

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-114703

衛生福利部疾病管制署 106 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

106 年 度/全 程 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：邱乾順研究員

研究人員：洪羽屏、鄧如琇

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 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 )
二、材料與方法	( 6 )
三、結果	( 7-9 )
四、討論	( 10-11 )
五、結論與建議	( 12 )
六、計畫重要研究成果及具體建議	( 13 )
七、參考文獻	( 13 )
八、圖、表	( 14-20 )
	計 16 頁
附錄一～八	( 21~23 )
附錄一、藥敏試劑盤 (NHRISAL7) 抗生素種類與濃度範圍	
附錄二、腸內菌科 ( <i>Enterobacteriaceae</i> ) 的藥敏試驗判定準則	
附錄三、沙門氏菌藥物敏感性試驗最低抑菌濃度測定標準操作程序	
附錄四、基因體 DNA (gDNA) 萃取標準操作程序	
附錄五、雙股 DNA 濃度測定 (Qubit 螢光法) 標準操作程序	
附錄六、次世代全基因定序文庫建構與品管 (NGS Library prep & QC) 標準操作程序	
附錄七、MiSeq 上機操作標準作業程序	
附錄八、MiSeq 下機數據品管標準作業程序	

共 3 頁

## 中文摘要

面對越來越嚴重的全球化抗藥性問題，GHSA (全球衛生安全綱領)所提出的 11 項具體行動方案，首要行動方案即為對抗抗微生物製劑抗藥性。本(106)年研究計畫目的在標準化人畜共通病原菌沙門氏菌之藥物敏感性試驗操作流程，並導入次世代全基因定序技術及生物資訊分析方法來鑑定抗藥性基因。我們利用客製化之藥敏試劑盤測試來自人、動物及肉品的沙門氏菌菌株共 1,277 株，藥敏結果顯示目前沙門氏菌對於 fluoroquinolones 類抗生素(ciprofloxacin) 及第三代 cephalosporins 類抗生素 (cefotaxime 及 ceftazidime) 抗藥性在 10% 左右，有增長的趨勢，過去常用的 chloramphenicol 及 penicillins 類抗生素 (如 ampicillin)，抗藥性約 5 成。本研究也發現，國內分離到的沙門氏菌對 colistin 抗藥性約 5%，且人及動物來源菌株均有 colistin 抗藥菌株出現，目前尚無監測到 carbapenem (ertapenem) 抗藥性菌株。此外，本研究也利用次世代全基因定序技術分析 5 株人、動物來源之多重抗藥沙門氏菌株，這些菌株攜帶相同的抗藥基因(至多 22 種抗藥基因)，且抗藥基因分布在 4 個質體中，顯示多重抗藥菌株在人、畜間傳播流行之流行病學關聯性。

關鍵詞：抗藥性，全球衛生安全綱領，人畜共通病原菌，藥物敏感性試驗，次世代全基因定序。

## **Abstract**

Facing the challenge of globally severe antibiotic resistance problem, GHSA proposed 11 concrete actions. First of all, the critical action is to control the resistance of antibiotic drug. The project in this year aims to standardize the antibiotic susceptibility test of zoonotic Salmonella, and introduce next generation sequencing (NGS) technique, as well as bioinformatic analysis methods, for antimicrobial gene detection. We used customerized antibiotic susceptibility test (AST) kit to test a total of 1,277 strains of Salmonella from human, animals and meat products. The results of antibiotic susceptibility test (AST) showed that the resistant rate of Salmonella to fluoroquinolones antibiotics (ciprofloxacin) and third generation cephalosporins (cefotaxime and ceftazidime) are about 10%, suggesting a growing trend. And the resistant rate of chloramphenicol and penicillins antibiotics (such as ampicillin), is about 5 percent. The study also found that the isolated Salmonella resistant to colistin is about 5%, and the colistin resistant strains are from both humans and animals. There is no carbapenem (ertapenem) resistant strains appeared. In addition, the present study also used the next generation whole genome sequencing technique to analyze five human and animal multi-drug resistant Salmonella strains which carried the same drug resistance gene (up to 22 drug resistance genes), and the drug resistance genes were distributed in four plasmids. This result showed that an epidemiological association of multiple drug-resistant strains in human and animals.

keywords : Antibiotic resistance, GHSA, Antibiotic susceptibility test (AST), Zoonotic, Next Generation Sequencing (NGS)

## 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化抗藥性問題，GHSA 所提出的 11 項具體行動方案，首要行動方案即為對抗抗微生物製劑抗藥性，強調跨人類、動物及食品等領域，從防疫一體的角度，發展整合性管理策略。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 Resistant; AMR)的產生，而這些抗藥性細菌常導致治療失敗，影響人類與動物健康甚鉅。惟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。本計畫將分年蒐集不同重要人畜共通傳染病原(沙門氏菌、李斯特菌、曲狀桿菌)，並標準化藥物敏感性試驗。今(106)年計畫目的為建立人畜共通病原菌沙門氏菌之藥物敏感性試驗操作流程，與建立次世代全基因體定序之標準操作程序。利用所建立之操作流程，進行沙門氏菌(人類、動物)菌株進行藥敏試驗，並針對多重抗藥性(MDR)菌株進行次世代全基因定序，分析鑑定抗藥性基因與基因載體(vehicle)，探討人、動物來源多重抗藥菌株之流行病學關聯性。

## 二、材料與方法

### (一)研究設計

#### 1. 菌株來源：

今年進行藥敏測試之人畜共通病原菌沙門氏菌菌株共 1,277 株，來源有人、動物及肉品。人類菌株來自參與疾病管制署實驗室自動通報系統(LARS)或食媒性病原監測計畫之醫院，涵蓋北中南東各地區醫學中心與區域級以上醫院。動物菌株分離自南部地區畜牧禽場之病死豬及禽類解剖樣本。肉品菌株分離自中部多間大型連鎖超市。

