

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-114702

衛生福利部疾病管制署 106 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

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：林鈺棋、謝佳倫

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		6
三、本文		
(一)、前言		8
(二)、材料與方法		14
(三)、結果		16
(四)、討論		19
(五)、結論與建議		21
(七)、參考資料		22
(六)、圖表		24

共 (29) 頁

圖次：

圖一、NDM-5 *E. coli* 之密集浮現

圖二、NDM-5 *E. coli* 親緣樹狀圖

圖三、NDM-5 *E. coli* 質體確認

圖四、NDM-5 *E. coli* 質體之基因比較分析

圖五、MCR-1 菌株之密集浮現

圖六、MCR-1 菌株親緣樹狀圖

計畫中文摘要：

關鍵詞：產碳氫黴烯酶，KPC

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(2017)年完成通報 NDM-5 群聚菌株 4 株以及 1 株散發的 NDM-5 E.coli 之全基因定序分析，散發個案之菌株在 NDM-5 基因附近缺少近 6 Kb 片段，此段基因 cassette 常造成抗藥基因之散播。

本計畫目標，建立初步的抗藥質體全基因體分析資料庫。期結果使我們了解這些質體攜帶的所有抗藥基因、轉移有關的基因(tra、insertion sequence(IS)、transposon(Tn)、integron...)、抗重金屬基因、利用鐵的基因等等，這些基因或許能增加該抗藥菌的存活、繁衍能力、菌株毒力，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, KPC

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 5 NDM-5 carrying plasmids (4 from outbreak strains, 1 from sporadic strain) by using NGS. The data showed there is a missing fragment around NDM-5 gene of sporadic strain. The missing fragment composed of 6 Kb IS91-IntI 1 intergrase cassettes. This cassettes usually cause the dissemination of antibiotic resistance genes.

The objective of this study is to establish a preliminary 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 agnets, transfer-related genes (tra,

insertion sequence (IS), transposon (Tn), integron ...), heavy metal resistance gene , iron-related metabolic genes, etc. These genes 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(1、2)。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)：

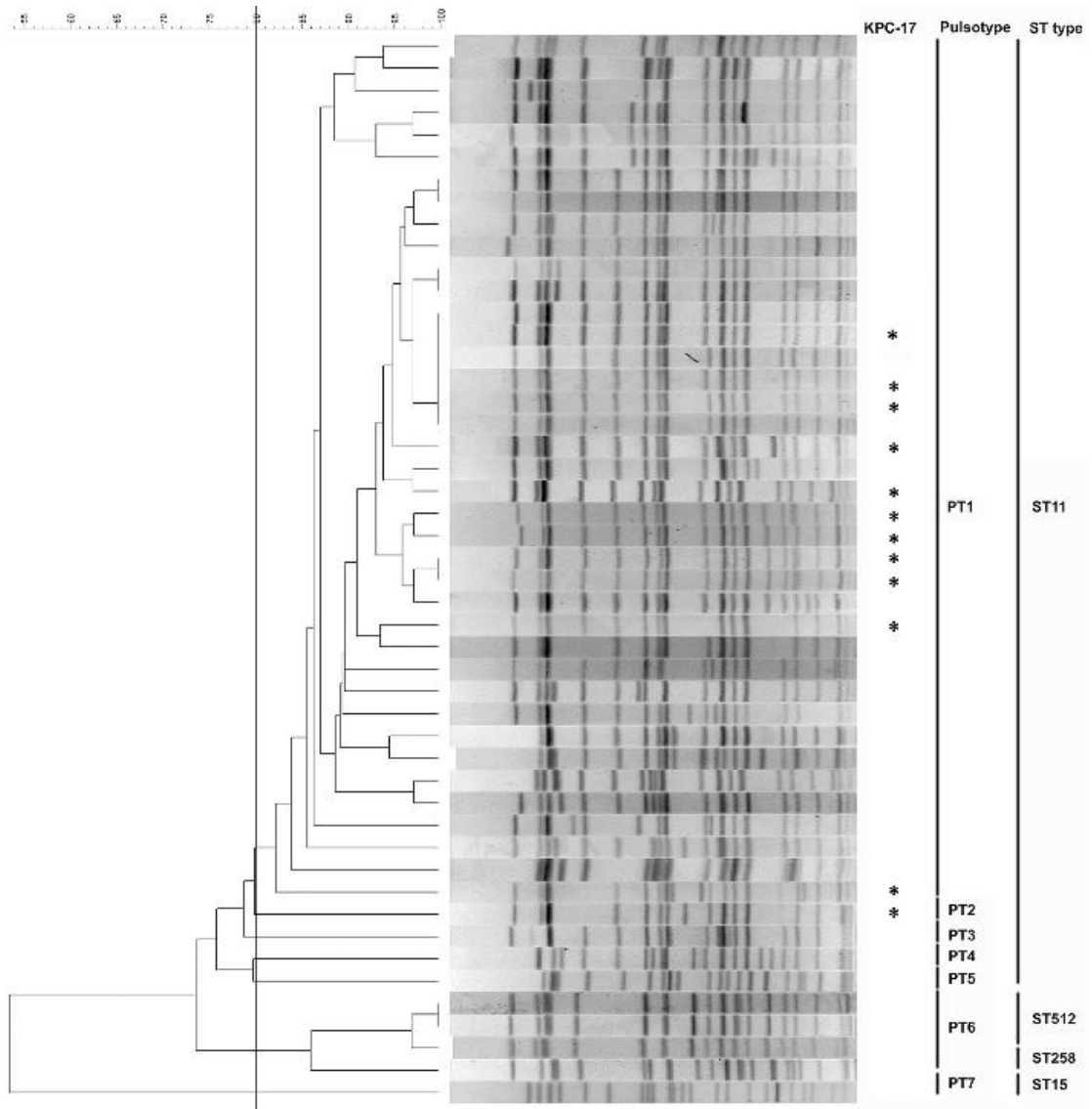
1. 表一詳列 carbapenem non-susceptible KP 的攜帶的各種 carbapenemase 基因型及比例。
2. 以 PFGE 分析 KPC-KP 之間的菌株關係圖一，發現多為 ST11 並屬於同一 pulsotype (PT)

