

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-124502

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫

計畫名稱：多重抗藥腸桿菌重要抗藥基因與質體變化之分析

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：林鈺棋、謝佳倫

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		7
(二)、材料與方法		13
(三)、結果		15
(四)、討論		18
(五)、結論與建議		19
(七)、參考資料		20
(六)、圖表		22

共 (25) 頁

圖次：

圖一、103-107 年帶 MCR-1 菌株統計圖。

圖二、各縣市醫療機構檢出 MCR-1 基因之菌株數

圖三、MCR-1 producing KP之質體分析

圖四、MCR-1 質體組裝片段之比較

計畫中文摘要：

關鍵詞：產碳氫黴烯酶，KPC

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。特別是，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，因 carbapenem 類抗生素為 β -lactam 類的後線用藥，且 CRE 常同時攜帶其他類抗生素的抗藥基因，此時，只剩最後線抗生素如 polymyxin 類抗生素及 tigecycline 類抗生素可有效地治療這些感染症。但不幸的是，2015 年底，Liu et al. 等人發現 E. coli 細菌株攜帶新型 colistin-resistance gene (mcr-1)，且位於可轉移的抗藥質體上。最近，台灣學者相繼報告 mcr-1 腸道菌的發現及 KPC-KP 造成的院內感染疫情的發生，然而，尚無系統性地研究攜帶 carbapenamase 或 MCR-1 的抗藥質體、並其在院感疫情上所產生的影響。

今(107)年完成 3 株通報 MCR-1 *Klebsiella pneumoniae* 菌株之全基因定序，藉由定序分析資料，與國際資料進行比對。結果使我們了解這些質體攜帶的抗藥基因，對於多重抗藥腸桿菌的致病性、播散的進一步的研究有其重要性並對發展快速篩檢平台提供有利的資訊。

計畫英文摘要：

Keywords: carbapenemase, KPC

Rapid and large increase of multi-drug resistant pathogen has threatened human health and public health. In particular, multidrug-resistant (MDR), extensively-drug resistant (XDR) Enterobacteriaceae has been increased significantly in the last decade.

The emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and colistin-resistant Enterobacteriaceae have been reported recently in Taiwan. The most important resistant mechanism is the production of carbapenemase or colistin resistant enzyme which located on mobile genetic elements (such as transposon, integron, plasmid) thereby facilitate their transfer between different species. Plasmid is the major contributor among these elements. However, a systemic investigation of antimicrobial plasmids harboring carbapenemase or *mcr-1* is lacking, and the role of antimicrobial plasmid played in the hospital outbreaks is not well understood.

We have analyzed genetic composition of 3 MCR-1 carrying plasmids by using NGS. The genetic data were compared with that in NCBI. The objective of this study is to establish database of whole genome of antimicrobial plasmids of MDR Enterobacteriaceae. This database will show us the whole panel of all resistance genes targeting different classes of antimicrobial agents. These gene sequences may be important for the survival, replication, and virulence of the resistant bacteria. This information will potentially help us to decipher the further

mechanisms involved in the pathogenicity and the dissemination of these pathogens.

本文

(一)前言

多重抗藥性病原體快速且大量的增加，加上近年來新一代抗生素的研發進展緩慢，導致即將人類面臨多重抗藥病原菌所造成的最緊迫威脅。正如世界衛生組織(World Health Organization, WHO) 2014 年指出，各國政府若不正視這個多重抗藥病原體的議題，並因應產生相關策略，來遏制抗藥病原體急遽的增加。過不多久，21 世紀時，人類將進入 “後抗生素時代 (post-antibiotic era) ”，此時常見感染症和輕傷都將成為致死性的疾病，因為已經不能找到有效的抗生素來治療這些病患 (1)

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)，如大腸桿菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumonia*, *K. pneumonia*, KP)，造成的感染症顯著上升(2、3)。2015 年底，Liu et al. 等人發現從豬隻分離的 *E. coli* 細菌株攜帶新型 colistin-resistance gene (*mcr-1*)，且位於可轉移的抗藥質體上，實驗證實其抗藥質體可輕易轉移至其他病原菌上，如綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及 KP(4)。隨後，丹麥、法國等國的學者也報告該國的病患及肉品樣本發現攜帶 *mcr-1* 的 *E. coli*(5、6)。這些報告顯示出，*mcr-1* 新型抗藥

