

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-114407

衛生福利部疾病管制署 110 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

110 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：110 年 1 月 1 日至 110 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	15
	(七)、參考資料	16
	(六)、圖表	17

共 (24) 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。carbapenemase 與 MCR-1 均位於可移轉的抗藥質體上，近年同時帶有 carbapenemase 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

I. 基因序列分析:

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，組裝完成之片段再以 MLST 2.0 及 ResFinder 3.2 (Center for Genomic Epidemiology, DTU, Denmark, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) 進行基因型別及抗藥基因分析。一次實驗可讀出總長約 2~15 Gb 的核酸序列。

II. 基因體組裝:

利用 Nanopore 系統進行高通量定序，可得到長片段之讀長，故可獲得較完整組裝之全基因體全貌。由於第二代定序 Illumina 系統雖然讀長短，但輸出序列之準確度高，因此本計畫採取先完成 Nanopore 長片段讀長之全基因體組裝後，再利用 Illumina 讀取片段校正 Nanopore 組裝片段，以獲得兼具長度及準確性之資訊。

4. Bioinformatics 分析

組裝完成之片段再以 ResFinder 4.1 (Center for Genomic Epidemiology, DTU, Denmark, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) 進行基因型別及抗藥基因分析，Easyfig(<https://mjsull.github.io/Easyfig/>) 軟體進行雙序列並列分析 (Pairwise sequence alignment)。

(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110(本)年，通報疾病管制署之CRE菌株共7801株，其中2402株為帶carbapenemase之CPE(carbapenem producing Enterobacteriaceae)。 *Klebsiella pneumoniae*為主要的CPE菌株(占比75.5%)，其次是*E. coli*(占比9.5%)、*Enterobacter spp*(占比9.4%)、*Citrobacter spp.*(占比3.3%)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62.1%(圖二)，主要存在*Klebsiella pneumoniae*(圖三)；其次是IMP，占比為15.2%，主要存在*Enterobacter spp.*。排名第三的是OXA-48 like，主要出現在*Klebsiella pneumoniae*，占比8.6%。NDM及MCR主要存在*E. coli*，占比分別為5.9%及1.3%。VIM主要在*Klebsiella pneumoniae*，占比4.7%(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上升至第三。NDM近年也快速增

加，2020 年與 IMP 並列第三 (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部不同，主要以近年快速增加的 NDM 與 OXA-48 like 為主(圖五)。

3. 帶 NDM-1 菌株之全基因定序分析

本署區管調查東部某醫院之 NDM-1 個案有流病重疊之相關性，分析該院具相關性個案之 NDM-1 如下:

- (1) 東部某醫院有流病重疊之 NDM-1 個案菌株共 7 株，其中包括 2 株 *Providencia rettgeri*、2 株 *Klebsiella pneumoniae*、1 株 *Citrobacter freundii*、1 株 *Citrobacter rodentium* 及 1 株 *Enterobacter cloacae*。由於這些攜帶 NDM-1 之菌株不同，無法以傳統 PFGE 進行親緣分析，因此以全基因定序進行抗藥菌株之分析。
- (2) 將 7 株帶 NDM-1 菌株分別利用 Nanopore 及 Illumina 定序後經組裝校正，接續以生物資訊軟體分析，菌種及抗藥基因分析結果如表一，依 NDM-1 質體大小及型別可分為三類：(1) 109CRE642 及 109CRE658 的質體最小，約 85.7 kb，型別為 Col3M；(2) 109CRE713 及 110CRE077 的質體大小為 93.7-

99.2kb，型別為 IncN2 與 IncR；(3)110CRE001、110CRE114 及 110CRE115 的質體最大，約 342.8-363.1kb，型別為 IncC、IncFIB 與 IncFII。

