

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-133133

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：產生 carbapenemase 腸桿菌(Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, CPE) 群聚事件之監測與分析

106 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、譚傳瑛

執行期間： 106 年 1 月 1 日至 106 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		8
(三)、結果		12
(四)、討論		15
(五)、結論與建議		16
(六)、參考資料		17
(七)、圖表		18

共 (23) 頁

圖次：

圖一、CPE 細菌種類佔比

圖二、圖二、CPE 之 carbapenemase 種類佔比

圖三、CPE 各菌株中 carbapenemase 佔比

圖四、CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布

圖五、通報 NDM-5 *E.coli* 之分布情形

圖六、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 pneumonia 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 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 106 年 4844 株 CRE 菌株中，有 1270 株為 CPE。KPC 基因陽性最多佔全部 CPE 之 67.1% (包含 KPC-2 及 KPC-17)，IMP 基因陽性佔全部 CPE 之 16.3% (包含 IMP-4、IMP-8、IMP23 及 IMP-V)，OXA-48 基因陽性佔全部 CPE 之 7.0% (包含 OXA-48 及 OXA-181)，VIM 基因陽性佔全部 CPE 之 5.0% (包含 VIM-1 及 VIM-3)，以及 NDM 基因陽性佔全部 CPE 之 2.2 % (包含 NDM-1、NDM-4、NDM-5 及 NDM-9)。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。

本年度 NDM-5 急遽增加，包括台北兩家及台南兩家醫院，其中台北一家醫院屬單一群聚事件，並提供群聚事件之 PFGE 圖譜與該醫院，在感控及時介入後，疫情並未擴大。

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 4844 CRE isolates, a total of 1720 isolates carried genes encoding carbapenemase. *Klebsiella pneumonia* carbapenemase (KPC) was 67.1%, IMP was 16.3%, OXA-48 was 7.0%, VIM in 5.0% and NDM was 2.2% among all CPE isolates. OXA-48 spreads rapidly, it comes the third place among all CPE in 2016.

There were 3 hospitals reported NDM-5 in 2017, two in Taipei, one in Tainan. The NDM-5 outbreak occurred in one of the hospitals in Taipei and the PFGE profile was provided for outbreak investigation. Due to serious infection control measure, the outbreak was under control.

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 β -lactamase) 抗藥性基因，調查發現此菌可水解 carbapenems 外的大部分 β -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-1 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-1 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) M100-S21 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 β -lactam， β -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 通報定義為符合 ceftriaxone, cefotaxime, and ceftazidime 第三代頭孢子菌素類 (third-generation cephalosporins) 具有抗藥性，且對 carbapenem 類抗生素 (doripenem、imipenem、meropenem 或 ertapenem 等) 任一種不具感受性(nonsusceptible)之腸道菌。100 年至 106 年 9 月年疾病管制署共收到 4844 株 CRE 菌株，其中 1270 株為帶 carbapenemase 之 CPE。 *Klebsiella pneumoniae* 為主要的 CPE 菌株(佔 83.5%)，其次是 *Enterobacter* spp.(佔 8.1%)、*E. coli* (佔 4.8%)、*Citrobacter* spp. (佔 2.0%)。 及 *K. oxytoca* (佔 1.3%) (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 67.1%，包括 KPC-2 及 KPC-17 (圖二)，主要存在 *Klebsiella pneumoniae* (圖三 A)；其次是 IMP，佔全部 CPE 之 16.3%，包括 IMP-4、IMP-8、IMP-23 以及自 2015 年開始發現新型 IMP-V (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，104 年從排名第四，至 105 年超越 VIM 上升至第三，主要出現在 *Klebsiella pneumoniae*，佔全部 CPE 之 7.0%。VIM 佔全部 CPE 之 5.0% 主要存在 *Citrobacter* spp. (圖三 C)。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 2.2% (圖二)，主要出現在 *E. coli* 中(圖三 D)。

2. CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布

CPE 菌株中最多的 KPC-2 以台灣北區分布最多，近年南部與中部地區也逐漸出現(圖四)，KPC-17 則集中台南、嘉義地區(圖四)。IMP-8 於 2001 年報導開始出現於台灣南部，迄今仍以南部居多(圖四)。VIM-1 與 KPC-2 相似，以台灣北區分布最多(圖四)。急速攀升的 OXA-48 以中部分布最多，南部及北部亦有零星個案(圖四)。NDM 則北南東都有個案出現(圖四)。今(2017)年台北醫院出現 NDM-5 之群聚事件(圖五)。