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 基因陽性的菌株做進一步的抗藥基因及質體的分析

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. 抗藥質體 DNA 萃取

確認抗藥質體後，以 gel cutting tips 將抗藥質體 DNA 自 S1-PFGE 電泳膠切出，並利用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, 美國) 試劑盒的說明進行萃取。

5. 抗藥質體定序

將萃取之抗藥質體 DNA 以 QIAseq FX Single Cell DNA Library kit (Qiagen, 德國) 進行建庫，並以 Illumina MiSeq 或 Miniseq 平台進行二代 NGS 定序。

6. Bioinformatics 分析

NGS 定序資料以 BaseSpace Sequence Hub (illumina) 之 SPAdes Genome Assembler 進行 de novo assembly 組裝，組裝完成之片段再以 ResFinder 3.0 (Center for Genomic Epidemiology, DTU, Denmark 進行抗藥基因分析(16)。

(三) 結果

1. NDM-5 *E. coli* 之密集浮現

自2014年起至2017年5月底共有12株 NDM-5通報菌株，均為*E.coli*，來自3家醫院，兩家在台北市(TH及HH)，一家來自台南(CH)。12個菌株來自10個不同個案，其中台北(TH)通報2株，分別為2014年及2017年，另一家(HH)2016至2017年陸續通報9株，來自7個不同個案，其中一個案通報3次。台南之醫院(CH)僅於103年通報1株。(圖一)

2. NDM-5 *E. coli* 親緣樹狀圖

以 PFGE 親緣樹狀圖分析至 2017 年 1 月底 8 株菌株 (來自 8 個案)，來自 HH 之 5 個菌株均大於 80% similarity，屬於同一個 clade，有群聚之可能性。其餘 TH 及 CH 兩家醫院之 3 個菌株，則屬不同 clade，應為散發個案。(圖二)

3. NDM-5 *E. coli* 質體確認

為了解這些帶NDM-5質體之差別性，以 S1-PFGE分別呈現細菌內染色體及質體之大小，續以Southern hybridization偵測8株帶NDM-5質體之位置(TH 2株，CH1株以及HH 5株)。結果顯示來自 TH及CH醫院之帶NDM-5質體(TH1、TH2及CH1)大小分別240kb、90kb及50kb，與來自HH醫院之5株帶NDM-5質體大小約180kb有顯著差異(圖三)。5株HH(HH1-5)

