

計畫編號： MOHW109-CDC-C-315-144406

衛生福利部疾病管制署 109 年科技研究計畫

計畫名稱：建置抗藥性微生物監測實驗室與巨量資料庫應用系統

109 年 度 研 究 報 告

執行機構：疾病管制署(檢驗及疫苗研製中心)

計畫主持人：邱乾順 聘任研究員

研究人員：洪羽屏、鄧如琇、陳柏翰、王佑文、宋惠詠

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

## 目錄

頁 碼

目錄

計畫中文摘要

計畫英文摘要

計畫內容

- |                 |         |
|-----------------|---------|
| 一、前言            | (5-6)   |
| 二、材料與方法         | (7)     |
| 三、結果            | (8-16)  |
| 四、討論            | (17-18) |
| 五、結論與建議         | (19)    |
| 六、計畫重要研究成果及具體建議 | (20)    |
| 七、參考文獻          | (21-22) |

計 22 頁

## 中文摘要

針對 2017–2018 年收集自全國各區合作醫院的 2,447 株沙門氏菌進行的藥敏試驗，發現有 3.1% (76 株) 菌株對阿奇黴素 (azithromycin) 具有抗藥性 (MIC  $\geq$  32 mg/L)，其中有 53 株攜帶 *mphA* (39 株)、*erm42* (10 株)、*mphA-erm42* (1 株) 與 *ermB* (3 株) 抗藥基因；10 株攜帶 *erm42* 菌株屬於 *S. Albany* 血清型。經基因體序列比對及溯源追蹤，發現攜帶 *erm42* 的 *S. Albany* 目前只出現在台灣，該 *erm42* 攜帶於一個屬於 SXT 家族的 integrative and conjugative elements (ICE)，命名為 ICE\_erm42。攜帶 ICE\_erm42 的 *S. Albany* 最早出現於 2014 年，且成了後續盛行菌株，2014-2019 年間分離的 28.0% *S. Albany* 菌株擁有 ICE\_erm42。目前証實 ICE\_erm42 可經由 conjugation 方式轉移到 *Escherichia coli* 與 *Vibrio cholerae*。Azithromycin 是治療侵襲性多重抗藥沙門氏菌症的建議用藥，而 2017-2018 年來自醫院的菌株已有 3.1% 對 azithromycin 有抗藥性，恐增加治療上的困難。農衛主管機關必需重視此 azithromycin 抗藥沙門氏菌流行的嚴重問題。

關鍵詞：藥敏試驗，阿奇黴素，抗藥基因，基因體序列，侵襲性多重抗藥沙門氏菌症。

## Abstract

Antimicrobial susceptibility testing of the *Salmonella* isolates collected from collaborative hospitals across the country in 2017-2018 revealed that 3.1% (76) of the isolates were azithromycin-resistant (MIC  $\geq$  32 mg/L). Of the 76 isolates, 53 carried resistance genes *mphA* (39 isolates), *erm42* (10 isolates), *mphA-erm42* (1 isolate), or *ermB* (3 isolates). The 10 *erm42*-carrying isolates were all *S. Albany*. Whole-genome sequencing and cgMLST profiles comparison indicated that the *erm42*-carrying *S. Albany* strains may be unique in Taiwan. *erm42* in *S. Albany* isolates was located in an integrative and conjugative element (ICE) of SXT family and was named ICE\_erm42. ICE\_erm42-carrying *S. Albany* was first identified in 2014 and had become prevalent after 2014. Among the *S. Albany* collected in 2014-2019, 28.0% was ICE\_erm42-carrying. Our preliminary experiment had indicated that the ICE\_erm42 could move from *S. Albany* into *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* strains via conjugation. Azithromycin is recommended as the alternative for the treatment of invasive salmonellosis caused by multidrug-resistant *Salmonella* strains. The emergence of azithromycin resistance in multidrug-resistant salmonellae would increase the burden for the medical treatment of multidrug-resistant salmonellosis. The agricultural and health sectors must pay great attention to this serious problem.

Keywords : Antimicrobial susceptibility testing (AST), Azithromycin, resistance gene, Whole-genome sequencing, invasive salmonellosis.

## 一、前言

本計畫根基於「全球衛生安全綱領」(Global Health Security Agenda, GHSA)之全球傳染病防治計畫，目的在強化我國對傳染病的預防 (Prevent)、監測 (Detect) 與應變 (Respond) 能力，透過相關科技研發整合促進我國防疫體制之合作與升級，並與國際間接軌，以期能儘速符合「國際衛生條例 2005」(International Health Regulations 2005, IHR 2005) 規範。面對越來越嚴重的全球抗藥性問題，GHSA 所提出的 11 項具體行動方案，首要行動方案即為處理微生物對抗微生物製劑(antimicrobials)的抗藥性，強調整合跨人類、動物及食品等領域，從防疫一體的角度，發展整合性的管理策略。抗微生物製劑包含抗生素、化學藥劑(如磺胺劑等)，用來預防及治療由微生物所引起的人類與動物疾病。抗微生物製劑是維持人類、動物健康與福利的重要工具，然而，不當使用抗微生物製劑常會伴隨抗藥性 (antimicrobial resistance, AMR) 的產生，導致治療失敗，影響人類與動物健康甚巨。因新藥研發速度遠不及抗藥性之發展，故抗微生物製劑抗藥性議題已演變為重大的危機，威脅著病人照護、經濟成長、公共衛生、農業、經濟安全及國家安全。

本計畫進行 2017–2018 年自國內各區域合作醫院收集之 *Salmonella* 菌株藥敏試驗，發現有 3.1% (76/2,449) 的沙門氏菌株具有 azithromycin 抗藥性 (MIC  $\geq$  32 mg/L)；azithromycin 是侵襲性沙門氏菌感染之替代治療用藥[1]，特別是近年來侵襲性沙門氏菌症的菌株對主要的治療用藥 ciprofloxacin 與 ceftriaxone 抗藥性逐年攀升的情況下，azithromycin 在侵襲性沙門氏菌症的治療上也越加重要，也因此有必要對國內沙門氏菌進行 azithromycin 抗藥性調查與抗藥機制之探討。本實驗室之前的研究發現國內已有 *S. Typhimurium* 菌株對 azithromycin 具有抗藥性，且這些攜帶 *mphA* 抗藥基因的菌株來自人與動物[2]。在 2017–2018 年分離的沙門氏菌株 azithromycin 抗藥比率已大幅上升(3.1%)，對這些菌株的抗藥機制、可能傳播模式與來源，有必要進行研究探討。