#### 2. 建立藥物敏感性試驗標準操作流程：

利用培養液微量稀釋法 (broth microdilution) 偵測抗生素殺菌 (或抑菌) 的最小抑制濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。使用 Sensititre (Trek Diagnostic Systems, West Sussex, UK) 所生產的客製化藥敏試劑盤，該盤上各獨立小孔已預先參考臨床抗生素使用範圍及歐盟食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 建議動物來源沙門氏菌藥敏測試抗生素種類與濃度範圍配製不同濃度的抗生素(附錄一)。依藥敏試劑盤的判定準則與美國臨床微生物檢驗室標準委員會 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 的規範決定菌株的抗生素感受性範圍與抗藥性(附錄二)。將收集來的菌株利用前述設計的藥敏試劑盤進行藥物敏感性最低抑菌濃度(MIC)試驗。

#### 3. 次世代全基因定序：

建立次世代全基因體定序之標準操作程序，針對 5 株人、雞、豬來源多重抗藥性(MDR)菌株進行全基因體定序，並利用生物資訊分析分法<sup>1</sup>鑑定抗藥性基因與組裝其 plasmid 載體。

### 三、結果

#### 1. 人畜共通病原菌沙門氏菌藥物敏感性試驗

已完成沙門氏菌藥物敏感性試驗最低抑菌濃度測定標準操作程序(附錄三)，設計藥敏試劑盤(圖一)。試劑盤包括所有歐盟建議用於測試人畜共通病原(*Salmonella*)之抗生藥物種類 (EFSA, 2008)，並使用客製化之藥敏試劑盤測試 1,277 株沙門氏菌菌株。

(1)菌株來源分佈：分別來自人(903 株)、豬(194 株)、雞(124 株)、鴨(28 株)、鵝(18 株)、火雞(10 株)(圖二)。

(2)血清型分佈：前 7 名依序為血清型 Typhimurium (19%)、Enteritidis (10%)、Newport (8%)、Derby (6%)、Albany (6%)、Agona (5%)、Anatum (5%)，其它血清型(42%)(圖三)。

(3)藥敏測試結果：表一及圖四~七所示。沙門氏菌對 ciprofloxacin 抗藥比率為 7%，常見血清型中 *Salmonella ser. Typhimurium* 占 8% 較高。沙門氏菌對 cefotaxime 抗藥比率為 11%，常見血清型中，*Salmonella ser. Typhimurium* 占 20%、Enteritidis 占 3%、Newport 占 10%。沙門氏菌對 ceftazidime 抗藥比率為 10%，常見血清型中，*Salmonella ser. Typhimurium* 占 18%、Enteritidis 占 3%、Newport 占 10%。

沙門氏菌對 Trimethoprim / sulfamethoxazole (SXT) 抗藥比率為 38%，常見血清型中，*Salmonella ser. Typhimurium* 占 35%、Enteritidis 占 19%、Newport 占 31%。沙門氏菌對 chloramphenicol 抗藥比率為 47%，常見血清型中，*Salmonella ser. Typhimurium* 占 53%、Enteritidis 占 6%、Newport 占 47%。沙門氏菌對 ampicillin 抗藥比率為 57%，常見血清型中，*Salmonella ser. Typhimurium* 占 85%、Enteritidis 占 45%、Newport 占 46%。沙門氏菌對 colistin

抗藥比率為6%，常見血清型中 *Salmonella ser. Typhimurium* 占6%，*Enteritidis* 占(45%)；*Enteritidis*對colistin的抗藥比率偏高，其原因與抗藥機制需進一步探討。沙門氏菌對carbapenem (ertapenem)尚無監測到抗藥性菌株。

所有測試結果同時提供本署感染管制組應用<sup>2</sup>。

## 2. 次世代全基因定序及抗藥基因分析

次世代菌株全基因體定序部分，已建立標準操作流程，撰寫相關標準操作程序書5份(附錄三~七)。為了進一步探討抗藥基因的傳播機制，本計畫也針對類似抗藥性圖譜的5株不同寄主來源菌株之次世代全基因體序列進行組裝及抗藥基因比對。

藥敏結果顯示，BL10、BL33、CS058、CD13.012、SD09.161這5株菌對β-內醯胺類抗生素(ampicillin)、第二代頭孢子素(cefotaxime, ceftazidime)、第三代頭孢子素(cefotaxime, ceftazidime)、奎諾酮類抗生素(ciprofloxacin、nalidixic acid)、胺基糖苷類抗生素(gentamicin、streptomycin)，氯黴素(chloramphenicol)、磺胺類藥物(sulfamethoxazole)、四環黴素(tetracycline)、甲氧苄啶類抗生素(trimethoprim)均具抗藥性(圖八)。

豬隻來源的BL10帶有22種抗藥基因，序列組裝後有5個質體，22種抗藥性基因分佈於其中4個質體(p220k、p113k、p11k、p10k)上。質體p220k大小為220,023 bp，具有16種抗藥性基因，分別屬胺基糖苷類(aminoglycosides: *strA*, *strB*, *aadA1*, *aadA2*, *aac(3)-IVa*, *aph(4)-Ia*, *aph(3')-IIa*)；氯黴素(chloramphenicol: *cmlA1*, *floR*)；巨環內酯類(macrolides: *mph(A)*)；奎諾酮類(quinolones: *oqxA*、*oqxB*)；鏈絲菌素(streptothricin: *sat*)；磺胺類(sulfonamides: *sul1*, *sul3*)；甲氧苄啶類(trimethoprim: *dfrA12*)。質體p113k大小為112,565 bp，具有3種抗藥性基因，分別屬胺基糖苷類