3. NDM-5 密集出現以及群聚事件

NDM-5 於 2014 年起零星出現於台北(TH)及台南(CHA)各一家醫院，自 2016 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，2017 年台南另一家醫院(CHB，與 CHA 為同一集團)亦通報 1 株 NDM-5 菌株(圖五)。截至本(2017)年 9 月，共通報本署 14 株 NDM-5 菌株分屬 11 個案，由 4 家醫院通報(TH、CHA、CHB 及 HH)，均為 *E. coli*。TH 醫院通報 2 株，台南 CHA 及 CHB 各通報 1 株，其餘 10 株由 HH 醫院通報，該醫院一個案於 5 個月內送驗 4 個菌株(個案 HH6，圖五)。

以 PFGE 圖譜分析四家醫院 14 株 NDM-5 *E. coli*，圖譜顯示 9 株來自 HH 醫院之菌株具 80% 以上 similarity，屬於一個 cluster(圖六)，顯示該醫院有群聚現象的發生。第 10 株為今(2017)年 5 月底通報之菌株，與其他 9 株 similarity 小與 80%，分屬不同 cluster。其餘 4 株來自 TH、CHA 及 CHB 醫院之菌株，皆分屬不同 cluster，應為零星個案。

因應 HH 醫院之 NDM-5 群聚事件，今(2017)年 5 月 17 日陪同本署全責組參與「HH 醫院疑似 NDM-5 突發群聚事件處理會議」，並提供醫院後續環境清消檢驗 21 件。在感控及時介入後，疫情並未擴大。

(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 2015 年急速攀升至第三位迄今。今(2017)年出現不同的 carbapenemase 基因；IMP-23, NDM-4 及 VIM-3。雖然為數不多，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，KPC-17、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蔓延，2016 年花蓮也出現群聚案例。因此，這些基因的地域分布在時空因素下有可能向其他區域蔓延，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-5 從 2014 年出現 2 株(TH 及 CHA 醫院通報)，直至 2016 年才再度出現。2016 年出現台北 HH 醫院後，10 個月間分別來自 7 例個案，密集通報 10 株 NDM-5 *E. coli* 菌株。從 PFGE 親緣樹狀圖分析，其中 6 例 9 株菌株屬同一 cluster，顯示該醫院出現群聚現象。

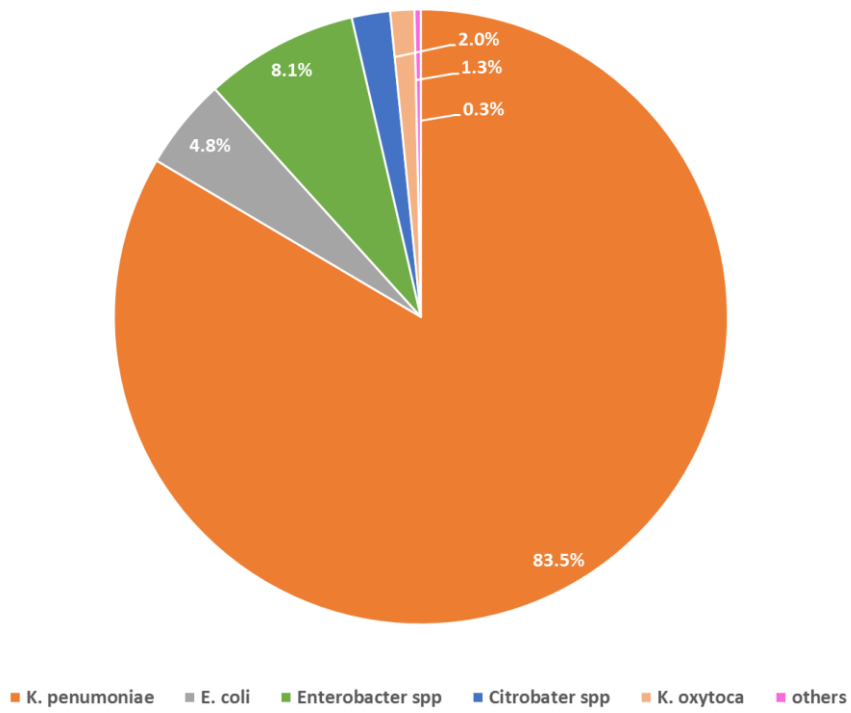
(五) 結論與建議

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。該醫院最新通報之 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，並且提供後續環境清消之檢驗。輔導加強感染管制措施後，均已見改善，未來將可提供更多協助於感染管制之施行方向。

