

國立臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所

碩士論文

Graduate Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene

College of Public Health

National Taiwan University

Master Thesis

台北市都市汙水處理廠與某實驗農場

環境水中大腸桿菌抗藥性之探討

Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* in
Wastewater of Two Municipal Wastewater Plants and One
Experimental Farm in Taipei City

黃詩雅

Shih-Ya Huang

指導教授：詹長權 教授

Advisor: Chang-Chuan Chan, Ph.D.

中華民國 108 年 8 月

August 2019



致謝

在此論文完成前夕，我在此想對本院指導教授暨口試委員詹長權教授、口試委員臺大醫院盛望徽醫師、流行病學與預防醫學研究所林先和教授、義大醫院醫研部微生物及病毒研究室的許淳茹博士致上誠摯的感謝，使我能完成本研究，並了解研究中不足與改進的方向。

由於詹教授對本項議題的重視與資源，讓我能夠展開探索環境中細菌抗藥性此議題的研究可能，並有幸與盛望徽醫師所帶領的台灣大學附設醫院感染管制中心合作，該中心同仁提供的技術與實驗室場地協助，對於我完成研究助益良多。在論文撰寫過程中，也感謝共同指導的吳涵涵專案助理教授、以及臺大醫院感染科楊佳鈴醫師，對於文獻整理及討論方式提供建議；也感謝 722 實驗室的大家，與親友們相同地在日常生活與精神上給予我的支持。

能夠根據以往的藥學背景訓練，進入環境衛生的研究視野，完成以公共衛生主題的論文，是我在本研究中感到最珍貴的部份，唯深感學藝仍未臻精進，學海浩瀚無垠，謹以此文感謝過程中各位老師與先進的指導與包容。

研究生 黃詩雅

寫於台北 2019.08.14

中文摘要



背景

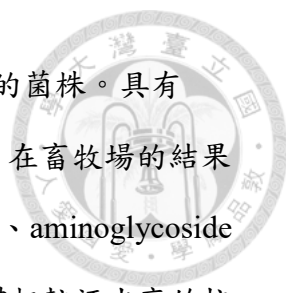
微生物對抗生素之抗藥性 (antimicrobial resistance) 在近年來成為全球公共衛生關注的重要議題之一，隨著世界衛生組織、聯合國糧食及農業組織和世界動物衛生組織提出整體防疫 (One Health) 的概念，近來研究開始探討潛在環境中與健康的人類與動物宿主的病原菌，其抗藥性隨宿主跨地域、跨國界傳播之機制，期望由整體環境的傳播途徑，減緩抗藥性的傳播。本研究選定台北市兩處污水處理廠、一處實驗農場之畜牧區，依據場址中排放汙廢水之處理過程選定採樣點，選定自來水指標檢測之一大腸桿菌為標定細菌，檢測各採樣點水中大腸桿菌對不同分類抗生素之抗藥性比例與表現型之分布，目的為瞭解都市污水處理設施與畜牧場兩類型場址水中大腸桿菌抗藥性特性，並討論其潛在之公共衛生危害，作為未來健康政策管制可參考之基礎。

材料及方法

採樣分別於 108 年 3 月 11 日、108 年 3 月 25 日進行，並於採樣完畢立刻送至臺灣大學附設醫院感控中心實驗室冷藏，於同一日下午進行塗抹培養。各採樣點取兩瓶水樣，合計為污水廠 $N = 12$ ，畜牧場 $N = 8$ 。依序以 chromID™ Coli media 區分性培養基、吡啶反應試驗確認、紙錠試驗篩選、VITEK™ 2 Compact System 鑑定菌株。

結果

研究結果顯示，台北市污水廠接收家戶及事業用水的入流水中，大腸桿菌除了對於第一線治療抗生素，如 ampicillin-sulbactam、窄效性 cephalosporins 類 (cefazolin、cefuroxime)、葉酸合成抑制類 trimethoprim-sulfamethoxazole 等具抗藥性之外，也對於後線治療之廣效性抗生素，如廣效性 cephalosporin 類與 cephamycin 類 (ceftriaxone、ceftazidime、cefepime、cefmetazole、flomoxef 等) 與 quinolone (levofloxacin、ciprofloxacin) 具抗藥性。並發現了多重抗藥性菌株的



存在，但尚未檢測到對廣效性後線抗生素 carbapenem 具抗藥性的菌株。具有 ESBL 抗藥性表型也佔了 62.2%（迪化廠）與 72.7%（內湖廠）。在畜牧場的結果顯示，畜牧場菌株主要對 ampicillin-sulbactam、cephalosporin 類、aminoglycoside 類、trimethoprim-sulfamethoxazole 等抗生素具抗藥性，除了整體相較汗水廠的抗藥性比例顯著較低，也未對 cephamycin 類、 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類、quinolone 類、carbapenem 類等較廣效性與後線的抗生素表現抗藥性；畜牧場菌株的野生型佔 62%至 78%，抗藥性表型主要為 acquired penicillinase 與 high-level cephalosporinase (AmpC)併有 ESBL 的表型。

關鍵詞：微生物、大腸桿菌、抗藥性、多重抗藥性、抗藥性表型、汗水處理系統、畜牧、整體防疫

Abstract



Background

Microbial resistance to antibiotics has become one of the most important global public health concerns in recent years. Existing studies have explored the pathogens in the living environment of healthy human and animal hosts. Such resistance to medicines, and transmission of resistance in the environment, transcends regional or state borders. It is expected that the transmission of drug resistance will be slowed down by better antibiotic use and recognizing the overall geographical resistance transmission pathway.

In this study, two wastewater treatment plants (WWTPs) in Taipei City and a livestock farm of National Taiwan University (NTU) were selected as sampling sites. According to the wastewater treatment process, ten sampling points were selected. *Escherichia coli* resistance prevalence and resistant phenotypes among these sampling points were identified. The purpose is to understand the characteristics of *E. coli* resistance in the waters of urban wastewater treatment facilities and livestock farms and to discuss its potential public health hazards, as a reference for future health policy.

Material and Methods

The sampling was carried out on March 11th and 25th, 2019. Samples were immediately sent to the laboratory of Center for Infection Control of Taiwan University Hospital for refrigeration. The enumeration and smear culture were carried out on the same day. Two samples of wastewater were taken at each sampling point, which totaled 12 grab samples for the two sewage plants and 8 grab samples for the livestock farm. The bacteria strains were identified by chromIDTM Coli media discriminating medium, Indole reaction assay confirmation, disk diffusion screening, and VITEKTM 2 Compact System.



Results

The results show that in the inflow water at the sewage treatment plant in Taipei City, which receiving households and business water, *E. coli* show resistance to the first-line treatment of antibiotics, such as ampicillin-sulbactam, narrow-acting cephalosporins (cefazolin, cefuroxime) and folate synthesis inhibitor trimethoprim-sulfamethoxazole, in addition to broad-acting antibiotic for post-line treatment, such as the broad-spectrum cephalosporin and cephamycin (ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, cefmetazole, flomoxef, etc.) and quinolone (levofloxacin, ciprofloxacin). The presence of multi-drug resistant strains was also discovered, while no strains revealed resistance to last-line broad-spectrum antibiotic such as carbapenem (ertapenem and imipenem). The ESBL resistant phenotype also accounted for 62.2% (Dihua Plant) and 72.7% (Neihu Factory). The results in the livestock farm showed that the livestock farm strains were mainly resistant to first-line antibiotics such as ampicillin-sulbactam, cephalosporin, aminoglycoside, trimethoprim-sulfamethoxazole, etc., except that the prevalence of antimicrobial resistance was much lower than that of the sewage plants. Resistance to cephamycin, β -lactam combined β -lactamase inhibitors, quinolones, carbapenem and other broad-spectrum antibiotics were not detected; wild-type strains accounted for 62% to 78%, and the drug resistance phenotype was mainly acquired penicillinase and high-level cephalosporinase (AmpC) with an ESBL phenotype.

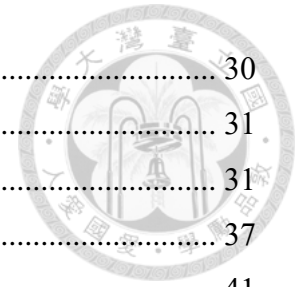
Keywords: microbial, *Escherichia coli*, Antimicrobial resistance, AMR, multi-drug resistance, resistant phenotype, wastewater treatment plant, livestock farm, One Health

目錄



致謝	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	v
目錄	1
圖目錄	3
表目錄	4
第一章 前言	5
1.1 研究背景	5
1.2 研究目的	7
第二章 文獻回顧	9
2.1 細菌對抗生素的抗藥性	9
2.1.1 抗藥性	9
2.1.2 乙內醯胺分解酶 (β -lactamases)	10
2.1.3 產廣效性乙內醯胺分解酶與致病性大腸桿菌流行病學	11
2.2 環境、細菌抗藥性生態與傳播	13
第三章 材料與方法	16
3.1 研究架構	16
3.2 樣本來源	17
3.2.1 採樣場址	17
3.2.2 採樣點	19
3.2.3 污水處理廠流程	19
3.2.4 水體採樣	20
3.3 大腸桿菌篩選與抗生素敏感性鑑定	20
3.3.1 實驗材料	21
3.3.2 細菌培養	21
3.3.3 乙內醯胺分解酶表現型大腸桿菌菌株篩選	23
3.3.4 菌株分生與藥敏性鑑定	24
3.4 統計分析	27
第四章 結果	28
4.1 大腸桿菌篩選	28
4.1.1 大腸桿菌菌落數估計	28

4.1.2	大腸桿菌菌株數	30
4.2	污水廠大腸桿菌抗藥性	31
4.2.1	抗藥性比例	31
4.2.2	乙內醯胺分解酶表型比例	37
4.2.3	多重抗藥性菌株	41
4.3	畜牧場大腸桿菌抗藥性	41
4.3.1	抗藥性比例	41
4.3.2	乙內醯胺分解酶表型比例	46
第五章	討論與總結	49
5.1	汙廢水中大腸桿菌抗藥性	49
5.2	環境水體中細菌抗藥性之研究重點及未來建議	50
5.3	研究限制	52
第六章	參考文獻	53
第七章	附錄	59
7.1	採樣紀錄表	59
7.2	VITEK™ 2 Compact System	60
7.2.1	藥敏卡片設定	60
7.2.2	AES 系統判讀畫面	60



圖目錄



圖 1. 細菌抗藥性傳播風險評估模式.....	6
圖 2-1. 水體採樣與大腸桿菌菌株鑑定步驟.....	16
圖 2-2. 大腸桿菌菌株鑑定培養基與 VITEK™ 2 Compact System.....	16
圖 3. 採樣場址相對地理位置.....	17
圖 4. 汙水處理廠處理程序與採樣點.....	19
圖 5. 畜牧場處理程序與採樣點.....	19
圖 6. 各採樣點大腸桿菌平均菌量估計.....	28
圖 7-1. 迪化汙水廠大腸桿菌抗藥性比例.....	34
圖 7-2. 內湖汙水廠大腸桿菌抗藥性比例.....	35
圖 8. 畜牧場大腸桿菌抗藥性比例.....	44

表目錄



表 1. 大腸桿菌菌落數估計.....	29
表 2. 各階段篩選大腸桿菌菌株數.....	30
表 3. 汗水廠大腸桿菌抗藥性比例.....	33
表 4. 汗水廠大腸桿菌抗藥性表型比例.....	39-40
表 5. 畜牧場大腸桿菌抗藥性比例.....	43
表 6. 畜牧場大腸桿菌抗藥性表型比例.....	47-48

第一章 前言



1.1 研究背景

當今探討微生物對治療藥物的耐受性時，細菌對抗生素的抗藥性 (Antimicrobial resistance; AMR) 已逐漸成為全球公共衛生關注的重要議題。細菌 (bacteria) 屬於原核生物 (prokaryote) 其中一支，存在地球上至今三十多億年，廣泛生存在自然環境例如土壤與水中。本文以下考慮細菌抗藥性的問題時，將範圍稍加限縮，主要討論與人類或動物宿主共生的細菌及病原菌 (pathogenic bacteria)。當細菌生存於人類與動物體內或體表，可經由個體排泄物或接觸的介質之間短暫地傳播，例如經由呼吸的空氣、飲用水、食物等途徑。青黴素，或稱盤尼西林 (penicillin) 是人類最早發現的抗生素，1928 年蘇格蘭生物學家弗萊明 (Alexander Fleming) 意外發現青黴素對金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 具有抑制生長作用，改變了此後感染症治療與藥物研發的歷史。抗生素治療使得人類及動物宿主大幅減少因感染症的死亡，然而細菌也在世代適應中獲得對抗生素之耐受性；自然界中細菌本就可對特定類別的抗生素不具感受性 (susceptibility)，可以視為其族群具有天然耐受性 (naturally resistant)，但引起醫療與公共衛生注意的則是細菌後天獲得並且適應後的抗藥性 (acquired resistance)，一旦特定菌種對曾經具感受性的藥物不再敏感，當中帶有抗藥性的部分菌株將可能影響整個物種 (American Academy of Microbiology, 2009)。如同 Fleming 於 1945 年發表的洞見 (Wright, 2005)：「微生物將快速學會抵抗盤尼西林，並繁殖且傳遞這樣的能力，終究他們將找到無法被盤尼西林所治療的敗血症或肺炎病人。」細菌可經由對抗生素產生耐受性，減低抗生素治療的成效，甚至加劇宿主患感染症後的死亡 (S.B. Levy, 2002)。在因感染症死亡趨緩的 21 世紀，抗藥性再度成為全球公共衛生的隱憂。世界衛生組織首先於 2001 年對抗生素抗藥性發表全球性應對策略，明確指出控制抗生素抗藥性的五大方針，包括監測、人類合理用藥、動物合理用藥、感染預防和控制以及支持研發創新藥物。世界衛



生組織於 2014 年再度提醒，若抗藥性的問題未受到慎重且立即的重視，感染症治療將會回到抗生素發展以前的舊時代 (pre-antibiotic era) (WHO, 2014)。隔年聯合國批准了抗藥性全球行動計畫 (Global Action Plan on AMR; GAP on AMR)，作為各會員國提出國家 AMR 行動計畫的示範 (WHO, 2015)。

世界衛生組織關於抗生素抗藥性的全球行動計畫中，要求抗生素在人類與動物健康使用上相關的改善，以及制訂評估日常用水和汗水中抗生素殘留風險的標準指引。兩年後，歐盟執行委員會 (European Commission; EC) 亦發表了一份歐洲整體健康／防疫的行動計畫 (European One Health Action Plan)，其中提到無法治療傳染病將會導致負面的公共衛生後果，與破壞性的全球經濟負擔 (Bürgmann et al., 2018)。

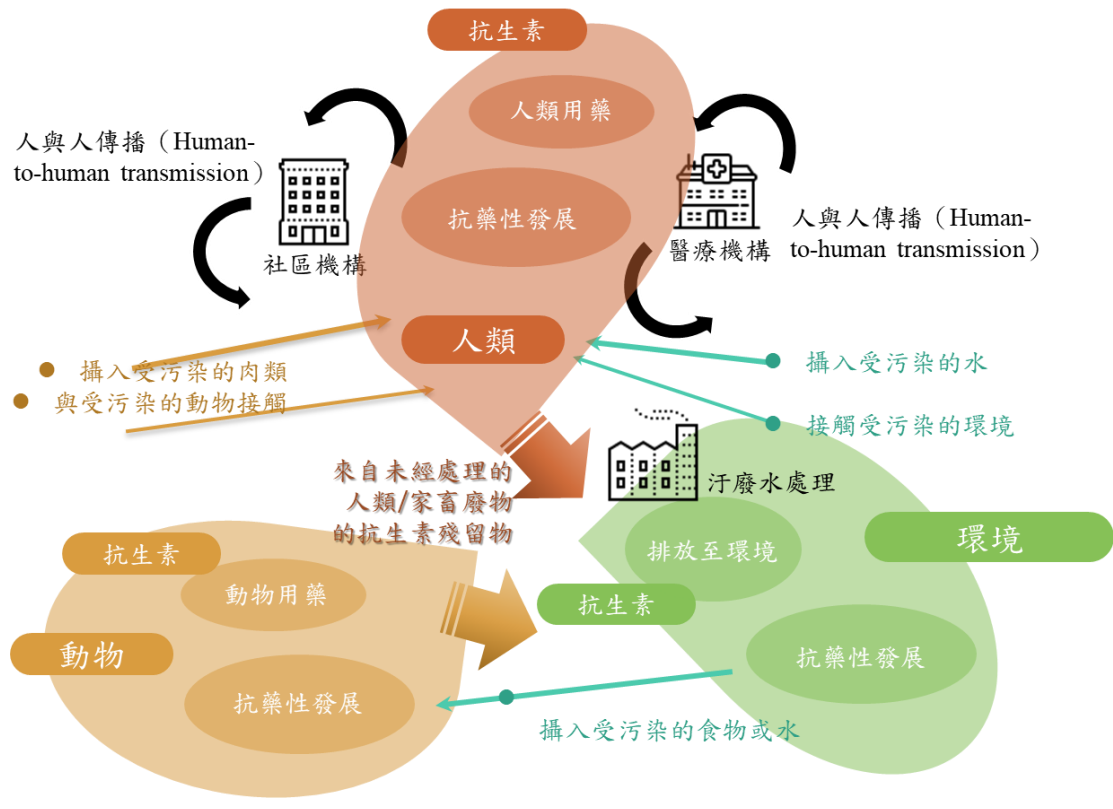



圖 1. 細菌抗藥性傳播風險評估模式 (參考 Chereau et al., 2017 繪圖)