雖然來自同醫院，PFGE屬同一cluster，親緣關係很近，但質體大小仍有些微差異(圖三)。這些差異僅是某些基因的遺失或加入，抑或是完全不同之質體，需以次世代定序技術(NGS)分析NDM-5質體之抗藥基因之情形。

4. NDM-5 *E. coli* 質體之基因比較分析

為瞭解帶 NDM-5 質體之差異，挑選 CH1、HH1-3 及 HH5 之帶 NDM-5 質體進行 NGS 定序分析。依 de novo assembly 組裝及抗藥基因分析結果，帶 NDM-5 基因之組裝片段長度介於 1.4kb 至 10.5kb(圖四)，其中 HH1 及 HH3 之組裝片段最長，約 10.5kb。依抗藥基因分析結果顯示，HH1 組裝片段之兩端均由插入序列 IS26 組成，且為正向重複序列 (direct repeat)。HH1 組裝片段可分成兩組抗藥基因結構，分別為 NDM-5-bleMBL(bleomycin resistance gene)與 class 1 integron。NDM-5 基因及 bleMBL 基因已被證實共用啟動子，該啟動子位於上游 ISAbal25 之 3'端部分序列(17)；class 1 integron 除 integrase 外，亦包含可分別抵抗 trimethoprim (dfrA17)、streptomycin (aadA5) 及 sulphonamides (sul1) 的抗藥基因，以及具有 multidrug efflux pump 功能的 emrE 基因。

經比較帶 NDM-5 之組裝片段，HH 醫院的 4 個帶 NDM-5 基因之組裝片段序列均相同；此外，CH1 具有與 HH1 相同的 NDM-5-bleMBL 序列，但下游序列為 IS26 部分片段，相異於 HH1 的 IS91。

5. 帶 MCR-1 菌株之密集浮現

目前通報MCR-1之菌株共13株，*E.coli* 8株，*KP* 5株。此13株MCR-1菌株以南部地區醫院通報最多，共6株；2株來自嘉義兩家醫院，4株來自台南兩家醫院(一家3株，一家1株)。其次為北部地區醫院，共5株，2株來自新北市一家醫院，3株來自新竹兩家醫院。東部兩醫院(花蓮、台東)各通報一株。

其中2株同時帶有MCR-1及carbapenemase基因，1株*E. coli*同時帶有MCR-1及NDM-9基因，通報自台南，1株*KP*同時帶有MCR-1及KPC-17基因，通報自花蓮(圖五)。

6. MCR-1 菌株親緣樹狀圖

以 PFGE 分析來自台南 A、B，嘉義 A、B 及新竹 A、B 醫院通報之 6 株帶 MCR-1 之 *E. coli* 菌株，包含同時帶有 MCR-1 及 NDM-9 之 *E. coli* 在內，此 6 株 MCR-1 *E. coli* 分屬不同 cluster，顯示並無群聚現象發生。另分析來自新北、台南 A、C 及花蓮醫院通報之 5 株帶 MCR-1 之 *K. p* 菌株，包含同時帶有 MCR-1 及 KPC-17 之 *K. p* 在內，此 5 株 MCR-1 *K. p* 亦分屬不同 cluster，顯示亦無群聚現象發生(圖六)。

(四) 討論

1. NDM-5 親緣樹狀圖顯示院內之群聚感染，southern hybridization 則顯示各醫院帶 NDM-5 之質體大小差異甚多，即使群聚之菌株，帶 NDM-5 之質體亦有些許差異。需以次世代定序技術(NGS)解密帶 NDM-5 之質體基因組成才能進行完整比較分析。
2. 此次 NGS 解密帶 NDM-5 質體，組裝出帶有 NDM-5 基因的片段長度介於 1.4 Kb 至 10Kb 不等，其組裝長度僅佔帶 NDM-5 質體約 1-5%。由於本次使用 MiSeq 2x150bp 雙端讀長進行 paired-end 定序及分析，單一讀長上限為 300bp，但帶 NDM-5 質體內具有一個以上且序列相同的 IS26，其長度 705bp 大於兩端讀長 300bp 相加為 600bp 的長度，故無法將 IS26 解序及定位，此讀長限制問題未來將利用較長讀長的 MiSeq 2x300bp 進行改善。
3. 依序列分析結果顯示，群聚事件(HH)之質體在 NDM-5 基因附近(圖四，HH1-3 及 HH5)，甚至有兩質體 10Kb 之片段基本組成皆相同(圖四，HH1 與 HH3)；反觀台南醫院(CH)之 NDM-5 質體，其質體大小約 50kb 遠小於群聚之 NDM-5 質體(圖三)，其質體基因組成缺少近 6 Kb 片段(IS91-IntI 1 intergrase)，且其 IS26 方向亦與群聚之質體相反。由於 IS91 是跳躍基因/轉位子，IntI 1 可剪接抗藥基因組成，因此，此段基因 cassette 常造成抗藥基因之散播。
4. NDM-5 於 2014 年出現於台北及台南，而密集浮現則是從 2014-2017 年，此密集浮現源自於醫院之群聚感染。MCR-1 亦

