

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-134513

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：多重抗藥腸桿菌重要抗藥基因與質體變化之分析

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、謝佳倫

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 | 3 |
| | 英文摘要 | 4 |
| 二、本文 | | |
| | (一)、前言 | 6 |
| | (二)、材料與方法 | 12 |
| | (三)、結果 | 14 |
| | (四)、討論 | 17 |
| | (五)、結論與建議 | 18 |
| | (七)、參考資料 | 19 |
| | (六)、圖表 | 21 |

共 (27) 頁

計畫中文摘要：

關鍵詞：產碳氫黴烯酶，MCR

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(108)年完成 4 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，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, MCR

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 4 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) ”，此時常見的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。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)：

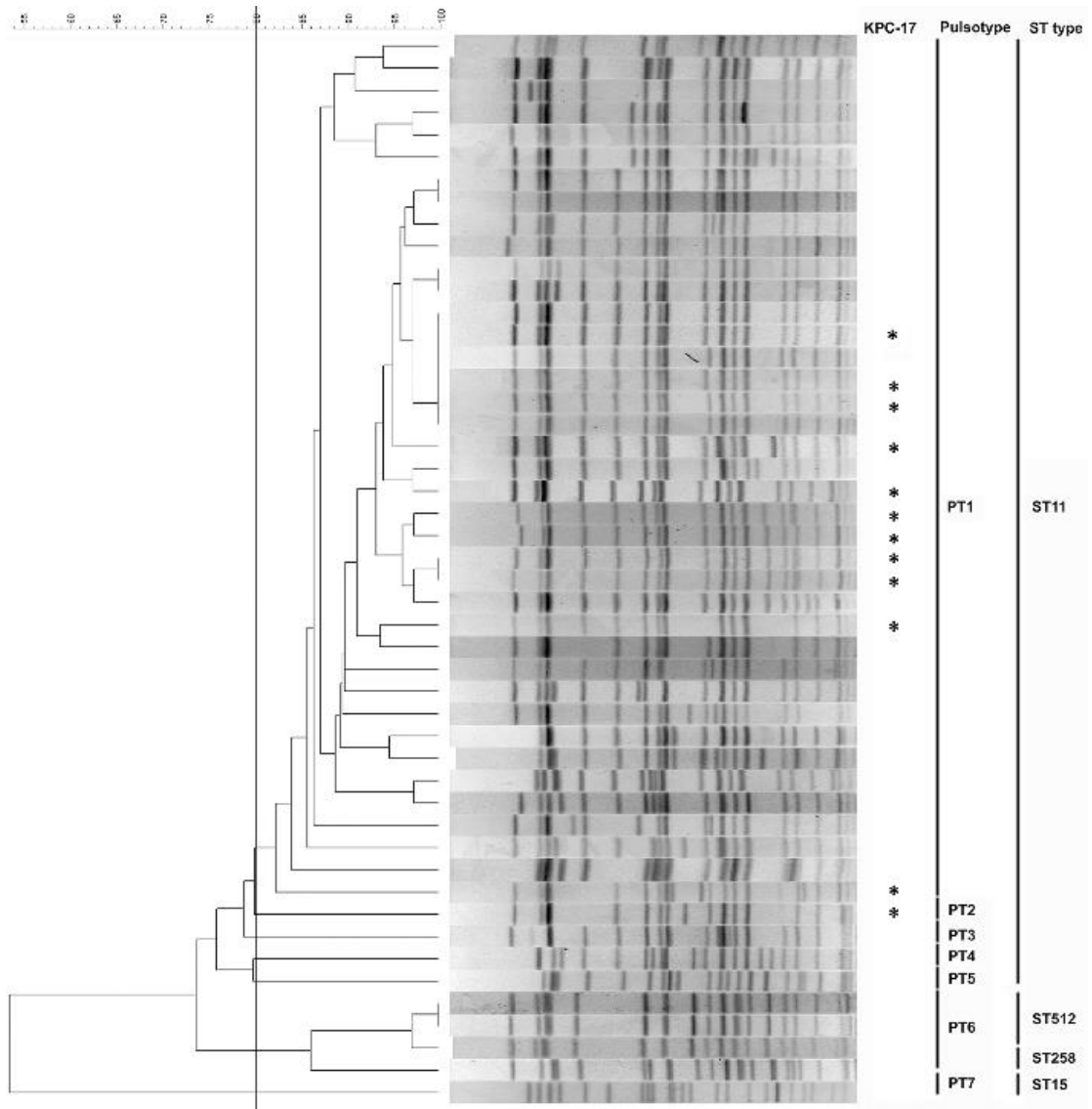
1. 表一詳列 carbapenem non-susceptible KP 的攜帶的各種 carbapenemase 基因型及比例。
2. 以 PFGE 分析 KPC-KP 之間的菌株關係圖一，發現多為 ST11 並屬於同一 pulsotype (PT)