基因不只侷限於中國，全球許多國家如亞洲的寮國、馬來西亞、日本、台灣、泰國、越南；歐洲的比利時、德國、英國、義大利、立陶宛、波蘭、葡萄牙、西班牙、瑞士、荷蘭；非洲的阿爾及利亞、埃及、奈及利亞、南非、突尼西亞；美洲的阿根廷、巴西、加拿大、美國，皆相繼報導發現多種 Enterobacteriaceae (如 *E. coli*、KP、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae*、*Shigella sonnei*、*Salmonella spp.*) 攜帶 mcr-1 新型抗藥基因(7)。mcr-1 抗藥基因已在不同種類的 Inc type 的抗藥質體上如 IncI2、IncHI2、incP、IncX4 被發現(8、9)。無可避免地，其抗藥質體將會播散至 CRE 上，造成 MDR、XDR、甚至是全抗藥性(Pandrug-resistant, PDR) 腸道菌的出現(10、11)。考量這些 carbapenemase 及 mcr-1 抗藥基因多位於抗藥質體上，進一步抗藥質體基因體研究，有助於了解抗藥質體基因組成、分布及相關基因調控機制。多重抗藥性病原菌快速大量的增加已日益嚴重威脅公共衛生及人類健康。

因 carbapenem 類抗生素已是 β -lactam 類的後線用藥，且 CRE 通常同時攜帶其他類抗生素的抗藥基因，此時，只剩最後線抗生素如 polymyxin 類抗生素及 tigecycline 類抗生素可有效地治療這些感染症。而 mcr-1 的出現，使得最後線用抗生素 polymyxin 類抗生素的有效使用性無法確保，將造成抗生素治療最後一道防線的一個重

要突破口(12)，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(1、2)。本研究結果期快速找出這些含抗藥基因質體的傳遞方式及分布特色，藉以分析抗藥基因之結構，並探討轉移與傳遞之方式，進而提供跨部會抗藥細菌流行與變異結果，共同商討可能之傳播途徑，以利對未來抗藥趨勢擬定解決方針，落實衛生福利部「完備防疫監視系統，強化防疫應變能力」之施政規劃重點，降低多重抗藥性細菌之發生。

造成 carbapenem 抗藥的 carbapenemases 基因位於抗藥質體上(13)，不僅可以水解大部分的 β -lactams 及造成較高的 carbapenem minimum inhibitory concentrations (MICs) 抗藥濃度，更重要的是攜帶 carbapenemase 的抗藥基因通常位於可移動的質體、transposons、或 integrons 上，可藉由 horizontal gene transfer 的方式，將抗藥基因傳遞至鄰近的同種或不同種的細菌上；加上 carbapenemase 的抗藥基因又常與其他類的抗藥基因連結，一起移動或傳遞。故此種 CRE 抗藥機制是重要的研究課題。

從 1982 年分離出第一個 carbapenemase，SME-1 (*Serratia marcescens* enzyme)。迄今，已有上百種的 carbapenemases 被發現且登錄於 <http://www.lahey.org/Studies>，並依胺基酸的相似度，區分為

Ambler A、B 及 D 三大類(14)：

1. Ambler A 類 carbapenemase，其酵素活化位置 (active site) 含 serine 胺基酸，故其功能可被 clavulanic acid 等抑制劑抑制。質體上的 carbapenemase 基因則有 KPC(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)、GES/IBC (Guiana extended-spectrum/integron-borne cephalosporinase) 等。KPC 是臨床上最常見的，且已在多國(美國、以色列、中國)引發重大的感染疫情(13)。

2. Ambler B 類 carbapenemase 為 metallo- β -lactamase (MBL)，主要為 VIM (Verona-integron-encoded metallo- β -lactamase)、IMP (active on imipenem) 及 NDM-1 (New-Delhi metallo- β -lactamase)。
MBL 可水解 monobactam(如 aztreonam)外的所有 β -lactams。