(aminoglycosides: *aac(3)-IId*、*aadA22*) 及  $\beta$ -內醯胺類抗生素 ( $\beta$ -lactam: *bla<sub>CMY-2</sub>*)。質體 p11k 大小為 11,080 bp，具有 4 種抗藥性基因，分別屬胺基糖苷類 (aminoglycosides: *strA*、*strB*)；磺胺類(sulfonamides: *sul2*)；四環黴素 (tetracycline: *tetA*)。質體 p10k 大小為 10,047 bp，具有 1 種抗藥性基因，屬於奎諾酮類 (quinolone: *qnrS1*)。而其他 4 株菌株分別帶有 20~22 種不等的抗藥基因，抗藥基因比較及質體整理如表二。

## 四、討論

### 1. 人畜共通病原菌沙門氏菌抗藥性

本(106)年度利用客製化之藥敏試劑盤測試1,277株沙門氏菌菌株，菌株來源有來自人、動物及肉品。Fluoroquinolones類抗生素(ciprofloxacin)及第三代cephalosporins類抗生素(cefotaxime及ceftazidime)常用於治療嚴重的沙門氏菌感染症。本計畫結果顯示目前沙門氏菌對於fluoroquinolones類抗生素(ciprofloxacin)及第三代cephalosporins類抗生素(cefotaxime及ceftazidime)抗藥性在10%左右，對照Lauderdale等人<sup>3</sup>分析1998-2002年台灣的臨床菌株抗藥性結果，顯示沙門氏菌對fluoroquinolones類抗生素及第三代cephalosporins類抗生素的抗藥比率有大幅增加的趨勢。過去常用的chloramphenicol及penicillins類抗生素(如ampicillin)，抗藥性約5成，已非治療沙門氏菌感染症的首選。本研究也發現，國內分離到的沙門氏菌對colistin抗藥性約5%，且人及動物來源菌株均有colistin抗藥菌株出現，雖然血清型Enteritidis抗colistin比例極高(45%)，但PCR分析431株colistin-resistant *S. Enteritidis* 菌株皆未發現攜有*mcr-1* gene<sup>4</sup>，因此*S. Enteritidis*的colistin抗藥機制需進一步探討。

### 2. 以次世代全基因定序(NGS)技術分析多重抗藥性菌株之抗藥基因

本計畫針對類似抗藥性圖譜的5株不同來源菌株之次世代全基因定序產生的序列進行進一步組裝及抗藥基因比對。這些菌株分別來自人類菌株(CD13.012 與 SD09.161)、動物來源：豬(BL10 與 BL33、雞(CS058)。序列比對結果發現這5株菌染色體序列相同，而且抗藥基因均位在4個共同質體。進一步分析抗藥基因與質體相關性，相同從豬隻身上分離來的BL33與BL10相似性最高，同樣具有5個相同質體，包含22種共同抗藥基因；其次從雞身上分離而來的CS058，則缺少p3.8k質體，且其p220k質體上的

*floR* 抗藥基因周遭發生缺失 (deletion)，只擁有 21 種抗藥基因；而人類來源的 CD13.012、SD09.161，都具有 p220k、p113k、p11k 及 p10k 質體，其中 CD13.012 缺少 p3.8k 質體，值得注意的是兩株菌皆具有具部份 DNA 序列刪除的 p113k 攜帶有 *bla*<sub>CMY-2</sub> 的質體，與其他三株菌所攜帶的 p113k 質體差異較大，除組成略有不同，也缺乏 *aac(3)-IId*、*aadA22* 抗藥基因，此兩株菌各攜帶有 20 種抗藥基因。

從上述比對到的資料可發現，p220k、p113k、p11k、p10k 為動物及人類來源的菌株所共有，p113k 質體推測為較晚期進入菌株，人與動物分離株之 p113k 差異較大。具第三代頭孢子素抗藥性的抗藥基因 *bla*<sub>CMY-2</sub> 在國內的醫學中心廣泛流傳，因此可能有不同的攜帶有 *bla*<sub>CMY-2</sub> 質體在傳播，此外，p220k 帶有 *sat* 這個抗藥基因，可產生乙醯酶(acetyltransferase)，使鏈絲菌素(streptothricin) 因乙醯化而失去活性。鏈絲菌素為動物用藥，暗示此多重抗藥質體 p220k 可能起源於動物。

本計畫使用次世代定序工具，分析 5 株動物與人類來源菌株的抗藥基因與其載體，發現 5 株菌株攜帶有至多 22 個相同的抗藥基因，這些基因位於 4 個共同的質體，抗藥基因與質體的高度同源性也顯示抗藥基因在人與動物間傳播的流行病學關聯性。

## 五、結論與建議

### 結論部分

1. 訂定沙門氏菌藥物敏感性試驗標準操作流程，可用於沙門氏菌藥敏試驗，所得到的藥敏試驗結果可相互進行比對，有利於沙門氏菌抗藥性的長期監測。完成次世代定序的標準操作流程，建立國家公衛實驗室利用新科技探討細菌株抗藥性的量能。
2. 5 株人、動物來源之多重抗藥沙門氏菌株，攜帶相同的抗藥基因(至多 22 種抗藥基因)，且抗藥基因分布在 4 個質體中，指出多重抗藥菌株在人、畜間傳播流行之流行病學關聯性。

### 建議部分

1. 本計畫訂定了人類沙門氏菌藥物敏感性試驗之標準化操作流程，但在 GHSA 計畫中，農方亦執行沙門氏菌抗藥性的研究，唯雙方之藥敏試驗操作方法、測試藥物種類與濃度範圍可能不同，產生之結果雙方難以比較。因此衛方與農方應討論，訂定共同的藥物敏感性試驗操作流程，以產生可相互比較之藥敏試驗結果，提供抗生素管制政策的規劃參考。
2. 本研究進行 5 株人、動物來源之多重抗藥沙門氏菌株的抗藥基因與其載體，顯示多重抗藥菌株在人、動物間傳播流行的關聯。然而，探討之菌株有限，仍有待衛方與農方合作，進行大規模的人、動物分離株間之基因與載體之探討，取得穩固之證據數據，做為抗生素用藥管理之參考依據。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