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* 基因陽性菌株做進一步的抗藥基因及質體分析。

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. 建構帶 MCR-1 質體之轉接合大腸桿菌及 NGS 定序

將可抵抗 Azide 的 *E.coli* J53 菌株與帶 MCR-1 質體的 *K. pneumoniae* 菌株混合進行轉接合(transconjugation)試驗後，培養於包含 100 mg/L sodium azide 及 2 mg/L colistin 的 TSA 培養基，以篩選帶 MCR-1 質體之轉接合 *E. coli*。轉接合 *E. coli* 之 MCR-1 質體經使用 Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Germany) 萃取後，再以 Pacific BioSciences (PacBio) 平台進行定序分析。

5. Bioinformatics 分析

定序資料以 SMRT Portal (Pacific BioSciences software) 軟體進行 de novo assembly 組裝，組裝完成之片段再以 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。

(三) 結果

1. 帶 MCR-1 質體 *K. pneumoniae* 菌株之藥敏試驗結果及親緣關係

本次選取4株帶MCR-1之*K. pneumoniae*菌株之藥敏結果如表一，該4株菌株對carbapenems均為感受性，對ceftazidime及colistin則皆具抗藥性。接續進行PFGE分析，結果顯示親緣關係之相同度均低於65% (圖一)，推測該4株菌株非同源菌株。

2. MCR-1 質體分析

為瞭解MCR-1質體間之差異性，以S1-PFGE分析質體大小，再利用MCR-1為探針進行Southern Hybridization，以標示MCR-1所在質體，結果如圖二。該4株菌株所帶MCR-1質體大小可略分為3種，分別為310 Kb (KP16103)、230 Kb (KP14052及KP14812)及30 Kb (KP15450)。

3. MCR-1 質體傳播能力之評估

為瞭解MCR-1質體是否具有傳播能力，進行MCR-1質體之轉接合(transconjugate)試驗(表二)，結果顯示帶MCR-1質體均可接合至大腸桿菌，接合頻率(conjugation frequency)介於 2.5×10^{-3} 至 1.7×10^{-6} 之間，顯見MCR-1質體確實具有傳播潛力。後續將利用此帶MCR-1質體之轉接合大腸桿菌進行NGS

定序，以瞭解MCR-1質體之全貌。

4. MCR-1 質體全基因定序

挑選KP14052及KP15450等2株菌株之帶MCR-1質體轉接合大腸桿菌，經萃取質體核酸後，進行PacBio定序。依序列組裝結果，KP14052的MCR-1質體可組成一環狀序列pKP14052-MCR1，大小約235 kb，質體型別為IncHI2。將該序列上傳至NCBI資料庫進行比對，結果顯示與分離自中國豬隻的pECJS-59-244 質體 (KX084394, *E. coli*)、pHNSHP45-2 質體 (KU341381, *E. coli*)，以及中國境內雞肉的pHNYJC8 質體 (KY019259, *E. coli*)之序列相近 (圖三A)。進一步利用Gview軟體進行序列比對，結果顯示pKP14052-MCR1、pHNSHP45-2及pECJS-59-244均具有*mcr-1*基因，且*mcr-1*基因兩端由插入序列 (insertion sequence, IS) *ISAp11*形成正向重複序列 (direct repeat)，構成*ISAp11-mcr-1-orf-ISAp11* (Tn6330)的基因結構 (圖三B)，此外，pHNYJC8質體除缺少*mcr-1*及*fosA3*基因，其他序列則與其他三者相近。