圖 1. 為 Chereau 等人根據 WHO 會員國區域特性，描述出東南亞國家的地域性細菌抗藥性互相傳播的風險評估模式 (Chereau et al., 2017)，該模式認為抗藥性



發展可以分為三大情境，包括：(1) 人類用藥、於醫院機構及社區中人與人傳播造成抗藥性的發展；(2) 動物用藥致使抗藥性發展；(3) 環境中接收人類、畜牧場未經處理的抗生素殘留排放，促成抗藥性發展。在此三大情境之間可能的傳播方式，除了人與人的傳播，還包括攝入受汙染的肉類、與受汙染的動物接觸、攝入受汙染的食物或水、接觸受汙染的環境等暴露途徑。

在醫療機構發現的多重抗藥性細菌使得感染症治療、手術後感染預防、免疫力不全病患的感染症治療等變得困難，需要延長的治療時間、額外的檢驗及更昂貴的藥品支出。根據經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Co-operation and Development; OECD) 報告推估，全球每年約有七十萬人因細菌抗藥性問題死亡。而世界衛生組織亦推估，抗藥性細菌引起的致病率和死亡率是非抗藥性細菌的二至三倍，隨之而來的則是醫療保險與社會成本的負擔，甚至是多重抗藥性無適合藥物治療、傳染控制惡化的情況 (Harbarth et al., 2015)。國內外探討細菌抗藥性問題時，過往管制的焦點主要於醫療與照護機構內，探討抗生素選用產生對細菌的篩選壓力及院內感染管控 (Bell et al., 2002)。近年來研究則進一步探討潛在環境中與健康的人類與動物宿主的病原菌，其抗藥性隨宿主跨地域、跨國界傳播之機制 (Hsu et al., 2014; Price et al., 2013)。世界衛生組織、聯合國糧食及農業組織和世界動物衛生組織更提出整體防疫 (One Health) 的概念，呼籲由掌握整體環境的傳播途徑，減緩抗藥性的傳播 (Queenan, Hasler, & Rushton, 2016)。在動物用藥方面，抗生素使用佔有相當的比例，除了肉品中的藥物殘留管制以外，是否可能導致畜牧場排放之廢水成為如都市汙水處理系統之相似環境，增加對細菌耐藥性之選擇壓力，相關研究仍需陸續補足。

1.2 研究目的

本研究的目的是探討大腸桿菌在不同水生環境中的抗藥性表現，比較兩類都市環境中的汙水排放場址：汙水廠與實驗性畜牧場，依據場址中排放廢汙水之各

項過程選定採樣點，標的細菌為自來水指標檢測之大腸桿菌，該環境水中大腸桿菌對不同類的抗生素抗藥性比例、多重抗藥性菌株存在、以及乙內醯胺分解酶 (β -lactamase) 為主的抗藥性表型分布。



第二章 文獻回顧




2.1 細菌對抗生素的抗藥性

2.1.1 抗藥性

抗藥性發生可以是細菌細胞主動對單一個或同一類抗生素產生適應，也可能是被動地因細胞在生存環境中廣泛對外來的藥物產生適應的結果。被動抗藥性可以是細菌的一般適應過程，例如葛蘭氏陰性菌普遍具有細胞外膜屏障，細胞缺乏抗生素的結合標的、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的膜通透性較低等特性 (Bockstael & Van Aerschot, 2009)；主動適應通常與遺傳物質改變酵素蛋白合成相關，無論是直接因抗生素的存在而進行了遺傳的突變，或是獲得外在轉移、傳遞遺傳物質而來的抗藥性基因 (Corona & Martinez, 2013)。研究發現經由細胞酵素蛋白降解和修飾作用，抗生素與細胞的互動可因為以下數種機制呈現治療的抗性：阻止藥物與標的位置 (target) 作用、細胞將抗生素排除 (efflux)、藥物化學結構受到修飾 (modification) 而失去活性 (Wright, 2005)。

偵測細菌的抗藥性及抗生素敏感性試驗 (susceptibility test) 可僅藉由檢測菌株的體外抗生素感受性分界點 (breakpoint)，亦即由最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) 範圍定義是否對單一抗生素具有感受性或抗藥性，在臨床的定義上，各國大多採用美國的 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI，前身為 National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS) 或歐洲 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 指引，再以本地的檢測累積資料做為臨床治療參考 (Paterson, 2006)。除了 MIC，也可藉由表型 (phenotypic) 或基因型 (genetic) 等生化方式表示篩選結果 (Sanders et al., 2000)。相對於具抗藥性的分型，野生型表型 (wild type)，定義為「野生環境」中該細菌的表型，亦即在染色體基因的任何突變之前，或獲得新的遺傳物質導致改變對某藥物類別的易感性之前的分型。細菌在沒有遺傳改變的情況下呈現




抗藥性，可歸類為「表型抗性 (phenotypic resistance)」，非因遺傳相關之抗藥性 (non-inherited antibiotic resistance) 自遺傳基因研究技術逐漸成熟以後，在抗藥性研究獲得的關注度變少，然而在較初階的抗藥性研究或醫療臨床應用上仍然可做為流行病學監測計畫的觀察指標，並且，遺傳相關的抗藥性目前並無法作為細菌各菌種抗藥性發生的單一歸因 (Levin & Rozen, 2006)。表型篩選一般只經由基因產物確認，而不對所涉及的實際基因或基因序列進一步測試。

2.1.2 乙內醯胺分解酶 (β -lactamases)

Penicillin 類藥物對細菌的殺菌作用來自於化學結構上的乙內醯胺 (β -lactam) 官能基， β -lactam 可與細菌細胞壁上連結肽糖類 (peptidoglycan) 的肽轉移酶 (DD-transpeptidase) 結合，同時也可影響負責合成細菌細胞壁的酵素，進而破壞影響細菌細胞壁，也可藉由跟細菌細胞壁上的青黴素結合蛋白 (penicillin-binding proteins; PBPs)，阻礙細菌合成細胞壁的階段，導致細菌細胞崩解。細菌若已帶有乙內醯胺分解酶 (β -lactamase)，可水解藥物的乙內醯胺 (β -lactam) 官能基，降低 β -lactam 類抗生素的治療效果 (Lee et al., 2003)。


以大腸桿菌對 β -lactam 類藥物的表型為例，野生型缺乏任何顯著程度的 β -lactamase，因此仍然可對 ampicillin 和大多數其他 β -lactam 類抗生素具藥物敏感性 (susceptibility)。一旦菌株獲得經由水平遺傳物質 (例如質體) 主導 (plasmid-mediated) 的青黴素酶 (penicillinase) 如 TEM-1 或 SHV-1，便可對 penicillin 和頭孢菌素類 (cephalosporins) 抗生素例如 cephalothin 具有抗藥性，在試驗時呈現具有 penicillinase 之抗藥性表型。若菌株獲得由透過質體主導的 AmpC 乙內醯胺分解酶 (plasmid-mediated AmpC β -lactamases)，將對頭孢菌素類其中的 cephamycin 類藥物例如 flomoxef、以及大部分的 β -lactam 類抗生素失效。假使菌株獲得廣效性乙內醯胺分解酶 (extended-spectrum β -lactamase; ESBL)，或因 *bla*_{TEM} 或 *bla*_{SHV} 相關基因突變導致產生 ESBL 衍生物，則該菌株在試驗時將呈現具有 ESBL 表型，產 ESBL 的菌株對不僅是 penicillin、cephalothin，也對廣效性的頭孢菌素類



抗生素，如 cefotaxime、ceftriaxone、ceftazime，以及對 monobactam 類抗生素，如 aztreonam 等 β -lactam 藥物都降低了敏感性，進而發展為抗藥性，使藥物治療失效 (Sanders et al., 2000)。抗藥性經由質體水平傳播、藉由細胞複製垂直散播，帶有 ESBL 的質體因其抗藥性基因的突變共位 (co-location) 性質，使 ESBL 容易同時呈現對數類治療抗生素的多重抗藥性。產 ESBL 的細菌在 1980 年代出現，1990 年代以照護機構內感染的 *bla*_{TEM} 型、*bla*_{SHV} 型為主，*bla*_{CTX-M} 型產 ESBL 大腸桿菌在 2000 年中期始成為社區感染的優勢菌株 (Chong, Shimoda, & Shimono, 2018)。抗藥性基因型 *bla*_{CTX-M} 的產 ESBL 大腸桿菌菌株對廣效性頭孢菌素類 (cephalosporins) 抗生素、喹諾酮類 (quinolones) 抗生素、氨基糖苷類 (aminoglycosides) 抗生素，磺胺類 (sulfonamides) 抗生素的抗藥性之間的密切關係，大幅限制了大腸桿菌感染的治療選擇，導致後線廣效性抗生素碳青黴烯類 (carbapenems) 使用開始增加 (Sidjabat & Paterson, 2015)，2000 年往後大約十年間，產 KPC、NDM、IMP、OXA-48 等碳青黴烯酶 (carbapenemases) 的抗藥性菌株也陸續在腸桿菌科細菌中發現，產碳青黴烯酶大腸桿菌 (carbapenemase-producing *E. coli*) 不僅對前述抗生素具抗藥性，更對後線廣效性抗生素如碳青黴烯類 (carbapenems) 抗生素、弗斯黴素 (fosfomycin) 具抗藥性。

2.1.3 產廣效性乙內醯胺分解酶與致病性大腸桿菌流行病學

大腸桿菌為好氧性 (aerobic) 細菌，學名為 *Escherichia coli* (簡稱 *E. coli*)，與克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 同屬於腸桿菌科 (*Enterobacteriaceae*) 的葛蘭氏陰性細菌 (Gram-negative bacteria)。部分大腸桿菌在自然環境與人類腸道中普遍存在，也普遍共生於人類與動物的正常腸道菌叢，然而部分致病性大腸桿菌卻是人類感染常見的致病菌，可造成出血性腹瀉、腸胃炎、肺炎，尿道感染，全身性菌血症等各種感染症。這些帶有致病因子的大腸桿菌可分為造成腸外感染之大腸桿菌 (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) 及造成腸道感染之大腸桿菌兩大類。



最早被確認的產 ESBL 菌株發生在 1986 年歐洲的重症加護病房 (intensive care units; ICUs) 病人，到了 1990 年代，法國統計在社區感染 *K. pneumoniae* 當中有 25% 至 35% 的菌株為 ESBL 陽性；亞洲也在 1988 年確認第一個帶有 SHV-2 型 ESBL 的 *K. pneumoniae*。根據估計，在 2000 年期間，韓國、日本、馬來西亞和新加坡臨床感染的 *E. coli* 菌株中 5% 至 8% 為 ESBL 陽性，而在泰國，台灣，菲律賓和印度尼西亞則為 12% 至 24% (Ghafourian et al., 2015)。在 2008 年，一個新的大腸桿菌群序列類型 131 (sequence type 131; ST 131) 被確認出現在歐洲、亞洲與北美洲八個國家 (Nicolas-Chanoine et al., 2008)，僅在不到十年間，ST131 已是全球主要的腸外致病性大腸桿菌 (ExPEC) 菌株，而在過去十年間，由 ExPEC 引起的尿道感染使臨床治療變得棘手，此類菌株帶有的致病因子 (virulence factors) 與多重抗藥性增加了治療的複雜性、發病率與死亡率 (Hung et al., 2018)。研究發現多重抗藥性 ExPEC 菌株的盛行率的上升，尤其是 ST131 此序列類型菌株，往往帶有 ESBL，對經常用於尿道感染治療的廣效性 β -lactam 類抗生素、葉酸合成抑制劑如 trimethoprim-sulfamethoxazole、氟喹諾酮類 (fluoroquinolones) 都具有抗藥性。其中 *bla*_{CTX-M-15} 型 ESBL 是 ST131 中的主要基因型，並且越來越廣泛地在導致尿道感染與全身性菌血症的分離菌株中發現 (Hung et al., 2018; Price et al., 2013)。

由 *bla*_{CTX-M} 型產 ESBL 的大腸桿菌引起的社區感染在 2000 年中期出現，可移動遺傳物質主導的 ESBL 基因傳播存在環境、動物、人類之間，人類的移動例如跨國旅遊，也可能是不同地域之間產 ESBL 大腸桿菌傳播的路徑之一 (Arcilla et al., 2017)。在歐洲國家，20% 至 50% 的旅行者在旅行後糞便中菌叢表現出產 ESBL 菌株；在亞洲，尤其是南亞與東南亞，旅遊後獲得產 ESBL 細菌菌株比例則有 50% 至 70%。ESBL 的基因型在世界各地分布略有差異，但以 *bla*_{CTX-M-15} 最普遍；*bla*_{CTX-M-14} 在歐洲 (西班牙)、東亞較為常見；東南亞常見包括了 *bla*_{CTX-M-15} 與 *bla*_{CTX-M-14}；*bla*_{CTX-M-15} 在南亞 (印度) 是優勢基因型；*bla*_{CTX-M-27} 較少見，CTX-M-27 屬於 CTX-M-14 的單核苷酸變異體，*bla*_{CTX-M-27} 在東亞和東南亞已經逐漸普

及 (Chong et al., 2018)。台灣產 ESBL 之 *K. pneumoniae* 盛行率約 8.5%至 29.8%，產 ESBL 之 *E. coli* 約 1.5%至 16.7%，常見有 *bla_{SHV-5}*、*bla_{SHV-12}* 以及 *bla_{CTX-M-3}*、*bla_{CTX-M-14}* 等基因型 (Yu, Chuang, & Walther-Rasmussen, 2006)。




2.2 環境、細菌抗藥性生態與傳播

糞便污染的土壤和沈積物通常被認為是水中的病原體（包括細菌）的常見來源。在土壤表面，病原體釋放可能由於降雨和其他侵蝕過程而發生 (Bradford et al., 2013)。現代人類或動物活動製造的汗水排放，經由地下水道及汗水處理系統集中處理，一部分排入流域、海洋，少部分則可供利用。汗水處理系統通常指包括使用物理、化學、生物方式，將汗水中的固體與水分離、降低水中有機物質如氮氧化物、磷化物等濃度，並以生物處理，如曝氣，再加以過濾、消毒等程序，減少水中病原、微生物含量，再將處理水排放到環境中。

水資源是有限且不可替代的資源，根據世界衛生組織報告 (WHO, 2018)，2015 年全球有 71%（52 億人口）可享用安全的飲用水供給，安全的飲水意味著可於適當的場所取得、不受污染的水源，然而當到達 2025 年時，世界上將有一半的人口生存在水資源緊縮的環境。人類及動物活動排放之廢棄物及糞便亦會使水源遭受污染，細菌或非細菌型急性腹瀉、霍亂、細菌性瘧疾仍在飲用水受污染的情況下發生。預估全球每年因受污染的飲用水發生的腹瀉性死亡仍有 50 萬個案例。安全水源與汗水處理設施有關，管理良好的汗水處理設施可減少個人暴露於受污染水源的健康風險；而在傳統水資源開發日趨困難的情況，汗水回收再利用是達到環境永續的方案之一。聯合國永續發展目標 (Sustainable Development Goals; SDGs) 第六項要求飲用水安全與可及性，經由可追溯的汗水處理過程及科學性的評估，確保飲用水的安全。


台灣在都市發展過程中，政府自民國 81 年開始持續推動汗水下水道建設，因應降雨不均，生活、工業用水需求量增加，也規劃發展都市汗水處理後之可再生水利用，根據經濟部水利署民國 105 年《下水道系統再生水利用技術參考手