人、動物來源多重抗藥沙門氏菌株之抗藥機制研究結果，證明多重抗藥沙門氏菌株在人、動物間傳播的流行病學關聯性。衛方與農方擴大比對人、動物菌株之藥敏測試資料與基因分析資料，進行資訊交換，做為擬訂政策之科學依據。

## 七、參考文獻：

- 1 Zankari, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2640-2644, doi:10.1093/jac/dks261 (2012).
- 2 疾病管制署感染管制及生物安全組. 2016 年台灣沙門氏菌抗藥性監測報告. (2017).
- 3 Lauderdale, T. L. *et al.* Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **55**, 149-155, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.01.002 (2006).
- 4 Chiou, C. S. *et al.* Dissemination of mcr-1-Carrying Plasmids among Colistin-Resistant *Salmonella* Strains from Humans and Food-Producing Animals in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, doi:10.1128/AAC.00338-17 (2017).

八、圖、表

表一、2016 年沙門氏菌株抗藥比率統計(單位%)

	<i>S. Typhimurium</i> (n = 249)			<i>S. Enteritidis</i> (n = 124)			<i>S. Newport</i> (n = 100)			All serotypes (n = 1,277)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Cefotaxime (FTX)	20%	0%	80%	3%	0%	97%	10%	0%	90%	11%	0%	89%
Ceftazidime (CAZ)	18%	1%	81%	3%	0%	97%	10%	0%	90%	10%	0%	89%
Ertapenem (EPT)	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Nalidixic Acid (NAL)	9%	0%	91%	15%	0%	85%	9%	0%	91%	22%	0%	78%
Ciprofloxacin (CIP)	8%	12%	80%	0%	15%	85%	1%	16%	83%	7%	23%	70%
Gentamicin (GEN)	28%	4%	68%	2%	0%	98%	23%	4%	73%	16%	5%	79%
Ampicillin (AMP)	85%	0%	15%	45%	0%	55%	46%	0%	54%	57%	0%	42%
Chloramphenicol (CHL)	53%	2%	44%	6%	2%	92%	47%	1%	52%	47%	3%	51%
Streptomycin (STR)	73%	4%	22%	19%	0%	81%	25%	4%	71%	41%	11%	48%
Sulfamethoxazole (SUL)	83%	0%	17%	32%	0%	68%	32%	0%	68%	56%	0%	44%
Tetracycline (TCY)	83%	0%	17%	28%	2%	70%	63%	0%	37%	61%	0%	39%
Trimethoprim / sulfamethoxazole (SXT)	35%	0%	65%	19%	0%	81%	31%	0%	69%	38%	0%	62%
Colistin (COL)*	4%	0%	96%	45%	0%	55%	0%	0%	100%	6%	0%	94%
Cefoxitin (FOX)	18%	2%	80%	4%	1%	95%	9%	1%	90%	11%	3%	86%

表二、人與動物來源菌株之抗藥基因比較

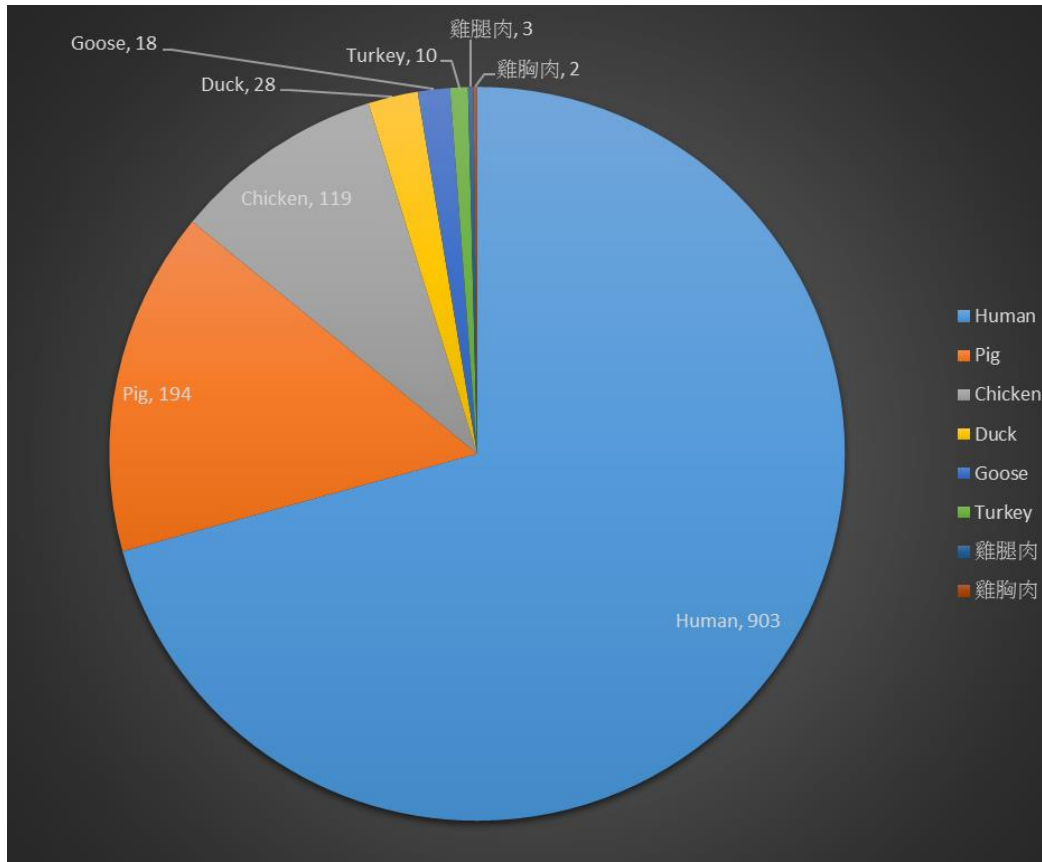
<b>Strain</b>	<b>BL10</b>	<b>BL33</b>	<b>CS058</b>	<b>CD13.012</b>	<b>SD09.161</b>
<b>p220k</b>	<i>strA</i>	<i>strA</i>	<i>strA</i>	<i>strA</i>	<i>strA</i>
	<i>strB</i>	<i>strB</i>	<i>strB</i>	<i>strB</i>	<i>strB</i>
	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>
	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>
	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>
	<i>aac(3)-IVa</i>	<i>aac(3)-IVa</i>	<i>aac(3)-IVa</i>	<i>aac(3)-IVa</i>	<i>aac(3)-IVa</i>
	<i>aph(4)-Ia</i>	<i>aph(4)-Ia</i>	<i>aph(4)-Ia</i>	<i>aph(4)-Ia</i>	<i>aph(4)-Ia</i>
	<i>aph(3')-IIa</i>	<i>aph(3')-IIa</i>	<i>aph(3')-IIa</i>	<i>aph(3')-IIa</i>	<i>aph(3')-IIa</i>
	<i>cmlA1</i>	<i>cmlA1</i>	<i>cmlA1</i>	<i>cmlA1</i>	<i>cmlA1</i>
	<i>floR</i>	<i>floR</i>		<i>floR</i>	<i>floR</i>
	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>
	<i>oqxA</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxA</i>
	<i>oqxB</i>	<i>oqxB</i>	<i>oqxB</i>	<i>oqxB</i>	<i>oqxB</i>
	<i>sat</i>	<i>sat</i>	<i>sat</i>	<i>sat</i>	<i>sat</i>
	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>
	<i>sul3</i>	<i>sul3</i>	<i>sul3</i>	<i>sul3</i>	<i>sul3</i>
	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>
<b>p113k</b>	<i>aac(3)-IIId</i>	<i>aac(3)-IIId</i>	<i>aac(3)-IIId</i>		
	<i>aadA22</i>	<i>aadA22</i>	<i>aadA22</i>		
	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
<b>p11k</b>	<i>strA</i>	<i>strA</i>	<i>strA</i>	<i>strA</i>	<i>strA</i>
	<i>strB</i>	<i>strB</i>	<i>strB</i>	<i>strB</i>	<i>strB</i>
	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>
	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>
<b>p10k</b>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>
<b>Type of AMR genes</b>	22	22	21	20	20
<b>Number of AMR genes</b>	25	25	24	23	23