KP15450的MCR-1質體亦成功組成一環狀序列pKP15450-MCR1，大小約33 kb，質體型別為IncX4。將該序列上傳至NCBI資料庫比對，比對結果與分離自臺灣病患

(pNG14043, KY120364, *Salmonella enterica*)、歐洲愛沙尼亞豬隻(pESTMCR, KU743383, *E. coli*)、美國豬隻(pSH146_32, JX258655, *S. enterica*)及中國病患 (pEc_18HAE25, KY012276, *E. coli*)之質體序列相近(圖四A)。再利用Gview軟體進一步比對序列，結果顯示pKP15450-MCR1、pNG14043、pESTMCR及pEc_18HAE25質體均具有*mcr-1*基因，惟在*mcr-1*基因上下游未發現IS*AplI*(圖四B)。此外，pSH146_32質體主要缺少*mcr-1*基因，其他序列則大致與其他質體相近。

(四) 討論

1. pKP14052-MCR1 質體的 *mcr-1* 基因兩端皆具有 *ISAp11*，且以正向重複序列排列，形成 Tn6330 轉座子(transposon)。目前已有研究證實 Tn6330 可形成環形中間體 (circular intermediate)(16, 17)，該結構可插入帶有 *ISAp11* 的質體，因此 Tn6330 已成為 *mcr-1* 基因廣泛傳播於不同型別質體中扮演重要角色。此外，依據 NCBI 資料庫比對結果，分離自中國境內雞肉上 *E. coli* 的 pHNYJC8 質體與其他 IncHI2 型別的 MCR-1 質體具高度相似，由於 pHNYJC8 質體未包含 *mcr-1* 基因，故推論 IncHI2 型別的 MCR-1 質體，可能藉由 Tn6330 插入該質體骨架，而帶有 *mcr-1* 基因。
2. IncX4 型別的 MCR-1 質體目前已陸續有多個國家報導，依據 NCBI 資料庫比對結果，分離自美國豬隻上 *S. enterica* 的 pSH146_32 質體與其他 IncX4 型別的 MCR-1 質體具高度相似，由於該質體未包含 *mcr-1* 基因，因此該質體可能為 IncX4 型別的 MCR-1 質體之原型(prototype)。此外，pKP14052-MCR1 質體的 *mcr-1* 基因兩端均缺少 *ISAp11*，已形成穩定的基因結構，將有助於 *mcr-1* 基因快速傳播，此由國際間流行之 IncX4 型別的 MCR-1 質體均具有高相似度可獲得證實。

(五) 結論與建議

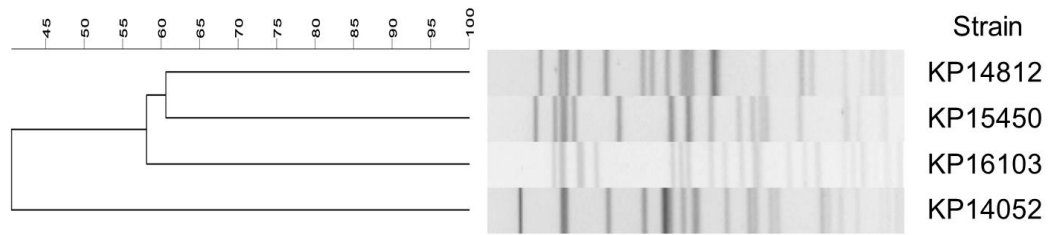
1. 本計畫發現不同型別的 MCR-1 質體，可能透過 Tn6330 轉座子或 IncX4 質體傳播，顯示 mcr-1 基因具有多元的傳播途徑，將使醫院內細菌對 colistin 的抗藥性攀升，對於臨床治療造成嚴重衝擊，因此，應持續監測抗藥趨勢，並建置抗藥質體基因資料庫供比對分析，及早掌握抗藥基因流行，以避免進一步蔓延。
2. 過去針對細菌抗藥性相關研究，多僅聚焦於某些已知抗藥基因，但對於其他與抗藥基因相關部分，通常難以同步進行分析。此外，由於細菌可透過質體交換或 IS 序列的易位機制傳播抗藥基因，因此若單以傳統 PFGE 進行菌株分型，僅能掌握同源菌株之傳播方式，難以瞭解其他如抗藥質體或抗藥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