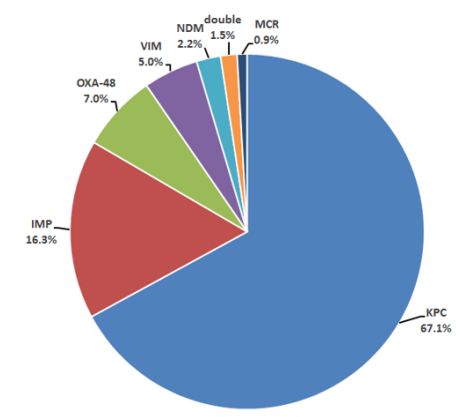
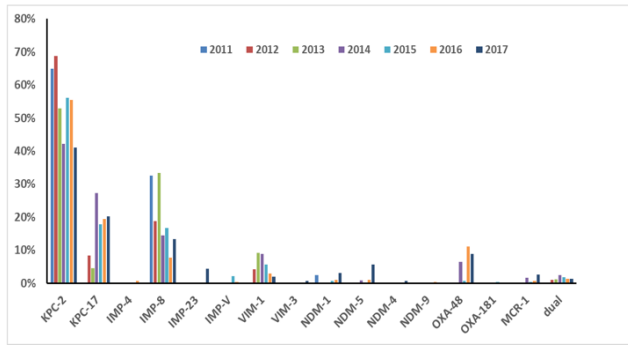
(六) 參考資料

1. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18:657-86.
2. Livermore DM, Woodford N. 2006. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol.* 14:413-20.
3. Thomson KS. 2010. Extended-spectrum- β -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.

