett JW, Mende K, Herrera ML *et al.* 2010. Mechanisms of carbapenem resistance among a collection of Enterobacteriaceae clinical isolates in a Texas city. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 66:445-8.
5. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 11:355-62.
6. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 9:228-36.
7. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 17:1791-8.
8. Shen P, Wei Z, Jiang Y, *et al.* 2009. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:4333-8.

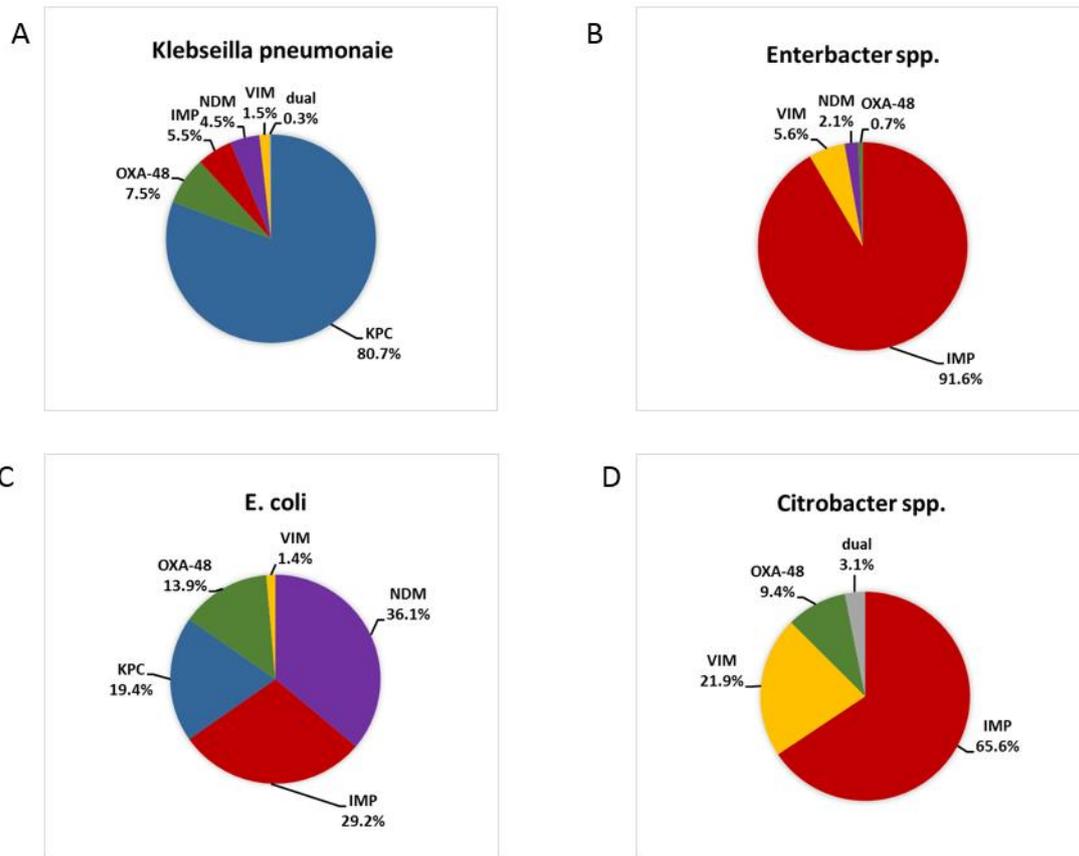
(七) 圖表



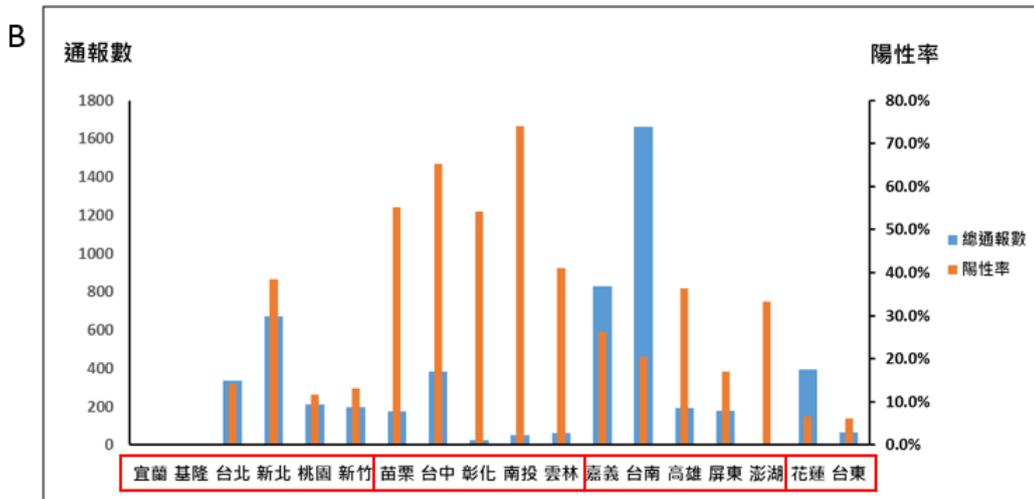
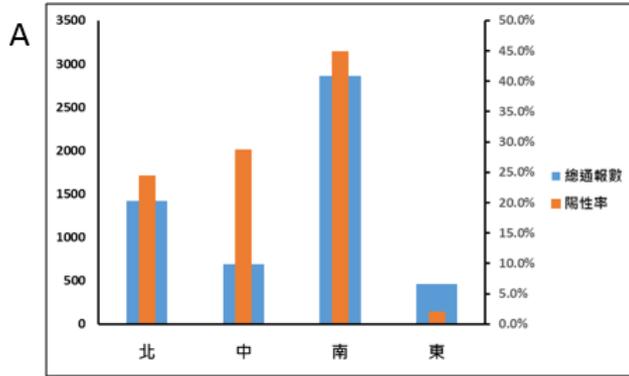
圖一、CPE 細菌種類佔比



