

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122115

衛生福利部疾病管制署 108 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

## 108 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

執行期間： 108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

目	錄	
一、摘要：	中文摘要	4
	英文摘要	5
二、本文		
	(一)、前言	6
	(二)、材料與方法	9
	(三)、結果	13
	(四)、討論	15
	(五)、結論與建議	16
	(六)、參考資料	17
	(七)、圖表	18

共 (25) 頁

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 108 年 10 月 6259 株 CRE 菌株中，有 1724 株為 CPE。108 年 KPC 基因陽性最多佔全部 CPE 之 50%，IMP (imipenem-resistant *Pseudomonas*) 基因陽性佔全部 CPE 之 17.4%，OXA-48 (oxacillinase-48-like  $\beta$ -lactamases) 基因陽性佔全部 CPE 之 13%，VIM (Verona Integron-Mediated Metallo- $\beta$ -lactamase) 基因陽性佔全部 CPE 之 6.1%，以及 NDM 基因陽性佔全部 CPE 之 11.7%。NDM 菌株的快速成長，已超越 VIM 的數量，成為 CPE 中 carbapenemase 的第四位。

NDM 種類及數量持續增加，今年東部三家醫院 5 月至 10 月底密

集出現 NDM-7 個案。需持續觀察 NDM 基因傳播情形，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 6259 CRE isolates, a total of 1724 isolates carried genes encoding carbapenemase. From Jan to Oct. in 2019, KPC was 50 %, IMP was 17.4 %, OXA-48 was 13 %, VIM 6.1 % and NDM was 11.7% isolated rate among all CPE isolates. NDM like isolates spread rapidly, it has come the four the place among all CPE this year (2019).

The variants and amount of NDM producing isolates increasing dramatically. The NDM-7 appeared in three hospitals located in eastern Taiwan from May to Oct. this year. The spread of NDM-like producing isolates 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 108 年 10 月年疾病管制署共收到 6259 株 CRE 菌株, 其中 1724 株為帶 carbapenemase 之 CPE。*Klebsiella pneumoniae* 為主要的 CPE 菌株(佔 79%), 其次是 *Enterobacter* spp.(佔 10%)、*E. coli* (佔 7%)、*Citrobacter* spp. (佔 2%) 及其他 (佔 2%) (圖一)。

分析 108 年 CPE 中之 carbapenemase 基因, KPC 仍為台灣主要流行的 carbapenemase, 佔全部 CPE 之 50%, 包括 KPC-2(圖二), 主要存在 *Klebsiella pneumoniae* (圖三 A); 其次是 IMP, 佔全部 CPE 之 17.4% (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 6.1% 主要存在 *Citrobacter* spp. (圖三 D)。NDM 在台灣已出現 5 種不同型別, NDM-1、NDM-4、NDM-5、NDM-7 及 NDM-9 佔全部 CPE 之 11.7% (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, 100 至 108 年 10 月通報 CRE 數量以

南部最多、東部最少 (圖四 A)。中部地區通報數量雖然較北部少 700 株左右,但 CPE 陽性佔比高於北部近 35% (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。OXA-48 以北及中部分布最多,南部、北部及東部亦有少數個案。急速攀升之 NDM 則全區都有個案出現,本年東區密集出現 NDM 個案,因此東區 carbapenemase 佔比中 NDM 躍升第一 (32.7%)。另 105-106 年北區有 NDM-5 群聚事件,因此,北部 NDM 佔比高於中及南區。(圖五)。

### 3. NDM-7 密集出現

目前台灣出現過之 NDM 基因型別為 NDM-1、NDM-4、NDM-5、NDM-7 及 NDM-9 (圖六)。本(108)年 NDM-1、NDM-4、NDM-5 及 NDM-7 均有新增個案,另有驗出同時產生 NDM-1 及 KPC-2 之 *Enterobacter cloacae* 以及同時產生 NDM-1 及 VIM-1 之 *Klebsiella pneumoniae*。本年第一次出現產 NDM-7 型別之菌株,4 株 *E. coli* 及 1 株 *Klebsiella pneumoniae*。5 株 NDM-7 菌株均由東部三家醫院於 5 月至 10 月密集通報。(圖六、七)

#### (四) 討論

1. KPC、IMP 仍然分佔通報 CRE 中 carbapenemase 基因之第一及第二位。OXA-48 則自 104 年急速攀升至第三位迄今。本年 NDM 急遽增加躍升至第四位。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 及 VIM 以北台灣居多，OXA-48 則以中部為最多，IMP 則多集中在南部，105-106 NDM 年北部有群聚，本年東部密集通報。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。本年第一次出現之 NDM-7 由台東花蓮通報。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. NDM-7 在 5 個月內密集出現，且出現於不同菌株中，是位於同一質體轉移抑或是不同質體形成多樣性，而密集出現之高傳播速率，這些問題需待質體序列解密。