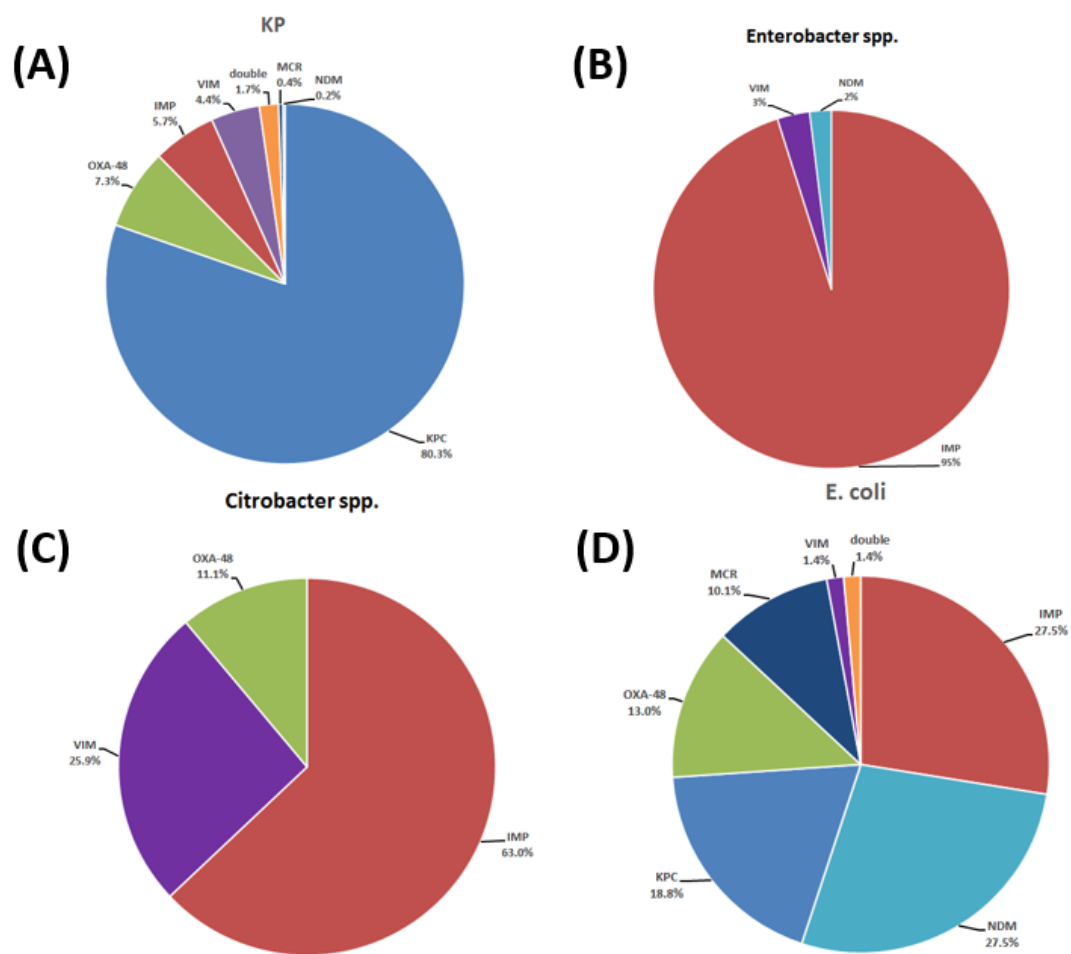
(七) 圖表



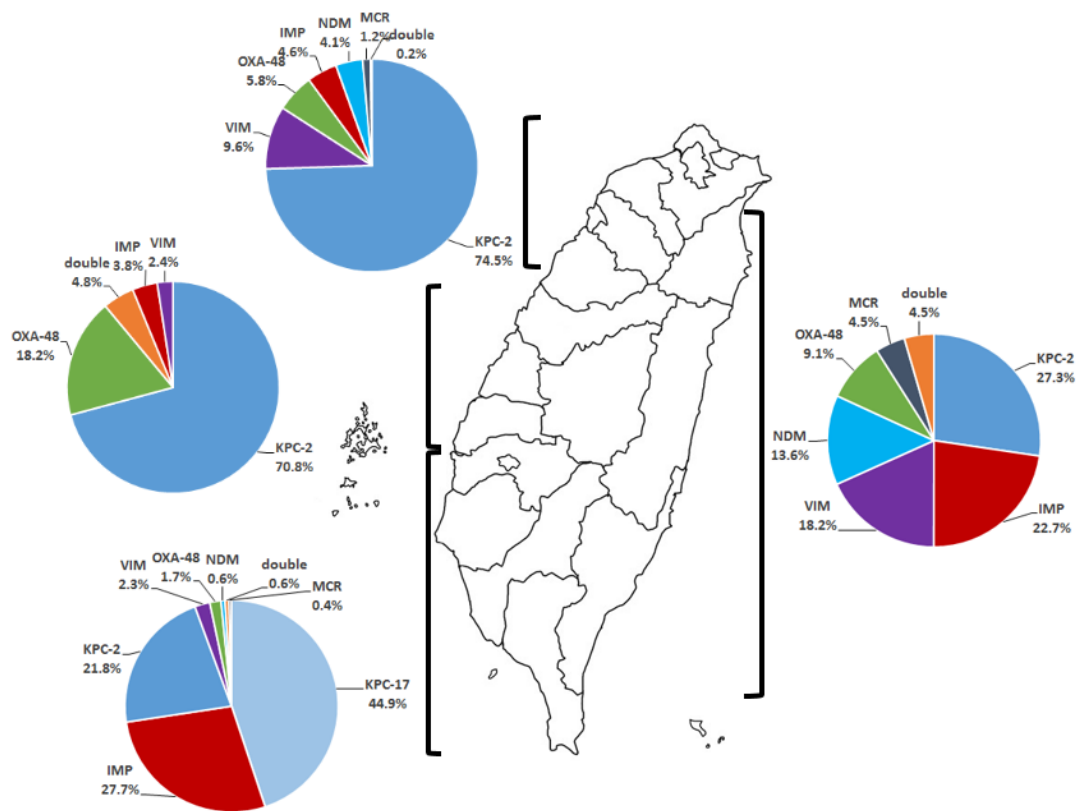
圖一、CPE 細菌種類佔比



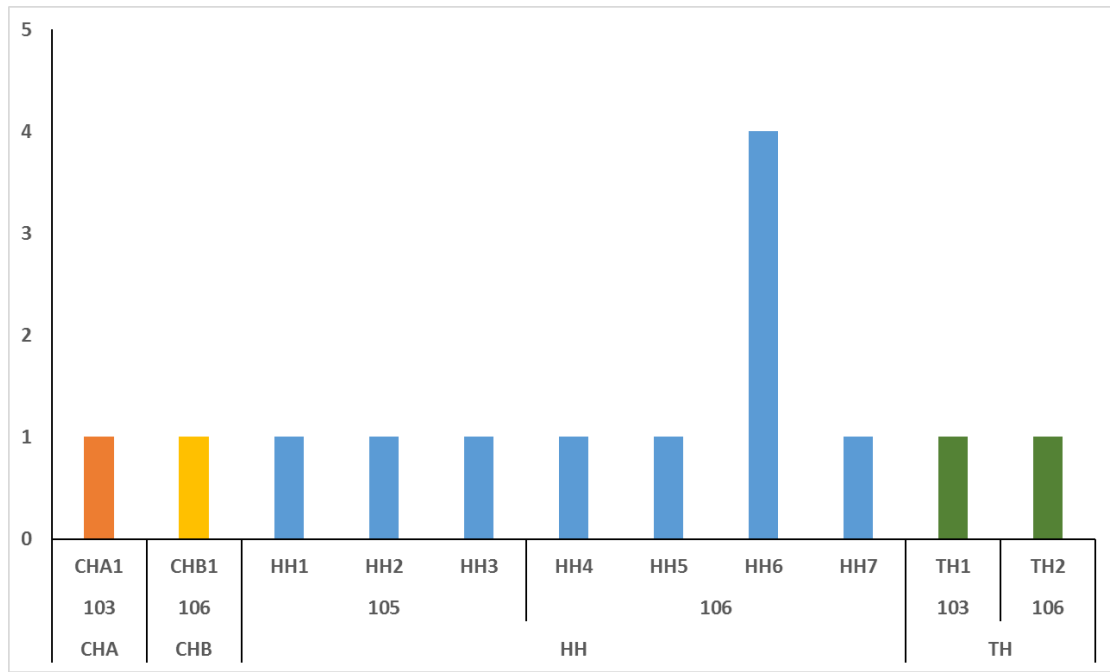
圖二、CPE 之 carbapenemase 種類佔比