- (3) 為比較各 NDM-1 質體間之異同，將各 NDM-1 質體全部序列以 Easyfig 軟體進行並列分析 (Pairwise sequence alignment)，如圖六。結果顯示，p110CRE001-NDM1、p110CRE114-NDM1 及 p110CRE115-NDM1 之質體序列雖相似，但 p110CRE001-NDM1 相較於其他 2 個質體，NDM-1 基因位於質體上不同位置；p109CRE077-NDM1 與 p109CRE713-NDM1 之質體序列相似；p109CRE658-NDM1 及 p109CRE642-NDM1 之質體亦相似。此外，比較 3 類質體，除了 NDM-1 基因及其附近序列較為相似外，大部分序列均相異。
- (4) 接續細部分析 7 株帶 NDM-1 菌株之 NDM-1 基因附近序列(圖七)，結果顯示即使 3 類質體之骨架大部分序列相異，但可發現均由 Tn3-emrE-ant1-bla-bla_{NDM-1}-ble-trpF-IS91-Tn3 序列組成 NDM-1 之 gene cassette。

(四) 討論

1. 本計畫結合 illumina 及 nanopore 雙 NGS 技術平台，分析東部某醫院 NDM-1 個案有流病重疊之相關性。依 7 株菌株之 NDM-1 質體組裝後分析結果，推測該院有 2 種 NDM-1 傳播模式：

(1) 同源菌株傳播：109CRE642及109CRE658經菌種鑑定皆為 *Providencia rettgeri*，雖無法進行該菌種之PFGE及MLST，以評估兩者之親緣關係，但經NGS定序分析結果，兩者組裝完成之染色體序列高度相似，且所含抗藥基因及NDM-1質體大小皆為85,754 bp，因此推論109CRE642及109CRE658屬於帶 NDM-1質體之同源菌株傳播方式。

(2) 不同菌種間同源質體傳播：110CRE001、110CRE114及110CRE115經菌種鑑定分別為 *C. freundii*、*E. cloacae*及 *K. pneumoniae*，屬於不同菌種，但三者卻各自帶有質體骨架序列相似，質體型別(IncC, IncFIB, IncFII)相同，質體大小(342.8-363.1kb)相近的 NDM-1 質體，此類似情形也可在109CRE077(*C. rodntium*)及109CRE713(*K. pneumoniae*)發現，顯示可能為由同源NDM-1質體在不同菌種間之傳播方式。

2. 本計畫進一步於這些 NDM-1 質體中發現，即使分為三類質體之序列大部分均相異，但細部分析 NDM-1 基因結構，可發現由 Tn3-emrE-ant1-bla-bla_{NDM-1}-ble-trpF-IS91-Tn3 序列組成的 NDM-1 之 gene cassette，且這些 NDM-1 質體內的 Tn3 transposon 均形成 direct repeat 結構，並將 NDM-1 基因含括在內；此外，也在 NDM-1 gene cassette 附近發現 insertion sequence IS26 的存在，顯示 Tn3 及 IS26 在 NDM-1 基因的傳播上，可能扮演重要角色(9, 10)。