本年度將針對 2017–2018 年國內分離之 azithromycin 抗藥菌株進行研究，探討其可能的各種抗藥機制、抗藥基因之載體，同時利用全基因體基因指紋比對

的方法，和貯存在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 基因體序列資料庫之全球菌株之全基因體序列進行基因指紋比對，調查這些貯存在 NCBI 資料庫的各國菌株是否有與國內流行的 azithromycin 抗藥菌株有親近的親緣關係，或可追溯國內主要 azithromycin 抗藥菌株之來源。

## 二、材料與方法

今(2020)年研究目標為「**Azithromycin 抗藥菌株之抗藥機制探討與全球菌株追蹤溯源(global strain tracking)**」，包括：

1. 利用 PCR 方法偵測 2017–2018 年分離之 azithromycin 抗藥菌株之 *mphA* 基因，若不具有 *mphA*，則用 PCR 偵測其它已知的抗藥基因。
2. 挑選攜帶 *mphA* 且為不同血清型之菌株進行全基因體定序，調查攜帶 *mphA* 之載體是為 plasmid-mediated or chromosome-mediated，若為 plasmid，決定其 incompatibility types。
3. 挑選未攜帶 *mphA* 的 azithromycin 抗藥菌株進行全基因體定序，調查其它可能的抗藥基因(抗藥機制)。本研究原訂優先挑選 S. Goldcoast 菌株進行全基因體定序，因之前我們的研究發現 MDR S. Goldcoast 菌株同時對 azithromycin 也具有抗藥性，但未發現目前已被鑑定可水平移轉的抗藥基因(例如 *mphA*)，同時有 5 株具相同 PFGE 型別之 MDR 菌株則不具 azithromycin 抗藥性[3]，因這些 S. Goldcoast 菌株皆具有極近的親緣關係，全基因體序列相互比較有可能鑑定出決定與 azithromycin 抗藥性相關的基因。然而，研究期間發現有特定群組 S. Albany 菌株攜帶 *erm42*，且這群菌株 azithromycin MIC 都超過 64 mg/L，因此優先進行 *erm42*-carrying S. Albany 菌株的分析。本研究將利用 Illumina MiSeq 進行菌株全基因體定序，同時合併使用 Illumina MiSeq 與 Oxford Nanopore 定序平台完成選定之 azithromycin 抗藥與敏感菌株之全基因體序列，利用 Unicycler 程式[4]組裝兩套定序平台之序列資料，組成完整全基因體序列，再由生資人員比較基因體序列之差異，找出和 azithromycin 抗藥性相關的基因。
4. 下載 NCBI 之 SRA 與 Assembly 資料庫內沙門氏菌株之全基因體序列，使用 SPAdes [5]程式進行組裝，組裝後之 contigs 再使用實驗室自行開發的 BENGAL 程式[6]與 *Salmonella* allele database 產生 cgMLST 基因指紋，進行國內菌株與國外菌株之 cgMLST 基因指紋比對，找出與台灣菌株親緣關係最近且攜帶相同 azithromycin 抗藥基因的菌株，以追溯台灣流行菌株來源。

### 三、結果

#### (一)、2017–2018 年 azithromycin 抗藥沙門氏菌株 *mphA* 等抗藥基因調查分析

2017–2018 年收集之沙門氏菌株中，2,447 株完成藥敏試驗，共 76 株 (3.1%) 具 azithromycin 抗藥性 (MIC  $\geq$  32 mg/L)。以 PCR 方法偵測有 40 株 (佔 52.6%) 攜帶有 *mphA*。參考 Darton 等人的研究[7]，偵測剩餘 36 株其它與 azithromycin 抗性有關之抗藥基因，結果發現 3 株 (佔 3.9%) 攜帶有 *ermB*，11 株 (14.5%) 攜帶有 *erm42*，當中 1 株同時具有 *mphA* 及 *erm42* 抗藥基因 (表一)。剩餘 22 株 MIC 皆為 32 mg/L，未偵測到已知抗藥基因，目前的資料顯示這些菌株抗藥機制與 efflux pump 有關，將持續進行其抗藥機制的探討。

表一、2017–2018 *Salmonella* 之 Azithromycin MIC 與抗藥基因分布

Gene	MIC (mg/L)						Total
	4	8	16	32	64	$\geq$ 128	
<i>ramA</i> <sup>Kp</sup>			16	21			37
<i>ermB</i>					1	2	3
<i>mphA</i>					11	29	40
<i>erm42</i>						11	11
None	10	45	5	1*	1**	0	62
Total	10	45	21	22	13	41***	152

\* *S. Anatum* (R17.0809)，其 *ramR* 插入一個 pR16.0676\_90k 的質體序列 (GenBank accession: CP029802.1)。

\*\* *S. Mbandaka* (R17.0904)，其抗藥機制未明。

\*\*\* 1 株 *S. Enteritidis* (R18.1630) 同時帶有 *mphA* 及 *erm42*。

攜帶 *mphA* 的菌株 MIC 均大於 32 mg/L，其中 *S. Typhimurium* 有 12 株 (30%) 最多，其次為 *S. Weltevreden*，*S. Newport*，*S. Agona* (表二)。攜帶 *erm42* 的菌株 MIC 均大於 64 mg/L，10 株為 *S. Albany* 與 1 株 *S. Enteritidis* (R18.1630)，*S. Enteritidis* R18.1630 同時攜帶有 *mphA* 及 *erm42*，經全基因體序列分析，發現 *mphA* 及 *erm42* 皆位於 chromosome 上，但該 *erm42* 基因不是位於 ICE\_erm42 上。攜帶 *ermB* 的 MIC 均大於 32 mg/L，3 株血清型分別為