## (五) 結論與建議

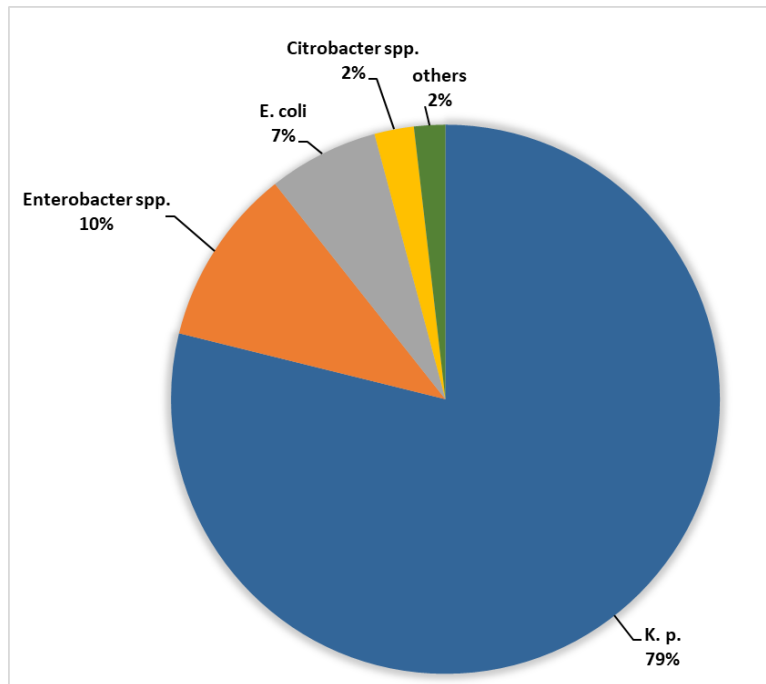
1. OXA-48 菌株的快速成長，已超越 VIM 的數量，成為 CPE 中 carbapenemase 的第三位；NDM 密集出現於院感檢體中，已造成醫院群聚事件。最新通報之 NDM-7 是否帶來下一波的疫情？值得觀察。
2. 本計畫歷年來提供 PFGE 親緣樹狀圖予各醫院進行群聚事件的分析，協助醫院釐清感染源。由於抗藥質體有菌株間移轉之特性，詳細分析抗藥質體基因序列，將能提供感染管制更多訊息。



