

計畫編號：MOHW111-CDC-C-315-124307

衛生福利部疾病管制署 111 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

## 111 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：謝佳倫、蔡幸君

執行期間：111 年 1 月 1 日至 111 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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactam 類的後線用藥，且 CRE 通常同時攜帶其他 extended-spectrum  $\beta$ -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 在台灣之流行現況。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。100年至111(本)年，通報疾病管制署之CRE菌株共 8048 株，其中2819株為帶 carbapenemase 之 CPE (carbapenem producing Enterobacteriaceae)。 *Klebsiella pneumoniae*為主要的CPE菌株（占比74.8%），其次是*E. coli*（占比10.5%）、*Enterobacter* spp.（占比9.1%）、*Citrobacter* spp.（占比3.6%）及 *K. oxytoca*（占比1.0%）（圖一）。

分析CPE中之carbapenemase基因，KPC仍為台灣主要流行的carbapenemase，占比為58.3%（圖二），主要存在 *Klebsiella pneumoniae*（圖三）；其次是IMP 與 OXA-48 like，占比均為13.6%，主要分別存在 *Enterobacter* spp. 與 *Klebsiella pneumoniae*。NDM及MCR主要存在 *E. coli*，占比分別為6.1%及1.1%。VIM主要在 *Klebsiella pneumoniae*，占比4.8%（圖二及三）。

以分年趨勢看，2011年開始迄今，KPC一直為主要流行之carbapenemase，OXA-48 like自2014年開始出現排名第四，之後快速增加，至2020年超越IMP上升至第二，之後逐年急遽上升。

NDM 近年也快速增加，2020 年與 IMP 並列第三，2021 開始超越 IMP (圖四)。

## 2. CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布:

CPE 菌株中最多的 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. 分析 CPE 菌株中急速增加之 OXA-48 like carbapenemase:

OXA-48 like 於 2020 年起成為 CPE 菌株中僅次最高 KPC 占比的 carbapenemase，且數量快速增加，並以 OXA-48 及 OXA-181 兩種 variants 為主(圖六)，存在 *Klebsiella pneumoniae* 中居多(圖七)。

(1) 挑選 7 株來自 6 家醫院帶 OXA-48 之菌株，3 株 *Klebsiella pneumoniae*、3 株 *E. coli*、1 株 *Citrobacter freundii*，利用 Illumina

定序，接續以生物資訊軟體分析，

(2) 共組裝三個 contig 帶 OXA-48 基因之部分質體，Type I 及 Type III 大約組裝近 20 Kb contig。Type II 可能因 OXA-48 基因附近有 repetitive sequences，組裝時不易分析，容易產生斷點，因此，僅組裝約 7 Kb contig，但其為分析中多數菌株(5 個

菌株)帶有之 contig 型態，出現於不同菌種 (*Klebsiella pneumoniae*、*E. coli*、*Citrobacter freundii*)，不同醫院(B、C、D、E 四家醫院)，Type II contig 之 OXA-48 質體可能為台灣主要流行之質體型別 (圖八)。未來須搭配長片段方式之 NGS 分析序列，以了解質體全貌。

#### (四) 討論

1. 本計畫以 NGS 技術平台，分析 7 株帶 OXA-48 質體，推測有 2 種傳播模式：
  - (1) 同源菌株傳播：B及C醫院 ST11之*Klebsiella pneumoniae*，有相同型別菌株及相同OXA-48 Type II contig，推論可能以同源菌株方式傳播 carbapenem 抗藥性。
  - (2) 不同菌種間同源質體傳播：D、E醫院之不同MLST type兩株*E. coli* (ST131、ST354) 及 E 醫院兩株不同菌株 (*E. coli* 及 *Citrobacter freundii*) 均帶有OXA-48 Type II contig，推測可能以同源OXA-48 Type II contig之質體在不同菌種之間平行傳播。
2. 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(9, 10)，未來須進一步細部分析 OXA-48 contig 基因結構，以了解 OXA-48 質體 gene cassette 之存在型態。