3. Ambler D 類 carbapenemase 為 extended-spectrum oxacillinase，可水解 oxacillin 及 cloxacillin，但對 carbapenem、ceftazidime、aztreonam 水解功效較弱。OXA-48 為 2003 年首度在土耳其自 *K. pneumoniae* (KP)分離得到，其傳播與 62.5Kb 的抗藥質體有關。

為了解國內現況，本署自 100 年設置 CRE 陽性菌株通報並提供 carbapenemase 基因型之確認服務。結果顯示，100 年至 104 年收到 3,265 株 CRE 菌株，有 683 株(20%)為產生 carbapenemase 的腸桿菌 (carbapenemase producing Enterobacteriaceae, CPE)，其中以 KPC-KP

最多。100-102 年分析結果可參考已發表的論文(15)：

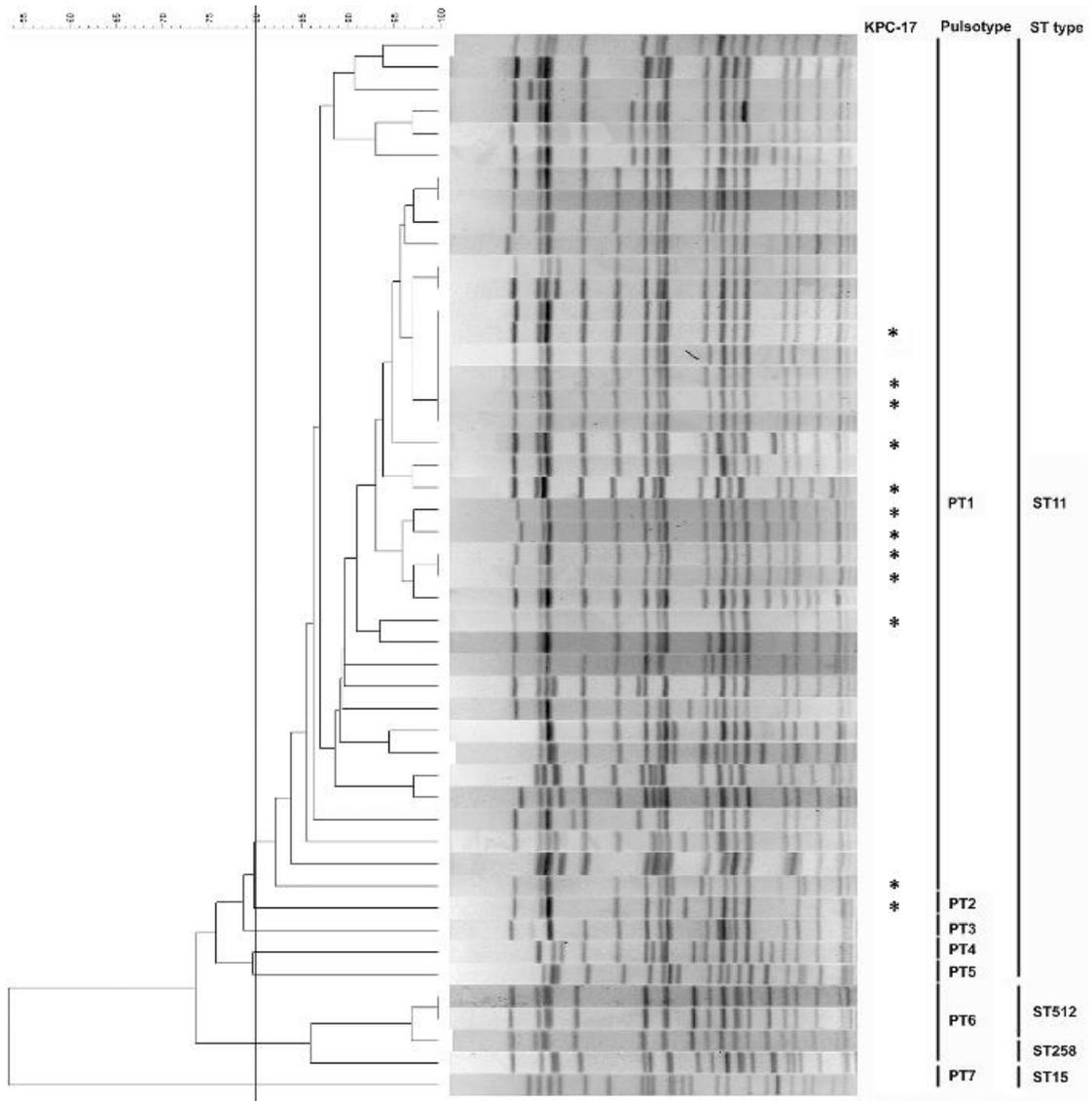
1. 表一詳列 carbapenem non-susceptible KP 的攜帶的各種 carbapenemase 基因型及比例。
2. 以 PFGE 分析 KPC-KP 之間的菌株關係圖一，發現多為 ST11 並屬於同一 pulsotype (PT)