圖一、藥敏試劑盤 (NHRISAL7)設計

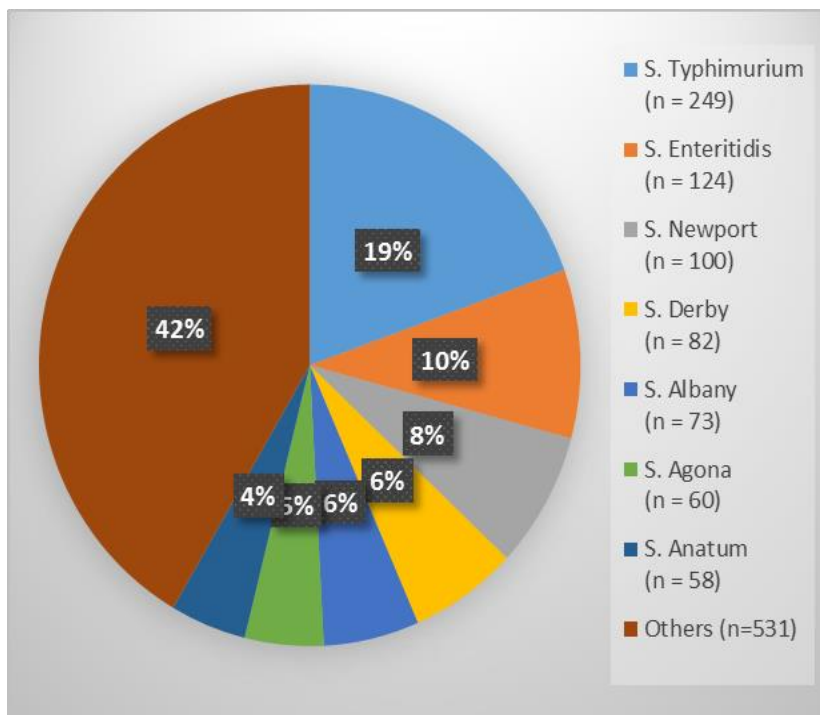
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 0.5	TAZ 0.25	STR 2	CHL 2	GEN 0.25	GEN 0.5	GEN 1	GEN 2	GEN 4	GEN 8	GEN 16	GEN 32
B	AMP 1	TAZ 0.5	STR 4	CHL 4	SXT 0.25	SXT 0.5	SXT 1	SXT 2	SXT 4	SXT 8	SXT 16	SXT 32
C	AMP 2	TAZ 1	STR 8	CHL 8	TET 0.5	TET 1	TET 2	TET 4	TET 8	TET 16	TET 32	TET 64
D	AMP 4	TAZ 2	STR 16	CHL 16	FOT 0.06	FOT 0.12	FOT 0.25	FOT 0.5	FOT 1	FOT 2	FOT 4	FOT 8
E	AMP 8	TAZ 4	STR 32	CHL 32	FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4
F	AMP 16	TAZ 8	STR 64	CHL 64	NAL 4	NAL 8	NAL 16	NAL 32	NAL 64	NAL 128	ERT 0.125	ERT 0.25
G	AMP 32	TAZ 16	STR 128	CHL 128	FIS 16	FIS 32	FIS 64	FIS 128	FIS 256	FIS 512	ERT 0.5	ERT 1
H	CIP 0.03	CIP 0.06	CIP 0.125	CIP 0.25	CIP 0.5	CIP 1	CIP 2	CIP 4	CIP 8	CIP 16	NC CON	POS CON