冊》，預估民國 120 年我國再生水目標量為每日 132 萬立方公尺 (CMD)。就再生水系統而言，暴露於處理不當的再生水可能造成微生物感染風險，為確保再生水之安全，在驗證監測方面，監測項目與結果均必須符合水質標準及用途規範，其中，微生物是驗證監測之首要項目，目的是確認再生水無致病菌。一般水處理後，自來水以大腸桿菌作為水中指標之微生物。

過去幾十年來，人類和動物用藥、畜牧業和水產養殖中抗生素的廣泛使用，導致了許多環境中抗藥性細菌的傳播。抗生素一旦被釋放到各種環境中，最終主要通過廢水排放和農業徑流進入水生系統。未完全生物降解的抗生素與代謝物，可能對細菌產生選擇性壓力，導致環境中抗生素抗性菌株的成長 (Kummerer, 2004)。此外，通過可移動性遺傳物質在細菌之間轉移抗藥性基因，是另一種可能的機制。醫院中廣泛存在的多重抗藥性 (multidrug-resistant, MDR) 細菌越來越多地在水生環境中分離出來 (Jakobsen et al., 2008)。在廢水中容易檢測到的抗藥性細菌被發現在廢水處理中存活，並釋放到水生環境中 (Amos et al., 2014; Gundogdu et al., 2013; Prado et al., 2008)。醫院廢水 (hospital wastewater, HWW) 被推斷為環境抗菌素耐藥性的重要來源。由研究得知，在醫院廢水中回收了多種 MDR 細菌，包括產廣效性乙內醯胺分解酶 (ESBL) 的腸桿菌科 (*Enterobacteriaceae*) 和產生碳青霉烯酶 (carbapenemase-producing) 的腸桿菌科 (CPE) (Gundogdu et al., 2013; Zhang, Lu, & Zong, 2012; Zurfluh et al., 2017)。在臺灣，包括抗生素和咖啡因在內的新興污染物通過地表水輸送到地下水 (Lin et al., 2015)。然而，化學污染源與可能的 MDR 細菌群落生態之間的關係，探討仍然十分有限。

研究發現，處理水雖整體細菌量減少，相較都市環境中細菌，帶有的抗藥性卻可能增加，推測原因包括 (1) 細菌族群的適應作用，篩選了適合在帶有低於殺菌濃度抗生素的微環境中存活的菌株，(2) 細胞內移動性遺傳物質在適合進行水平基因片段交換的環境行交互作用，而污水處理系統可能提供了這樣的場合。研究指出，污水中涵容的排泄物、抗生素、消毒劑、重金屬等，無意中形成一個重



要的貯存場域，使暴露在其中的細菌一方面接觸抗生素的篩選壓力，一方面也利於細菌可移動的遺傳物質片段進行交換，隨著汗水經處理後排放至環境水體。根據 Reinthaler 等人在奧地利南部的研究，處理接收都會區以及醫院汗水的汗水廠水中發現帶抗藥性大腸桿菌菌株 (Reinthal et al., 2003; Tennstedt et al., 2003)，Ferreira da Silva 等人於葡萄牙北部的研究比較都市汗水處理廠中處理前與處理後水中大腸桿菌屬 (*Escherichia* spp.) 的抗藥性，以及水中抗生素、消毒劑與重金屬含量與抗藥性的相關性，並且偵測可移動的遺傳物質整合子 (class I integron)，都發現處理水中細菌抗藥性的持續存在，都市汗水處理過程中之新興汗染物排放，亦是對細菌耐藥性之選擇壓力增加的因素之一。經過汗水處理廠處理後的排放水中、處理後排放的下游水域，相較於處理前水中細菌的抗藥性比例更為增加 (Ferreira da Silva et al., 2006)。另有 Agga 等人於美國內布拉斯州 (Nebraska) 中部、東部研究針對城市汗水處理設施、動物飼養場與廢棄物瀉湖、徑流集水池等地的水中細菌抗藥性進行比較，發現受畜牧排放影響處與城市汗水中，兩者大腸桿菌 (*E. coli*)、沙門氏菌屬 (*Salmonella* spp.) 在濃度及抗藥性盛行比率程度相似 (Agga et al., 2015)，綜上所述，在人類與動物生活周遭的水環境與細菌抗藥性的分布與交互作用，需要在地性的研究實地探討，了解其潛在的公共衛生危害。

第三章 材料與方法



3.1 研究架構

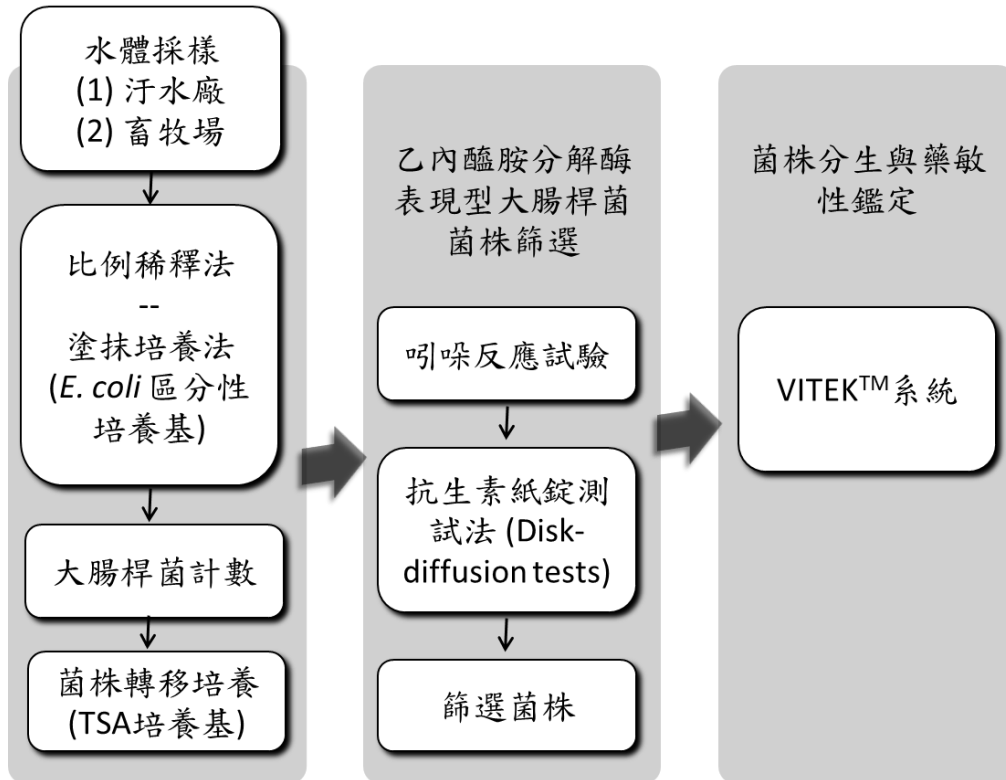


圖 2-1. 水體採樣與大腸桿菌菌株鑑定步驟

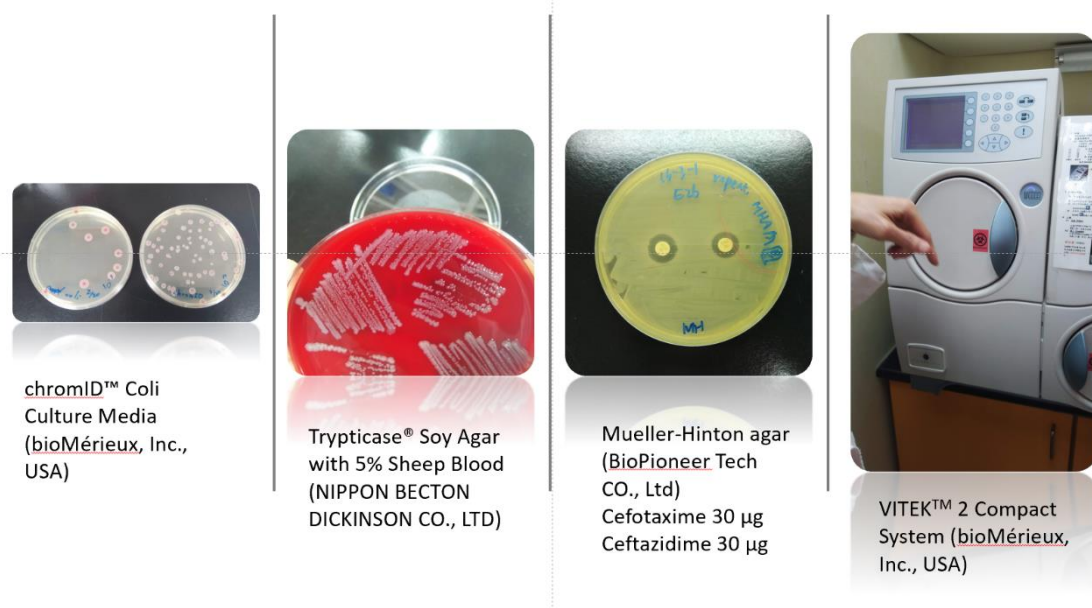


圖 2-2. 大腸桿菌菌株鑑定培養基與 VITEK™ 2 Compact System



3.2 樣本來源

3.2.1 採樣場址

採樣場址選定為位於台北市之汙（廢）水處理設施，分別為台北市汙水處理系統與一小型畜牧場。台北市全市汙水下水道系統分為內湖及迪化汙水處理廠兩個汙水收集處理系統，內湖汙水處理廠民國 93 年完工啟用，民國 95 年迪化汙水處理廠提升為二級處理廠，次年開始試運轉，兩者處理範圍至少涵蓋台北市面積約 271.7997 平方公里之 2,664,983 人口（統計至民國 108 年 2 月）。畜牧場隸屬於國立臺灣大學生物資源暨農學院附設農業試驗場（以下簡稱台大畜牧場），於民國 24 年 3 月竣工，汙水處理設施於民國 80 年啟用。飼養動物以乳牛、試驗用小型豬與乳山羊為主。場址相對地理位置如圖 3。

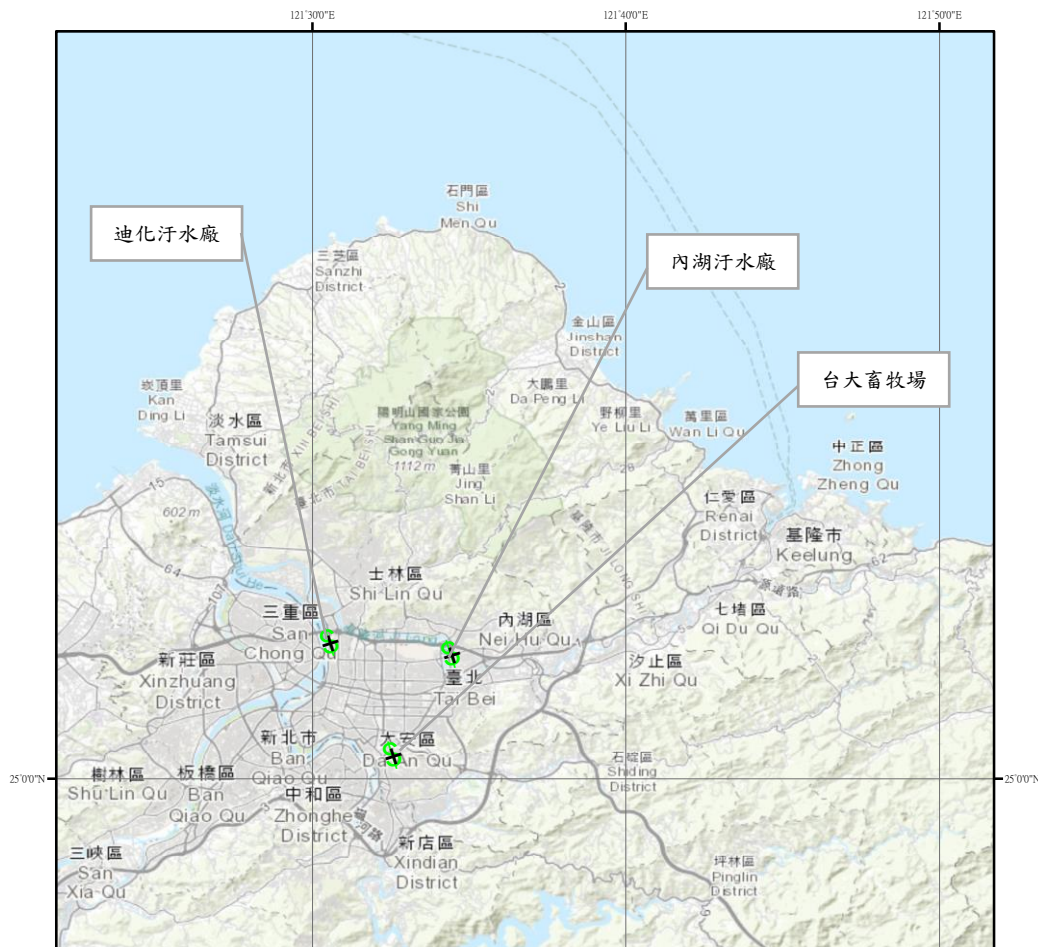


圖 3. 採樣場址相對地理位置



(1) 內湖汙水廠設計容量為平均每日處理 240,000 立方公尺汙水，汙水進入處理廠後，首先經過粗攔汙柵除去汙水中較大垃圾及雜物，然後經細攔汙柵後流至渦流式沉沙池去除砂礫及雜物，再進入初級沉澱池去除水中約 30%有機物及 60%懸浮固體物。初級沉澱池之上澄液則被引入二級處理之曝氣池及二級沉澱池做活性汙泥法處理。二級沉澱池後之出流水再經次氯酸鈉消毒，去除大腸桿菌，達到放流水質後排入放基隆河。汙水來源主要包含台北市內湖、大直、南港、松山等區，以及部分來自基隆市七堵、新北市汐止等區。汙水水質：進流水生化需氧量 (BOD5) = 185 mg/L，懸浮固體 (SS) = 190 mg/L；放流水 BOD5 = 30 mg/L，SS = 30mg/L；回收 (再生) 水：每日設計量 20,000 立方公尺。

(2) 迪化汙水處理廠設計容量為平均每日處理 500,000 立方公尺汙水，汙水採深槽階段曝氣二級生物處理，自迪化汙水抽水站分流部分汙水進廠後，先經細攔汙柵去除較大固體物，再經由初級沉澱池去除大部分可沉降性懸浮固體物，初級沉澱池流出水接著再進入曝氣池、二級沉澱池去除有機物。最後經添加次氯酸鈉消毒，去除水中大腸桿菌，達到放流水質後放流至淡水河中，汙水來源為台北市各區。汙水水質：進流汙水生化需氧量 (BOD5) = 180 mg/L，懸浮固體 (SS) = 180 mg/L；放流水水質 BOD5 ≤ 20mg/L，SS ≤ 20mg/L；回收 (再生) 水：每日設計量 10,000 立方公尺。

(3) 台大畜牧場廢 (汙) 水處理設施申請每日最大廢 (汙) 水生產量為 34 立方公尺，核准飼養量為每日最多牛 65 頭、豬 360 頭、羊 300 頭、雞 500 隻。原廢 (汙) 水水質：懸浮固體 4970 mg/L、化學需氧量 7390 mg/L、生化需氧量 4100 mg/L、pH 值 6~9、水溫攝氏 20~35 度。處理後排放入台北市汙水下水道系統。



3.2.2 採樣點

(1) 汙水處理廠：迪化 D1、D2、D3；內湖 N1、N2、N3

迪化汙水廠		內湖汙水廠
汙水下水道 ↓	處理程序	汙水下水道 ↓
迪化抽水站 ↓		內湖抽水站 ↓
細攔汙柵 ↓		粗攔汙柵 ↓
雙層式初沉池 (D1) ↓		細攔汙柵 ↓
深槽曝氣池 ↓		渦流式沉沙池 ↓
雙層式二沉池 ↓		初沉池 (N1) ↓
加氯消毒池 ↓		階梯式曝氣池 (生物反應池)
出水抽水站 放流泵站 (D2)		二沉池 ↓
過濾設備 ↙ 放流管		加氯消毒池 ↓
浮渣濃縮機 ↓ 淡水河		放流泵站 (N2) 回收用水泵站 (N3)
除砂設施 ↓		放流管 ↓
回收水加壓站 (D3)		基隆河 ↓