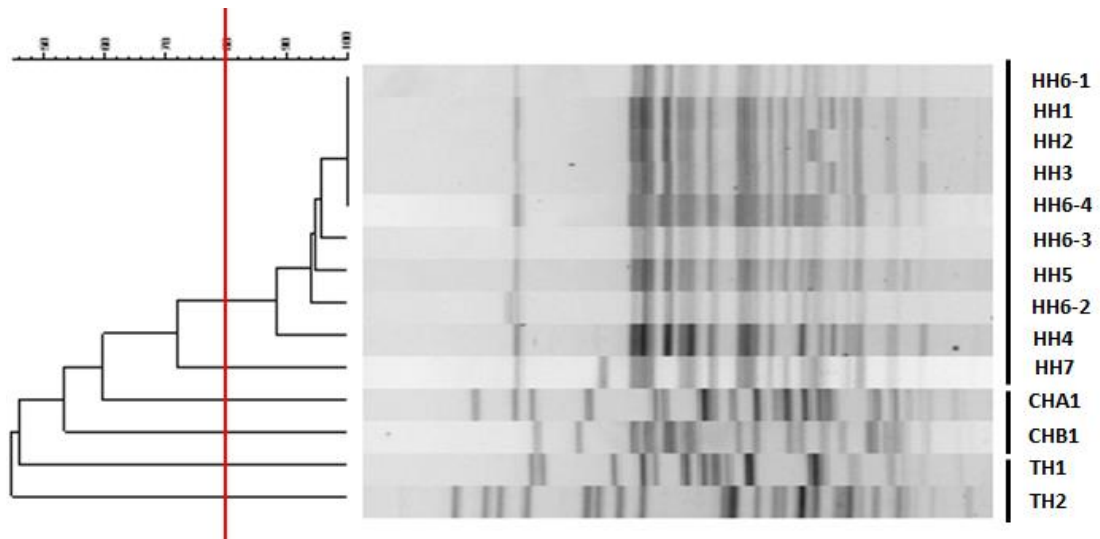
圖三、 CPE 各菌株中 carbapenemase 占比



圖四、CPE 菌株中 carbapenemase 基因之地區分布



圖五、通報 NDM-5 E.coli 之分布情形



圖六、NDM-5 E.coli 親緣樹狀圖