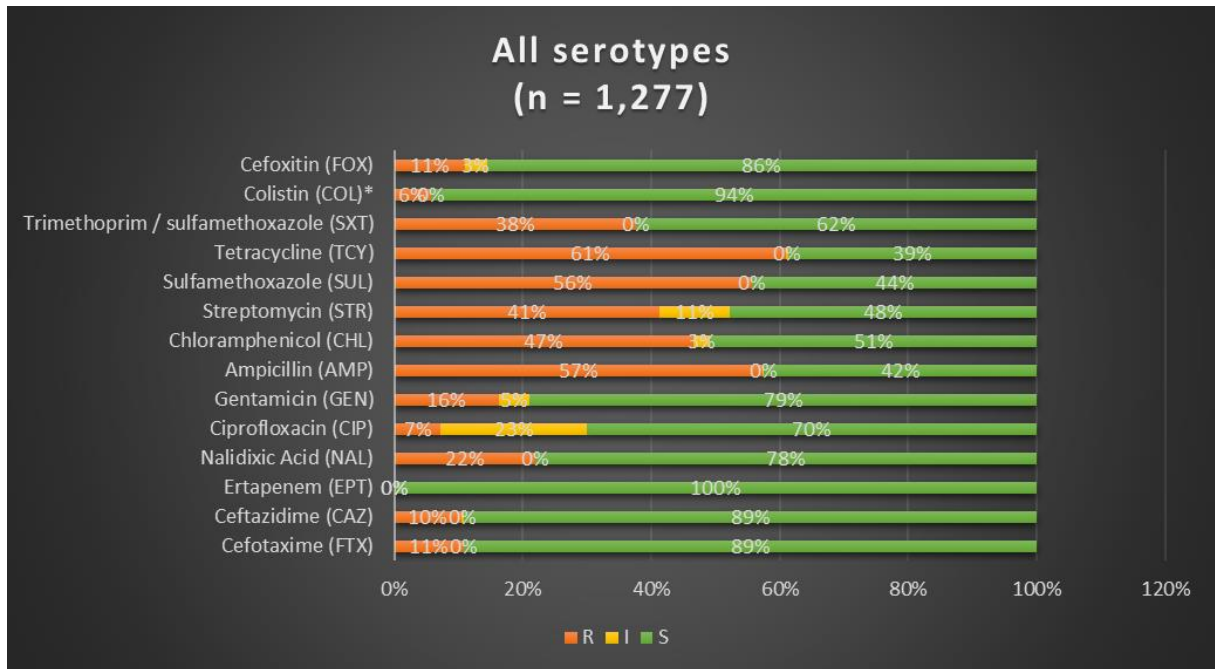
圖二、菌株來源分佈



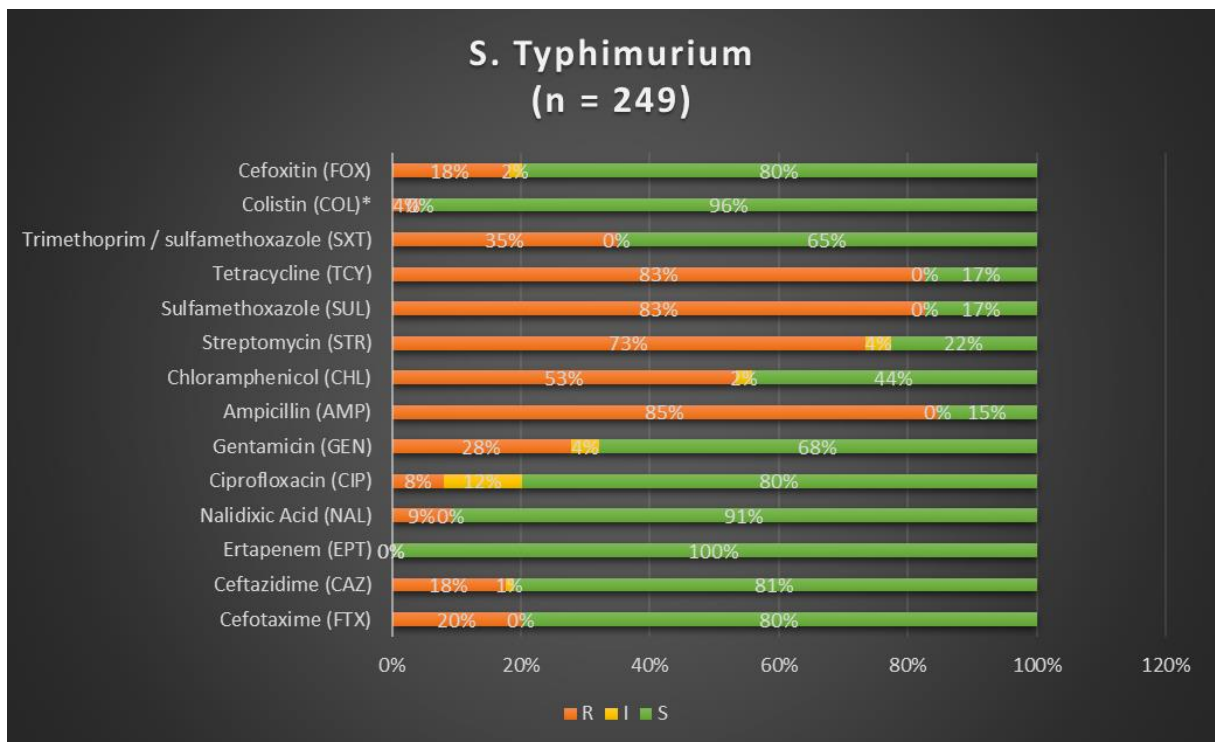
圖三、菌株血清型分佈