圖 4. 汙水處理廠處理程序與採樣點

(2) 畜牧場：牛舍 FC4、FC5；豬舍 FS4、FS5

牛舍廢水	台大畜牧場	豬舍廢水
攔汙柵 1 ↓	處理程序	↓ 攔汙柵
固液分離機 ↓		↓ 固液分離池
厭氣池 1 ↓		↓ 初級沉澱池 2 (FS4)
初級沉澱池 1 (FC4) ↓		↓ 曝氣池 4
調整池 1 ↓		↓ 曝氣池 5
調整池 2 ↓		↓ 曝氣池 6
曝氣池 1 ↓		↓ 生物沉澱池 2
生物沉澱池 (FC5) [進入豬舍固液分離池二次處理]		↓ 放流水 (FS5)

圖 5. 畜牧場處理程序與採樣點

3.2.3 汙水處理廠流程

根據臺北市政府工務局衛生下水道公開資訊，迪化及內湖汙水處理廠處理流程概述如下：



(1) 沉澱：抽水站分流汙水進廠後，經細攔汙柵去除較大固體物，再經初級沉澱池去除大部分可沉降性懸浮固體物，進入初級沉澱池。

(2) 曝氣：初級沉澱池流出水再進入曝氣池、二級沉澱池後去除有機物。

(3) 消毒：經添加次氯酸鈉消毒，去除水中病原菌，放流至河川。

(4) 砂濾：放流水經砂濾處理後回收，提供廠區沖洗、澆灌用水及民間園藝用水。

(5) 汙泥：水肥併同經濃縮處理後之初沉汙泥及二沉汙泥，進行厭氧消化及脫水處理後製成汙泥餅，脫水後汙泥餅規劃再使用之用途包括焚化、製磚、路基材、水泥摻料等。

3.2.4 水體採樣

參考行政院環境保護署《環境微生物檢測通則—細菌 (NIEA E101.04C)》，樣品採集時採樣器材避免交互汙染。採樣瓶使用可滅菌之聚丙烯 250 毫升廣口塑膠瓶。盛裝水樣時，採樣容器之上端留下至少 2.5 公分的空間，以便檢驗時進行樣品混合。若欲採取之水樣可能含有餘氯或其他鹵素（汙水廠之放流水與回收水），必須在採樣容器內加入適量之硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 以中和餘氯，避免餘氯在樣品運送過程當中持續進行殺菌作用。採取加氯之廢水時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 10% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 15 mg/L。本次採樣以市售滅菌袋中所附之硫代硫酸鈉藥錠 Sodium Thiosulfate 30 mg (Nasco® B01254WA Standard Whirl-Pak® Thio-Bag® With Sodium Thiosulfate Tablets)。

樣品運送時水樣溫度維持在低於於 15°C ，送至實驗室後於冰箱冷藏保存溫度維持在 $2\sim 8^\circ\text{C}$ ，過程不得凍結。採樣前以同樣步驟準備空採樣瓶，盛裝滅菌二次水，與採樣器材同時運送，作為空白運送樣本，後續並與採樣樣本進行相同之培養步驟。

3.3 大腸桿菌篩選與抗生素敏感性鑑定



3.3.1 實驗材料

- 區分性培養基 chromID™ Coli Culture Media (bioMérieux, Inc., USA)
- Trypticase® Soy Agar with 5% Sheep Blood (NIPPON BECTON DICKINSON CO., LTD)
- BD BBL™ DMACA Indole Reagent Droppers (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Mueller-Hinton agar (BioPioneer Tech CO., Ltd)
- 標準菌株 *E. coli* ATCC® 25922
- VITEK™ 2 Compact System (bioMérieux, Inc., USA)
- Installed VITEK™ 2 Systems Version: 07.01
- MIC Interpretation Guideline: Copy of Global CLSI-based NTUH-S27 (2019)
- AES Parameter Set Name: Global CLSI+NR NTUH-S27
- VITEK® 2 GN card
- VITEK® 2 AST card (內載抗生素類別見 3.3.4)

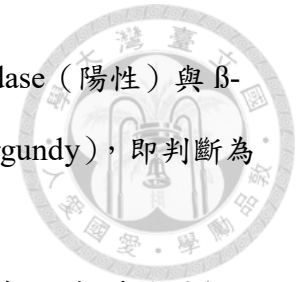
3.3.2 細菌培養

一、水樣連續稀釋

- 1、水樣在進行檢測或稀釋之前必須劇烈搖晃 25 次以上，以使樣品充分混合均勻。
- 2、視水樣中微生物可能濃度範圍進行水樣稀釋步驟。使用無菌吸管吸取 0.5 mL 之水樣至 4.5 mL 之無菌稀釋液中，形成 10 倍稀釋度之水樣，混合均勻。而後自 10 倍稀釋度水樣，以相同操作方式進行一系列適當之 100、1000、10000 倍等稀釋水樣，並混搖均勻。
- 3、進行稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。

二、以區分性培養基 chromID™ Coli Culture Media (bioMérieux, Inc., USA) 塗

抹培養，當菌株與培養基酵素反應結果為 β -glucuronidase (陽性) 與 β -glucosidase (陰性)，呈現粉紅 (pink) 或酒紅色 (burgundy)，即判斷為 *Escherichia coli*。



- 1、 編號 chromID™ Coli 營養平板：樣本編號-稀釋倍數編號-重複平板培養基編號，以“S01-3-2”表示樣本 No. 01 稀釋 10^3 倍之第二個培養基。
- 2、 以無菌吸管吸取 200 μ L 的原液及 (或) 各稀釋度水樣至 chromID™ Coli 營養基平板，選定之濃度皆進行二重複樣本培養。
- 3、 固定塗抹轉盤速度，將已滴加原液樣本或稀釋樣本之培養基依序放至塗抹轉盤，輕置拋棄式 L 型推棒短邊於培養基半徑方向，以腳踏板啟動及暫停旋轉，旋轉約 30 圈，將稀釋樣本推勻。
- 4、 將塗抹後之 chromID™ Coli 營養平板移至 44°C 溫箱，放置 24 ± 2 小時培養。

三、大腸桿菌(*Escherichia coli*; *E. coli*)計數

- 1、 從 44°C 溫箱取出培養皿，記錄菌株數量及菌落型態。
- 2、 計算適當生長數目的培養皿 (介於 25-250 colony forming unit, CFU) 並作記錄，在培養皿底部編號欲分離菌株 1, 2, 3, ..., n，呈粉紅至酒紅色紀錄為 *E. coli*，呈藍灰色之菌株不納入後續鑑定。依採樣地點隨機挑選該處樣本介於 40~80 株菌株。
- 3、 依編號取出 *E. coli* 菌株至 Trypticase® Soy Agar with 5% Sheep Blood (NIPPON BECTON DICKINSON CO., LTD) 作分離培養。
- 4、 計算重複培養樣本的菌株計數平均值，並依照稀釋濃度回推各樣本之 *E. coli* 菌量。
- 5、 若 *E. coli* 菌株計數未介於 25~250 CFU，則調整樣本稀釋倍數，再重新於 chromID™ Coli 營養平板培養。

四、菌株分離培養，使用 Trypticase® Soy Agar with 5% Sheep Blood



(NIPPON BECTON DICKINSON CO., LTD)，以下簡稱 TSA。

- 1、 於 TSA 底部及上蓋註明樣本及菌株編號。
- 2、 畫線法
 - (1) 右手持接種棒在紅外線滅菌儀內滅菌，將前端接種環燒紅後冷卻。
 - (2) 左手持 chromID™ Coli 平板底部，定位已編號之待取菌株，右手持接種棒以前端接種環輕沾紅紫色菌株之菌落中心。
 - (3) 將接種環上的細菌畫於 TSA 營養基面之靠左上側平面，此為第一個菌區。
 - (4) 接種環再度以紅外線滅菌冷卻，將平板逆時針微轉角度，由第一菌區之邊緣，往右畫出第二菌區，轉動接種環至無菌側，由第二菌區之邊緣以鋸齒狀往下方畫開畫出第三菌區，之後即可得到由單一細胞所長成之獨立菌落。
 - (5) 畫線時接種環應避免接觸到先前畫過線之菌區。
- 3、 重複上述步驟，將挑選之菌株分離培養於 TSA，將 TSA 平板倒放置於 37°C 溫箱中培養 24 ± 2 小時。

3.3.3 乙內醯胺分解酶表現型大腸桿菌菌株篩選

一、 吲哚反應試驗

- 1、 將分離培養菌株之 TSA 平板從溫箱取出，觀察記錄菌落生長情形。
- 2、 將滅菌棉棒以少許 Tryptone Soy Broth 培養液沾濕，輕沾分離菌株之菌落中心，將沾菌棉棒以 BD BBL™ DMACA Indole Reagent Droppers (Becton, Dickinson and Company, USA) 滴注測試，若呈藍綠色則為陽性反應，記錄試劑試驗結果。

二、 抗生素紙錠測試法 (Disk-diffusion tests)

- 1、 將分離培養菌株之 TSA 平板從溫箱取出，觀察記錄菌落生長情形。

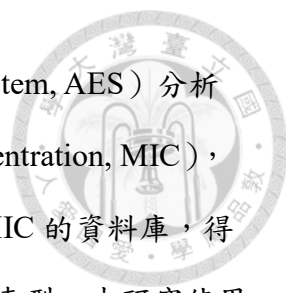


- 2、將 Mueller-Hinton agar (BioPioneer Tech CO., Ltd) 依樣本及菌株編號。
 - 3、將滅菌棉棒以少許 Tryptone Soy Broth 培養液沾濕，輕沾分離菌株之菌落中心，將沾菌棉棒於康氏管中與 3 mL 0.45% NaCl 混合，以濁度比色計測定菌液濁度為 0.5 McFarland 後平行均勻塗佈 Mueller-Hinton agar 平板區域(第一層)，接著垂直於第一層塗佈第二層，即依十字交叉方向共塗佈 4 層。
 - 4、於 Mueller-Hinton agar 平板上距離適當間隔放置抗生素紙錠：
cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg)。
- 三、將 Mueller-Hinton agar 營養平板放置於 37°C 溫箱中培養 24 ± 2 小時，取出時紀錄抗生素紙錠之抑菌圈直徑。參考 Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines (2017) 之定義：cefotaxime (30 µg) 與 ceftazidime (30 µg)：具感受性(susceptible)、中間型(intermediate)、具抗性(resistant) 界定抑菌圈結果。
- 1、Cefotaxime (30 µg)：Resistant (\leq 14 mm)、Intermediate (15~22 mm)、Susceptible (\geq 23 mm)；
 - 2、Ceftazidime (30 µg)：Resistant (\leq 14 mm)、Intermediate (15~17 mm)、Susceptible (\geq 18 mm)。
- 四、保存菌株：初步篩選抑菌圈直徑 27 mm 以下之菌株，保存作為進一步鑑定之樣本菌株。

3.3.4 菌株分生與藥敏性鑑定

一、VITEK™ 2 自動化鑑定系統

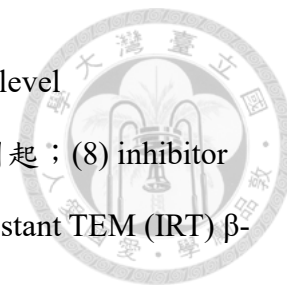
VITEK™ 2 Compact System (bioMérieux, Inc., USA) 自動化抗菌藥敏試驗系統是由 bioMérieux 公司開發的一個整合系統，以人工製備待鑑定菌株之菌液後，藉由特定鑑定卡片槽內生化反應，自動進行菌株快速鑑定與抗菌藥敏試驗。



VITEK™ 2 整合系統連接的高等專家系統 (Advanced Expert System, AES) 分析菌株的生化反應效度與最小抑菌濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC), 並基於內建包含 2,000 多種表現型 (phenotypes) 和 20,000 個 MIC 的資料庫, 得以識別 MIC 分布與特定藥敏性模式, 評定出菌株之特定抗藥性表型。本研究使用之抗生素敏感性卡片為 VITEK™ 臺灣商用型號 AST-N341 版, 預先載不同分類 (class) 的代表性抗生素如下: (1) cephem 類含 cephalosporin 類及 cephamycin 類: cefazolin (CZ) (第一代 cephalosporin), cefuroxime (CXM) (第二代 cephalosporin), cefmetazole (CMZ) (cephamycin 類), ceftriaxone (CRO) (第三代 cephalosporin), ceftazidime (CAZ) (第三代 cephalosporin), cefepime (FEP) (第四代 cephalosporin), flomoxef (FMOX) (cephamycin 類); (2) β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類: ampicillin-sulbactam (SAM), cefoperazone-sulbactam (SCF), piperacillin-tazobactam (TZP); (3) carbapenem 類: ertapenem (ETP), imipenem (IPM); (4) quinolone 類: ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LVX); (5) aminoglycoside 類: amikacin (AN), gentamicin (GM); (6) 葉酸合成抑制劑類: trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT); (7) 甘氨酸環素類: tigecycline (TGC); 共 18 個抗生素。

經由 VITEK™ 高等專家系統 (Advanced Expert System, AES) 評定之 β -lactamase 抗藥性表型, 分別為: (1) wild type 野生型, 無明顯程度的 β -lactamase; (2) acquired penicillinase (Pase) & cephalosporinase (Case) (AmpC), 染色體和質粒基因編碼已帶有 AmpC β -lactamase, 由質體主導的抗性較不常見; (3) acquired penicillinase, 如 TEM-1 或 SHV-1, 對 penicillin 及較窄效的 cephalosporins 類如 cephalothin 具有抗藥性; (4) ESBL, 如 TEM-3 或 SHV-2, 與 penicillinase 相似的抗藥圖譜以外, 對 monobactam 類, 如 aztreonam; 較廣效的 cephalosporins 類, 如 ceftriaxone、ceftazidime; 較廣效的 cephamycin 類, 如 flomoxef 等, 也具抗藥性; (5) ESBL, CTX-M like, ESBL 帶有 *bla*_{CTX-M} 基因, 比其他分型的 ESBL 易於水解 cefotaxime, 對 ceftazidime 水解能力較弱; (6) SHV-1

hyperproduction, *bla*_{SHV-1} 相關突變產生 ESBL 衍生物；(7) high-level cephalosporinase (AmpC)，由控制 AmpC 表現的調控基因突變引起；(8) inhibitor resistant penicillinase (IRP 或 OXA)，如 OXA-1，或 inhibitor resistant TEM (IRT) β -lactamases。



所有篩選菌株皆以 VITEK™ 系統進行以下三階段鑑定：

- (1) 葛蘭氏陰性菌 (Gram negative bacteria, GN) 卡片鑑定：鑑定確為 *E. coli* 菌株。
- (2) 抗生素敏感性 (Antimicrobial Susceptibility Testing; AST) 卡片鑑定：判讀最小抑菌濃度 (Minimum inhibitory concentration; MIC)。
- (3) 高等專家系統 (Advanced Expert System; AES)：評定抗藥性表型。

二、VITEK™ 菌液製備

1. 0.45%無菌生理食鹽水
2. 無菌康氏管
3. Densichek®比濁計
4. 無菌棉棒
5. AST-ST 藥敏卡 (AST-N341)
6. VITEK 2 GN 鑑定卡
7. VITEK 2 compact 145 μ L pipet 與滅菌 tip

三、步驟

1. 將 GN 鑑定卡及 AST 藥敏卡自 4 °C 冰箱取出回溫 30 分鐘。
2. 取無菌康氏管，注入 3 mL 0.45%無菌生理食鹽水。
8. GN 鑑定管：將保存菌株經 Trypticase® Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA) 於 37 °C 溫箱培養 18 至 24 小時的相同形態數個純菌落，以棉棒沾取後，於康氏管中 0.45%無菌生理食鹽水製備細菌懸浮液，以 Densichek®比濁計調整濃度範圍於 0.50 至 0.63 McFarland。
3. AST 藥敏鑑定管：使用 VITEK 2 compact 145 μ L pipet 取上述製備好之



菌液，至另一 3 mL 0.45%無菌生理食鹽水中混合均勻。

4. 將製備好的菌液放在 VITEK 2 所附之 cassette 上，放上相對應的 VITEK 2 GN 鑑定卡、藥敏卡及康氏管。於 30 分鐘內完成上機與輸入菌株編號。
5. 使用無菌接種環取退出的 cassette 菌液另外接種至 TSA 培養基作為菌液純度檢查，確認流程未受其他細菌污染。
6. 經 8 至 15 小時分析，完成後於 VITEK 2 電腦輸出菌株鑑定、藥敏與 AES 評讀結果。