於 2014 年出現於醫院臨床檢體中，目前完成親緣分析之 11 株帶 MCR-1 菌株雖尚無群聚現象，但 2016 及 2017 年連續出現 MCR-1 與不同 carbapenemase 出現於同一菌株中，若 MCR-1 持續與 carbapenemase 質體共同出現同一菌株，乃至於發展成組合在同一質體上，將面臨無藥可用之用藥危機。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。

(五) 結論與建議

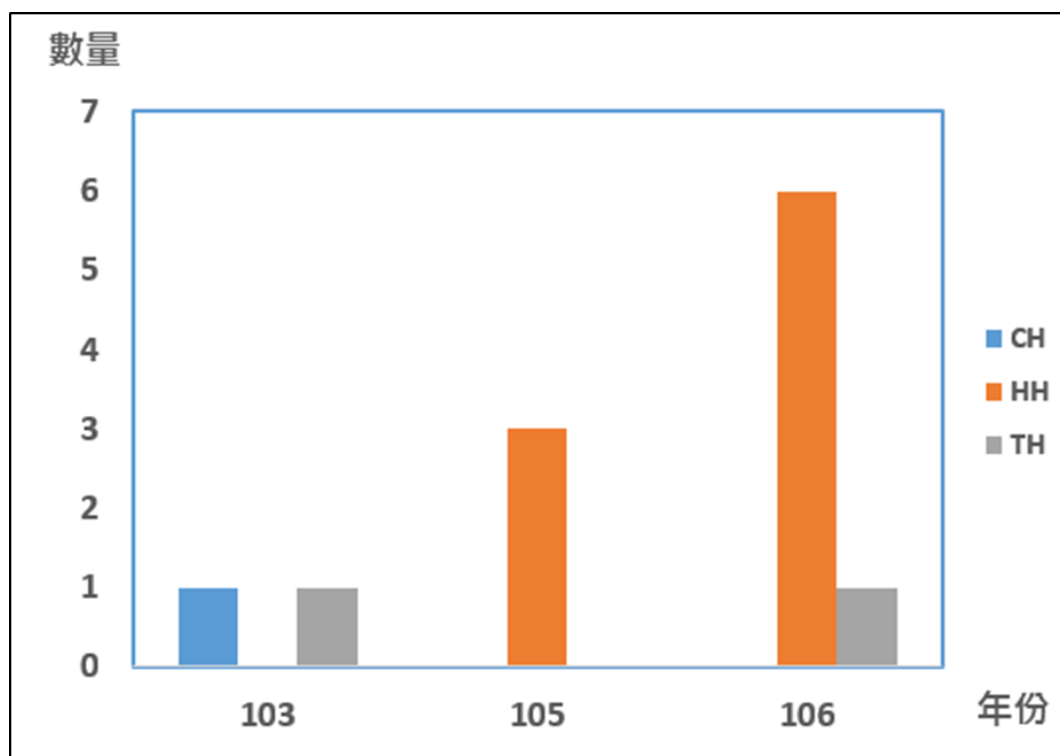
1. 本計畫目的在以次世代定序技術(NGS)解密多重抗藥菌株之基因組成，並建置抗藥基因 database，分析抗藥基因傳播，並提供未來制菌劑設計發展的基礎。
2. 本(2017)年完成建立 NGS 定序所需前置步驟如下：
 - (1)建立 S1-PFGE 電泳膠中萃取微量抗藥質體 DNA 之技術：
經比較各純化 DNA 試劑，遴選可有效萃取微量抗藥質體 DNA 之試劑，除可排除染色體及其他非抗藥質體干擾，亦提升 NGS 定序之專一性。
 - (2)建立微量 DNA 之自建庫技術：由於自電泳膠中萃取微量抗藥質體 DNA 之濃度低於 0.1 ng/μL，爰比較各自建庫試劑後，遴選可有效增幅微量 DNA 之建庫試劑，並發展自行建庫之技術能力。
3. 本次發現並非每個帶 NDM-5 質體都可組裝成長片段，主要原因可能為抗藥質體內通常具有多個且重複的片段(如 insertion sequence)，且長度超過兩端讀長相加的長度(如本實驗的 IS26)，將大幅影響序列組裝結果。關於讀長限制問題，後續將評估使用較長讀長的 MiSeq 2x300bp 進行改善。