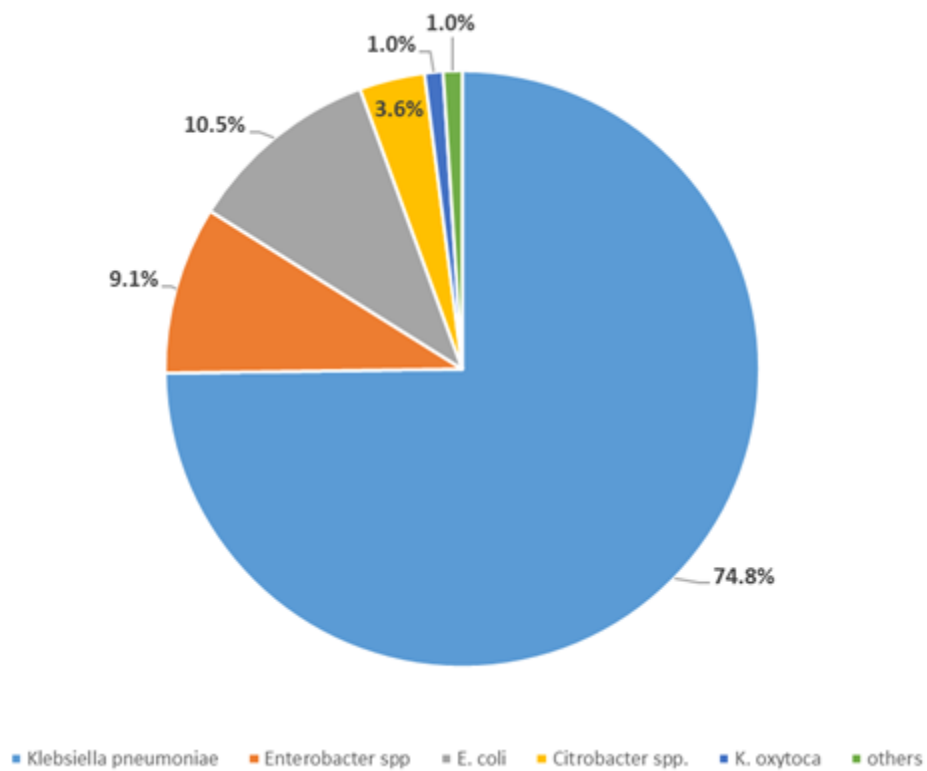
## (五) 結論與建議

1. 抗藥基因以可藉由菌株攜帶傳播，亦可由質體在院內或醫院間平行傳遞，甚至多種抗藥基因質體轉至同一菌株內。後者之發生，將使多重抗藥性情況增加，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. 由於細菌可透過質體交換或 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，並可掌握抗藥菌株之流行演化趨勢。本計畫建置之流程，在未來面對新型變異之病原，提供全基因序列解密，更可與國際序列進行比對，與國際接軌。

## (六) 參考資料

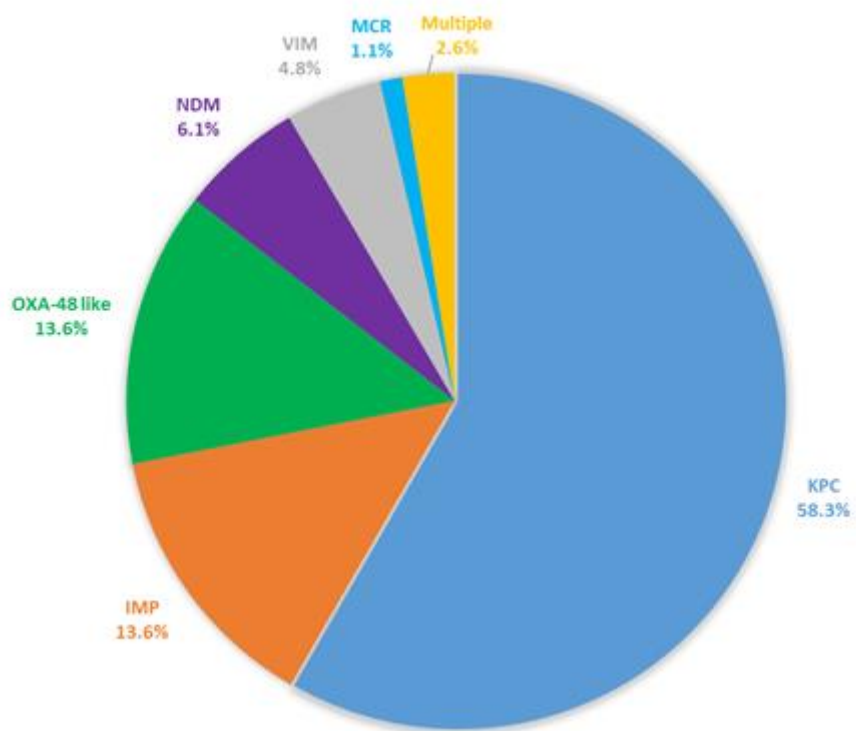
1. Anonymous. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf). 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. 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.
10. 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.