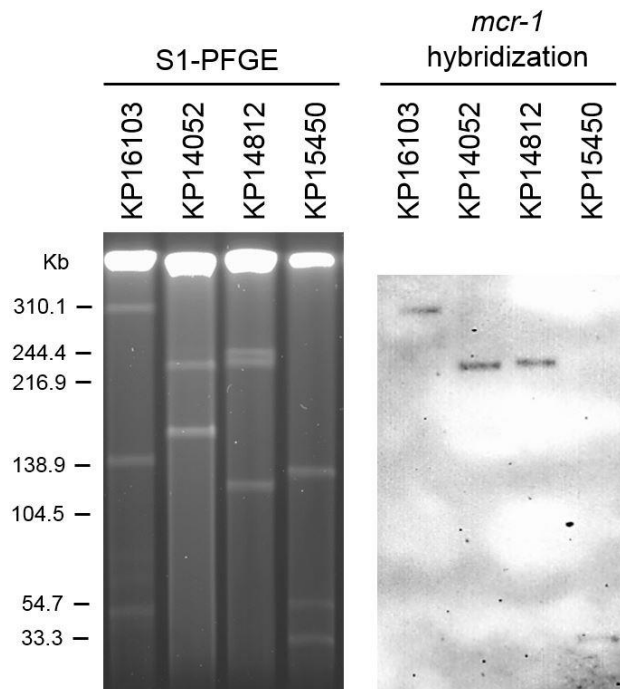
1. Anonymous. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
2. Nordmann P, Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20:821-30.
3. Walsh TR, Toleman MA. 2012. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J Antimicrob Chemother* 67:1-3.
4. 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.
5. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agerso Y, Zankari E, Leekitcharoenphon P, Stegger M, Kaas RS, Cavaco LM, Hansen DS, Aarestrup FM, Skov RL. 2015. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill* 20.
6. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houee P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, Soumet C, Sanders P. 2016. Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill* 21.
7. Schwarz S, Johnson AP. 2016. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother* 71:2066-70.
8. Webb HE, Granier SA, Marault M, Millemann Y, den Bakker HC, Nightingale KK, Bugarel M, Ison SA, Scott HM, Loneragan GH. 2016. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:144-5.
9. Zhi C, Lv L, Yu LF, Doi Y, Liu JH. 2016. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:292-3.
10. Yu H, Qu F, Shan B, Huang B, Jia W, Chen C, Li A, Miao M, Zhang X, Bao C, Xu Y, Chavda KD, Tang YW, Kreiswirth BN, Du H, Chen L. 2016. Detection of the mcr-1 Colistin Resistance Gene in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Different Hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5033-5.
11. Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. 2016. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis* 16:287-8.
12. Paterson DL, Harris PN. 2016. Colistin resistance: a major breach in our last

- line of defence. *Lancet Infect Dis* 16:132-3.
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 beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20:440-58, table of contents.
 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:e0138471.
 16. Li R, Xie M, Lv J, Wai-Chi Chan E, Chen S. 2017. Complete genetic analysis of plasmids carrying *mcr-1* and other resistance genes in an *Escherichia coli* isolate of animal origin. *J Antimicrob Chemother* 72:696-699.
 17. Li R, Xie M, Zhang J, Yang Z, Liu L, Liu X, Zheng Z, Chan EW, Chen S. 2017. Genetic characterization of *mcr-1*-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J Antimicrob Chemother* 72:393-401.