S. Typhimurium (2 株)及 S. Enteritidis (1 株)；經全基因體分析，這些菌株攜帶之 *ermB* 皆位於 IncI1-I 質體。

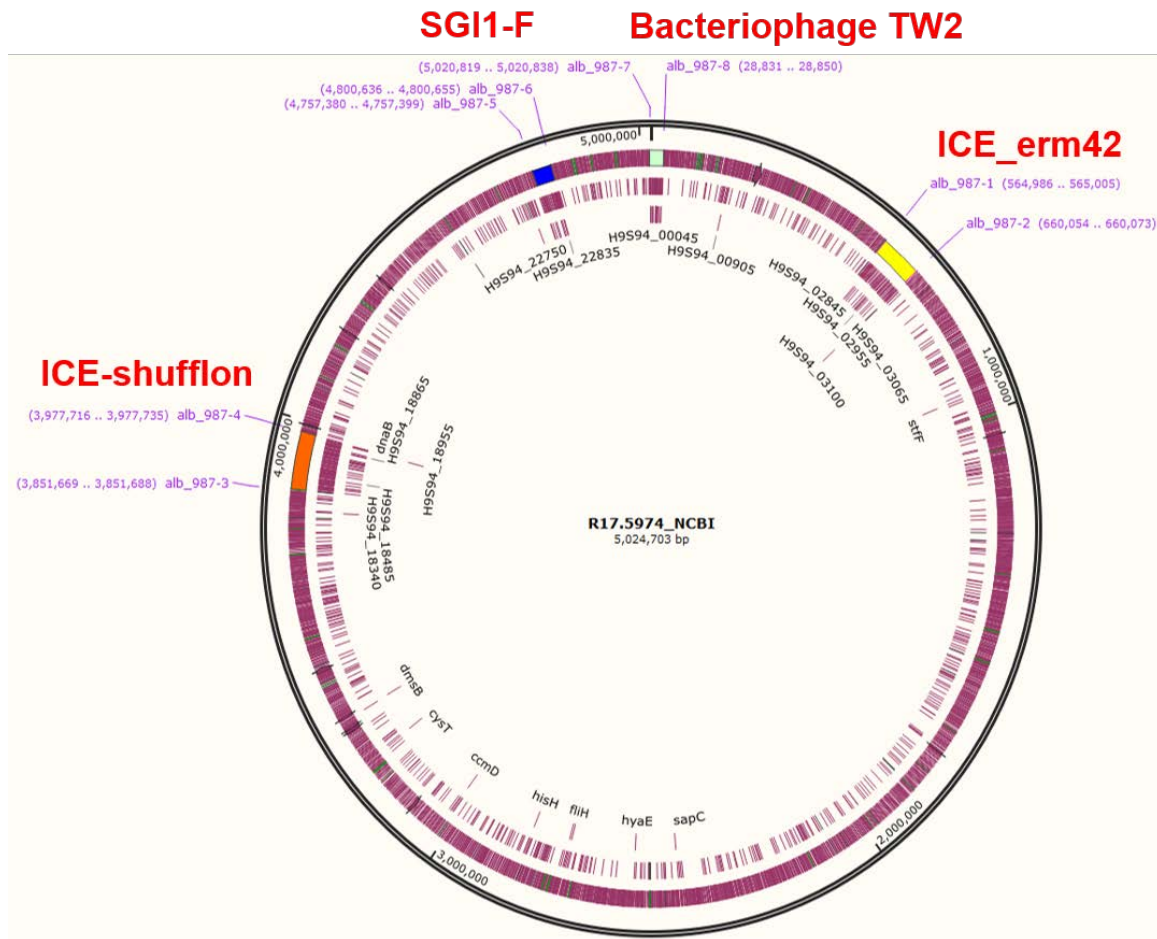
表二、攜帶 *mphA*、*erm42*、*ermB* 抗藥基因的沙門氏菌血清型分布

Serovar	<i>mphA</i>	<i>erm42</i>	<i>ermB</i>	<i>mphA/erm42</i>	Total
Typhimurium	12		2		14
Albany		10			10
Weltevreden	6				6
Newport/Bardo	5				5
Agona	5				5
Mbandaka	3				3
Enteritidis	1		1	1	3
Montevideo	2				2
Blockley/Haardt	2				2
Thompson	1				1
4:i:-	1				1
London	1				1
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>53</b>

## (二)、攜帶 *erm42* 的 S. Albany 菌株基因結構探討

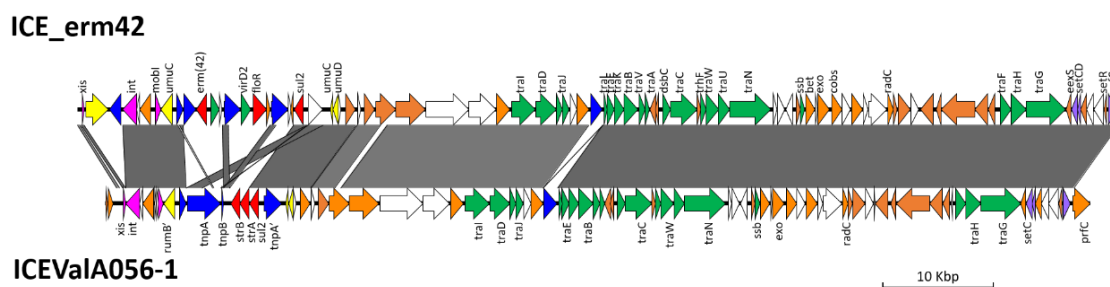
10 株攜帶 *erm42* 的 S. Albany 菌株皆進行全基因體定序，這 10 株菌皆攜帶 7 個抗藥基因 *bla*<sub>CARB-2</sub>, *dfrA1*, *erm42*, *floR*, *sul1*, *sul2*, *tet(G)*，另有 2 株另攜帶 *mcr-1* 基因，此 2 菌株共同攜帶一個 IncI2(Delta)質體，*mcr-1* 位於該質體上。其它 8 株菌株皆未發現攜有質體，7 個抗藥基因皆位於 chromosome 上。我們完成其中一株菌株(R17.5974)之完整 chromosome 序列(GenBank accession: CP060730.1)，其基因圖譜顯示，菌株擁有 4 個可移動遺傳因子 (mobile genetic element, MGE) (圖一)，其中 2 個是 integrative and conjugative elements (ICEs) (ICE 曾被稱為 conjugative transposon)，我們將之命名為 ICE\_erm42 與 ICE\_shufflon，其它兩個 MGE 皆分別為 *Salmonella*