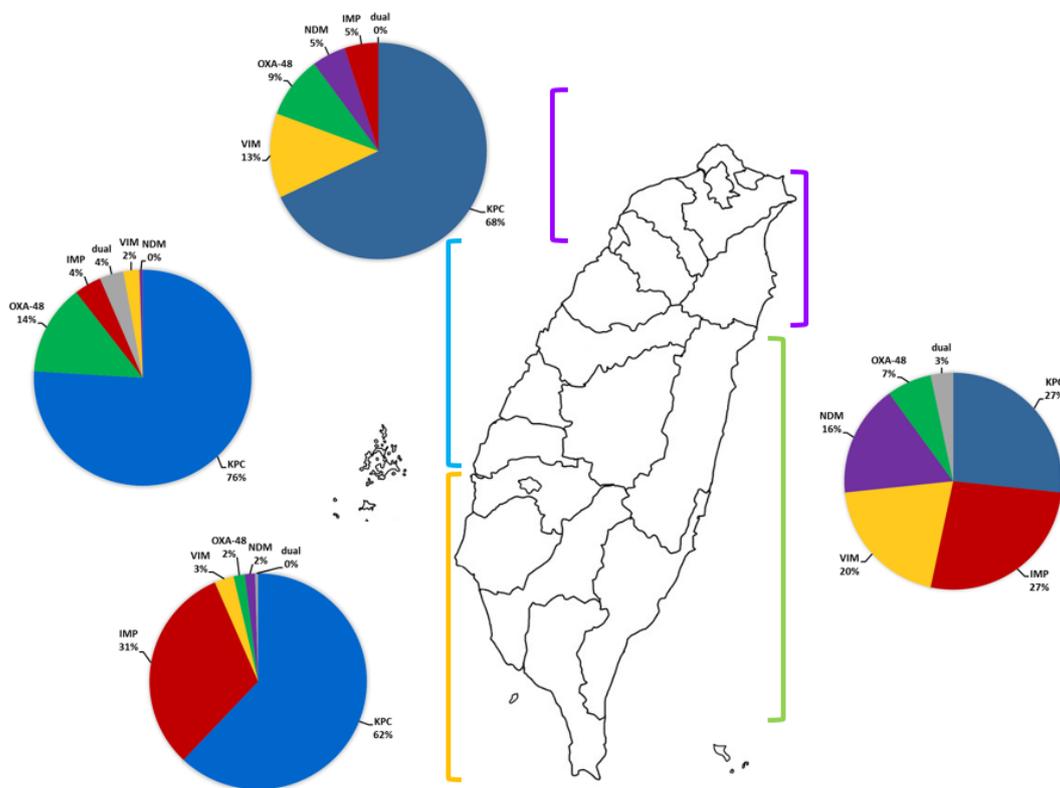
圖二、CPE 之 carbapenemase 種類佔比



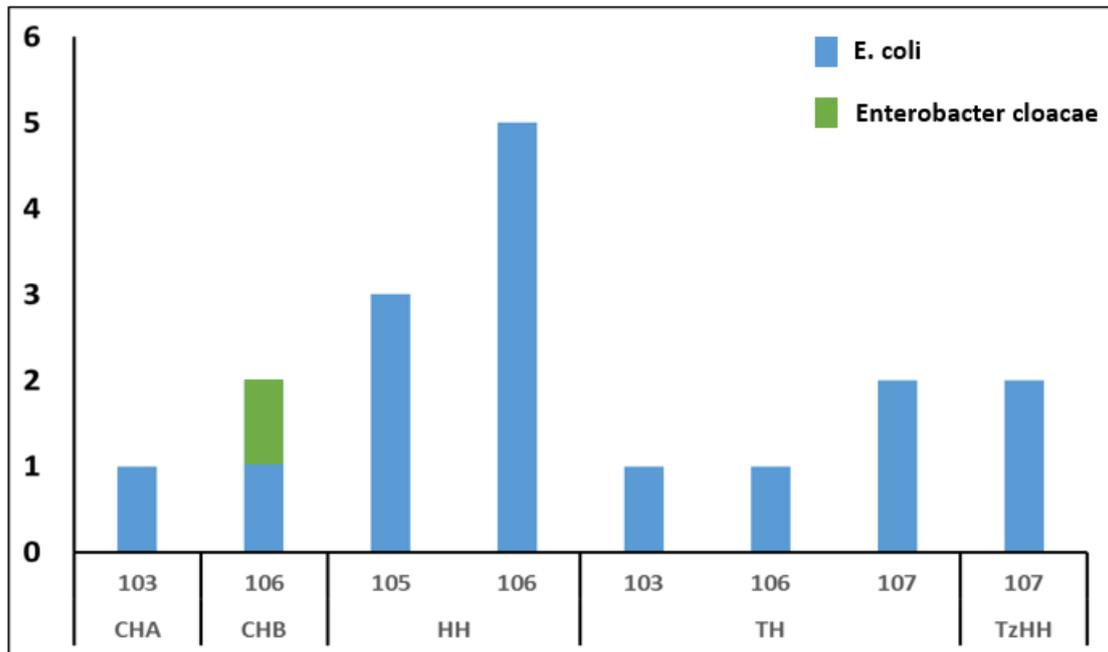
圖三、 CPE 各菌株中 carbapenemase 占比



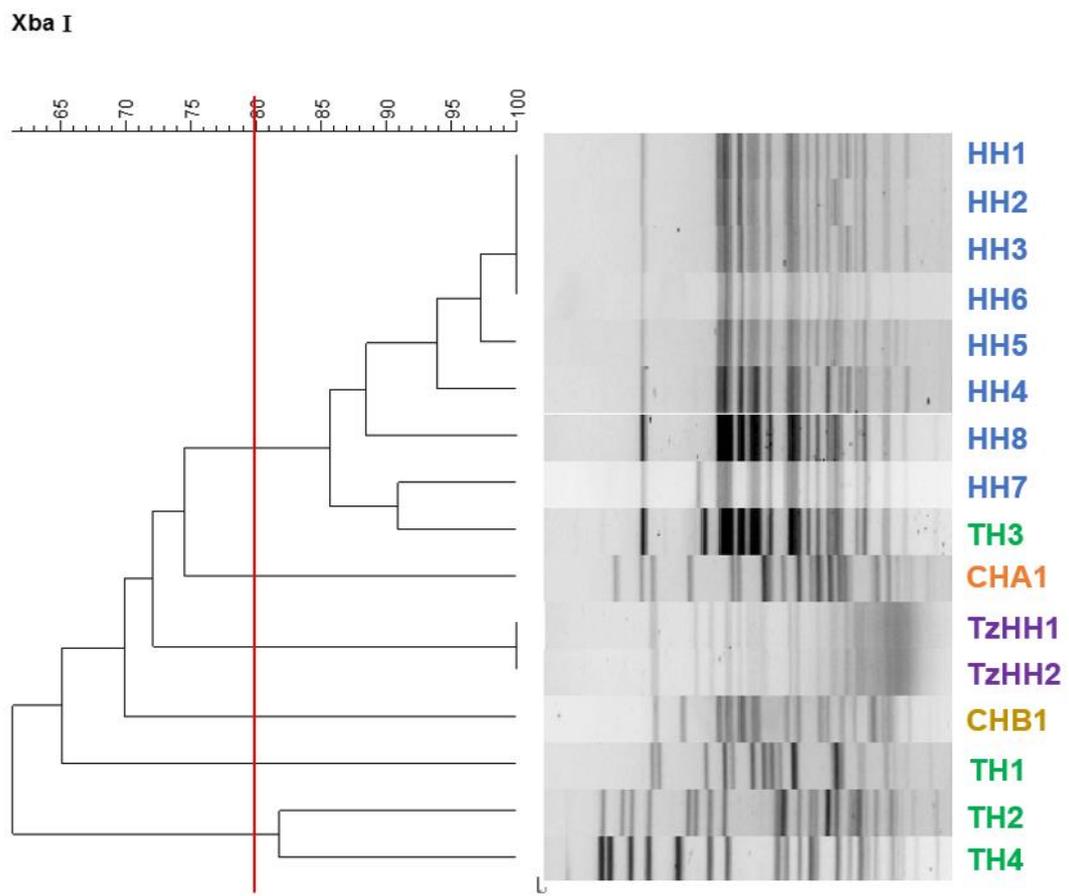
圖四、各區域縣市 CRE 通報數及 CPE 陽性佔比



圖五、CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布



圖五、通報 NDM-5 菌株之分布情形