依據以上結果，可推斷 KPC-KP 的確在國內醫院散布，也造成了某些醫院的院內感染疫情。

表一、2011~2013 年 Carbapenemase producing KPs

Carbapenemase Group (n ^a)	Carbapenemase variants	2011	2012	2013	total	total
KPC (157)	KPC-2	26	72	47	157 (15.8%)	145 (14.6%)
	KPC-17	0	8	4		12 (1.2%)
IMP (16)	IMP-8	5	4	7	16 (1.6%)	
VIM (9)	VIM-1	0	3	6	9 (0.9%)	
NDM (1)	NDM-1	0	0	1	1 (0.1%)	
total CPKP (183)		31 (9.5%)	87 (25.4%)	65 (20%)	183 (18.4%)	
total carbapenem non-susceptible KPs (994)		326	343	325	994	

^an: isolates numbers in each carbapenemase group



圖一、KPC-KPs 親緣關係圖

(二)材料與方法

1. 實驗菌株

使用疾病管制署收集之 CRE 送驗菌株。將挑選送至昆陽實驗室的 CRE 菌株經實驗室確認為 carbapenemase、mcr-1 基因陽性的菌株做進一步的抗藥基因及質體的分析

2. 脈衝膠電泳分析(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；以 H9812 菌株(XbaI 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。

3. 抗藥質體的確認：S1-PFGE/Southern hybridization

使用 S1 nuclease 限制酶進行菌株分型實驗，以脈衝電泳儀 CHEF-MAPPER (BIO-RAD, USA)，變換時間：0.5-30 秒，電場值為 6V/cm²，200V 電壓值，20 小時電泳時間，使用 1 % SeaKem Gold agarose (BMA, Rockland, ME, USA) 及 0.5×TBE 電泳液，以 H9812 菌株 (XbaI 限制酶切割) 當作片段大小指標。電泳膠須

以 HCl depurination、NaOH denature 以及 Tris-HCl (pH 7.5) neutralization 處理後，轉漬至 NC paper 上。與 DIG 標誌之探針 (Roche Applied Science) 經 hybridization 20 小時，清洗後，以化學冷光偵測儀 (VersaDoc, BioRad) 偵測反應訊息

4. 抗藥質體 DNA 萃取

確認抗藥質體後，以 gel cutting tips 將抗藥質體 DNA 自 S1-PFGE 電泳膠切出，並利用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, 美國) 試劑盒的說明進行萃取。

5. 抗藥質體定序

將萃取之抗藥質體 DNA 以 QIAseq FX Single Cell DNA Library kit (Qiagen, 德國) 進行建庫，並以 Illumina MiSeq 或 Miniseq 平台進行二代 NGS 定序。

6. Bioinformatics 分析

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 ResFinder 3.0 (Center for Genomic Epidemiology, DTU, Denmark 進行抗藥基因分析(16)。