3.4 統計分析

本篇使用 ArcGIS Desktop version 10.5.1 繪製場址相對位置地圖。實驗數據使用 R version 3.5.1 及 R Studio 輔助分析，抗藥性百分比以費雪精確檢定 (Fisher's Exact Test) 檢定抗藥性百分比是否具有統計意義的顯著差異，並以 $p < 0.05$ 判定具有統計顯著差異，各採樣點抗藥性比例增減變化未達顯著意義。



第四章 結果

4.1 大腸桿菌篩選

4.1.1 大腸桿菌菌落數估計

經 3.3.2 步驟培養之各樣本平均菌落數如圖 5，由表 1. 稀釋倍數及單位體積之形成菌落數，參考行政院環境保護署《水中總菌落數檢測方法—塗抹法 (NIEA E203.56B)》、《水中總菌落數檢測方法—濾膜法 (NIEA E205.57B)》估計原始樣本之大腸桿菌菌落數。其中汙水廠初沉池大腸桿菌菌落數約為每毫升 $10^4 \sim 10^5$ CFU，經由汙水處理後的放流水及回收水則下降至每毫升 $10 \sim 10^3$ CFU。畜牧場牛舍及豬舍糞尿排放的大腸桿菌菌落數分別為牛舍約每毫升 10^5 CFU，豬舍約 $10 \sim 10^3$ CFU。

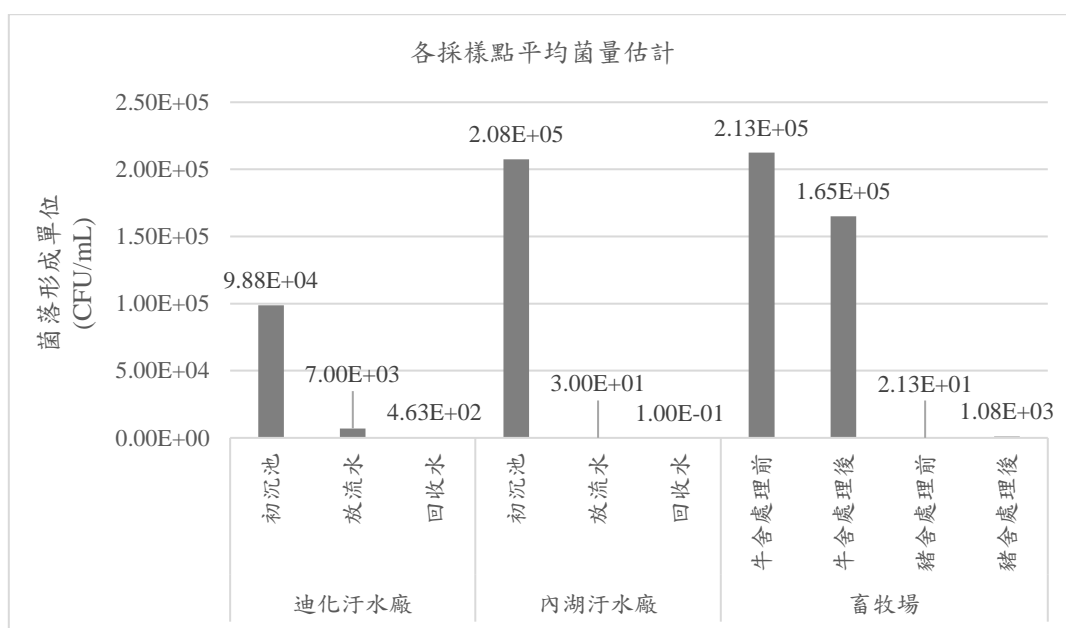


圖 6. 各採樣點大腸桿菌平均菌量估計

由各採樣點樣本菌落挑選培養後，各階段試驗菌株數如 4.1.2 所述，最終留存 *E. coli* 統計為 231 株。其中汙水廠佔 94 株，畜牧場佔 137 株，以下將於 4.2 與 4.3 部分分別說明汙水廠與畜牧場兩場址之 *E. coli* 抗藥性結果。



表 1. 大腸桿菌菌落數估計

菌落數估計 colony-forming unit per mL; CFU/mL					
採樣點		A	B	C	C / (B/A)
		稀釋倍數	塗抹培養體積 (mL)	平均培養菌落 數	菌落形成單位# (CFU/mL)
迪化汙水廠					
初沉池	(D1)	1000	0.2	19.75	9.88E+04
放流水	(D2)	100	0.2	14	7.00E+03
回收水	(D3)	10	0.2	9.25	4.63E+02
內湖汙水廠					
初沉池	(N1)	1000	0.2	41.5	2.08E+05
放流水	(N2)	1	0.2	6	3.00E+01
回收水	(N3)	1	100	10	1.00E-01
畜牧場					
牛舍處理前	(FC4)	1000	0.2	42.5	2.13E+05
牛舍處理後	(FC5)	1000	0.2	33	1.65E+05
豬舍處理前	(FS4)	1	0.2	4.25	2.13E+01
豬舍處理後	(FS5)	10	0.2	21.5	1.08E+03

*此採樣點樣本使用 100 mL 過濾之濾膜法。

#菌落形成單位(CFU/mL) = 選取培養皿之菌落數總和 ÷ 選取培養皿之水樣實際體積總和



4.1.2 大腸桿菌菌株數

採樣分別於 108 年 3 月 11 日（汙水廠 D1, D2, D3, N1, N2, N3）、108 年 3 月 25 日（畜牧場 FC4, FC5, FS4, FS5）單日上午 9-11 點進行，並於採樣完畢立刻送至臺灣大學附設醫院感控中心實驗室冷藏，於同一日下午進行塗抹培養。各採樣點取兩瓶水樣，合計為汙水廠 N = 12，畜牧場 N = 8。依序以 chromID™ Coli media 區分性培養基、吲哚反應試驗確認、紙錠試驗篩選、VITEK™ 2 Compact System 鑑定菌株。各階段試驗菌株數如表 2，其中經 VITEK™ 2 Compact System 鑑定，D2 刪去 3 株 *Kluyvera cryocrescens*；D3、N2 共刪去 4 株為 *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*，N3 刪去 1 株為 *Enterobacter cloacae complex*；FS5 刪去 2 株為 *Salmonella enterica ssp arizonae*；FC4、FS4 各刪去 1 株為分離結果不佳的菌株、次培養無結果的菌株；D1 則刪去 1 株抗藥性結果無法判讀的 *E. coli*，最終 *E. coli* 統計為 231 株。

表 2. 各階段篩選大腸桿菌菌株數

樣本來源	汙廢水性質	chromID™ Coli media	紙錠試驗	VITEK 鑑定	<i>E. coli</i>
迪化廠入流 (D1)	處理前	79	79	38	37
迪化廠排放 (D2)	處理後	24	24	3	0
迪化廠回收 (D3)	處理後	37	37	13	10
內湖廠入流 (N1)	處理前	83	52	22	22
內湖廠排放 (N2)	處理後	24	24	19	18
內湖廠回收 (N3)	處理後	10	8	8	7
畜牧場牛區 (FC4)	處理前	221	92	60	59
畜牧場牛區 (FC5)	處理後	165	52	26	26
畜牧場豬區 (FS4)	處理前	17	17	9	8
畜牧場豬區 (FS5)	處理後	86	80	46	44
合計 (菌株數)		746	465	244	231




4.2 汙水廠大腸桿菌抗藥性

4.2.1 抗藥性比例

來自汙水廠各個採樣點水中大腸桿菌菌株對不同抗生素的抗藥性比例如表 3、圖 7-1 與圖 7-2。依採樣點位置以入流（初沉池）至出流（放流水、回收水）區分。

首先由迪化廠入流水的菌株，可觀察到入流水的菌株對於 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類抗生素的 ampicillin-sulbactam 抗藥性比例最高（64.9%）；對 cephem 類抗生素抗藥性比例有 5-40.5% 的抗藥性比例，分別為窄效性 cefazolin（37.8%）、cefuroxime（40.5%）；廣效性 ceftriaxone、ceftazidime 與 cefepime（同為 35.1%）；cephamycin 類抗生素 cefmetazole（10.8%）、flomoxef（5.4%）；對於 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類抗生素 cefoperazone-sulbactam、piperacillin-tazobactam，以及 carbapenem 類的 ertapenem 與 imipenem 則未出現抗藥性菌株；迪化廠入流菌株對其他類抗生素亦有 18-35.1% 的抗藥性比例：quinolone 類 levofloxacin（18.9%）、ciprofloxacin（21.6%）；葉酸合成抑制類 trimethoprim-sulfamethoxazole（35.1%）；對 aminoglycoside 類中僅對 gentamicin 具抗藥性（21.6%），未發現對 amikacin 具抗藥性菌株；也無對甘氨酸環素類 tigecycline 具抗藥性的菌株。

內湖廠入流菌株抗藥性分別表現於窄效性 cephalosporin 類 cefazolin（50%）、cefuroxime（54.5%）；廣效性 cephalosporin 類 ceftriaxone、ceftazidime 與 cefepime（皆為 50%）；cephamycin 類 cefmetazole 與 flomoxef（皆為 13.6%）； β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑的 ampicillin-sulbactam（77.3%）、piperacillin-tazobactam（4.5%）；無對 cefoperazone-sulbactam 具抗藥性菌株；對 carbapenem 類的 ertapenem 與 imipenem 亦未出現抗藥性菌株；quinolone 類 levofloxacin（31.8%）、ciprofloxacin（27.3%）；葉酸合成抑制類 trimethoprim-sulfamethoxazole



(54.5%)；aminoglycoside 類中僅 gentamicin (27.3%)，未發現對 amikacin 具抗藥性菌株；也無對甘氨酸環素類 tigecycline 具抗藥性的菌株。內湖廠入流菌株具抗藥性的對應抗生素分類、藥物大致與迪化廠相同，差別僅在於 piperacillin-tazobactam，屬於廣效性 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑之一。

出流水，亦即包含經汙水處理後的放流水及回收水菌株抗藥性比例，迪化廠放流水未培養出大腸桿菌菌株，故無抗藥性比例結果。相較於入流菌株抗藥性比例，放流水與回收水菌株可觀察到相等或降低的比例，但對葉酸合成抑制類 trimethoprim-sulfamethoxazole 皆呈現升高（迪化回收 50%、內湖放流 38.9%、內湖回收 42.9%）。入流中最高抗藥性比例的 ampicillin-sulbactam 略為降低（迪化回收 60%、內湖放流 61.1%、內湖回收 71.4%）。

迪化廠回收水菌株對 cephem 類抗藥性比例為 10-30%，窄效性 cefazolin、cefuroxime，廣效性 ceftriaxone、ceftazidime 與 cefepime 皆為 30%；cephamycin 類 cefmetazole 為 10%，入流時表現有抗藥性比例的 flomoxef 於回收水則不具抗藥性菌株；其他類抗藥性比例為 quinolone 類 levofloxacin、ciprofloxacin、aminoglycoside 類的 gentamicin（皆為 10%）。

相較於入流水，內湖廠放流水菌株對 flomoxef、gentamicin 無抗藥性，其中 gentamicin 抗藥性比例下降（入流 27.3%，放流 0%）；回收水菌株對 flomoxef、piperacillin-tazobactam、cefmetazole、gentamicin 也無抗藥性；內湖廠放流水菌株抗藥性仍表現於 cephem 類與 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類抗生素，包括窄效性 cefazolin (50%)、cefuroxime (55.6%)；廣效性 ceftriaxone、ceftazidime 與 cefepime（皆為 50%）；cephamycin 類 cefmetazole 與 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑 piperacillin-tazobactam（皆為 5.6%）、ampicillin-sulbactam (61.1%)；其他類抗藥性比例為 quinolone 類 levofloxacin、ciprofloxacin（皆為 11.1%）。回收水菌株抗藥性仍表現於窄效性 cefazolin (28.6%)、cefuroxime (14.3%)；廣效性 ceftriaxone、ceftazidime 與 cefepime（皆為 14.3%）；與 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑 ampicillin-sulbactam (71.4%)。

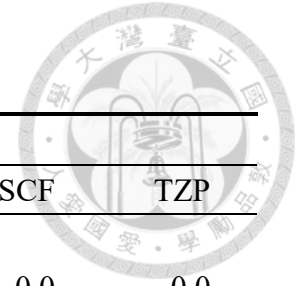


表 3. 汙水廠大腸桿菌抗藥性比例

菌株來源	n	抗藥性比例 (Resistance prevalence, %)									
		CZ	CXM	CMZ	CRO	CAZ	FEP	FMOX	SAM	SCF	TZP
迪化汙水廠											
初沉池(D1)	37	37.8	40.5	10.8	35.1	35.1	35.1	5.4	64.9	0.0	0.0
放流水(D2)	0										
回收水(D3)	10	30.0	30.0	10.0	30.0	30.0	30.0	0.0	60.0	0.0	0.0
內湖汙水廠											
初沉池(N1)	22	50.0	54.5	13.6	50.0	50.0	50.0	13.6	77.3	0.0	4.5
放流水(N2)	18	50.0	55.6	5.6	50.0	50.0	50.0	0.0	61.1	0.0	5.6
回收水(N3)	7	28.6	14.3	0.0	14.3	14.3	14.3	0.0	71.4	0.0	0.0
菌株來源	n	抗藥性比例 (Resistance prevalence, %)									
		ETP	IPM	CIP	LVX	SXT	GM	AN	TGC	R3	R4
迪化汙水廠											
初沉池(D1)	37	0.0	0.0	21.6	18.9	35.1	21.6	0.0	0.0	5.4	5.4
放流水(D2)	0										
回收水(D3)	10	0.0	0.0	10.0	10.0	50.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0
內湖汙水廠											
初沉池(N1)	22	0.0	0.0	27.3	31.8	54.5	27.3	0.0	0.0	18.2	18.2
放流水(N2)	18	0.0	0.0	11.1	11.1	38.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
回收水(N3)	7	0.0	0.0	0.0	0.0	42.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