(六) 參考資料

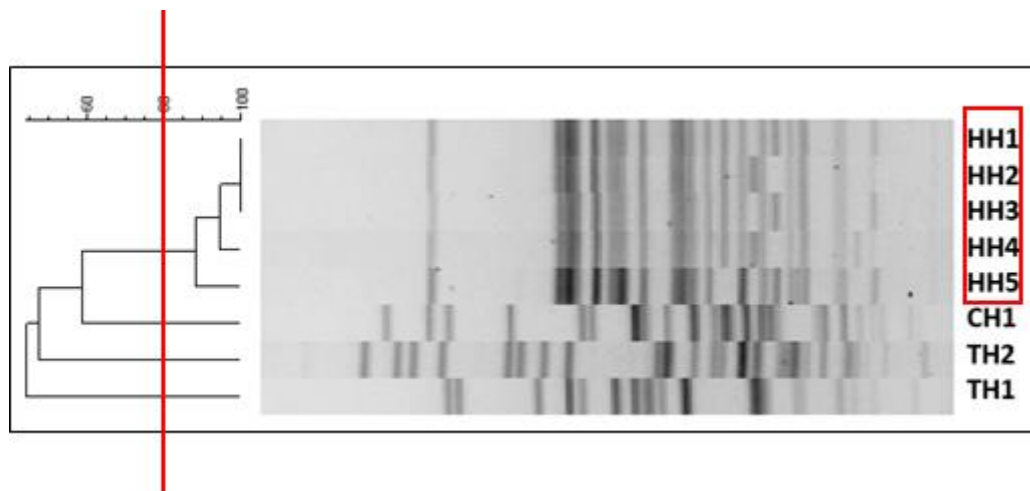
1. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
2. Walsh TR, Toleman MA. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1–3.
3. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 821–30.
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR et al. 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*. 2016;16(2):161-8.
5. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F et al. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(49).
6. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P et al. Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill*. 2016;21(6).
7. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jun 24. pii: dkw274.
8. Zhi C, Lv L, Yu LF et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):292-3.
9. Webb HE, Granier SA, Marault M et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):144-5.
10. Yu H, Qu F, Shan B, Huang B et al. Detection of mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) from different hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 May 23. pii: AAC.00440-16.
11. Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):287-8
12. Paterson DL, Harris PN. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):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 β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20:440-58.
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:e013847.
16. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2012;67:2640-4
17. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2012;56:1693-7.

