

環境唑類抗藥煙麴黴的健康一體化 (One Health) 議題

楊聖永¹ 吳綺容^{1,2}

¹國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所台灣黴菌實驗中心

²國立成功大學醫學院附設醫院 內科部感染科

前 言

唑類 (azole) 藥物具有廣效及優異的抑制黴菌 (在農業上慣稱為真菌) 效果，是治療人類、動物及植物黴菌感染症不可或缺的藥品[1]。在農業上，真菌之危害估計佔植物傳染性病害的 75% 左右，而對治真菌病原的殺真菌劑中，demethylation inhibitors (DMIs) 是最重要的類別，約佔全球殺真菌劑使用量的三分之一[1,2]。DMIs 是單點作用機制的藥劑，透過抑制真菌 sterol C14-demethylase (即 *erg11* 或稱 *cyp51* 基因所轉譯的蛋白酶) 的功能以阻斷細胞膜麥角固醇 (ergosterol) 的生成，進而達到殺菌的效果[2]。DMIs 中，咪唑 (imidazole) 及三唑 (triazole) 類是最主要的藥物種類[1]。於人類醫學，麴

菌症 (aspergillosis) 是最常見的絲狀黴菌感染症，以煙麴黴 (*Aspergillus fumigatus*) 為最重要致病菌種。唑類是治療麴菌症的首選藥物，作用機轉與 DMIs 相同，常用於治療侵襲性麴菌症 (voriconazole 和 isavuconazole) 和慢性麴菌症 (itraconazole) 及高危險群的預防性使用 (posaconazole) [3]。在 2000 年以前鮮少有唑類抗藥煙麴黴 (azole-resistant *A. fumigatus*, ARAF) 的報告，但近 20 年來全球 ARAF 盛行率已明顯上升[1]。

目前認為煙麴黴產生唑類抗藥性的途徑有二：臨床唑類治療及環境唑類使用[4]。於後者，雖然煙麴黴不是 DMIs 所針對的作物病原，但煙麴黴若長期生存在含有 DMIs 的土壤中，會逐漸發展出對 DMIs 的耐受性及對醫用唑類的交互抗藥性，是近年

來 ARAF 逐漸盛行的可能原因[1,5]。DMIs 所誘發的唑類抗藥機轉，主要以 *cyp51A* 基因發生 TR₃₄/L98H、TR₃₄/L98H/S297T/F495I 或 TR₄₆/Y121F/T289A 突變為代表 (本文簡稱 TR₃₄ 或 TR₄₆ 突變) [1,5,6]。迄今多國的監測都可從環境中分離出 TR₃₄ 或 TR₄₆ 菌株，因此即使病人未曾接受過唑類治療也可能因吸入環境中的抗藥菌孢子而罹患抗藥性麴菌症[1,4]。目前各國臨床 ARAF 的盛行率約介於 1% 至 10% 之間；在英國及尼德蘭，甚至可超過 20% [4]。據統計，八成的唑類抗藥性麴菌症是由 TR₃₄ 與 TR₄₆ 菌株所引起[7]。唑類抗藥性麴菌症的死亡率遠高於無抗藥性麴菌症 (62% vs. 37%)，高死亡率可部分歸因於未能及時給予有效的藥物治療 [8]。因此國際專家共識建議，若臨床 ARAF 盛行率大於 10%，麴菌症的經驗性療法應考慮唑類與 echinocandin 合併使用或改用 amphotericin B，避免因單一使用唑類藥物而導致治療失敗[7]。

由於環境 ARAF 已威脅人類的健康，尼德蘭奈梅亨大學醫師教授 Paul Verweij 在 2019 年召集了來自歐洲多國，涵蓋醫學黴菌學、分子黴菌學、植物生理學/病理學、演化學及農藥產業跨領域的專家及代表，針對 ARAF 對臨床的影響、DMIs 誘發 ARAF 的機制、後續因應對策等議題相互交流，勾勒未來努力的方向 [1]。台灣長期且廣泛地使用咪唑及