(三) 結果

1. 統計 103-107 年帶 MCR-1 菌株

統計自 103 年至 107 年共檢出 18 株帶有 MCR-1 之菌株，12 株為 *E. coli*，6 株為 *Klebsiella pneumoniae*，其中於 105 年檢出 1 株同時帶有 MCR-1 及 NDM-9 之 *E. coli*，106 年檢出 1 株同時帶有 MCR-1 及 KPC-17 之 *E. coli* (圖一)。另依檢出年度分析，自 103-107 年分別檢出 4 株、1 株、3 株、6 株及 4 株菌株。檢出 MCR-1 之縣市，由北至南至東分別是台北、新北、新竹、嘉義、台南、花蓮及台東，共 11 家醫院 (圖二)。

2. MCR-1 質體分析

K. pneumoniae 帶有 MCR-1 基因在台灣尚無人分析其質體情形，為瞭解這些帶 MCR-1 *K. pneumoniae* 菌株之質體差異性，因 southern hybridization capacity 只有 5 個，顧及涵括地域性，故並無選取帶 NDM-9 與 MCR-1 之 105-Sch 之台南菌株，選取 103Sch、103-TF、104-TF、105ST 及 106ET。先以 S1-PFGE 分離菌株之染色體及質體後，再利用 MCR-1 探針進行 Southern hybridization，以偵測 MCR-1 質體位置，結果如圖三所示。在 5 株 *K. pneumoniae* 菌株中均偵測到 MCR-1 質體，依質體大小可

分成3類，分別為310 Kb (105-ST)、220 Kb (103-SCh及103-TF) 及30 Kb (104-TF及106-ET)。

3. MCR-1 質體之全基因定序分析

為深入瞭解MCR-1質體，並分析不同MCR-1質體間的差異性，因此從3種不同大小的MCR-1質體中，分別選取1株 (103-TF、104-TF及105-ST)進行NGS。經*de novo* assembly後進行質體分型，結果顯示103-TF、104-TF及105-ST之MCR-1質體型別分別為IncHI2、IncX4及IncHI1；此外，3株MCR-1質體均組裝出包含MCR-1的片段，經進一步比對分析，結果如圖四所示。

103-TF之MCR-1片段由*ISApII-mcr-1-orf-ISApII*構成，*mcr-1*基因兩端由插入序列 (insertion sequence, IS) *ISApII*形成正向重複序列(direct repeat)；105-ST之MCR-1片段同樣由*ISApII-mcr-1-orf-ISApII*構成，但不同於103-TF，兩端的*ISApII*形成反向重複序列(inverted repeat)；此外，104-TF的MCR-1片段則僅由*mcr-1-orf*組成，在*mcr-1*基因上下游均未發現*ISApII*序列。

將3個MCR-1片段上傳至NCBI資料庫進行序列比對，結

果顯示103-TF片段與分離自中國豬隻上的pECJS-59-244質體(KX084394)之序列相近，質體型別均為IncHI2；此外，104-TF則與分離自臺灣人體上的pNG14043質體(KY120364)之序列相近，且質體型別均為IncX4。

(四) 討論

1. 質體型別為 IncX4 的 MCR-1 質體，已在中國境內不同區域與其他國家中陸續被發現，值得注意的是，這些從不同地緣上發現的 MCR-1 質體均具有多項共同點，包括：(1)序列高度相似；(2)質體大小約 30kb；(3) *mcr-1-orf* 附近無 *ISApII*；(4)質體上無其它抗藥性基因。此外，經比對 NCBI 資料庫，發現 IncX4 的 MCR-1 質體與分離自 *Salmonella enterica* 的 pSH146_32 質體之序列高度相似，由於 pSH146_32 質體不包含 *mcr-1-orf*，因此推論是由外來的 *mcr-1-orf* 插入該質體骨架而形成 MCR-1 質體。
2. 103-TF 的 MCR-1 質體具有 *ISApII-mcr-1-orf-ISApII* 的基因結構，由於兩端的 *ISApII* 形成正向重複序列，可透過重組 (recombination) 形成 *ISApII-mcr-1-orf* 環形中間體 (circular intermediate)，故 *ISApII-mcr-1-orf-ISApII* 被稱為 Tn6330 新型轉座子 (transposon)，目前 IncHI2 質體為最常見具有 Tn6330 的質體型別；105-ST 的 *ISApII-mcr-1-orf-ISApII* 基因結構之兩端 *ISApII* 形成反向重複序列，可能藉由髮夾結構 (hairpin conformation) 形成僅包含 *mcr-1-orf* 的環形中間體 (circular intermediate)，因此被稱為另一個新型轉座子 Tn6390；此外，104-TF 的 *mcr-1-orf* 基因結構由於兩端缺少 *ISApII*，結構較穩定無法進一步傳播，可部分解釋在不同國家中發現 IncX4 的 MCR-1 質體均具有高相似度。