genomic island, SGI-1F [8]與 1 個新的 prophage，將之命名為 prophage TW2。



圖一、 *S. Albany* R17.5974 chromosome。該菌株 chromosome 擁有 5,024,703 bp，沒有 plasmid。基因體上有 4 個外來 DNA 插入片段，包括 2 個 integrative and conjugative elements (ICE\_erm42, 94,039 bp; ICE\_shufflon, 125,205 bp)、*Salmonella* genomic island SGI-1F (42,654 bp)與 prophage TW2 (32,231 bp)，同時攜帶 7 個抗藥基因：*bla*<sub>CARB-2</sub>, *dfrA1*, *erm42*, *floR*, *sul1*, *sul2*, *tet(G)*。

ICE\_erm42 大小為 94,039 bp，屬於最早在 *Vibrio cholerae* 發現的 SXT 家族，插入 chromosome 之 *prfC* 基因上[9]，與 NCBI 資料庫比對，發現其與 *Vibrio alginolyticus* strain A056 上的 ICEValA056-1 (GenBank accession: KR231688.1)[10]，有 90%的長度覆蓋率與 98%的序列相同度；ICEValA056-1 攜帶 *strA*, *strB*, *sul2* 抗藥基因，與 ICE\_erm42 攜帶之 *erm42*, *floR*, *sul2* 有差異 (圖二)。



圖二：ICE\_erm42 與 ICEValA056-1 基因圖譜對照圖。

ICE\_shufflon 有 125,205 bp，擁有可決定 conjugation 專一性的 shufflon operon [11]，未攜帶已知的抗藥基因。

SGI-1F 長度為 42,654 bp，最早被發現於多重抗藥的 *S. Albany* 菌株[8]。SGI-1F 攜帶 5 個抗藥基因 *bla*<sub>CARB-2</sub> (= *bla*<sub>PSE-1</sub>), *dfrA1*, *floR*, *sul1*, *tet(G)*。2004-2019 年 *S. Albany* 菌株的藥物敏感性測試資料顯示，96.6%或以上的菌株對 5 種測試藥物具有抗藥性：ampicillin (*bla*<sub>CARB-2</sub> 提供抗藥性)、chloramphenicol (*floR*)、sulfamethoxazole-trimethoprim (*sul1/dfrA1*)、sulfamethoxazole (*sul1*)、tetracycline (*tetG*) (表三)；以此數據推測台灣流行的 *S. Albany* 都應攜帶有 SGI-1F，此項推論在大量 *S. Albany* 菌株完成全基因體定序後得到証實，唯有部份菌株在 SGI-1F 有發生序列長短不一的刪除情形，而喪失部份抗藥基因。89.3%菌株與 89.5% *S. Albany* 菌株分別對 nalidixic acid 與 ciprofloxacin

喪失或降低藥物敏感性，後續的全基因體序列分析，顯示是在 *gryA* 發生 S83F 或 D87N 的突變所致。

表三：Antimicrobial susceptibility in *S. Albany* isolates recovered from human salmonellosis in 2004–2019.

Antimicrobial	No isolates tested	Resistance %	Intermediate, %
Azithromycin*	50	34.0	0.0
Ampicillin	834	97.0	0.1
Cefotaxime	834	2.5	0.5
Cefoxitin**	252	4.4	8.3
Ceftazidime	748	2.4	0.3
Chloramphenicol	834	96.6	0.6
Ciprofloxacin	834	3.4	86.1
Colistin**	252	3.2	0.0
Ertapenem**	252	0.0	0.0
Gentamicin	834	6.6	1.6
Nalidixic acid	834	89.3	0.0
Streptomycin	834	10.1	28.1
Sul/Trimetho	834	98.1	0.0
Sulfamethoxazole	834	98.7	0.0
Tetracycline	834	96.6	0.2

\* Only isolates from 2017-2019 were tested.

\*\*Only isolates from 2009-2018 were tested.

### (三)、ICE\_erm42 的流病與演化探討

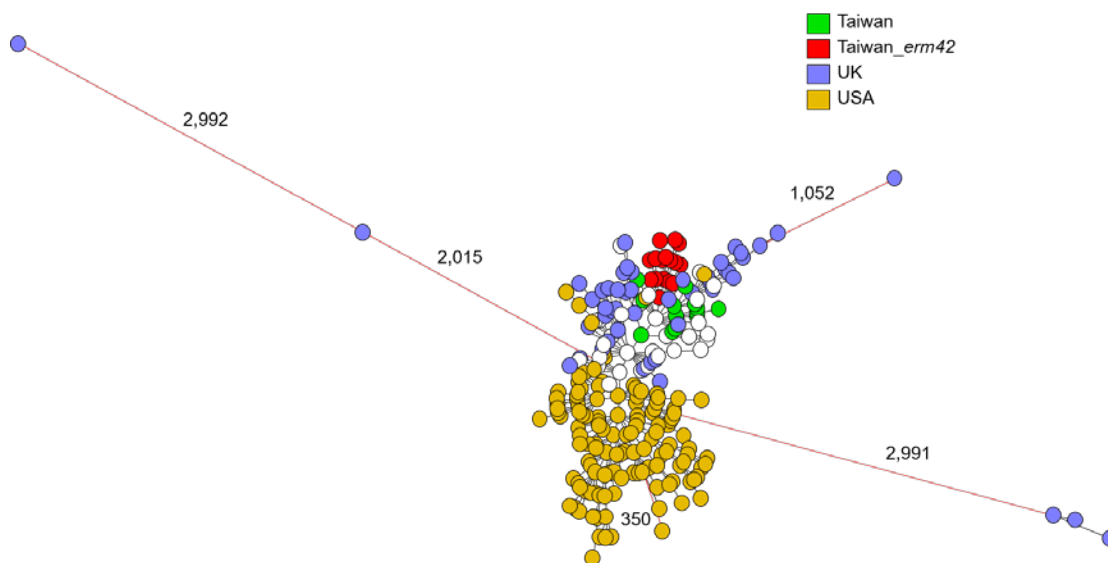
本研究只在 *S. Albany* 發現 ICE\_erm42。*S. Albany* 屬於台灣高度盛行的血清型，2004-2011 年間國人感染的沙門氏菌症，平均有 4.1% 受到 *S. Albany* 感染，*S. Albany* 感染在 2012 年大幅下降，2012-2019 年間，但仍占 1.6%。ICE\_erm42 最早出現在 2014 年的 *S. Albany* 分離株，攜帶 ICE\_erm42 的菌株占 2014-2019 年 *S. Albany* 分離株的 28.0% (表四)。