圖六、NDM-5 E.coli 親緣樹狀圖

## 107 年科技研究計畫期末報告審查意見回復表

計畫名稱：多重抗藥腸桿菌重要抗藥基因與質體變化之分析

計畫主持人：慕容蓉

填報日期：107.12.04

\*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
1	有助於 CDC 瞭解各大醫院的感染管制成果和群聚的處理	謝謝委員肯定	
2	建議研究報告書寫依標準研究報告格式書寫，如第一次出現之縮寫要有全名；部分資料的呈現，考慮除了百分比外也呈現數字。	第一次出現之縮寫已於 P1 補齊 未來於百分比外會加上數字呈現	P1
3	細菌抗藥性持續監測為重要工作，宜持續進行。	謝謝委員肯定	
4	通報陽性率及佔比有區域性差異	謝謝委員肯定	
5	宜注意 NDM-5 菌株之趨勢 (TH3 & HH8)。	謝謝委員建議	
6	建議宜加入環境採檢數，每案平均環境檢體數，及陽性率等。	當年有進行疫調群聚有環境採檢均納入計畫報告中，107 年無群聚疫調。	

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
7	計劃書提及高風險群進行主動監測，宜提出具體作法，如高風險群定義、主動監測做法	實驗室提供可能之群聚資訊予權責組參考，若有主動監測之必要，實驗室將配合主動監測收案進行後續檢測	