(五) 結論與建議

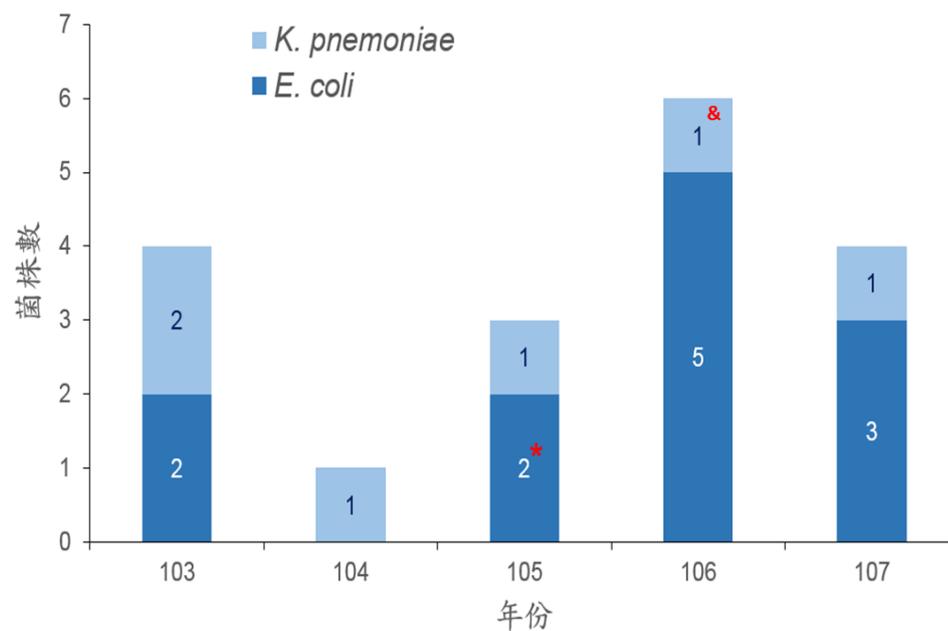
本計畫發現 2 株 MCR-1 同時帶有其他 carbapenemase 基因，一為同時帶 MCR-1 與 NDM-9 之 *E. coli* 菌株，另一為同時帶 MCR-1 與 KPC17 之 *K. pneumoniae* 菌株。由於此兩株對於後線抗生素如 carbapenem 及 colistin 均具有抗藥性，倘未來同時帶有 carbapenemase 及 MCR-1 的菌株持續增加，將嚴重衝擊臨床治療，使醫師面臨無藥可用的困境，因此除持續加強監測分析，並需建置抗藥質體基因資料庫以供比對，提供感染管制措施之施行，以避免蔓延實為當務之急。