三唑類殺真菌劑，環境與病人身上也已分離出 TR₃₄ 及 TR₄₆ 抗藥煙麴黴[9-11]。台灣與尼德蘭具有相近的人口數及國土面積，農業同是兩國重要的產業，也同樣面臨 ARAF 的威脅，因此尼德蘭的經驗相當值得台灣借鏡。本文在文獻回顧之外，也節錄了上述會議的重要內容，介紹環境唑類抗藥煙麴黴的健康一體化 (One Health) 議題之新近發展。

DMIs 與 ARAF 的關聯性

DMIs 被認為可誘發 ARAF 的推論來自以下的觀察。1. 以流病觀點而言，在尼德蘭，沒有地緣關係的病人所分離的 ARAF 菌株中，高達 94% 的菌株同屬 TR₃₄/L98H 基因型；三分之二分離出 ARAF 的病人先前並未接受過唑類治療；臨床和環境分離的 TR₃₄ 菌株親緣關係高度相關，TR₄₆ 菌株亦同[12-15]。2. 以藥物學而言，5 種三唑類 DMIs (difenconazole、tebuconazole、propiconazole、epoxiconazole 及 bromuconazole) 分子結構與醫用唑類高度相似，可與煙麴黴 Cyp51A 蛋白酶對接結合；TR₃₄ 和 TR₄₆ 菌株對此 5 種 DMIs 也具耐藥性[5]。另外，Cyp51A 序列分析及基因重組實驗發現 TR₃₄/L98H/S297T/F495I 的 F495I 和咪唑抗藥性有關，以此推測咪唑類 DMIs (如 prochloraz) 會篩選出 TR₃₄/L98H/S297T/F495I 基因型 ARAF [6]。3. 以黴菌生物學

觀點而言，縱列重複序列 (tandem repeat, TR) 類型的突變常發生在有性生殖階段、因減數分裂時同源染色體不對稱的交叉互換而產生。煙麴黴感染人體時大多處於無性生殖階段，意指 TR₃₄ 或 TR₄₆ 突變可能是菌株在自然環境中進行有性生殖的過程發生 [16]。尼德蘭科學家分別於有使用及未使用 DMIs 的農場進行堆肥土壤採樣，採樣土壤經 70°C 熱休克處理後培養一段時間，觀察土壤樣本 ARAF 的分離情形 [17]。熱休克的目的是將無性生殖孢子 (conidia) 去除，留下較耐熱的子囊孢子 (ascospores)，以了解有性生殖在抗藥性產生的過程中所扮演的角色。培養結果發現，在不含 DMIs 的土壤所分離出的 50 株煙麴黴中，僅 2% 為 ARAF；相反的，在含有 DMIs 的土壤所分離出的 45 株煙麴黴中，高達 91% 為 ARAF，其中多數為 TR₄₆/Y121F/T289A 基因型。特別的是，4 株 ARAF 帶有 TR₄₆ 重複 3 次的 TR46³/Y121F/M172I/T289A/G448S 新興基因型突變。科學家進一步將 2 株不同交配型的 TR₄₆/Y121F/T289A 菌株進行有性生殖後，也成功分離出 TR₄₆ 重複 3 次的 TR46³/Y121F/T289A 基因型子代菌株。回溯分析 2012~2015 年間尼德蘭的臨床菌株庫發現已有三位病人分離出 TR46³/Y121F/M172I/T289A/G448S 基因型菌株。這個重要的研究顯示，在有性世代的煙麴黴有機會產生帶有縱列重複序列 (TR) 的抗藥性突變，而含有