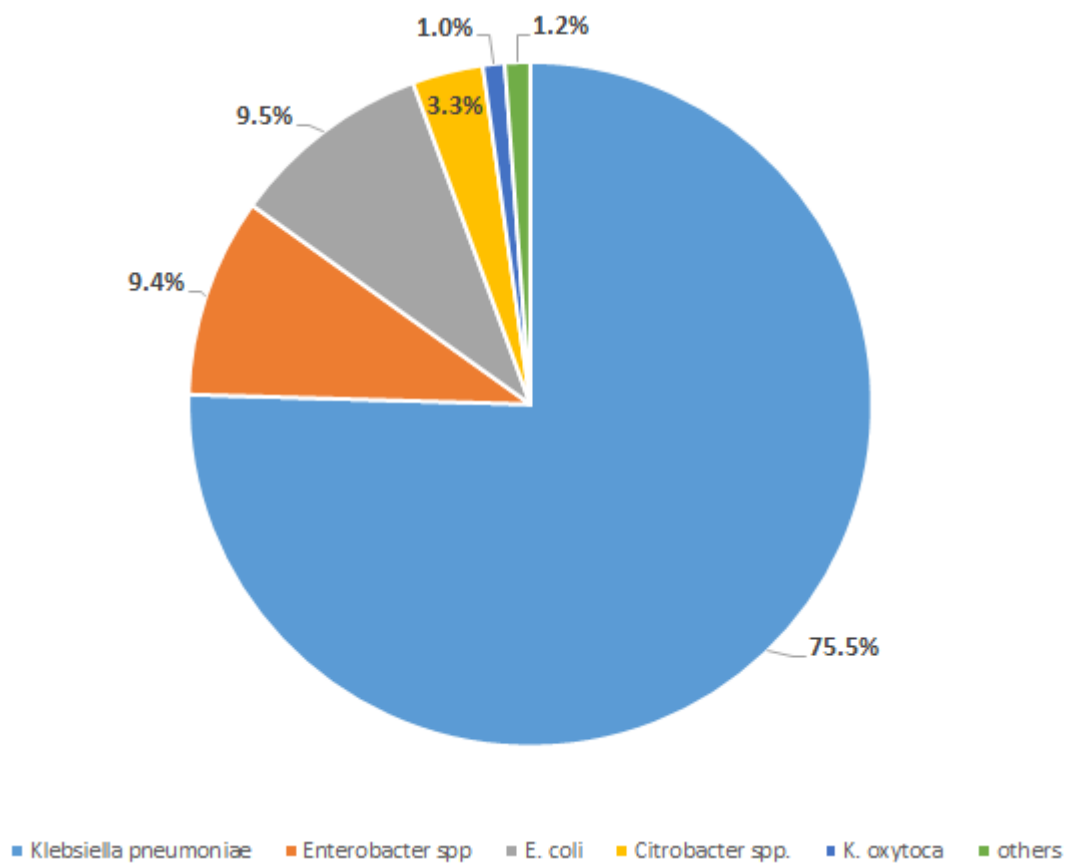
(五) 結論與建議

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 transposon 的易位機制傳播抗藥基因，因此若單以傳統 PFGE 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。

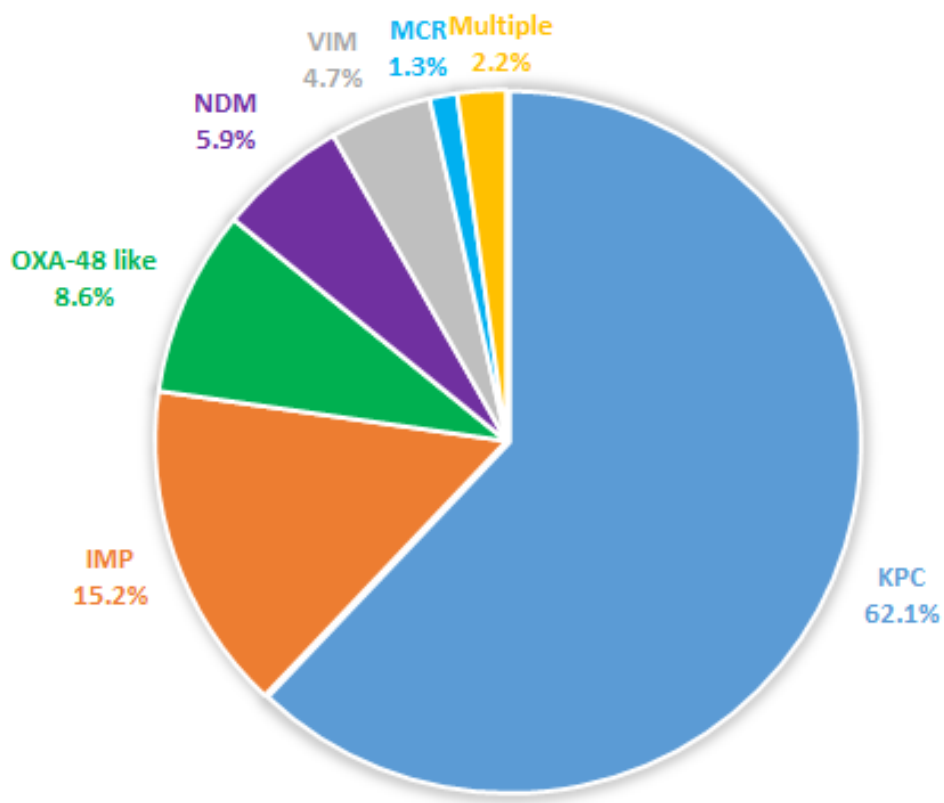
(六) 參考資料

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. 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.