表四：Distribution of *S. Albany* and resistance gene *erm42* among *Salmonella* isolates recovered from human salmonellosis.

Year	All serovars	<i>S. Albany</i> (%)	<i>S. Albany</i> with <i>erm42</i> (%)
2004	2,535	86 (3.4)	0 (0.0)
2005	2,326	109 (4.7)	0 (0.0)
2006	2,071	99 (4.8)	0 (0.0)
2007	3,766	151 (4.0)	0 (0.0)
2008	2,284	88 (3.9)	0 (0.0)
2009	1,924	75 (3.9)	0 (0.0)
2010	1,621	71 (4.4)	0 (0.0)
2011	743	26 (3.5)	0 (0.0)
2012	863	17 (2.0)	0 (0.0)
2013	2,247	38 (1.7)	0 (0.0)
2014	1,821	42 (2.3)	5 (11.9)
2015	3,035	45 (1.5)	16 (35.6)
2016	3,756	64 (1.7)	13 (20.3)
2017	5,153	87 (1.7)	28 (32.2)
2018	1,708	20 (1.2)	7 (35.0)
2019	1,607	15 (0.9)	5 (33.3)
<b>Total</b>	<b>37,460</b>	<b>1,033 (2.8)</b>	<b>74 (28.0)*</b>

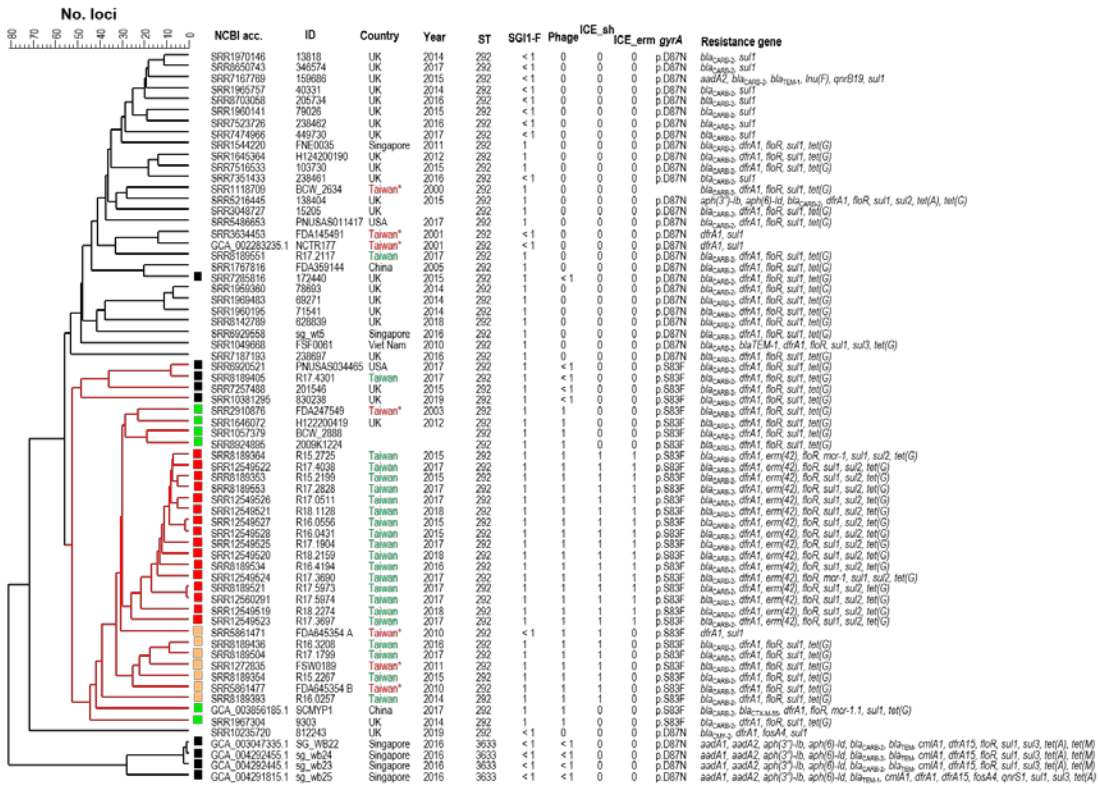
\*Only isolates collected between 2014 and 2019

我們下載 NCBI 資料庫所有 *S. Albany* 基因體序列，使用 cgMLST 方法比較國內與國外分離株之親緣關係。國外的 *S. Albany* 菌株主要來自英國與美國，絕大多數國外菌株和台灣菌株有很近的遺傳距離，只有 7 株菌株的距離超過 200 個基因位點(loci) (圖三)，大多數台灣分離株則有更近的遺傳距離。