(七) 圖表

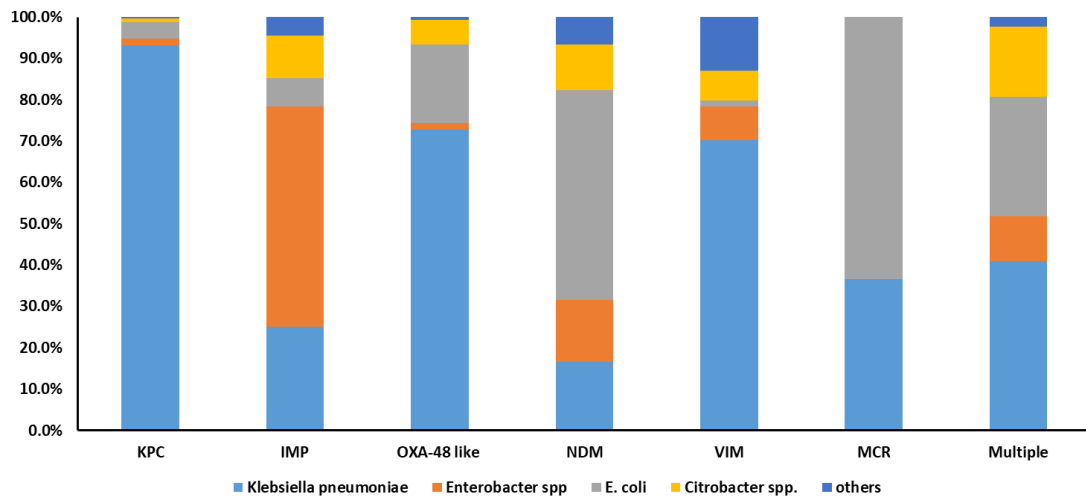


圖一：帶 carbapenemase 與 MCR 菌株之分布

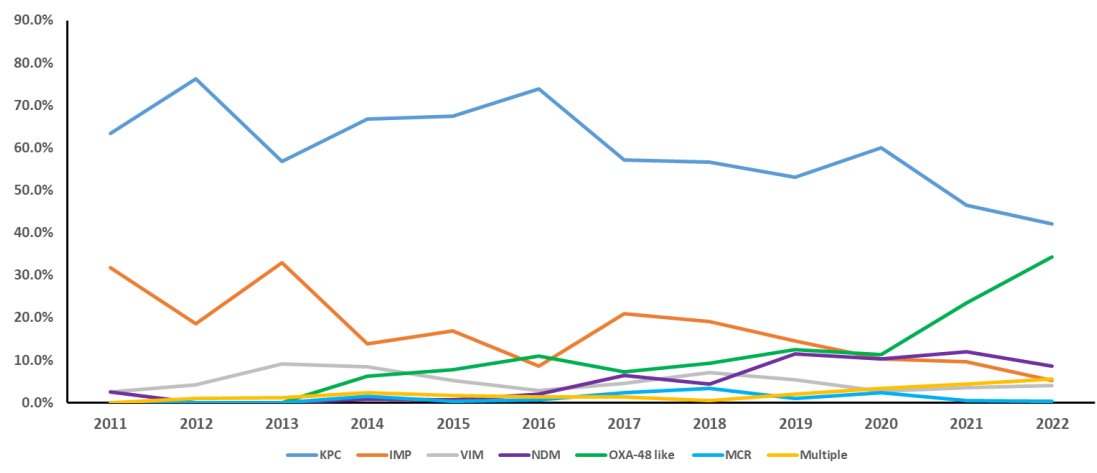




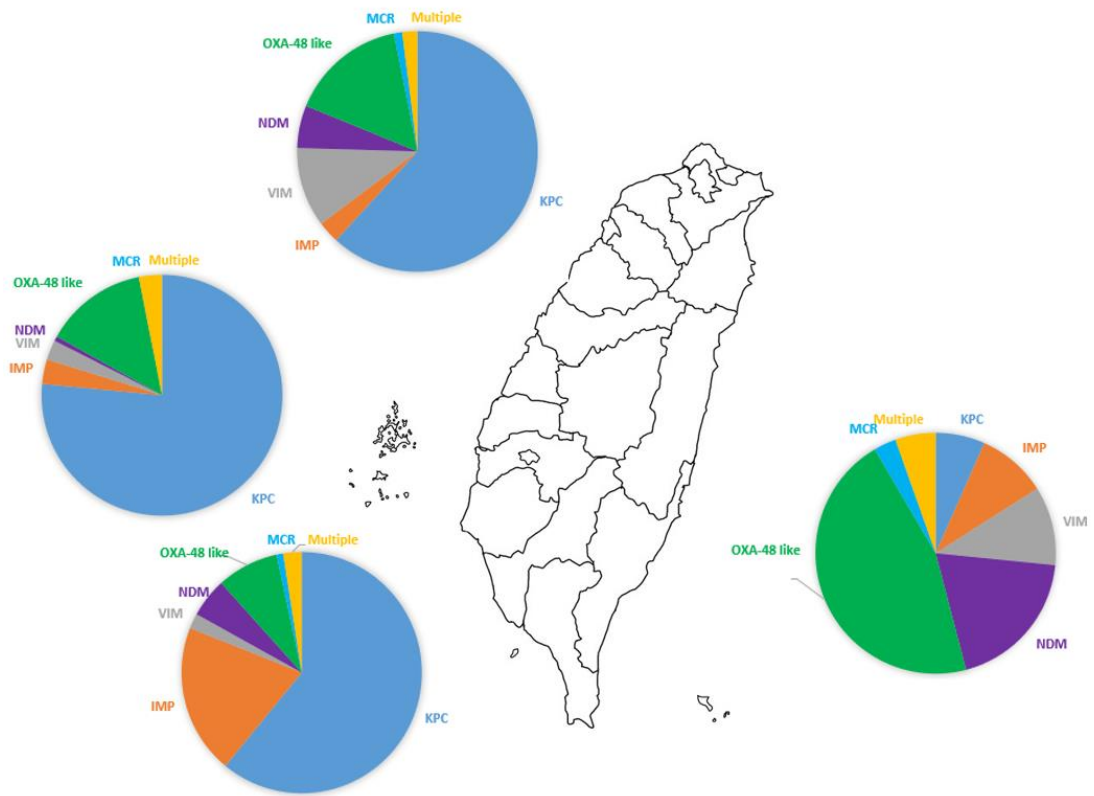
圖二: CPE 菌株中 carbapenemase 與 MCR 之占比



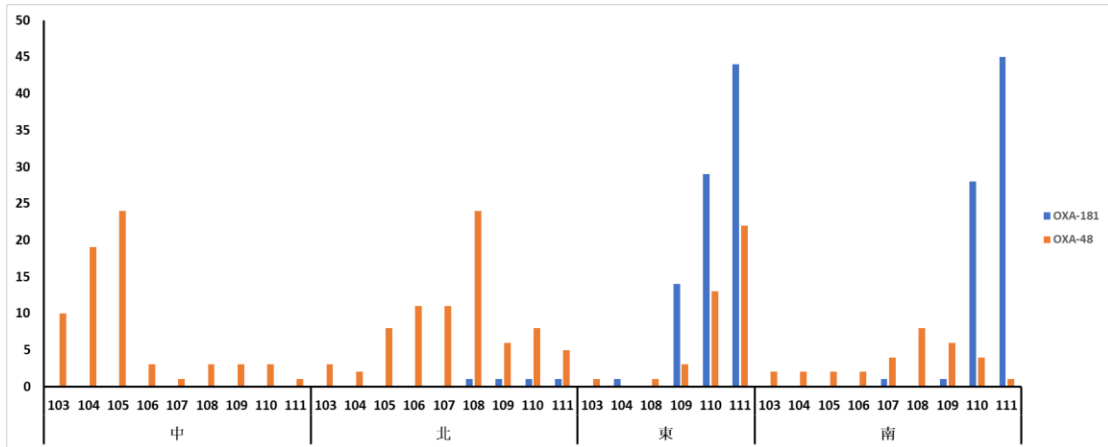
圖三: CPE 菌株帶 carbapenemase 與 MCR 之占比



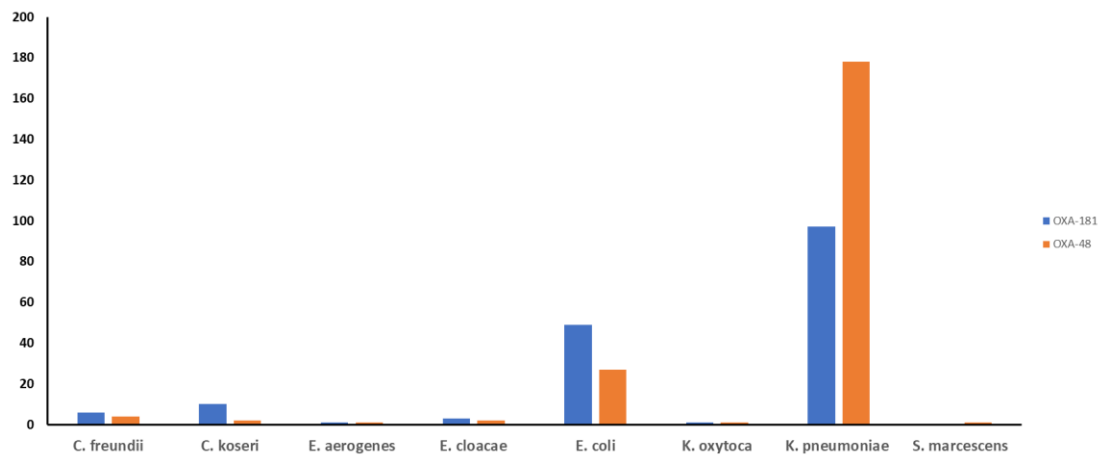
圖四: carbapenemase與MCR之分年趨勢



圖五、台灣各區帶 Carbapenemase 與 MCR 菌株之分布