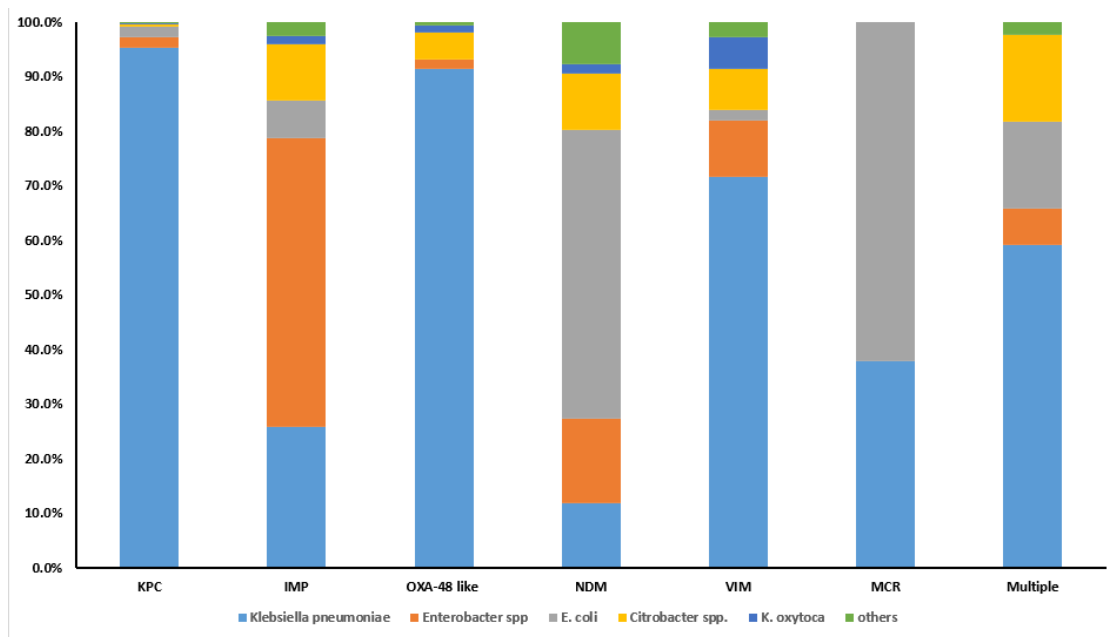
(七) 圖表



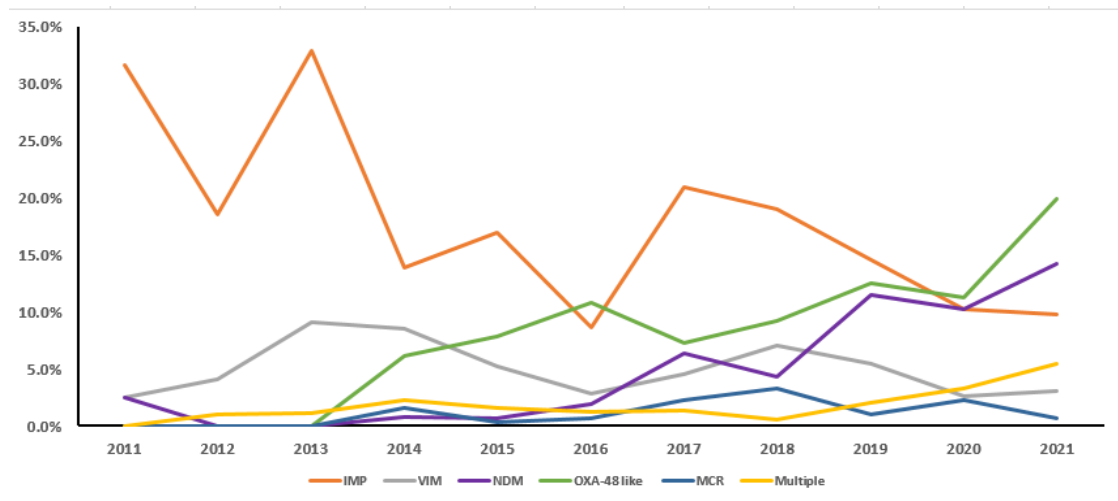
圖一：帶 carbapenemase 與 MCR 菌株之分布



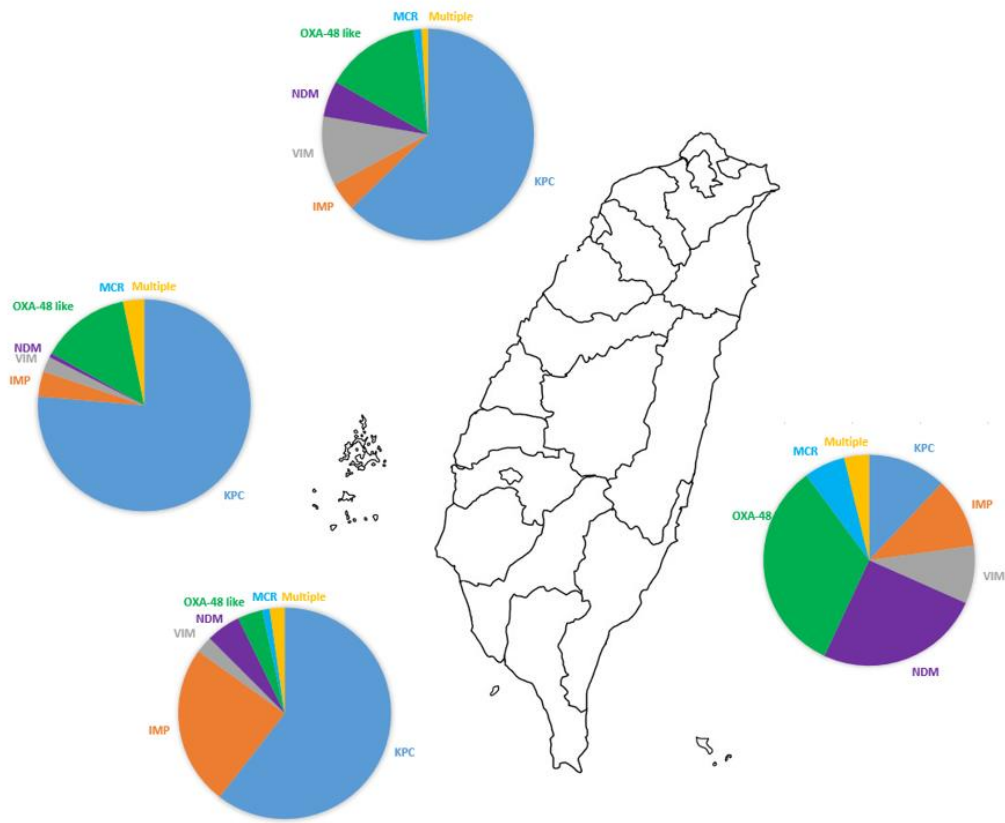
圖二: CPE 菌株中 carbapenemase 與 MCR 之占比



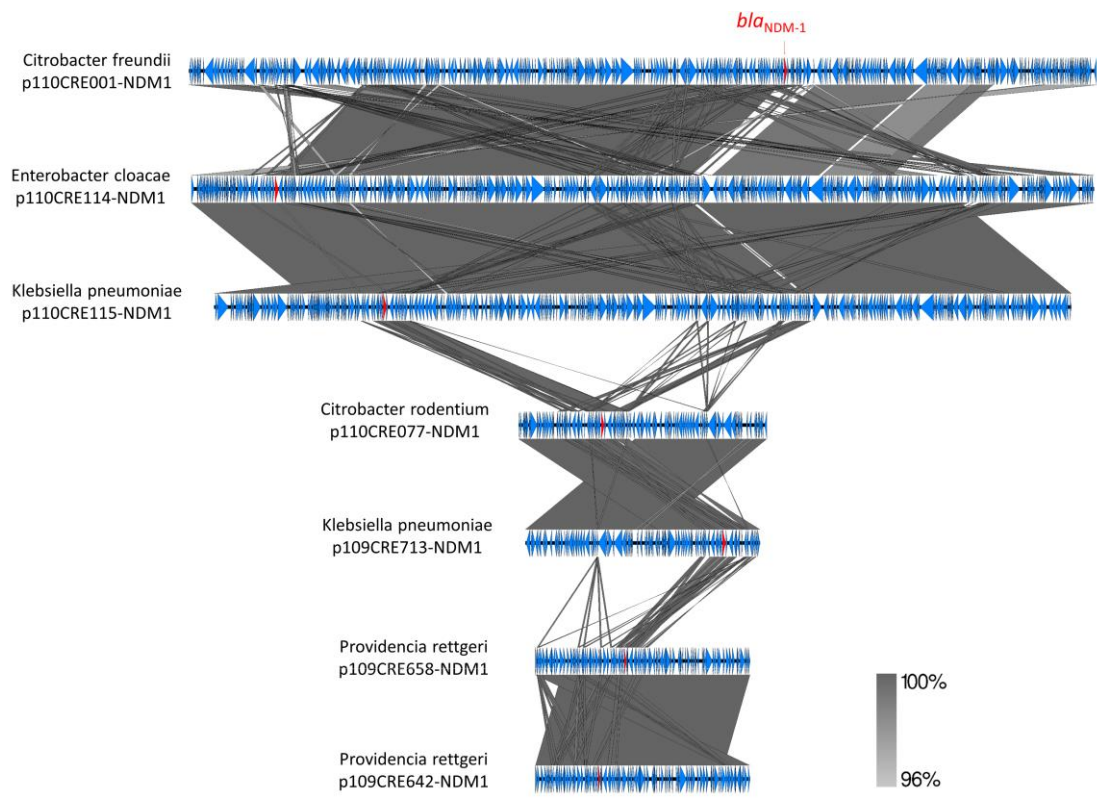
圖三: CPE 菌株帶 carbapenemase 與 MCR 之占比



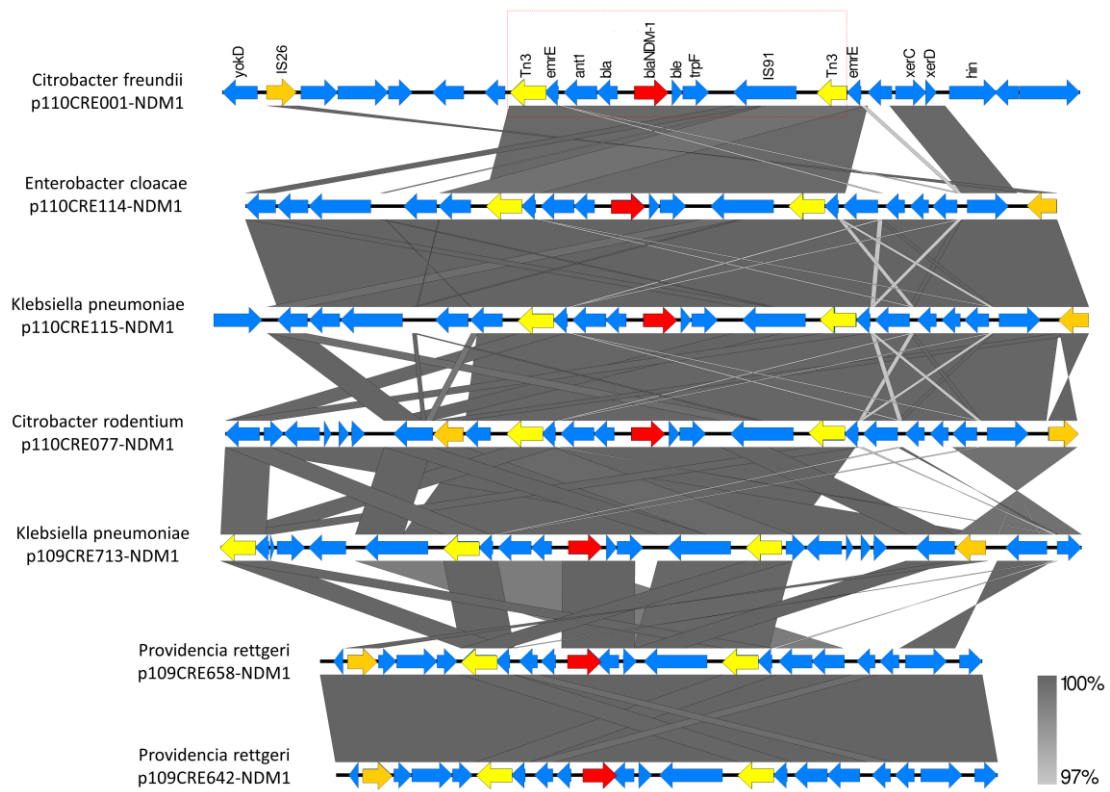
圖四: carbapenemase與MCR之分年趨勢



圖五、台灣各區帶 Carbapenemase 與 MCR 菌株之分布



圖六、並列比較分析 NDM-1 質體間之差異性



圖七、並列比較分析NDM-1基因及附近序列之差異性

表一、7株帶NDM-1菌株之菌種及抗藥基因

Isolates	Speices	Antimicrobial resistant genes	NDM-1 plasmid size , Inc type