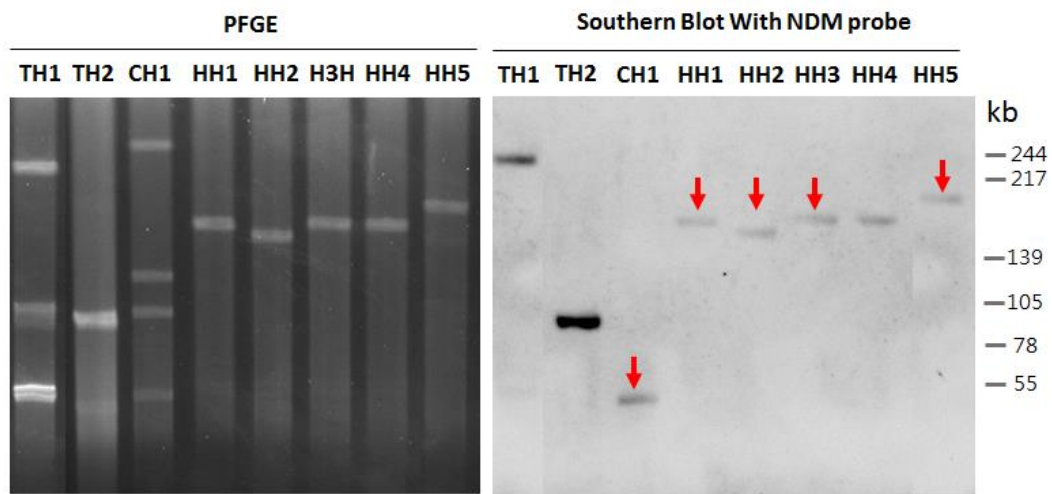
(七) 圖表



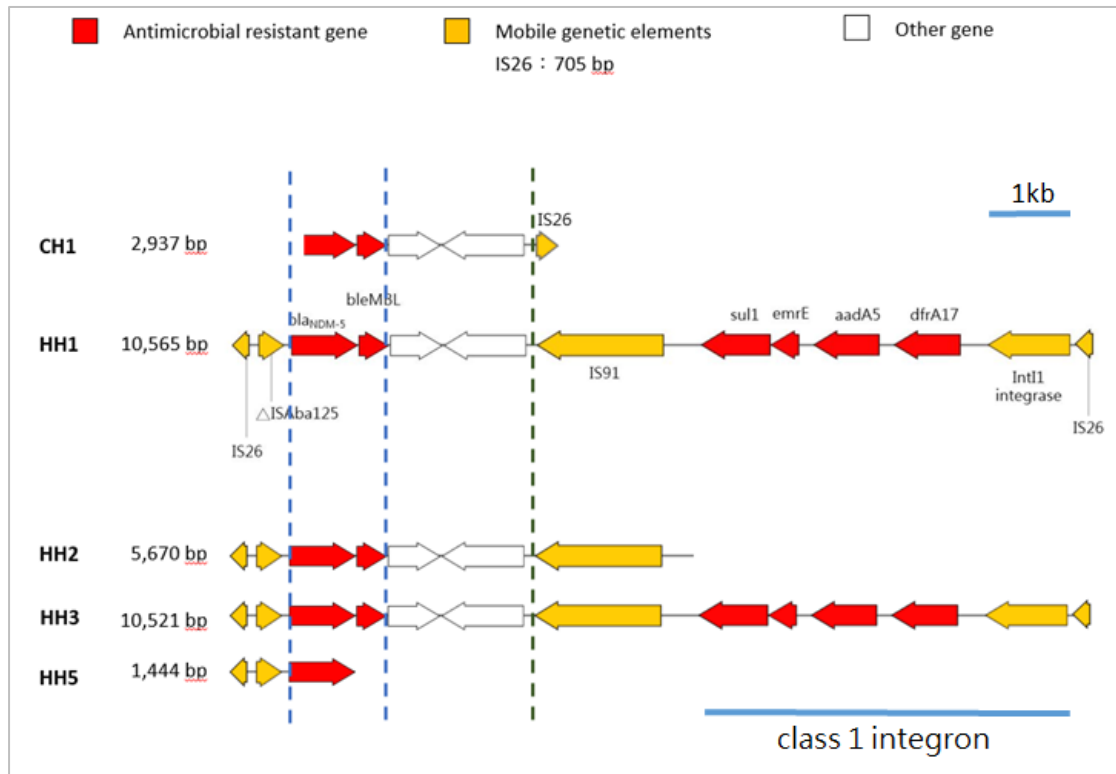
圖一、NDM-5 *E. coli* 之密集浮現



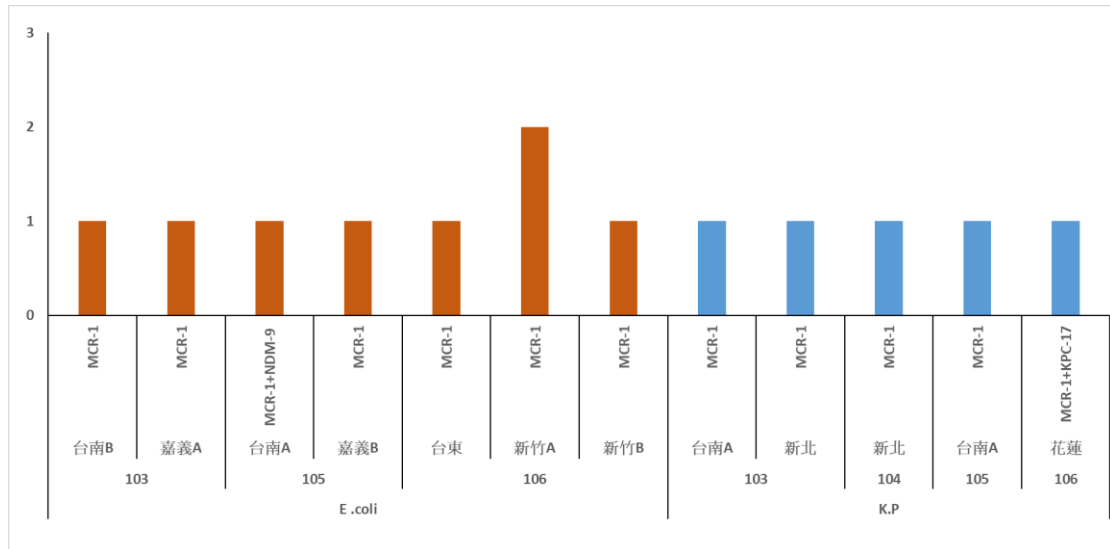