(六) 參考資料

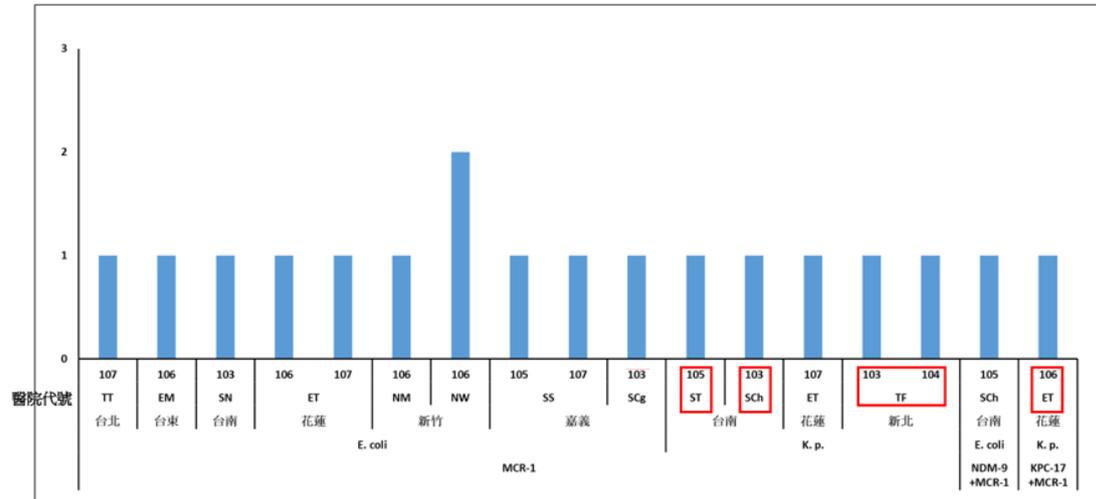
1. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
2. Walsh TR, Toleman MA. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1–3.
3. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 821–30.
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR et al. 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*. 2016;16(2):161-8.
5. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F et al. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(49).
6. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P et al. Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill*. 2016;21(6).
7. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jun 24. pii: dkw274.
8. Zhi C, Lv L, Yu LF et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):292-3.
9. Webb HE, Granier SA, Marault M et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):144-5.
10. Yu H, Qu F, Shan B, Huang B et al. Detection of mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) from different hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 May 23. pii: AAC.00440-16.
11. Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):287-8
12. Paterson DL, Harris PN. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):132-3.
13. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 17:1791-8.

14. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20:440-58.
15. Tseng IL, Liu YM, Wang SJ, Yeh HY, Hsieh CL, Lu HL, Tseng YC, Mu JJ. 2015. Emergence of Carbapenemase Producing *Klebsiella* Pneumonia and Spread of KPC-2 and KPC-17 in Taiwan: A Nationwide Study from 2011 to 2013. *PLoS One.* 10:e013847.