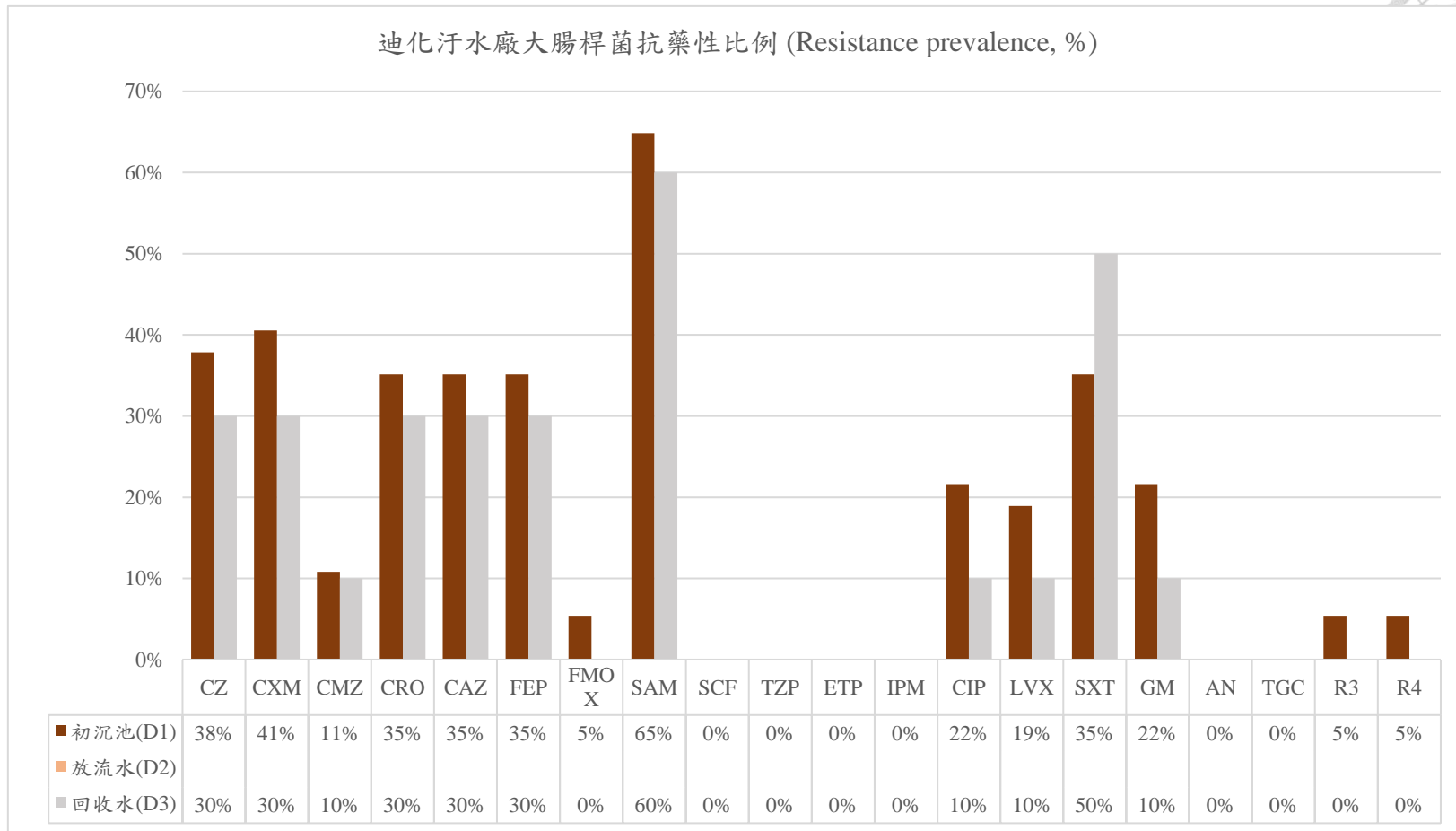


圖 7-1. 迪化汙水廠大腸桿菌抗藥性比例

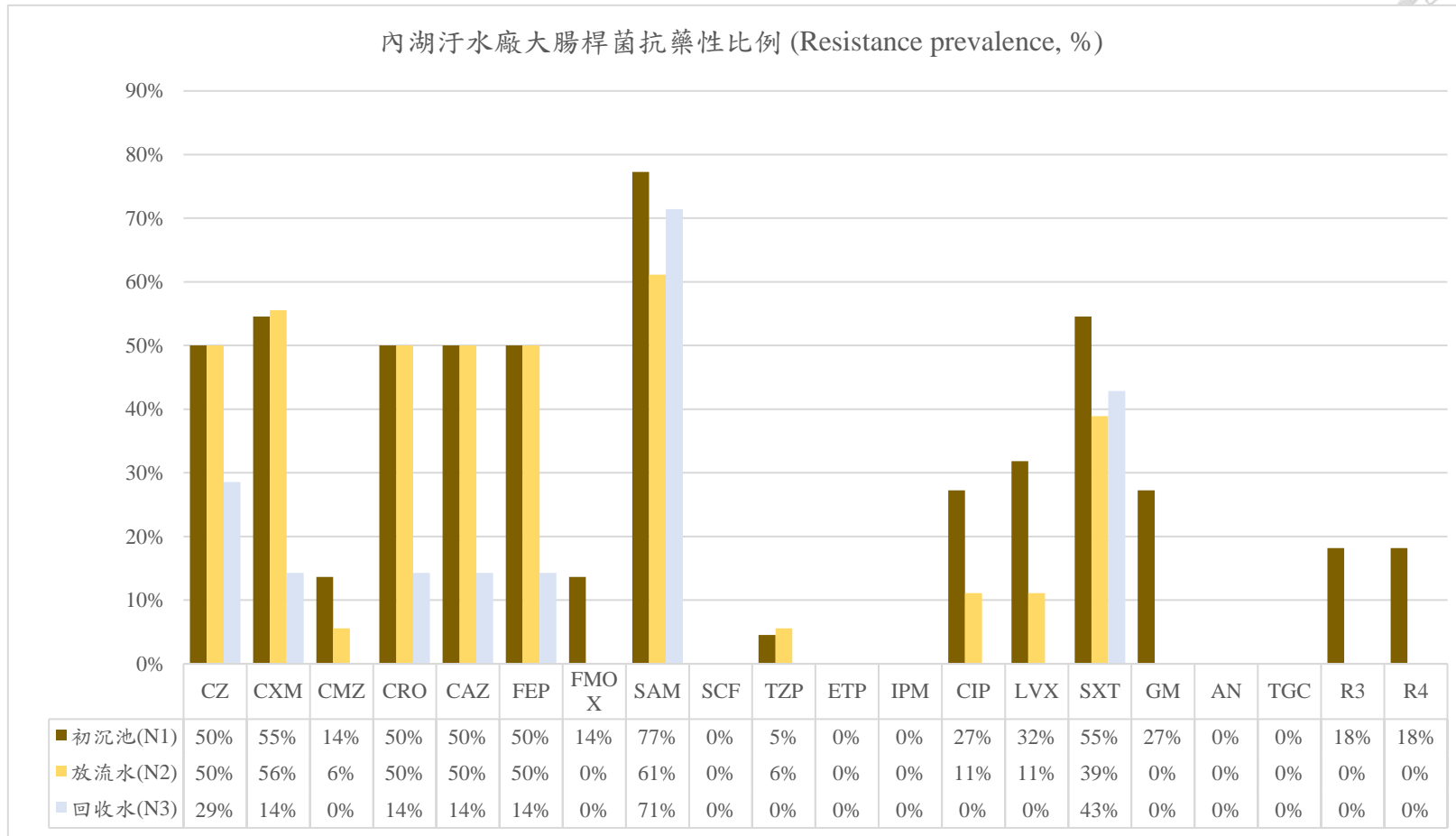


圖 7-2. 內湖污水廠大腸桿菌抗藥性比例



(1) cephem 類含 cephalosporin 類及 cephamycin 類：cefazolin (CZ) (第一代 cephalosporin)，cefuroxime (CXM) (第二代 cephalosporin)，cefmetazole (CMZ) (cephamycin 類)，ceftriaxone (CRO) (第三代 cephalosporin)，ceftazidime (CAZ) (第三代 cephalosporin)，cefepime (FEP) (第四代 cephalosporin)，flomoxef (FMOX) (cephamycin 類)；(2) β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類：ampicillin-sulbactam (SAM)，cefoperazone-sulbactam (SCF)，piperacillin-tazobactam (TZP)；(3) carbapenem 類：ertapenem (ETP)，imipenem (IPM)；(4) quinolone 類：ciprofloxacin (CIP)，levofloxacin (LVX)；(5) aminoglycoside 類：amikacin (AN)，gentamicin (GM)；(6) 葉酸合成抑制類：trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)；(7) 甘氨酸環素類：tigecycline (TGC)；共 18 個抗生素。R3, R4, 對三個類別或四個類別抗生素具抗藥性，定義對「至少三類」抗生素具有抗藥性的菌株即為具多重抗藥性 (multi-drug resistance)。



4.2.2 乙內醯胺分解酶表型比例

汙水廠菌株呈現 β -lactamase 抗藥性表型的組合如表 4。迪化廠入流菌株中，wild type 佔 24.3%，與表現帶有 inhibitor resistant Pase (IRT or OXA) + acquired penicillinase 的 24.3% 同佔最高的比例，其他依序則是 high-level cephalosporinase (AmpC) + ESBL (18.9%)，wild type + acquired penicillinase (10.8%)，ESBL (CTX-M like) (8.1%)，high-level cephalosporinase (AmpC) + SHV-1 hyperproduction (5.4%)，各有 2.7% 為 ESBL，acquired penicillinase，混和 acquired Pase & Case (AmpC) + cephalosporinase (AmpC) + inhibitor resistant Pase (IRT or OXA) + acquired penicillinase 的菌株。迪化廠入流水中菌株具有 ESBL 抗藥性表型佔 62.2%。

迪化廠回收水菌株中，wild type 佔 10%，餘下各佔 10% 的尚有比例上升的 ESBL，ESBL (CTX-M like)，inhibitor resistant Pase (IRT or OXA) + acquired penicillinase；與比例下降的 high-level cephalosporinase (AmpC) + ESBL；wild type + acquired penicillinase 與只帶 acquired penicillinase 的菌株各佔 30% 與 20%，皆比入流的比例上升。迪化廠回收水菌株中仍有 40% 具 ESBL 之抗藥性表型。

內湖汙水廠入流菌株中，wild type 佔 18.2%，占最高比例的是 high-level cephalosporinase (AmpC) + ESBL (27.3%)，其他依序為 inhibitor resistant Pase (IRT or OXA) + acquired penicillinase (22.7%)，ESBL 與 high-level cephalosporinase (AmpC) + SHV-1 hyperproduction 各佔 9.1%，各佔 4.5% 的是 ESBL (CTX-M like)，wild type + acquired penicillinase 與只帶 acquired penicillinase 的菌株。內湖廠入流水中菌株具有 ESBL 抗藥性表型佔 72.7%。

內湖放流水與回收水菌株中，wild type 分別為 22.2%、14%，含 ESBL 抗藥性表型分別為 61.1%、71.4%，其中放流水中 high-level cephalosporinase (AmpC) + ESBL 佔 27.8%，ESBL 合計佔 22.2% (ESBL 11.1%，ESBL (CTX-M like) 5.6%，ESBL + SHV-1 hyperproduction 5.6%)；而回收水中則主要為 IRT or OXA 型

(inhibitor resistant Pse (IRT or OXA) + acquired penicillinase 42.9% , 合併有
acquired Pse & Case (AmpC) with cephalosporinase (AmpC), inhibitor resistant Pse
(IRT or OXA) and acquired penicillinase 14.3%) , 以及 high-level cephalosporinase
(AmpC) + SHV-1 hyperproduction 佔 14.3% 。)





表 4. 汙水廠大腸桿菌抗藥性表型比例

		抗藥性表型比例 (β -lactam Class Resistance Phenotype Prevalence, %)					
菌株來源	n	Wild type	ESBL	ESBL (CTX-M like)	ESBL + SHV-1 Hyperproduction	High-level Cephalosporinase (AmpC) + ESBL	High-level Cephalosporinase (AmpC) + SHV-1 Hyperproduction
迪化汙水廠							
初沉池(D1)	37	24.3	2.7	8.1	0.0	18.9	5.4
放流水(D2)	0						
回收水(D3)	10	10.0	10.0	10.0	0.0	10.0	0.0
內湖汙水廠							
初沉池(N1)	22	18.2	9.1	4.5	0.0	27.3	9.1
放流水(N2)	18	22.2	11.1	5.6	5.6	27.8	0.0
回收水(N3)	7	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	14.3

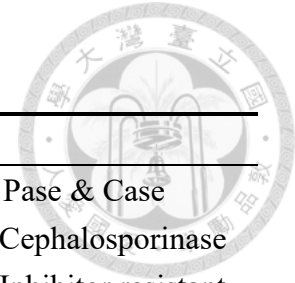


表 4 (續) . 汙水廠大腸桿菌抗藥性表型比例

		抗藥性表型比例 (β -lactam Class Resistance Phenotype Prevalence, %), 續上表			
		Acquired Penicillinase	Wild Type + Acquired Penicillinase	Inhibitor resistant Pase (IRT or OXA) + Acquired Penicillinase	Acquired Pase & Case (AmpC), Cephalosporinase (AmpC), Inhibitor resistant Pase (IRT or OXA), Acquired Penicillinase
菌株來源	n				
迪化汙水廠					
初沉池(D1)	37	2.7	10.8	24.3	2.7
放流水(D2)	0				
回收水(D3)	10	20.0	30.0	10.0	0.0
內湖汙水廠					
初沉池(N1)	22	4.5	4.5	22.7	0.0
放流水(N2)	18	11.1	5.6	11.1	0.0
回收水(N3)	7	0.0	14.3	42.9	14.3



4.2.3 多重抗藥性菌株


經參考醫療照護上包括 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)、European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 定義於體外抗生素敏感性測試中，對三個類別或以上抗生素具抗藥性之菌株為多重抗藥性 (multi-drug resistant) 菌株 (Magiorakos et al., 2012)。在迪化污水廠入流、內湖污水廠入流各有 5.4% (2/37)、18.2% (4/22) 為多重抗藥性菌株，且皆對四類抗生素具有抗藥性 (β -lactams、aminoglycosides、quinolones、trimethoprim-sulfamethoxazole)，污水廠排放水、回收水，則未發現有多重抗藥性菌株 (表 3)。自迪化污水廠入流與內湖污水廠入流獲得之此 6 株抗藥性菌株，依 β -lactamase 抗藥性表型區分 (表 4)，呈現以下兩組各佔 50%：high-level cephalosporinase (AmpC) + ESBL (50%，內湖入流 3 菌株)，ESBL (CTX-M like) (33.3%，迪化入流 2 菌株；16.7%內湖入流 1 菌株)；亦即此 6 株多重抗藥性菌株皆呈現 ESBL 抗藥性表型，且 50%為 ESBL CTX-M 表型。

4.3 畜牧場大腸桿菌抗藥性

4.3.1 抗藥性比例

畜牧場依採樣點位置及廢水處理前、後，區分為牛舍處理前 (廢水)、牛舍處理後 (進入豬舍廢水處理系統前)、豬舍處理前 (經固液體分離之廢水)、豬舍處理後 (灌溉使用、接管納入污水下水道系統)。來自畜牧場各個採樣點水中大腸桿菌菌株對不同抗生素的抗藥性比例如表 5 與圖 8。

牛舍處理前水中大腸桿菌菌株抗藥性表現於 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類的 ampicillin-sulbactam (15.3%)；cephalosporin 類的窄效性 cefazolin、cefuroxime，廣效性 ceftriaxone、ceftazidime、cefepime 與 aminoglycoside 類 gentamicin (皆為 11.9%)；葉酸合成抑制劑 trimethoprim-sulfamethoxazole (3.4%)；相較處理前，處理後菌株對 β -lactam 藥物抗藥性比例上升，包括



ampicillin-sulbactam (34.6%)，以及由處理前 11.9% 上升至處理後 34.6% 的 cephalosporin 類 cefazolin、cefuroxime、ceftriaxone、ceftazidime、cefepime 與 aminoglycoside 類 gentamicin。處理後則未發現對葉酸合成抑制類 trimethoprim-sulfamethoxazole 具抗藥性菌株。

豬舍處理前水中大腸桿菌菌株抗藥性僅表現於 ampicillin-sulbactam (12.5%)，而處理後水中菌株抗藥性上升，表現於 ampicillin-sulbactam (22.7%)、廣效性 cefuroxime (2.3%)、葉酸合成抑制類 trimethoprim-sulfamethoxazole (13.6%)。其中對 cefuroxime、trimethoprim-sulfamethoxazole 的抗藥性也在牛舍處理前後、牛舍處理前的菌株中呈現。

畜牧場菌株對 cephamycin 類：cefmetazole、flomoxef， β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類：cefoperazone-sulbactam、piperacillin-tazobactam，carbapenem 類：ertapenem、imipenem，quinolone 類：ciprofloxacin、levofloxacin，aminoglycoside 類其中之 amikacin，甘氨酸環素類：tigecycline，在牛舍、豬舍處理前、處理後四處皆未出現抗藥性菌株。畜牧場亦無符合多重抗藥性定義之菌株。



表 5. 畜牧場大腸桿菌抗藥性比例

菌株來源	n	抗藥性比例 (Resistance prevalence, %)									
		CZ	CXM	CMZ	CRO	CAZ	FEP	FMOX	SAM	SCF	TZP
畜牧場-牛											
處理前(FC4)	59	11.9	11.9	0.0	11.9	11.9	11.9	0.0	15.3	0.0	0.0
處理後(FC5)	26	34.6	34.6	0.0	34.6	34.6	34.6	0.0	34.6	0.0	0.0
畜牧場-豬											
處理前(FS4)	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.5	0.0	0.0
處理後(FS5)	44	0.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	22.7	0.0	0.0

菌株來源	n	抗藥性比例 (Resistance prevalence, %)									
		ETP	IPM	CIP	LVX	SXT	GM	AN	TGC	R3	R4
畜牧場-牛											
處理前(FC4)	59	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	11.9	0.0	0.0	0.0	0.0
處理後(FC5)	26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	34.6	0.0	0.0	0.0	0.0
畜牧場-豬											
處理前(FS4)	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
處理後(FS5)	44	0.0	0.0	0.0	0.0	13.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