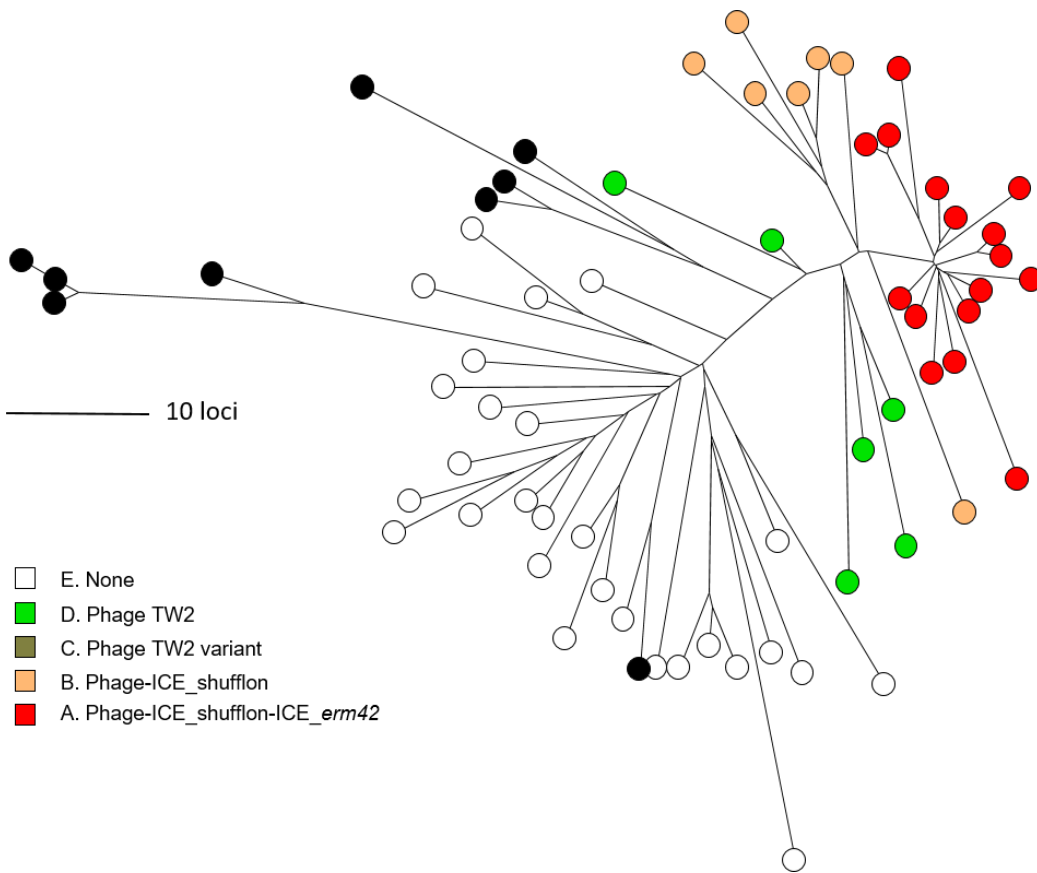
圖三：A cgMLST constructed with cgMLST profiles of 234 *S. Albany* isolates using the minimum spanning tree algorithm. The distance between two nodes greater than 200 loci is marked with a number.

我們挑選台灣菌株和與台灣菌株親緣關係最接近的菌株(共 66 株)進一步分析比較。66 株菌株中，有些菌株源於台灣，但在國外被分離與定序後上傳 NCBI 資料庫，也將這些菌株標示國家為 Taiwan(圖四)。如圖四所示，66 株菌株皆擁有 SGI1-F，只是一些菌株的 SGI1-F 已有部份序列刪除(圖四 SGI1-F 長度標示<1 者)，這些序列刪除也可能發生在抗藥基因上，這些菌株未擁有完整的 5 個抗藥基因(*bla<sub>CARB-2</sub>*, *dfrA1*, *erm42*, *floR*, *sul1*)。23 株擁有 ICE\_shufflon 的菌株都在台灣分離或源於台灣，16 株擁有 ICE\_shufflon 與 ICE\_erm42 也都在台灣分離，且有最緊密的親緣關係，擁有很高同源性。有較多菌株(29 株)擁有 prophage TW2，此 bacteriophage 除了台灣也出現在中國與英國的菌株。另有 9 株菌株帶有 TW2-like prophage (圖四 phage 長度標示<1 者)。



圖四：A cgMLST tree showing the genetic relatedness among 66 closely-related isolates from Taiwan and other 5 countries, and the relevant information and genetic traits for the isolates. The isolates, which are originated from Taiwan but recovered in other countries, were marked with an asterisk. Isolates harbor an SGI1-F, bacteriophage, ICE\_shufflon, and ICE\_erm42 are marked with red squares; an SGI1-F, bacteriophage, and ICE\_shufflon marked with orange squares; an SGI1-F and bacteriophage marked with green squares; SGI1-F and variants of the bacteriophage marked with black squares.

為了更進一步評估 66 株菌的遺傳距離，我們使用 neighbor joining 演算法建構 66 株菌株的 cgMLST 親緣關係樹(圖五)。由圖五的菌株遺傳距離推測，菌株應先獲得 bacteriophage TW，再獲得 ICE\_shufflon，最後獲得 ICE\_erm42。



圖五：A cgMLST tree shown the genetic relatedness among 66 closely-related isolates from Taiwan and other 5 countries constructed using the neighbor-joining algorithm. Isolates harbor an SGI1-F, bacteriophage, ICE\_shufflon, and ICE\_erm42 are indicated by red circles; an SGI1-F, bacteriophage, and ICE\_shufflon indicated by orange circles; an SGI1-F and bacteriophage indicated by green squares; SGI1-F and bacteriophage variants indicated by black circles; only SGI1-F indicated by white circles.