DMIs 的堆肥土壤是發生抗藥性突變的熱區。

ARAF 待研究領域

不過有些田野研究並未支持 DMIs 與 ARAF 兩者間的關聯性。英法德 15 個小麥田的監測並未分離出 ARAF 或是分離的比例很低，顯示小麥田使用 DMIs 的慣行農法並不容易篩選出 ARAF [18,19]。另一方面，尼德蘭的研究發現三類有機材料的儲放區是最容易分離出 ARAF 的熱區，分別為花卉球莖廢棄物、綠色廢棄物 (草、樹葉、灌木、樹木等) 及木材廢棄物 (鐵軌枕木、木箱、木圍籬等) 儲放區，測得的煙麴黴菌落量約為 10³~10⁵ cfu/g；三唑類 tebuconazole、epoxiconazole 和 prothioconazole 則是這些儲放區最常測到的殺真菌劑 [20]。尼德蘭花卉種植過程使用殺真菌劑的時機有二，分別為種植前的球莖浸泡和種植後的田間噴灑，目的為減少真菌病原所造成的病害。另一方面，煙麴黴可生長的溫度範圍很寬 (12°C~65°C，35°C 最適合生長)，喜歡潮濕的環境 (相對溼度 85~100%)。釐清尼德蘭花卉產業整個堆肥的管理流程，分析堆肥的溫度、濕度和 DMIs 殘留量與 ARAF 的相關性，將有助於了解篩選抗藥菌的關鍵環境條件。綜合上述及相關的研究觀察，科學家認為使用 DMIs 本身並不一定會誘發抗藥性突變，符合下述條件的環

境才是容易篩選出抗藥菌的熱區。熱區條件包括：1. 適合真菌生長、繁殖及傳播的物理性、生物性和非生物性的條件；2. 可讓真菌長時間生存生長，完成各階段的生命週期（特別是有性世代）；3. 含有唑類藥物，且其濃度足以篩選出抗藥菌株。

目前 DMIs 與 ARAF 關聯性的議題仍存在以下知識缺口：1. 土壤中的煙麴黴族群在 DMIs 篩選壓力下的動態變化；2. 無性及有性世代在 DMIs 篩選壓力下產生抗藥菌株的過程及機制是否有所差異？3. 抗藥性的產生是否會伴隨適存度代價 (fitness cost)，影響抗藥菌的生長速率、傳播及毒力；4. 哪些是篩選出 ARAF 的高風險環境因子？5. 不同 DMIs 種類及使用不同 DMIs 濃度於篩選抗藥菌的風險？於使用濃度方面，理論上，在含低濃度 DMIs 的土壤中，低度抗藥的菌株被篩選出來後，有機會逐漸累積抗藥性突變而發展出高度抗藥性；相反的，若提高 DMIs 施用濃度，有機會可以有效根除低度抗藥的菌株，阻絕其後續發展抗藥性的機會[21]。實際的田野調查則發現在分離出 ARAF 的熱區所測得的 DMIs 殘留濃度從低到高範圍很寬 (0.001~6.4 mg/L)，沒有一致性的結論。另外要注意的是，土壤中的 DMIs 濃度是動態變化的，所測得的 DMIs 殘留濃度並不能代表抗藥菌被篩選出來當時的真實濃度[20]。因此，何者是不易篩選出 ARAF 的適當 DMIs 使用濃度，仍待

進一步研究解答。釐清上述未知領域，將有助擬定適當的介入措施，減少環境 ARAF 的生成。

台灣現況

台灣長期使用 prochloraz、difenoconazole 及 tebuconazole 農藥，近來大規模的研究發現台灣水稻徒長病原 (*Fusarium fujikuroi*) 已產生 prochloraz 及 tebuconazole 抗藥性[11,22]。以此推測，存在土壤的 prochloraz 及 tebuconazole 的選擇壓力也可能使煙麴黴發展出唑類抗藥性。