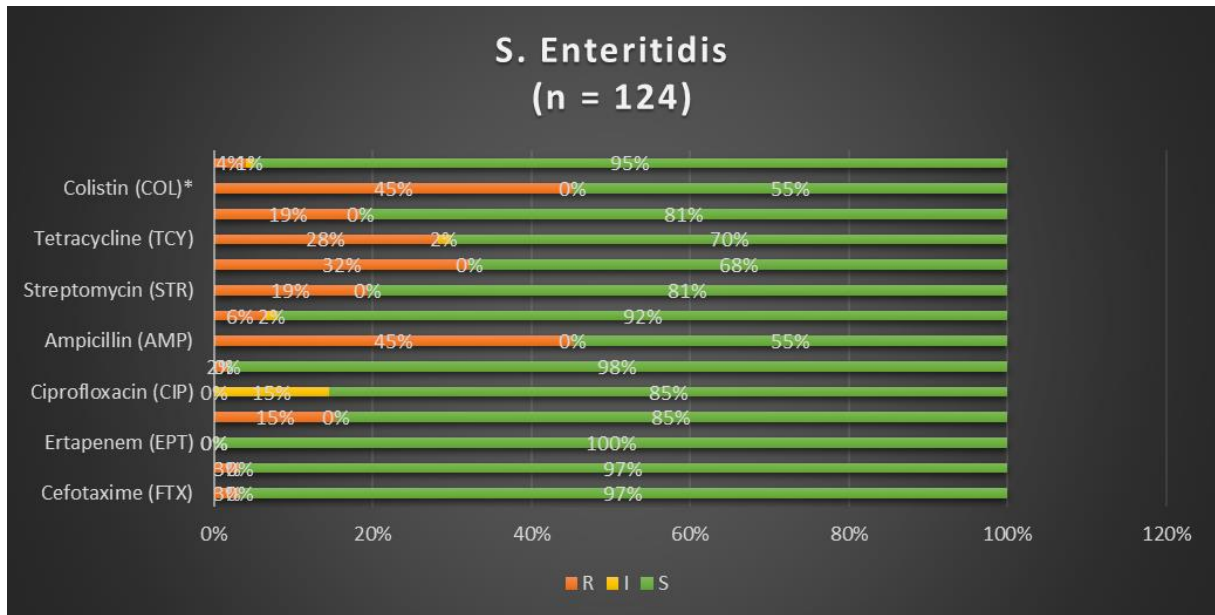
圖四、抗藥性分佈 (All serotypes)



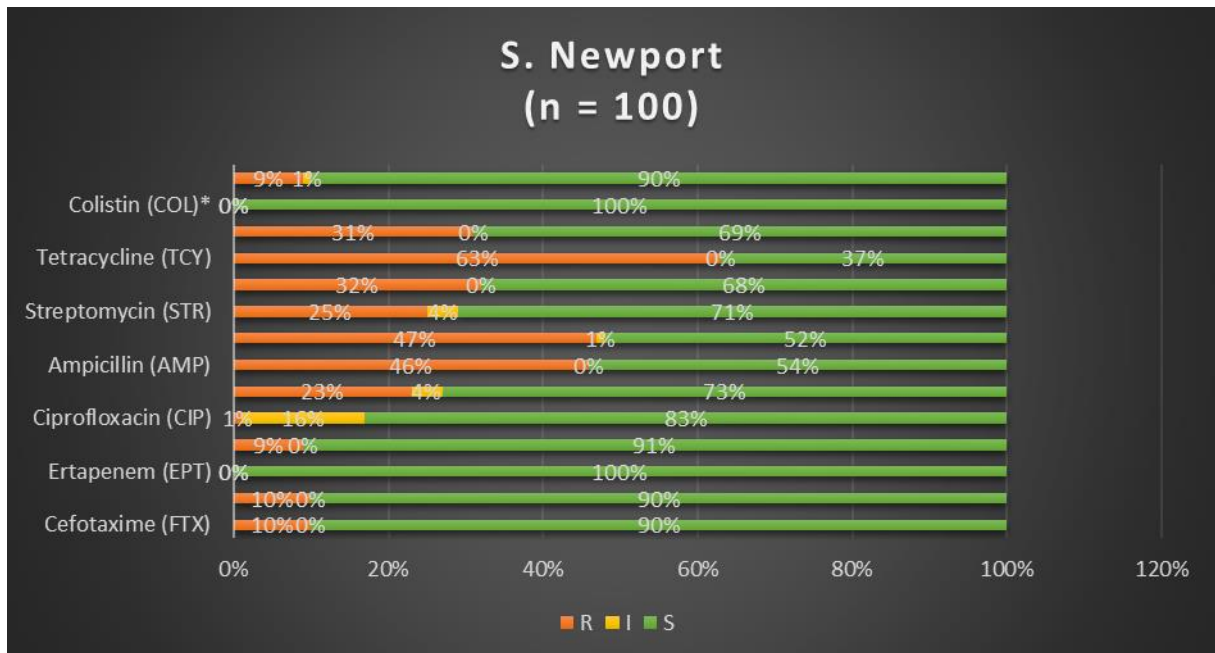
圖五、抗藥性分佈 (S. Typhimurium)