#### 四、討論

Azithromycin 是治療侵襲性沙門氏菌症(特別是傷寒的治療)的推薦藥物[1]。去年(2019年)台灣出現第一例境外移入的超級抗藥性傷寒病例[12]，醫師最初使用 ceftriaxone 治療 5 天無效後，檢驗室的藥敏試驗發現菌株對 ceftriaxone 具有抗藥性，後發現其抗藥圖譜與在巴基斯坦引發大規模傷寒群聚感染事件的超級抗藥菌相同[13]，醫師立即改使用美國 CDC 推薦的治療藥物 meropenem [14]，但是 7 天後該病人仍持續發燒與菌血症，後來蒐尋相關的治療案例論文後，改合併使用 meropenem 與 azithromycin 治療，2 天後即退燒且血液培養陰性[12]。現今沙門氏菌普遍對第一線治療藥物如 ciprofloxacin 產生抗藥性，對 ceftriaxone 具有抗藥性的菌株也不斷出現，對沙門氏菌引發的侵襲性感染(特別是傷寒)，azithromycin 已成最後一線藥物，因此必需嚴密監控沙門氏菌 azithromycin 抗藥性的發展與流行。

本實驗室於 2017 年開始監控沙門氏菌 azithromycin 的抗藥性，2017–2018 年間執行 2,447 菌株的藥敏試驗，其中有 3.1% (76/2,447) 的 azithromycin MIC  $\geq$  32 mg/L，顯示國內沙門氏菌 azithromycin 抗藥性的問題已不容忽視。我們分析此 76 株菌株的抗藥機制，發現有 53 株攜帶有已知的抗藥基因 *mphA* (39 株), *ermB* (3 株), *erm42* (10 株), *mphA-erm42* (1 株)。*mphA* 分布較廣，主要出現在 *S. Typhimurium*，但也出現在其它 11 種血清型菌株 (表二)，推測 *mphA* 應該攜帶於可移動的質體上[2]。10 株攜帶 ICE\_erm42 菌株皆是 *S. Albany*，利用 PFGE 圖譜進行群組分析，此 10 株菌株位於一個親緣關係非常近的群組，利用 PCR 檢測與藥敏試驗，發現此一群組內的所有菌株(74 株)皆攜帶有 *erm42*，且對 azithromycin 具有抗藥性，整體而言，2014-2019 年期間的 *S. Albany* 分離株有 28.0% 攜帶 *erm42* 抗藥基因。

台灣流行的 *S. Albany* 原本就帶有 SGI1-F，此一 *Salmonella* genomic island 擁有 5 個抗藥基因，是對 ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole, trimethoprim, tetracycline 具有抗性的多重抗藥菌株，然而現在此一多重抗藥 *S. Albany* 菌株又多獲得 3 個抗藥基因(*erm42*, *floR*, *sul2*)，因此增加對

azithromycin 的抗藥性。*erm42* 攜帶於一個可移動的 ICE 上，因此可以將 *erm42* 轉移到同種或不同種類的細菌(目前已証實 ICE\_erm42 可經由 conjugation 傳到 *Vibrio cholerae* 與 *Escherichia coli*，唯 conjugation rate 小於  $10^{-7}$ /donor)，增加 azithromycin 抗藥性散播的危險性。

利用本實驗室發展的沙門氏菌 cgMLST scheme，我們能快速與貯存在 NCBI 資料庫的菌株進行親緣關係的探討。我們利用 cgMLST 基因指紋建構的 cgMLST 親緣關係樹(圖三)，顯示絕大多數國內外 *S. Albany* 有很近的遺傳距離，國內的分離株則有更接近的親緣關係。

攜帶 *erm42* 的 *S. Albany* 菌株同時擁有 4 個可移動遺傳因子，其中 ICE\_erm42 與 ICE\_shufflon 目前只出現在台灣分離株，phage TW2 大多出現在台灣菌株，但也發現在英國與中國的菌株上。SGI1-F 存在所有已定序的菌株，藥敏試驗結果顯示，超過 96.6% 的台灣沙門氏菌分離株對 5 種藥物有抗藥性，且 cgMLST 親緣關係比對顯示絕對多數存在 NCBI 資料庫的 *S. Albany* 菌株與台灣菌株有很近的親緣關係，推測目前的 *S. Albany* 流行菌株，應該都帶有 SGI1-F 這個可移動遺傳因子。

利用 neighbor-joining 演化法，建構 66 株最親近的 *S. Albany* 菌株的 cgMLST 親緣關係樹，顯示菌株是先獲得 bacteriophage TW2 後，再獲得 ICE\_shufflon，最後才獲得 ICE\_erm42，目前 ICE\_shufflon 與 ICE\_erm42 尚未在國外的菌株偵測到。由於 2014 年後的 *S. Albany* 菌株有 28.0% 攜帶 ICE\_erm42，且 ICE\_erm42 可移動到其它菌，因此除了要強化監控此抗藥菌株的流行，也需追查此 ICE\_erm42-carrying *S. Albany* 的上游來源，方能控制 azithromycin 的散播。

## 五、結論與建議

### 結論部分

1. 2017–2018 年自醫院收集之 *Salmonella* 菌株，有 3.1% (76/2,449) 菌株對 azithromycin 具有抗藥性。
2. 76 株 azithromycin 抗藥株，有 53 攜帶已知的抗藥基因：*mphA* (39 株), *ermB* (3 株), *erm42* (10 株), *mphA-erm42* (1 株)，這些菌株之 MIC  $\geq$  64 mg/L。其餘 23 株，有 22 株可能與 efflux pump 的調控有關，這些菌株 MIC 位於 16-32 mg/L 之間，另一株 (*S. Mbandaka* R17.0904；MIC = 64 mg/L) 之抗藥機制仍不明。
3. *S. Albany* 的 *erm42* 由可移動遺傳因子 ICE\_erm42 所攜帶，這些有 ICE\_erm42 的 *S. Albany* 具有很近的親緣關係，應由共同的菌株演化而來。這些菌株也同時攜帶 ICE\_shufflon 與一獨特的 bacteriophage TW2。