圖六、OXA-48 like variants 型式與時序地區分布



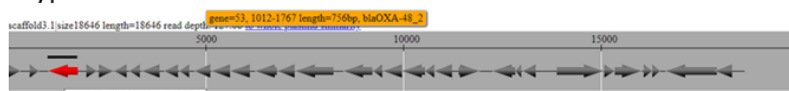
圖七、菌株中OXA-48 like variants之分布

菌種	ST type	醫院
<i>K. p.</i>	ST11	A

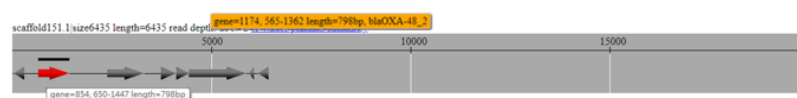
<i>K. p.</i>	ST11	B
<i>K. p.</i>	ST11	C
<i>E. coli</i>	ST131	D
<i>E. coli</i>	ST354	E
<i>C. fr.</i>		E

<i>E. coli</i>	ST410	F
----------------	-------	---

### Type I



### Type II



### Type III



圖八、7株帶OXA-48質體contig之分析

## 111 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：111.12.21

\*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	CRE 監測與全國性院感政策制定息息相關，應與感管組搭配。	謝謝委員建議，將加強與權責組的溝通與協調。	
2	MCR-1 基因監測與農政單位政策有關。	曾與農委會協調共同監測 MCR-1 基因，將持續進行。	
3	CRE 為目前院內感染的最重要細菌，抗藥基因型監測有助於治療與預防。	謝謝委員。	
4	建議抗藥基因監測可以和權責組合作或勾稽來加強偵測院內群聚的時效性。	謝謝委員建議，將加強與權責組的溝通與協調。	
5			

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 111 年 12 月 21 日前至 GRB 系統完成資料抽換。