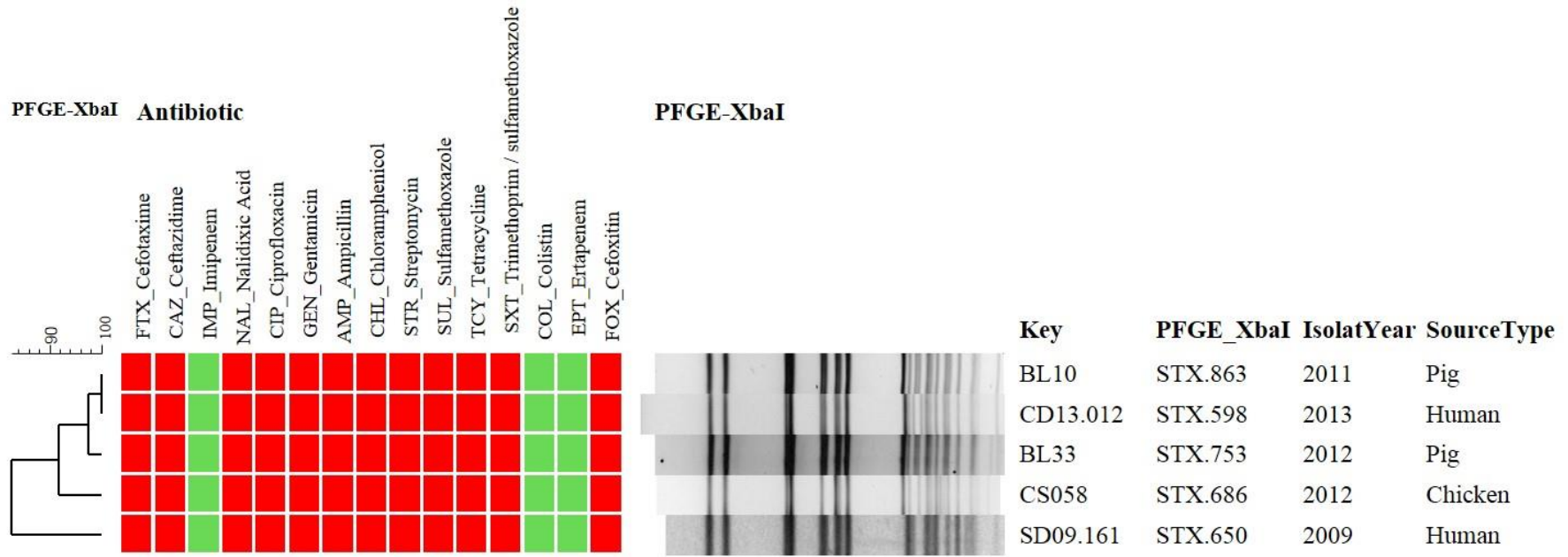
圖六、抗藥性分佈 (S. Enteritidis)



圖七、抗藥性分佈 (S. Newport)



圖八、不同來源分離菌株之抗藥性圖譜與遺傳關連性



## 九、附錄

### 附錄一、藥敏試劑盤 (NHRISAL7) 抗生素種類與濃度範圍

	SAL7	EFSA
ANTIMICROBICS	Concentration (µg/mL)	Concentration(µg/mL)
Ampicillin(AMP)*	0.5-32	0.5-64
Tetracycline(TET)	0.5-64	0.5-64
Nalidixic Acid(NAL)*	4-128	2-256
Ceftazidime(TAZ)**	0.25-16	—
Ciprofloxacin(CIP)*	0.03-16	0.008-8
Gentamicin(GEN)	0.25-32	0.25-32
Trimethoprim / sulfamethoxazole (SXT)***	0.25-32	0.25-32 (Trimethoprim only)
Chloramphenicol(CHL)	2-128	2-256
Streptomycin(STR)	2-128	2-256
Sulfamethoxazole (SMX)*	16-512	8-1024
Cefotaxime(FOT)	0.06-8	0.06-8
Cefoxitin(FOX)**	4-32	—
Colistin(COL)**	0.5-4	—
Ertapenem(ERT)**	0.125-1	—

\*與 EFSA 相比較，抗生素濃度範圍有調整。

\*\*EFSA 無建議濃度範圍。

\*\*\*EFSA 建議濃度為 Trimethoprim only

附錄二、腸內菌科(*Enterobacteriaceae*)的藥敏試驗判定準則

Graded*	CLSI† Antibiotic Classification	Antibiotics	Antibiotic concentration range (µg/mL)	MIC Interpretation criteria (µg/mL)			Interpretation basis‡
				S	I	R	
I	Aminoglycosides	Gentamicin	0.25-32	≤4	8	≥16	1
		Streptomycin	2-128	≤16	-	≥32	2
	Cephems	Cefotaxime	0.06-8	≤1	2	≥4	1
		Ceftazidime	0.25-16	≤4	8	≥16	1
	Lipopeptides	Colistin	0.5-4	≤2	-	≥4	3
	Penems	Ertapenem	0.12-1	≤0.5	1	≥2	1
		Imipenem	0.25-2	≤1	2	≥4	1
	Penicillins	Ampicillin	0.5-32	≤8	16	≥32	1
	Quinolones	Ciprofloxacin	0.03-16	≤0.06	0.12 -0.5	≥1	1
Nalidixic Acid		4-128	≤16	-	≥32	2	
II	Cephems	Cefoxitin	4-32	≤8	16	≥32	1
	Folate pathway inhibitors	Sulfamethoxazole	16-512	≤256	-	≥512	2
		Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX)	0.25/4.75 -32/608	≤2/38	-	≥4/76	1
	Phenicols	Chloramphenicol	2-128	≤8	16	≥32	1
	Tetracyclines	Tetracycline	0.5-64	≤4	8	≥16	1

\*Graded by WHO Critically important antimicrobials for human medicine-4th rev.: I , Critically Important; II , Highly Important.

† CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

‡ Interpretation basis : 1-CLSI M100-S27 , 2-2014 NARMS Integrated Report, the US , 3-CDC, Taiwan ; 1>2>3.

附錄三、沙門氏菌藥物敏感性試驗最低抑菌濃度測定標準操作程序

附錄四、基因體 DNA(gDNA)萃取標準操作程序

附錄五、雙股 DNA 濃度測定(Qubit 螢光法)標準操作程序

附錄六、次世代全基因定序文庫建構與品管 (NGS Library prep&QC) 標準操作程序

附錄七、MiSeq 上機操作標準作業程序

附錄八、MiSeq 下機數據品管標準作業程序