在環境監測方面，國衛院於 2015~2017 年間從台灣各區的社區及農地土壤、社區及醫院空氣等 2,760 個樣本分離出 451 株煙麴黴，其中 7.5% (34 株) 為 ARAF，多數 (29, 85%) 為 TR₃₄ 菌株[10]。在臨床監測方面，於 2011~2018 年來自台灣多中心醫院 297 位病人中，12 (4%) 位病人分離出 ARAF，多數 (10 位, 83.3%) 病人帶有 TR₃₄ 菌株 (9 位) 或 TR₄₆ 菌株 (1 位) [9]。此 TR₄₆ 菌株和荷蘭及印度流行菌株親緣關係高度相關，顯示抗藥菌無國界的廣泛傳播。值得注意的是，有一主要本土流行型別 TR₃₄/L98H/S297T/F495I 菌株分佈台灣各區環境土壤，並已造成兩例致命肺麴菌症[9]。這些 TR₃₄ 及 TR₄₆ 菌株表現 tebuconazole 及 difenconazole 耐藥性，TR₃₄/L98H/S297T/F495I 及

TR₄₆ 菌株另同時表現 prochloraz 耐藥性；TR₃₄ 及 TR₄₆ 菌株也未因抗藥性突變而導致生長或產孢趨緩，因此含有 DMIs 的土壤便成了抗藥菌持續繁殖的沃土[9,10]。由於台灣臨床 ARAF 的比例仍小於 5%，因此唑類仍是麴菌症的首選藥物，不過面對唑類治療反應不佳患者，應將抗藥性列入鑑別診斷。

抑制煙麴黴菌抗藥性發展之策略

目前臨床上可使用的抗黴菌藥物並不多，唑類又是麴菌症唯一可口服使用的有效藥物。為確保麴菌症能保有治療藥物，首要策略即是阻止環境 ARAF 的產生及散播。雖然 DMIs 使用與誘發 ARAF 的因果關係並未完全被確認，但會議專家們都認同應該開始進行減害措施，並建議可依以下三方面進行[1]。1. 營造不利煙麴黴生長及繁殖的環境：尼德蘭有多種不同型式的堆肥廠，可以比較堆肥原材料在經過不同堆肥方式分解後的殘餘煙麴黴菌落量。理論上，採用低菌落殘餘量的堆肥方法應該也同時會降低產生 ARAF 的風險。2. 降低土壤 DMIs 篩選壓力：可選用半衰期較短或抗藥性篩選風險較低的 DMIs，或與不同作用機轉的非 DMIs 藥劑輪替使用。3. 農藥法規層面管理：在新藥上市前或既有藥物申請展延的使用執照審核時，也應評估環境用藥是否會有誘發人類黴菌病原產生醫用抗黴

菌藥交互抗藥性的風險。有些專家甚至強烈認為應該避免在醫學及農業同時使用具有相同作用機轉的藥物，以防止交互抗藥性的產生。目前許多唑類殺真菌劑(如 tebuconazole)已被歐盟列在可被取代的藥物評估清單中。另一方面，若環境藥物無可避免地與醫用抗黴菌藥物共享相同的作用機轉時，就需要針對環境用藥訂定嚴格的使用範圍，限制其只能在誘發抗藥菌風險較低的農法或環境使用。此外，農藥產業也應引入產品管理 (product stewardship) 的概念，朝著從生產製造、販售、使用、到廢棄的過程都是對環境友善的目標努力。

尼德蘭花卉球莖產業產品管理目前的重點是保護地表水，規範殺真菌劑只能使用在逕流及引流良好的農地使用。花卉球莖產業也致力減少整體農藥的使用，並在農藥選擇上，以多點作用機制的農藥取代單點作用機制的農藥。從 2012 到 2016，初步成果可見整體殺真菌劑、prothioconazole 和 tebuconazole 使用量分別下降了 16.9%、29.7% 和 24.2% [1]。我國農委會於 2017 年宣示「十年農藥減半政策」，推動對環境、人體危害較低的農藥使用策略。台灣農學界也持續呼籲農民輪替使用不同作用機轉的農藥，以避免單點作用機制藥劑連續重複使用而篩選出抗藥作物真菌病原 [2,22]。2019 年農委會更修正了農藥標示管理辦法，將農藥作用機制代碼及農藥產品條碼納入規範，方便農民