圖二、NDM-5 *E. coli* 親緣樹狀圖



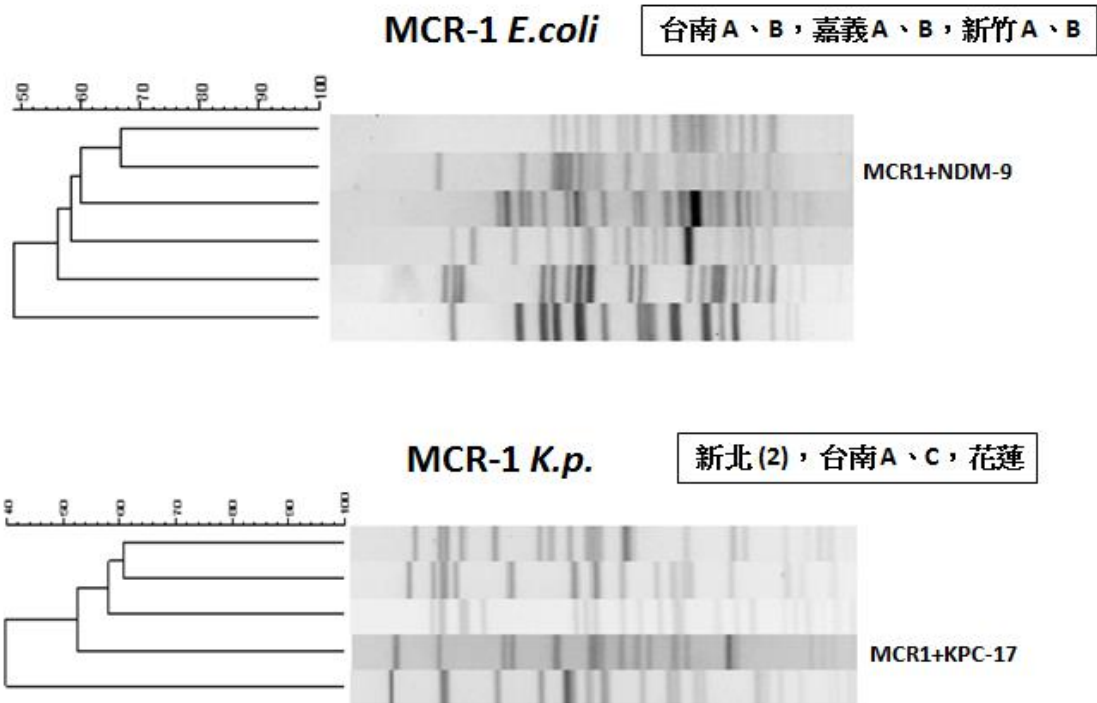
圖三、NDM-5 *E. coli* 質體確認



圖四、NDM-5 *E. coli* 質體之基因比較分析



圖五、帶 MCR-1 菌株之密集浮現



圖六、MCR-1 菌株親緣樹狀圖