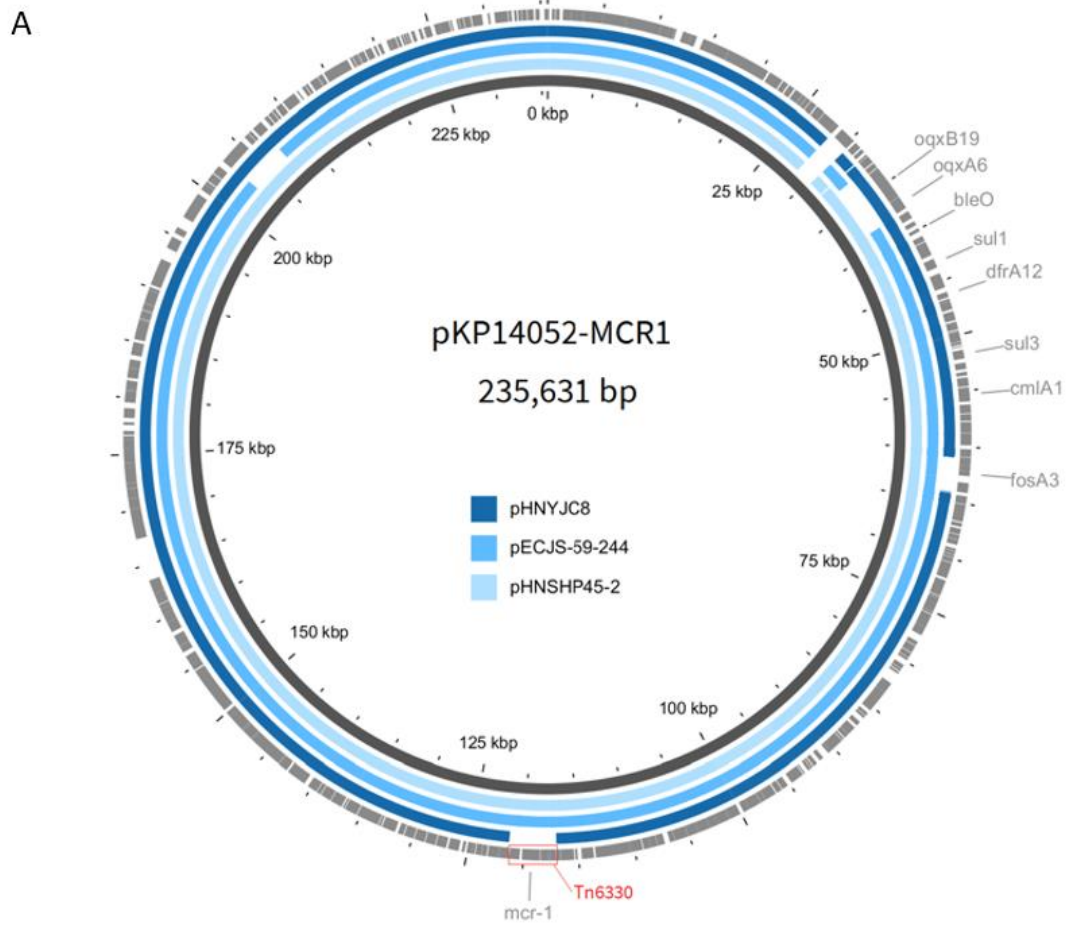
(七) 圖表



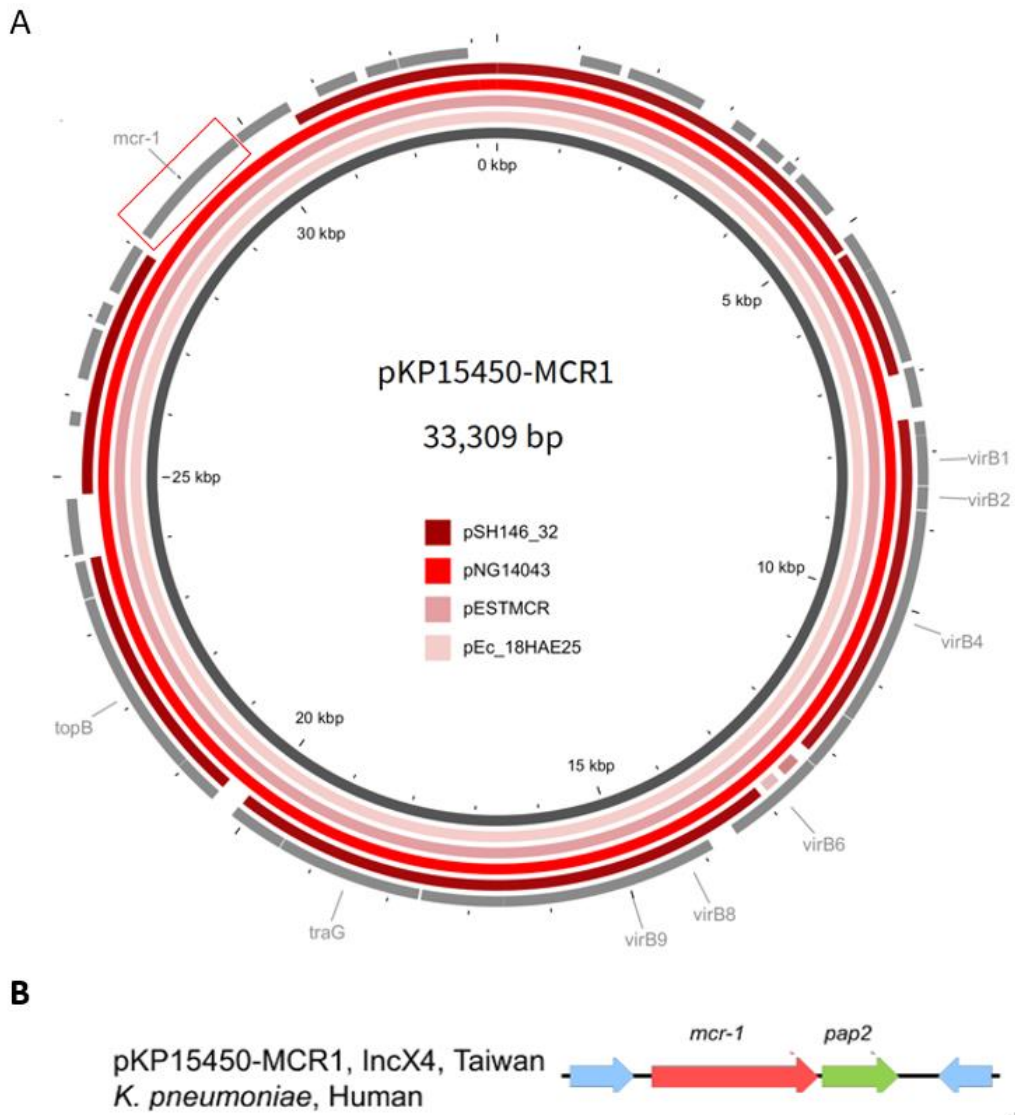
圖一、帶MCR-1菌株之PFGE親緣關係圖



圖二、MCR-1 質體大小分析



圖三、pKP14052-MCR1 與序列相近質體比對



圖四、pKP15450-MCR1 與序列相近質體比對

表一、MCR-1 菌株之藥敏試驗結果

| Antimicrobial agent | MIC(mg/L) | | | |
|---------------------|-----------|---------|---------|---------|
| | KP14052 | KP14812 | KP15450 | KP16103 |
| Cefepime | >16 | ≤2 | >16 | >16 |
| Ceftazidime | >16 | >16 | >16 | >16 |
| Imipenem | ≤1 | ≤1 | ≤1 | ≤1 |
| Meropenem | ≤1 | ≤1 | ≤1 | ≤1 |
| Ciprofloxacin | >2 | >2 | 2 | 2 |
| Amikacin | >32 | ≤8 | ≤8 | ≤8 |
| Gentamicin | >8 | ≤2 | >8 | >8 |
| Colistin | >4 | >4 | >4 | >4 |

表二、MCR-1 質體之接合頻率

| Strain | Conjugation frequency of MCR-1 plasmid |
|---------|--|
| KP14052 | 3×10^{-4} |
| KP14812 | 1.7×10^{-6} |
| KP15450 | 2.5×10^{-3} |
| KP16103 | 1.4×10^{-4} |

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-315-134513

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 | 除本土資料外，有部分創新 | 謝謝委員鼓勵。 | |
| 2 | 將來可考慮非質體相關抗藥機制研究。 | 謝謝委員建議，未來將非質體部分列入考慮 | |
| 3 | 分析 transposome 方式可行，可能要更進一步分享 NDM 相關的資訊給醫界及感染管制相關部門。 | 謝謝委員鼓勵，未來將更密切與感染管制相關單位合作。 | |

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。