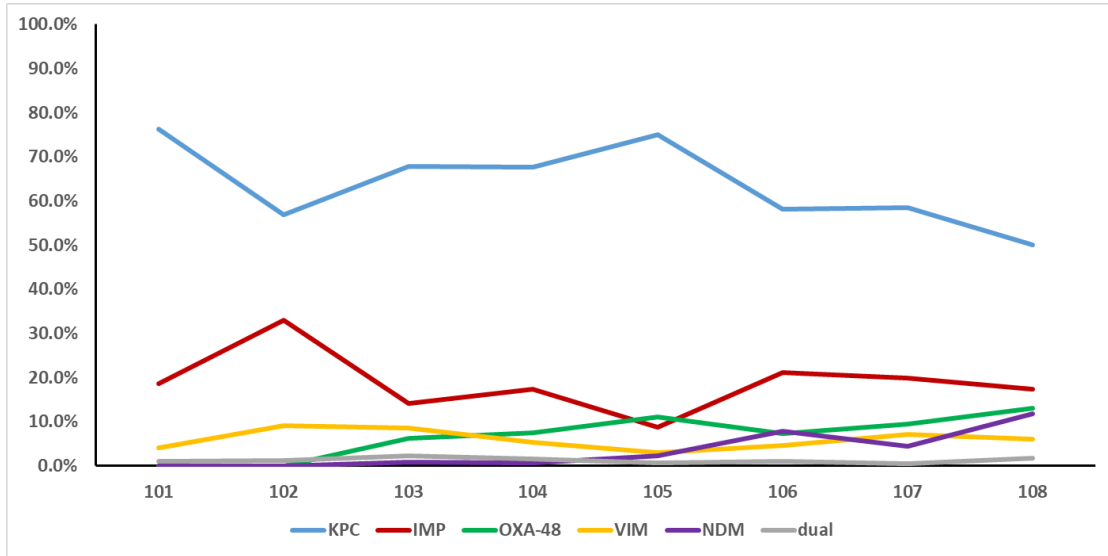
## (六) 參考資料

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

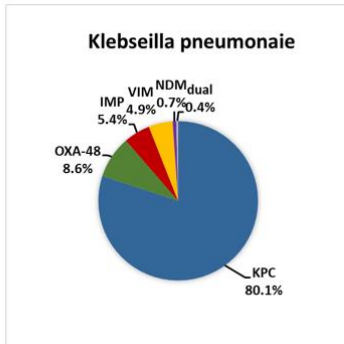


圖一、CPE 細菌種類佔比

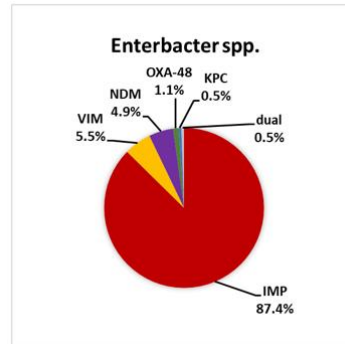


圖二、CPE 之 carbapenemase 種類佔比

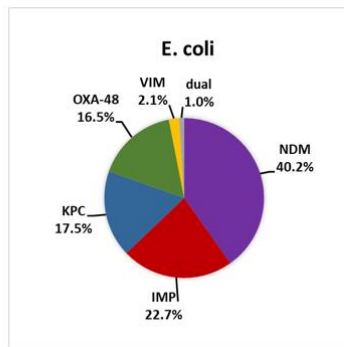
A



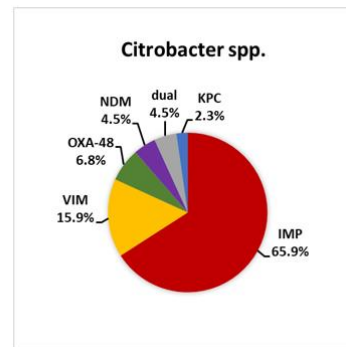
B



C

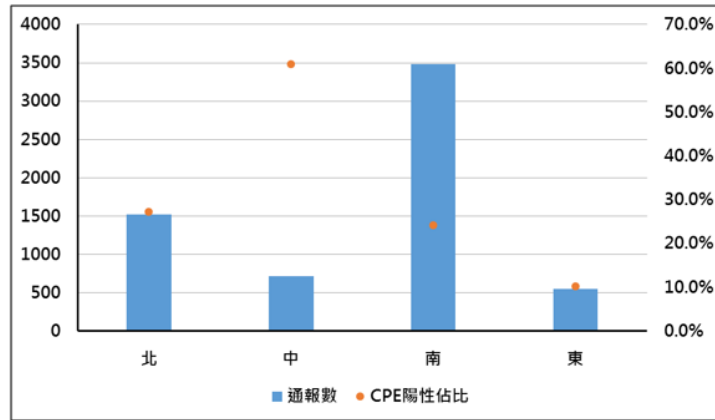


D

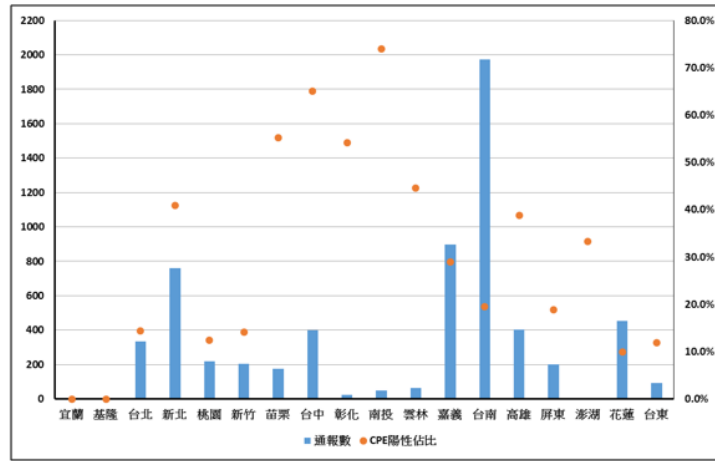


圖三、 CPE 各菌株中 carbapenemase 占比

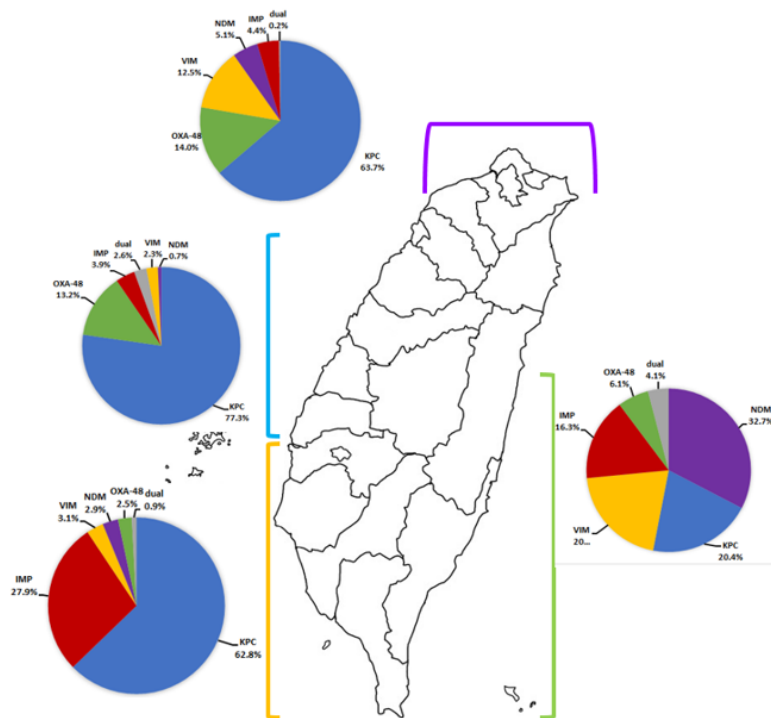
A



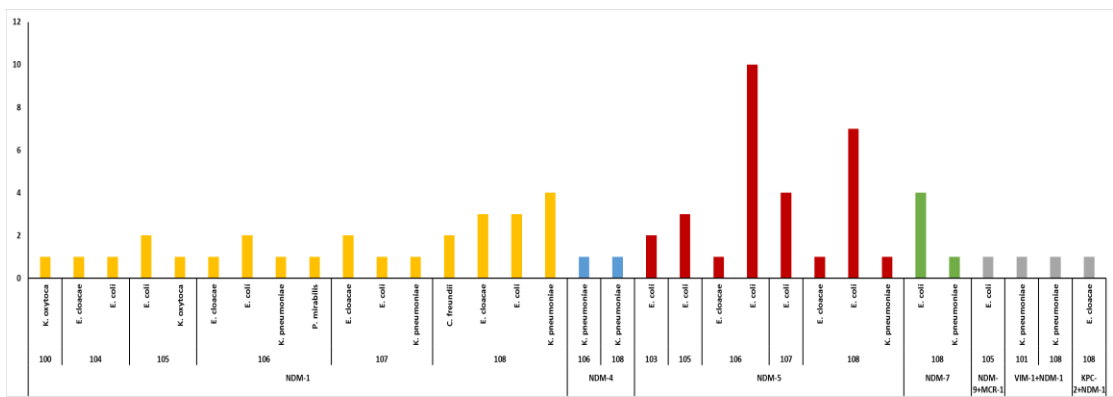
B



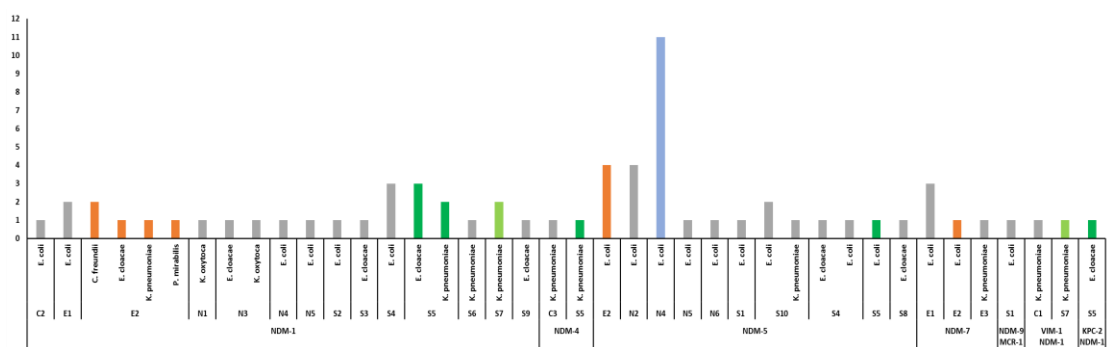
圖四、各區域縣市 CRE 通報數及 CPE 陽性佔比



圖五、CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布



圖六、通報 NDM 菌株之年代、基因型別及菌種情形



圖七、通報 NDM 菌株之醫院、基因型別及菌種情形



# 衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫

## 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122115

計畫名稱：多重抗藥腸桿菌之 carbapenemase 監測與分析

計畫主持人：慕蓉蓉

\*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	計畫與「多重抗藥腸桿菌重要抗藥基因與質體變化之分析」稍有重複	本計畫明年起將與「多重抗藥腸桿菌重要抗藥基因與質體變化之分析」合併為一整體計畫	
2	標題是否改為 CRE 比 MDR 合適？	謝謝委員建議，未來制訂題目會更加注意。	
3	非常清楚、很好的研究計畫。與區管中心的合作也非常值得讚賞。	謝謝委員鼓勵。	

備註：請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。