辨識不同農藥的作用機轉，有助推動農藥輪替使用。目前仍待更多的田野研究，辨識台灣環境 ARAF 的分佈熱區及易篩選出抗藥菌的高風險的農藥及慣行農作法，作為擬定台灣農藥政策時可參考的實證資料。

結語

因環境用藥而篩選出的 ARAF 衝擊人類的健康，美國疾病管制局於已於 2019 年將 ARAF 列為需密切關注的警示清單菌種[23]。目前亟待跨領域多方共同研究合作，辨識那些是易篩選出 ARAF 的高風險農藥及慣行農作法，後續擬定相對應的農藥使用政策。期望能透過合理的農藥使用，減少作物真菌病原及人類致病黴菌唑類抗藥性的出現，以確保唑類藥物於對治植物病害及人類黴菌症的療效，達到人類與環境健康一體化「One Health」的目標。

參考文獻

1. Verweij PE, Lucas JA, Arendrup MC, et al: The one health problem of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: current insights and future research agenda. *Fungal Biology Reviews* 2020;34:202-14.
2. 曾德賜：農藥藥理與應用。台中：國立中興大學出版中心。新北市：藝軒圖書出版社。2015 (2018 初版再刷);1,83,133。
3. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikian-Akdagli S, et al: Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:e1-e38.
4. Lestrade PPA, Meis JF, Melchers WJG, et al: Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:799-806.
5. Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, et al: Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *Plos One* 2012;7:e31801.
6. Chen Y, Li Z, Han X, et al: Elevated MIC values of imidazole drugs against *Aspergillus fumigatus* isolates with TR34/L98H/S297T/F495I mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e01549-17.
7. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, et al: International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat* 2015;21-22:30-40.
8. Lestrade PP, Bentvelsen RG, Schauwvlieghe A, et al: Voriconazole resistance and mortality in invasive aspergillosis: A multicenter retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2019;68:1463-71.
9. Wu CJ, Liu WL, Lai CC, et al: Multicenter study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolates, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2020;26:806-9.
10. Wang HC, Huang JC, Lin YH, et al: Prevalence, mechanisms and genetic relatedness of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* exhibiting resistance to medical azoles in the environment of Taiwan. *Environ Microbiol* 2018;20:270-80.
11. Taiwan Crop Protection Industry Association: Domestic manufacturers production & sale of pesticides. Taipei, Taiwan: Taiwan Crop Protection Industry Association, 1962-2016 [In Chinese].
12. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al: Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008;5:e219.
13. Snelders E, Huis In't Veld RA, Rijs AJ, et al: Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Applied and environmental microbiology* 2009;75:4053-7.
14. van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, et al: Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis* 2013;57:513-20.

15. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al: Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1846-54.
16. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, et al: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *The Lancet Infectious diseases* 2009;9:789-95.
17. Zhang J, Snelders E, Zwaan BJ, et al: A novel environmental azole resistance mutation in *Aspergillus fumigatus* and a possible role of sexual reproduction in its emergence. *mBio* 2017;8:e00791-17.
18. Fraaije B, Atkins S, Hanley S, et al: The multi-fungicide resistance status of *Aspergillus fumigatus* populations in arable soils and the wider european environment. *Front Microbiol* 2020;11:599233.
19. Barber AE, Riedel J, Sae-Ong T, et al: Effects of agricultural fungicide use on *Aspergillus fumigatus* abundance, antifungal susceptibility, and population structure. *mBio* 2020;11:e02213-20.
20. Schoustra SE, Debets AJM, Rijs A, et al: Environmental hotspots for azole resistance selection of *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2019;25:1347-53.
21. Van Den Bosch F, Paveley N, Shaw M, et al: The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology* 2011;60:597-606.
22. Chen YC, Lai MH, Wu CY, et al: The genetic structure, virulence, and fungicide sensitivity of *Fusarium fujikuroi* in Taiwan. *Phytopathology* 2016;106:624-35.
23. The Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic/Antimicrobial Resistance. Biggest Threats and Data. Available <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html#azole>.