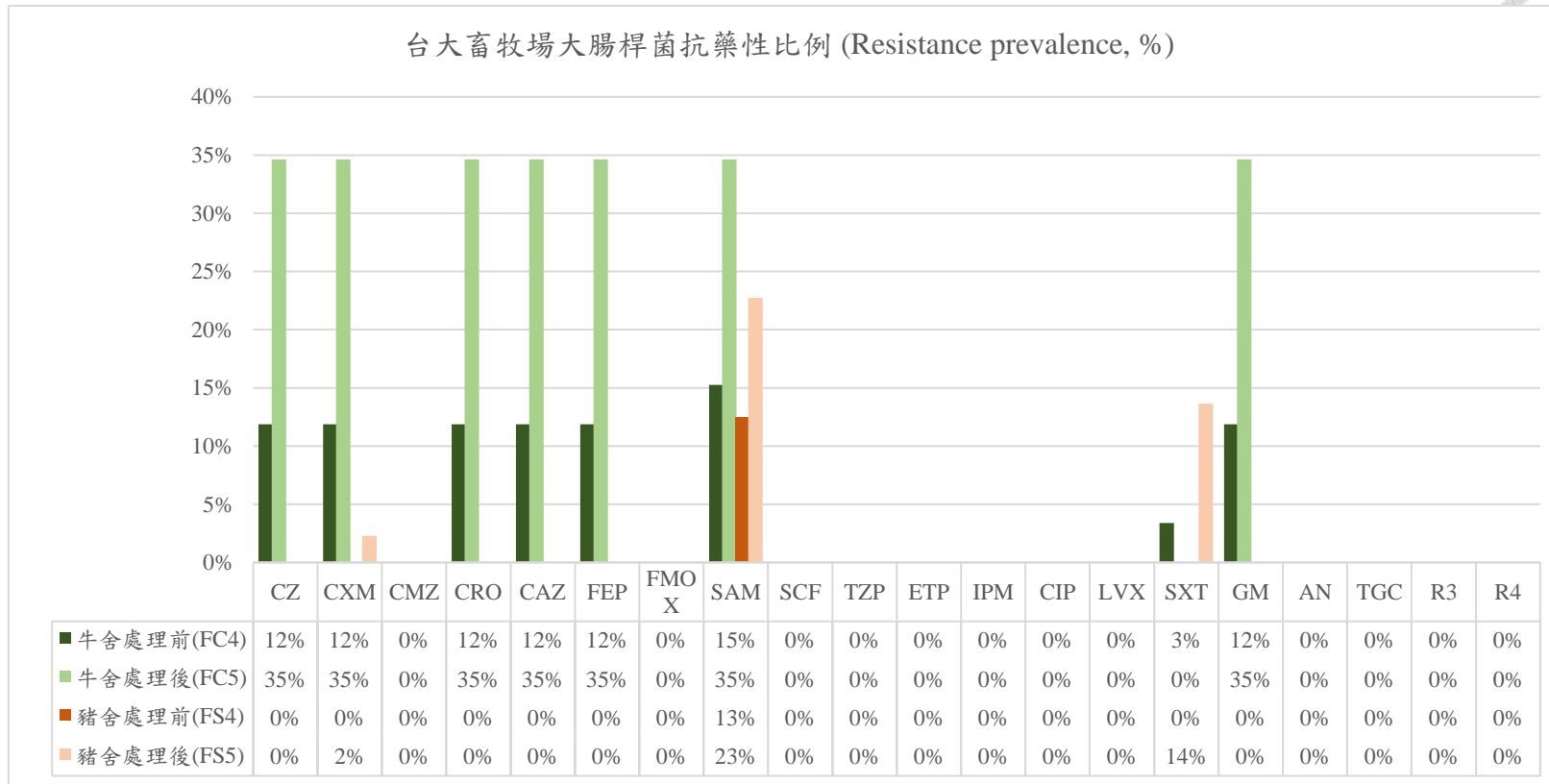


圖 8. 畜牧場大腸桿菌抗藥性比例

(1) cephem 類含 cephalosporin 類及 cephamycin 類：cefazolin (CZ) (第一代 cephalosporin)，cefuroxime (CXM) (第二代 cephalosporin)，cefmetazole (CMZ) (cephamycin 類)，ceftriaxone (CRO) (第三代 cephalosporin)，ceftazidime (CAZ) (第三代

cephalosporin)，cefepime (FEP) (第四代 cephalosporin)，flomoxef (FMOX) (cephamycin 類)；(2) β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類：ampicillin-sulbactam (SAM)，cefoperazone-sulbactam (SCF)，piperacillin-tazobactam (TZP)；(3) carbapenem 類：ertapenem (ETP)，imipenem (IPM)；(4) quinolone 類：ciprofloxacin (CIP)，levofloxacin (LVX)；(5) aminoglycoside 類：amikacin (AN)，gentamicin (GM)；(6) 葉酸合成抑制劑類：trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)；(7) 甘氨酸環素類：tigecycline (TGC)；共 18 個抗生素。R3, R4, 對三個類別或四個類別抗生素具抗藥性，定義對「至少三類」抗生素具有抗藥性的菌株即為具多重抗藥性 (multi-drug resistance)。





4.3.2 乙內醯胺分解酶表型比例

畜牧場菌株呈現 β -lactamase 抗藥性表型的組合如表 6。各採樣點菌株呈 wild type 佔 62-78% (牛舍處理前 78%，牛舍處理後 65.4%，豬舍處理前 62.5%，豬舍處理後 70.5%)，ESBL 抗藥性表型其中 inhibitor resistant Pse (IRT or OXA) + acquired penicillinase 僅出現在牛舍處理前與豬舍處理後 (11.4%)，同時豬舍也僅有此 ESBL 型態。

牛舍菌株抗藥性表型以 high-level cephalosporinase (AmpC) + ESBL 占最高比例 (處理前 11.9%，處理後 34.6%)，廢水處理前之其他抗藥性表型以 acquired penicillinase 為主 (wild type + acquired penicillinase 6.8%，inhibitor resistant Pse (IRT or OXA) + acquired penicillinase 3.4%)。

豬舍菌株抗藥性表型在廢水處理前、處理後皆以 acquired penicillinase 為主，包括僅有 acquired penicillinase (處理前 12.5%，處理後 11.4%)，與同時表現 wild type + acquired penicillinase (處理前 25%，處理後 6.8%)。



表 6. 畜牧場大腸桿菌抗藥性表型比例

		抗藥性表型比例 (β -lactam Class Resistance Phenotype Prevalence, %)					
菌株來源	n	Wild type	ESBL	ESBL (CTX-M like)	ESBL+SHV-1 Hyperproduction	High-level Cephalosporinase (AmpC) + ESBL	High-level Cephalosporinase (AmpC) + SHV-1 Hyperproduction
畜牧場-牛							
處理前(FC4)	59	78.0	0.0	0.0	0.0	11.9	0.0
處理後(FC5)	26	65.4	0.0	0.0	0.0	34.6	0.0
畜牧場-豬							
處理前(FS4)	8	62.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
處理後(FS5)	44	70.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
畜牧場合計	137						

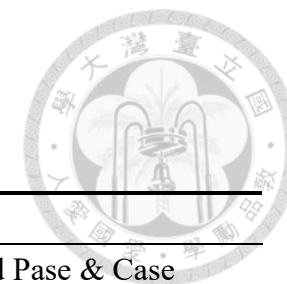


表 6 (續). 畜牧場大腸桿菌抗藥性表型比例

		抗藥性表型比例 (β -lactam Class Resistance Phenotype Prevalence, %), 續上表			
菌株來源	n	Acquired Penicillinase	Wild Type + Acquired Penicillinase	Inhibitor resistant Pse (IRT or OXA) + Acquired Penicillinase	Acquired Pse & Case (AmpC), Cephalosporinase (AmpC), Inhibitor resistant Pse (IRT or OXA), Acquired Penicillinase
畜牧場-牛					
處理前(FC4)	59	0.0	6.8	3.4	0.0
處理後(FC5)	26	0.0	0.0	0.0	0.0
畜牧場-豬					
處理前(FS4)	8	12.5	25.0	0.0	0.0
處理後(FS5)	44	11.4	6.8	11.4	0.0
畜牧場合計	137				


第五章 討論與總結



5.1 汙廢水中大腸桿菌抗藥性

細菌抗藥性的問題首先受到重視是來自臨床病人感染症治療的藥物失效，關於人畜共通的致病菌如大腸桿菌抗藥性研究顯示，除了醫療機構內制定適切且節制的治療計畫，減少抗生素濫用以外，對畜牧及環境中的抗藥性細菌生態的瞭解也是制定策略時不可或缺的面向。本研究結果顯示，台北市汙水廠接收家戶及事業用水的入流水中，大腸桿菌除了對於第一線治療抗生素，如 ampicillin-sulbactam、窄效性 cephalosporins 類 (cefazolin、cefuroxime)、葉酸合成抑制類 trimethoprim-sulfamethoxazole 等具抗藥性之外，也對於後線治療之廣效性抗生素，如廣效性 cephalosporin 類與 cephamycin 類 (ceftriaxone、ceftazidime、cefepime、cefmetazole、flomoxef 等) 與 quinolone (levofloxacin、ciprofloxacin) 具抗藥性。並發現了多重抗藥性菌株的存在，但尚未檢測到對廣效性後線抗生素 carbapenem 具抗藥性的菌株。具有 ESBL 抗藥性表型也佔了 62.2% (迪化廠) 與 72.7% (內湖廠)。根據 Lien 等人在一項越南的醫院廢水中大腸桿菌抗藥性研究，連續一年中每個月連續採樣收集的 256 株大腸桿菌中，83% 的菌株檢測到對至少一種抗生素的抗藥性，多重藥抗藥性比例為 32%；對於 trimethoprim-sulfamethoxazole 抗藥性比例最高 (70%)，carbapenem 類抗生素 imipenem 最低 (1%)；43% 的菌株產 ESBL，且 *bla*_{TEM} 基因型比 *bla*_{CTX-M} 型更常見 (Lien et al., 2017)。

汙水廠接收人群活動產生家庭汙水、事業廢水，尤其是未經初步處理的醫療機構廢水，其中的化學汙染源如大量消毒劑、代謝物與抗生素殘留，以及帶有經抗生素治療之細菌，可能促使遺傳物質抗藥性基因在此貯存環境中易於在細菌間水平交換而散播 (Bouki, Venieri, & Diamadopoulos, 2013; Kovalova et al., 2012; Lien et al., 2017)。經由汙水處理的過程，本研究顯示放流水與回收水菌株中未再




發現多重抗藥性菌株，然而抗藥性比例並未呈現顯著的降低，且 ESBL 抗藥性表型的比例仍佔 40%至 71.4%，代表細菌仍可能對 β -lactam 抗生素的感受性降低，也極可能發展為同時對 quinolone 類、trimethoprim-sulfamethoxazole 的多重抗藥性。對照國外研究發現經汗水處理後菌株抗藥性比例增加，是值得注意的問題。

本研究在畜牧場的結果顯示，畜牧場菌株主要對 ampicillin-sulbactam、cephalosporin 類、aminoglycoside 類、trimethoprim-sulfamethoxazole 等抗生素具抗藥性，除了整體相較汗水廠的抗藥性比例顯著較低，也未對 cephamycin 類、 β -lactam 合併 β -lactamase 抑制劑類、quinolone 類、carbapenem 類等較廣效性與後線的抗生素表現抗藥性；畜牧場菌株的野生型佔 62%至 78%，抗藥性表型主要為 acquired penicillinase 與 high-level cephalosporinase (AmpC)併有 ESBL 的表型。根據 Agga 等人於研究也曾觀察到畜牧場對 cephalosporin 類抗生素、quinolone 類抗生素的抗藥性比例比汗水廠顯著較低 (Agga et al., 2015)，然而 Kindle 等人於蘇黎世大學獸醫學院 (Swine Medicine of the Vetsuisse Faculty Zurich) 一項探討 quinolone 類藥物在畜牧場 (豬舍) 呈現的抗藥性研究卻指出，其中有 68.4% (119 株) 為多重抗藥性菌株，有 21.8% (38 株) 至少帶有一種質體 (plasmid) 主導的 quinolone 抗藥性表型 (Kindle et al., 2019)，由上述的差異，可推測受限於畜牧場的規模與營運方式多樣化，本研究所採樣的小型畜牧場屬於台灣大學農業試驗場，應無法類比至商業化的國內外畜牧場環境菌株抗藥性情形。

5.2 環境水體中細菌抗藥性之研究重點及未來建議

本研究認為採樣點的特性與地理區域、產業特徵分布對細菌抗藥性的呈現至為重要，並且應重視環境中汗廢水、承受排放的自然水體中，抗藥性基因的聚集與傳遞現象，與人類、動物活動時危害暴露的可能。

國內醫院排放廢水並未強制需經初步處理再排放入都市汗水下水道系統，醫院廢水中分離的抗藥性菌株比例通常相較於都市汗水中更高，與院內感染管制的細菌抗藥性監測之長期變化關係卻仍待補足。國內主管動物用藥與相關之抗藥性



監測屬於行政院農業委員會職責，然而畜牧業的細菌抗藥性監測並未經常性公開，在人畜共通致病菌抗藥性的分布與變化仍缺少長期性背景資料的基礎。根據Chen 等人在台灣南部河流水域觀察到，從河水中分離的 *bla*_{CTX-M} 基因型產 ESBL 的大腸桿菌與養雞場的存在有顯著關聯，但與養豬場無關(Chen et al., 2016)，該研究認為此發現可解釋為與豬相比，家禽每平均體重的抗生素使用時間更短，抗生素使用量更高。

根據 Franz 等人於荷蘭某地區廢水和地表水的 170 株產 ESBL 的大腸桿菌研究顯示，經由比對菌株的 ESBL 基因型 (ESBL-genotype)、親緣關係群 (phylogenetic group)、抗藥性表型 (resistance phenotype) 以及致病性標記 (virulence markers) 等特性，描述水生環境中 ESBL 大腸桿菌與其致病性的相關性，170 株產廣效性乙內醯胺分解酶 (ESBL-producing) 的大腸桿菌分離株其中有 17.1% 與致病性大腸桿菌的特徵相關 (非腸內型 ExPEC 佔 8.8%，腸內型佔 8.3%)，而這些致病性 ESBL 大腸桿菌菌株當中有 84% 對三種或更多種不同分類的抗生素具有抗藥性；結合了 ESBL、多重抗藥性與致病性因子的大腸桿菌，在水生環境中可能在人類受到暴露時構成健康風險 (Franz et al., 2015)。目前國內再生水規劃依水利署報告 (水利署, 2016)，將再生水之使用定調為供應工業用水為主 (冷卻、鍋爐、製程)，民生次級用水為輔 (沖廁、非食用植栽澆灌用水)，再生水廠之設置，也以就近供應為工業用水為首要推動方向。另一方面，根據台北市政府公開新聞稿，於 2017 年試辦利用汗水處理後的乾燥污泥與垃圾混燒產生的焚化底渣再生粒料，進行內湖汗水處理廠的廠區道路更新工作，Reinthalder 等人在奧地利南部的研究發現汗水的生物處理導致大腸桿菌數量減少約 200 倍，然而有超過 10^2 CFU/mL 的大腸桿菌進入汗水(Reinthalder et al., 2003)，可見汗水處理過程有助於環境中傳播抗藥性細菌。在民生取用回收水，與污泥再利用的過程是否會有抗藥性細菌暴露的風險，未來應就相關易感族群再進行評估。




5.3 研究限制

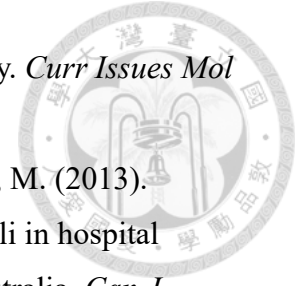
本研究的限制包括採樣的時間限制，無法呈現不同時期之比較；尚未完成篩選菌株的多位點序列分型 (Multilocus sequence typing; MLST) 與親緣圖譜，對於菌株 ESBL 基因型鑑定、是否屬於致病性的序列 (sequence type) 等缺少佐證，對於抗藥性呈現相似圖譜的菌株，亦建議進一步以脈衝場凝膠電泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE) 等基因分型分析方式鑑定菌株重複性 (redundancy)，可使分析對照抗藥性比例時更具準確性。本研究也未納入討論與汙廢水個別階段處理過程中對細菌抗藥性的影響因子如溫度、濁度、需氧量等。另外在以抗生素紙錠測試法篩選傾向產 ESBL 菌株的步驟，可能低估其他類抗藥性機制的菌株；根據 Schauss 等人於德國的研究中檢測沼氣環境中產 ESBL 大腸桿菌之方法，改以篩選 ESBL 之 CHROMagar™ ESBL 培養基，在第一步篩選時可留下較多樣的潛在產 ESBL 細菌(Schauss et al., 2015)，再由 VITEK 自動化系統鑑定篩選菌種，應為可改良之產 ESBL 菌株篩選方式。而未來可進展的研究方向，應可針對相關文獻顯示抗藥性細菌熱區 (例如醫院或特定類型畜牧場)、人群易暴露區 (回收水民生取用點、作物灌溉區) 週遭水生環境的人為化學物質排放、抗藥性菌株分布關係，進行本地的地域傳播與相關健康風險的評估。