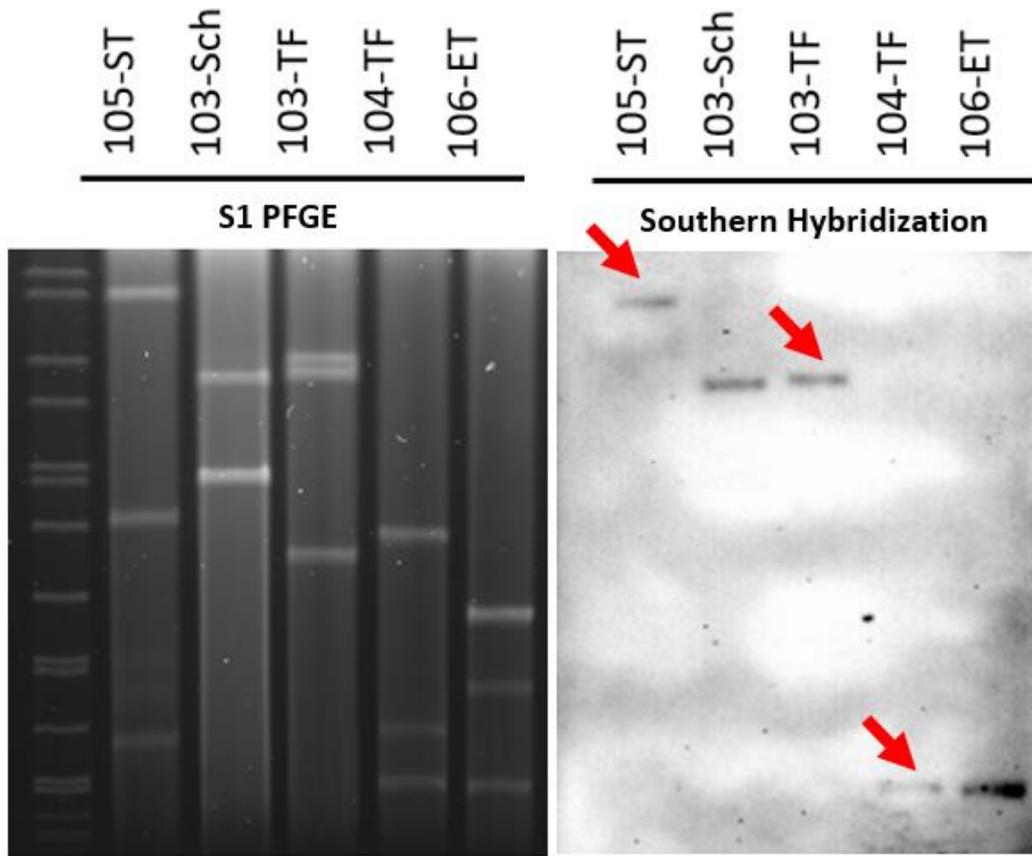
(七) 圖表



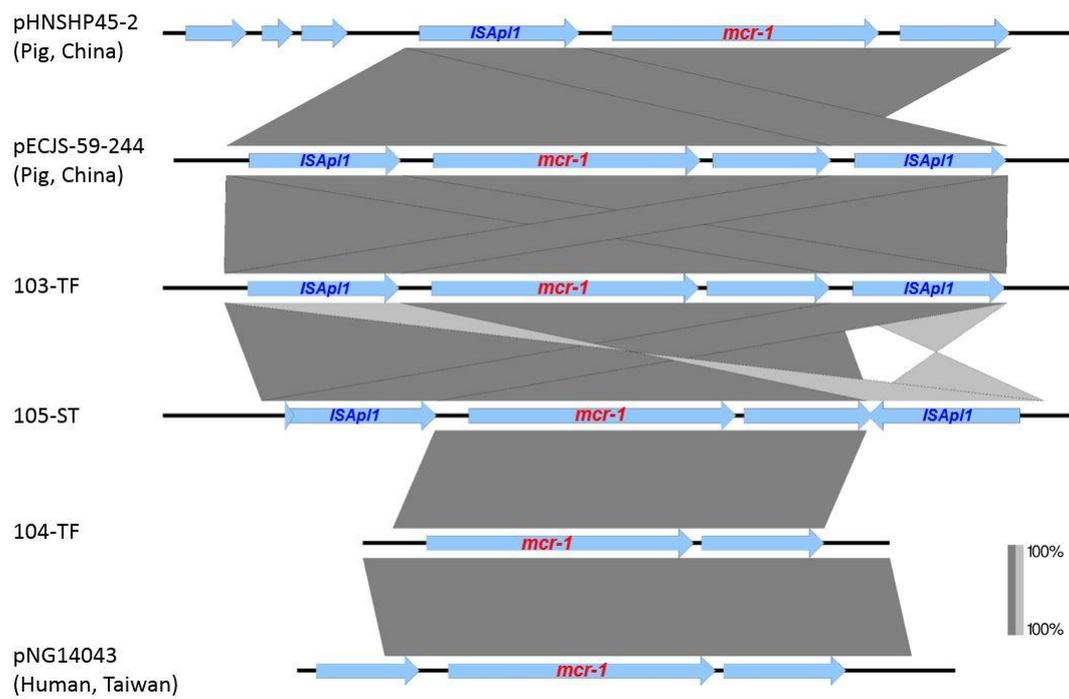
圖一、103-107 年帶 MCR-1 菌株統計圖。「*」為 1 株分離自 105 年同時帶有 NDM-9 及 MCR-1 之 *E. coli* 菌株。「&」為 1 株分離自 106 年同時帶有 KPC-17 及 MCR-1 之 *E. coli* 菌株



圖二、各縣市醫療機構檢出MCR-1基因之菌株數



圖三、MCR-1 producing KP之質體分析



圖四、MCR-1質體組裝片段之比較

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	可以看出大陸和台灣豬隻 mcr-1 質體序列是不同。	將持續分析	
2	細菌抗藥性監測為重要工作宜持續進行。	謝謝委員肯定	
3	建議再深入分析 105SCh 和 106ET 之 mcr-1 基因分析。	謝謝委員建議，將於明年計畫中深入分析	