### 建議部分

1. 沙門氏菌是人畜共通傳染病原，長期監測結果顯示，2017-2018 年已有 3.1% 菌株對被推薦用於治療侵襲性 XDR 沙門氏菌症的 azithromycin 產生抗藥性，恐增加治療困難。農衛主管機關應重視此新興抗藥菌株流行的嚴重問題，強化監測與追溯源頭。
2. *S. Albany* 多重抗藥株的流行，疾病負擔相對巨大。需要強化民眾處理農畜產品的衛生教育，以減輕民眾感染風險。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

台灣的沙門氏菌在本計畫四年監測下來，抗藥性問題相當嚴重，此高度盛行之人畜共通病原，每年感染病例數龐大，醫療負擔大，是公衛極需重視的傳染病原。從不同動物來源樣本也分離到多重抗藥菌株，顯示更應由農場至馬桶(From Farm to Flush)，上中下游共同進行監測。此外，由於國內對人、動物來源菌株之藥敏測試未有統一的測試藥品種類與操作方法，導致藥敏測試結果不易相互比較，農、衛雙方對此人畜共通病原的抗藥性難以共同討論。在 GHSA 二期，將規劃衛方與農方統一測試藥品種類與藥敏測試方法，以進一步擴大比對人、動物菌株之藥敏測試資料與基因分析資料，相互交換資訊，共同擬定防治策略，方能有效維護民眾的健康。

## 七、參考文獻：

1. Crump JA, Sjolund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM: **Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections.** *Clin Microbiol Rev* 2015, **28**(4):901-937.
2. Hong YP, Wang YW, Huang IH, Liao YC, Kuo HC, Liu YY, Tu YH, Chen BH, Liao YS, Chiou CS: **Genetic relationships among multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains from humans and animals.** *Antimicrob Agents Chemother* 2018, **62**(5):e00213-00218.
3. Liao Y-S, Chen B-H, Hong Y-P, Teng R-H, Wang Y-W, Liang S-Y, Liu Y-Y, Tu Y-H, Chen Y-S, Chang J-H *et al*: **The emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Goldcoast strains in Taiwan and the international spread of ST358 clone.** *Antimicrob Agents Chemother* 2019, (revising).
4. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE: **Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads.** *PLoS Comput Biol* 2017, **13**(6):e1005595.
5. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD *et al*: **SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.** *J Comput Biol* 2012, **19**(5):455-477.
6. Tu Y-H, Chen Y-S, Chen B-H, Liu Y-Y, Hong Y-P, Teng R-H, Wang Y-W, Chiou C-S: **cgMLST@Taiwan: A web service for *Vibrio cholerae* cgMLST profiling and global strain tracking.** (Submitted for review) 2019.
7. Darton TC, Tuyen HT, The HC, Newton PN, Dance DAB, Phetsouvanh R, Davong V, Campbell JI, Hoang NVM, Thwaites GE *et al*: **Azithromycin Resistance in *Shigella* spp. in Southeast Asia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2018, **62**(4).
8. Doublet B, Lailler R, Meunier D, Brisabois A, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A: **Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(5):585-591.
9. Wozniak RAF, Waldor MK: **Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow.** *Nature Reviews Microbiology* 2010, **8**(8):552-563.
10. Luo P, He X, Wang Y, Liu Q, Hu C: **Comparative genomic analysis of six new-found integrative conjugative elements (ICEs) in *Vibrio alginolyticus*.** *BMC Microbiol* 2016, **16**(1):79.
11. Komano T, Kim SR, Yoshida T: **Mating variation by DNA inversions of shufflon in plasmid R64.** *Adv Biophys* 1995, **31**:181-193.
12. Liu PY, Wang KC, Hong YP, Chen BH, Shi ZY, Chiou CS: **The first imported case of extensively drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi infection in Taiwan and the antimicrobial therapy.** *J Microbiol Immunol Infect* 2020.

13. Qamar FN, Yousafzai MT, Khalid M, Kazi AM, Lohana H, Karim S, Khan A, Hotwani A, Qureshi S, Kabir F *et al*: **Outbreak investigation of ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi and its risk factors among the general population in Hyderabad, Pakistan: a matched case-control study.** *Lancet Infect Dis* 2018, **18**(12):1368-1376.
14. Chatham-Stephens K, Medalla F, Hughes M, Appiah GD, Aubert RD, Caidi H, Angelo KM, Walker AT, Hatley N, Masani S *et al*: **Emergence of extensively drug-resistant *Salmonella* Typhi infections among travelers to or from Pakistan - United States, 2016-2018.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019, **68**(1):11-13.

## 衛生福利部疾病管制署 109 年科技研究計畫 期末審查意見回復

計畫編號：**MOHW109-CDC-C-315-144406**

計畫名稱：建置抗藥性微生物監測實驗室與巨量資料庫應用系統

計畫主持人：邱乾順

\*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	研究發現 2017-2018 由合作醫院收集的 2,447 株沙門氏菌有 3.1% 對 azithromycin 具抗藥性，此結果呼籲農政衛生主管機關重視。	謝謝委員的意見。	無
2	研究成果需與農政機關共同討論，研擬防治對策。	謝謝委員的意見。已與農方溝通於 GHSA 二期計畫共同設計藥敏盤進行抗藥菌株監測，並藉由定期開會分享溝通研究成果，提供農業用抗生素使用管理參考依據。	無
3	此檢體來源為醫院，監測結果若能結合病人資訊詮釋(年齡、住院與否等)，將更完整。	謝謝委員的意見。將試著導入病人資訊(年齡、住院與否等)進行流行病學分析，並結合實驗室基因體資訊，期望能從更完整之面相進行分析討論。	無
4	建議與事業主管機關進行溝通。	謝謝委員的意見。將透過定期會議提報研究成果予相關部會，同時聆聽其他部會的看法與考量點。希望透過跨部會的成果分享與相互理解，在共同防治目標上有更多的共識與協同合作，並有政策支持。	
5	很有價值的研究，抗藥性是否有上源的控制。	謝謝委員的意見。將透過定期會議提報研究成果予相關部會，研擬共同訂定抗生素管制政策，由農場至馬桶(From Farm to Flush)，上中下游共同進行監	

		測。	

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。