第六章 參考文獻



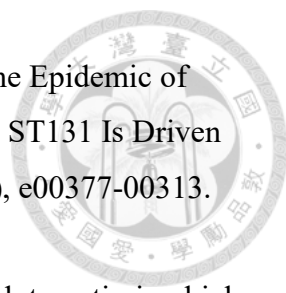
- 國立臺灣大學環境工程學研究所，台灣水環境再生協會（民 105）。下水道系統再生水利用技術參考手冊。經濟部水利署。取自
<https://www.wra.gov.tw/media/22089/105年-下水道系統再生水利用技術參考手冊.pdf>
- 行政院環境保護署《環境微生物檢測通則－細菌（NIEA E101.04C）》。
<https://www.epa.gov.tw/niea/BD1112FB7452F9A0>。公告日 105/08/17，實施日 105/11/15。
- 行政院環境保護署《水中總菌落數檢測方法－塗抹法（NIEA E203.56B）》、《水中總菌落數檢測方法－濾膜法（NIEA E205.57B）》
<https://www.epa.gov.tw/niea/39D19479D3897831>
- Agga, G. E., Arthur, T. M., Durso, L. M., Harhay, D. M., & Schmidt, J. W. (2015). Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. *PLOS ONE*, 10(7), e0132586. doi:10.1371/journal.pone.0132586
- Amos, G. C. A., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., & Wellington, E. M. (2014). Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(7), 1785-1791. doi:10.1093/jac/dku079
- Arcilla, M. S., van Hattem, J. M., Haverkate, M. R., Bootsma, M. C. J., van Genderen, P. J. J., Goorhuis, A., Grobusch, M. P., Lashof, A. M. O., Molhoek, N., et al. (2017). Import and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis*, 17(1), 78-85. doi:10.1016/s1473-3099(16)30319-x
- Bürgmann, H., Frigon, D., H Gaze, W., M Manaia, C., Pruden, A., Singer, A. C., F Smets, B., & Zhang, T. (2018). Water and sanitation: an essential battlefield in the war on antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Ecol*, 94(9), fiy101-fiy101. doi:10.1093/femsec/fiy101
- Bell, J. M., Turnidge, J. D., Gales, A. C., Pfaller, M. A., & Jones, R. N. (2002). Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from

- 
- SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 42(3), 193-198.
- Bockstael, K., & Van Aerschot, A. (2009). Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine*, 4(2), 141. doi:10.2478/s11536-008-0088-9
- Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulou, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1-9.
- Bradford, S. A., Morales, V. L., Zhang, W., Harvey, R. W., Packman, A. I., Mohanram, A., & Welty, C. (2013). Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(8), 775-893. doi:10.1080/10643389.2012.710449
- Chen, P. A., Hung, C. H., Huang, P. C., Chen, J. R., Huang, I. F., Chen, W. L., Chiou, Y. H., Hung, W. Y., Wang, J. L., et al. (2016). Characteristics of CTX-M Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Strains Isolated from Multiple Rivers in Southern Taiwan. *Appl Environ Microbiol*, 82(6), 1889-1897. doi:10.1128/aem.03222-15
- Chereau, F., Opatowski, L., Tourdjman, M., & Vong, S. (2017). Risk assessment for antibiotic resistance in South East Asia. *BMJ*, 358, j3393. doi:10.1136/bmj.j3393
- Chong, Y., Shimoda, S., & Shimono, N. (2018). Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Infect Genet Evol*, 61, 185-188. doi:10.1016/j.meegid.2018.04.005
- Corona, F., & Martinez, J. L. (2013). Phenotypic Resistance to Antibiotics. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2(2), 237-255. doi:10.3390/antibiotics2020237
- Ferreira da Silva, M., Tiago, I., Verissimo, A., Boaventura, R. A., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2006). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol*, 55(2), 322-329. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00032.x
- Franz, E., Veenman, C., van Hoek, A. H. A. M., Husman, A. d. R., & Blaak, H. (2015). Pathogenic Escherichia coli producing Extended-Spectrum β -Lactamases isolated from surface water and wastewater. *Scientific Reports*, 5, 14372. doi:10.1038/srep14372
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2015). Extended Spectrum



- Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*, 17, 11-21.
- Gundogdu, A., Jennison, A. V., Smith, H. V., Stratton, H., & Katouli, M. (2013). Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in hospital wastewaters and sewage treatment plants in Queensland, Australia. *Can J Microbiol*, 59(11), 737-745. doi:10.1139/cjm-2013-0515
- Harbarth, S., Balkhy, H. H., Goossens, H., Jarlier, V., Kluytmans, J., Laxminarayan, R., Saam, M., Van Belkum, A., Pittet, D., et al. (2015). Antimicrobial resistance: one world, one fight! , 4(1), 49. doi:10.1186/s13756-015-0091-2
- Hsu, J. T., Chen, C. Y., Young, C. W., Chao, W. L., Li, M. H., Liu, Y. H., Lin, C. M., & Ying, C. (2014). Prevalence of sulfonamide-resistant bacteria, resistance genes and integron-associated horizontal gene transfer in natural water bodies and soils adjacent to a swine feedlot in northern Taiwan. *J Hazard Mater*, 277, 34-43. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.02.016
- Hung, W.-T., Cheng, M.-F., Tseng, F.-C., Chen, Y.-S., Lee, S. S.-J., Chang, T.-H., Lin, H.-H., Hung, C.-H., & Wang, J.-L. (2018). Bloodstream Infection with Extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: the role of virulence genes. *bioRxiv*, 366187. doi:10.1101/366187
- Jakobsen, L., Sandvang, D., Hansen, L. H., Bagger-Skjot, L., Westh, H., Jorgensen, C., Hansen, D. S., Pedersen, B. M., Monnet, D. L., et al. (2008). Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. *Environ Int*, 34(1), 108-115. doi:10.1016/j.envint.2007.07.011
- Kindle, P., Zurfluh, K., Nüesch-Inderbilen, M., von Ah, S., Sidler, X., Stephan, R., & Kümmerlen, D. (2019). Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* with non-susceptibility to quinolones isolated from environmental samples on pig farms. *Porcine Health Management*, 5(1), 9. doi:10.1186/s40813-019-0116-y
- Kovalova, L., Siegrist, H., Singer, H., Wittmer, A., & McArdell, C. S. (2012). Hospital Wastewater Treatment by Membrane Bioreactor: Performance and Efficiency for Organic Micropollutant Elimination. *Environmental Science & Technology*, 46(3), 1536-1545. doi:10.1021/es203495d
- Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother*, 54(2),

- 311-320. doi:10.1093/jac/dkh325
- Lee, M., Heseck, D., Suvorov, M., Lee, W., Vakulenko, S., & Mobashery, S. (2003). A mechanism-based inhibitor targeting the DD-transpeptidase activity of bacterial penicillin-binding proteins. *J Am Chem Soc*, 125(52), 16322-16326. doi:10.1021/ja0384451
- Levin, B. R., & Rozen, D. E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 4(7), 556-562. doi:10.1038/nrmicro1445
- Levy S. B. (2002). *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys their Curative Powers*, Perseus Publishing, Cambridge, MA.
- Lien, T. Q., Lan, P. T., Chuc, N. T. K., Hoa, N. Q., Nhung, P. H., Thoa, N. T. M., Diwan, V., Tamhankar, A. J., & Stalsby Lundborg, C. (2017). Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Genes in Escherichia coli Isolates from Hospital Wastewater in Vietnam. *Int J Environ Res Public Health*, 14(7). doi:10.3390/ijerph14070699
- Lin, Y. C., Lai, W. W., Tung, H. H., & Lin, A. Y. (2015). Occurrence of pharmaceuticals, hormones, and perfluorinated compounds in groundwater in Taiwan. *Environ Monit Assess*, 187(5), 256. doi:10.1007/s10661-015-4497-3
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3), 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J., et al. (2008). Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 61(2), 273-281. doi:10.1093/jac/dkm464
- Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Infection Control*, 34(5, Supplement), S20-S28.
- Prado, T., Pereira, W. C., Silva, D. M., Seki, L. M., Carvalho, A. P., & Asensi, M. D. (2008). Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol*, 46(1), 136-141. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x
- Price, L. B., Johnson, J. R., Aziz, M., Clabots, C., Johnston, B., Tchesnokova, V.,

- 
- Nordstrom, L., Billig, M., Chattopadhyay, S., et al. (2013). The Epidemic of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* ST131 Is Driven by a Single Highly Pathogenic Subclone, H30-Rx. *mBio*, 4(6), e00377-00313. doi:10.1128/mBio.00377-13
- Queenan, K., Hasler, B., & Rushton, J. (2016). A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance: is there a business case for it? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(4), 422-427. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.06.014
- Reinthal, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., & Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res*, 37(8), 1685-1690. doi:10.1016/s0043-1354(02)00569-9
- Sanders, C. C., Peyret, M., Moland, E. S., Shubert, C., Thomson, K. S., Boeufgras, J. M., & Sanders, W. E., Jr. (2000). Ability of the VITEK 2 advanced expert system To identify beta-lactam phenotypes in isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 570-574.
- Schauss, T., Glaeser, S. P., Gütschow, A., Dott, W., & Kämpfer, P. (2015). Improved detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in input and output samples of German biogas plants by a selective pre-enrichment procedure. *PLOS ONE*, 10(3), e0119791-e0119791. doi:10.1371/journal.pone.0119791
- Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2015). Multidrug-resistant *Escherichia coli* in Asia: epidemiology and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13(5), 575-591. doi:10.1586/14787210.2015.1028365
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., & Schlüter, A. (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol*, 45(3), 239-252. doi:10.1016/s0168-6496(03)00164-8
- World Health Organization. (2012). The evolving threat of antimicrobial resistance : options for action. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/44812>
- World Health Organization (2005) In Containing antimicrobial resistance (10), WHO Policy Perspectives on Medicine 1–5
- World Health Organization. (2018). WHO Water, Sanitation and Hygiene strategy 2018-2025. World Health Organization.



<https://apps.who.int/iris/handle/10665/274273>.

- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(10), 1451-1470. doi:10.1016/j.addr.2005.04.002
- Yu, W. L., Chuang, Y. C., & Walther-Rasmussen, J. (2006). Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect*, 39(4), 264-277.
- Zhang, X., Lu, X., & Zong, Z. (2012). Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73(2), 204-206. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.007
- Zurfluh, K., Bagutti, C., Brodmann, P., Alt, M., Schulze, J., Fanning, S., Stephan, R., & Nuesch-Inderbinen, M. (2017). Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*, 50(3), 436-440. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.04.017

第七章 附錄



7.1 採樣紀錄表

污水細菌抗藥性計畫 採樣、培養紀錄
 臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所 / 臺灣大學附設醫院

(A) 採樣			
分析項目 <input checked="checked" type="checkbox"/> 微生物(細菌)		採樣人員	
採樣日期	2019-__-__	保存溫度	保冰桶內 ____ C
採樣時間	__ : __ ~ __ : __	採樣條件 <input type="checkbox"/> 室內 <input type="checkbox"/> 戶外(降雨 <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無; 其他: _____)	
(B) 樣本資訊			
採樣設施	<input type="checkbox"/> 土地汙水處理廠 <input checked="checked" type="checkbox"/> 內湖汙水處理廠 <input type="checkbox"/> 台大農場畜牧區 <input type="checkbox"/> C乳牛場 <input type="checkbox"/> S豬場 <input type="checkbox"/> 初期沉澱池 <input type="checkbox"/> 汙水廠放流水 <input type="checkbox"/> 畜糞槽帶水 <input type="checkbox"/> 畜糞處理後排水 <input type="checkbox"/> 汙水廠回收水 <input type="checkbox"/> 回收灌漑水		
用途分區	<input type="checkbox"/> 土地汙水處理廠 <input type="checkbox"/> 內湖汙水處理廠 <input type="checkbox"/> 台大農場畜牧區 <input type="checkbox"/> C乳牛場 <input type="checkbox"/> S豬場 <input type="checkbox"/> 初期沉澱池 <input type="checkbox"/> 汙水廠放流水 <input type="checkbox"/> 畜糞槽帶水 <input type="checkbox"/> 畜糞處理後排水 <input type="checkbox"/> 汙水廠回收水 <input type="checkbox"/> 回收灌漑水		
樣本序號	採樣設施	用途分區	備註
e.g. 01	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
	D N 1 2 3		
	FC FS 4 5 6		
(C) 實驗室分析			
送達時間	____ : ____ : ____ ; 冰箱溫度 ____ C		
處理時間	_____		

v20190228ed

污水細菌抗藥性計畫 採樣、培養紀錄
 臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所 / 臺灣大學附設醫院

--	--

v20190228ed

污水細菌抗藥性計畫 採樣、培養紀錄
 臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所 / 臺灣大學附設醫院

樣本序號	體積比	(1:1) (1:10) (1:100)	採樣點編號
連續總釋法	(樣本序號-稀釋倍數-重複樣本)		
稀釋管 編號 / 稀釋倍數	培养基 編號		
樣本序號	體積比	(1:1) (1:10) (1:100)	採樣點編號
連續總釋法	(樣本序號-稀釋倍數-重複樣本)		
稀釋管 編號 / 稀釋倍數	培养基 編號		
樣本序號	體積比	(1:1) (1:10) (1:100)	採樣點編號
連續總釋法	(樣本序號-稀釋倍數-重複樣本)		
稀釋管 編號 / 稀釋倍數	培养基 編號		
樣本序號	體積比	(1:1) (1:10) (1:100)	採樣點編號
連續總釋法	(樣本序號-稀釋倍數-重複樣本)		
稀釋管 編號 / 稀釋倍數	培养基 編號		
Coli agar 培養時間			
實驗紀錄			

v20190228ed

污水細菌抗藥性計畫 採樣、培養紀錄
 臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所 / 臺灣大學附設醫院

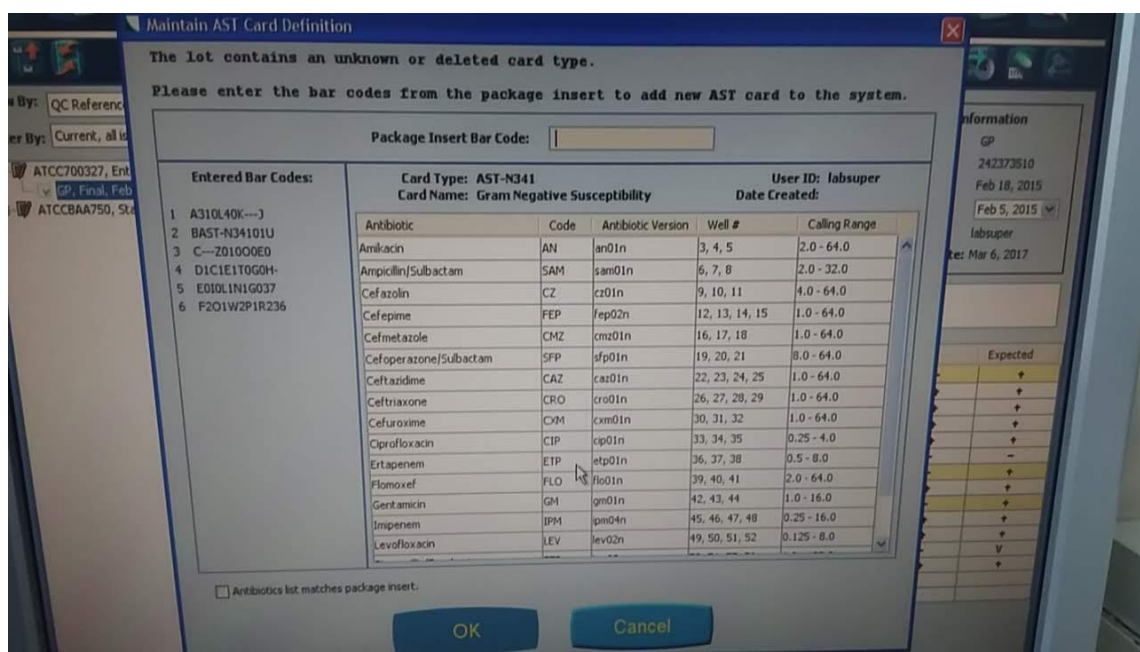
--	--

v20190228ed



7.2 VITEK™ 2 Compact System

7.2.1 藥敏卡片設定



7.2.2 AES 系統判讀畫面