109CRE642	<i>Providencia rettgeri</i>	ARR-3, ant(2'')-Ia, aph(3')-Ia, blaNDM-1 , blaOXA-10, blaVEB-1, ble, cmlA5, dfrA14, floR, lnu(G), mph(E), msr(E), qacEdelta1, sul1, tet(B)	85.7 kb, Col3M
109CRE658	<i>Providencia rettgeri</i>	ARR-3, ant(2'')-Ia, aph(3')-Ia, blaNDM-1 , blaOXA-10, blaVEB-1, ble, cmlA5, dfrA14, floR, lnu(G), mph(E), msr(E), qacEdelta1, sul1, tet(B)	85.7 kb, Col3M
109CRE713	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ARR-3, aac(3)-IId, aac(6')-Ib-cr, aadA16, blaNDM-1 , blaOKP-B-2, blaOXA-10, ble, dfrA27, fosA, oqxA10, oqxB11, qacEdelta1, qnrB6, sul1	93.7 kb, IncN2, IncR
110CRE001	<i>Citrobacter freundii</i>	ARR-3, aac(3)-IId, aac(6')-Ib-cr, aadA16, ant(2'')-Ia, blaCMY-84, blaNDM-1 , blaOXA-10, blaTEM-1, ble, dfrA10, dfrA27, mph(A), qacEdelta1, qnrB38, qnrS2, sul1, sul2, tet(D)	363.1 kb, IncC, IncFIB, IncFII
110CRE077	<i>Citrobacter rodentium</i>	ARR-3, aac(3)-IId, aac(6')-Ib-cr, aadA16, blaNDM-1 , blaOXA-10, blaSED, ble, dfrA27, qacEdelta1, qnrB6, sul1	99.2 kb, IncN2, IncR
110CRE114	<i>Enterobacter cloacae</i>	ARR-3, aac(3)-IId, aac(6')-Ib-cr, aadA16, aadA2, armA, blaACT-28, blaCTX-M-3, blaNDM-1 , blaOXA-1, blaOXA-10, blaTEM-1, ble, catB3, dfrA12, dfrA27, mph(A), mph(E), msr(E), qacEdelta1, qacG2, sul1, sul2, tet(D)	360.9 kb, IncC, IncFIB, IncFII
110CRE115	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ARR-3, aac(3)-IId, aac(6')-Ib-cr, aadA16, aph(3')-Ia, blaNDM-1 , blaOXA-1, blaOXA-10, blaSHV-70, blaTEM-1, ble, catB3, dfrA27, fosA5, mph(A), oqxA8, oqxB10, qacEdelta1, qacG2, sul1, sul2, tet(D)	342.8 kb, IncC, IncFIB, IncFII

110 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：110.12.08

*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	符合進度，方法適當。	謝謝委員。	
2	可提供實務防治運用，作為政策參考。	謝謝委員建議。	
3	以 NGS 進行 carbapenem-resistant 腸內菌抗藥性之質體/基因分析，有助於釐清其跨菌種傳播模式及提出防治措施。	謝謝委員。	
4	可與感管組討論並提出田野防治措施。	謝謝委員建議。	
5	另可分析 Carbapenemase CRE。	謝謝委員建議。	

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 110 年 12 月 23 日前至 GRB 系統完成資料抽換。