

出國報告（出國類別：訓練）

抗生素抗藥性區域短期訓練  
出國報告

(Regional Short-term Training on  
Antimicrobial Resistance)

服務機關：行政院農委會家畜衛生試驗所

姓名職稱：官南綾助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：105/11/13-105/11/18

報告日期：106/2/2

## 摘要

本次短期訓練由 OIE（OIE Collaborating Centres Diagnosis and Control of Animal Diseases and Related Veterinary Product Assessment in Asia）提供機會及經費，由日本動物醫藥品檢查所 National Veterinary Assay Laboratory（NVAL）主辦，在 105 年 11 月 14 日至 18 日期間針對抗生素抗藥性檢測議題，包含實驗室基本能力的訓練、國家監測計畫執行經驗分享、各國抗藥性現況分享，包含我國、越南、柬埔寨、菲律賓、泰國、緬甸、蒙古、香港等，共 13 人參加。本次 NVAL 訓練目的之一，乃是藉由資訊交流提升各國抗藥性意識並能持續投注心血。國家監測計畫經驗分享是另一個重點，NVAL 在日本獸醫抗藥性監測系統（The Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System；JVARM）中扮演核心角色，建立細菌分離、鑑定標準，由各地動物疾病診斷中心、經能力認證的民間公司收集菌株，交由 NVAL 進行抗藥性篩檢及後續分析，以網絡合作的方式能有效執行大量的、全國性的監測，如此高效率 and 涵蓋區域廣大分層分工網絡，值得借鏡。

## 目錄

第1章目的 .....	4
第2章訓練行程與內容 .....	5
第3章心得與建議 .....	11
第4章附圖 .....	12
第5章附錄 .....	13

## 第 1 章目的

日本動物醫藥品檢查所 National Veterinary Assay Laboratory (NVAL) 身為 OIE Collaborating Centres Diagnosis and Control of Animal Diseases and Related Veterinary Product Assessment in Asia 的成員，因應 One Health 的議題中對於全球抗藥性的重視，集結亞洲國家，在 105 年 11 月 14 日至 18 日期間舉辦首次抗生素抗藥性區域短期訓練，包含實驗室基本能力的訓練、國家監測計畫執行經驗分享、各國抗藥性現況分享，包含我國、越南、柬埔寨、菲律賓、泰國、緬甸、蒙古、香港等，共 13 人參加，期能藉由本次訓練，審視各自實驗室需要提升的技術，在相同的能力基礎下，未來能針對抗藥性的重要議題，分享資訊以達到區域性的連結、整合。

## 第 2 章訓練行程與內容

自 11 月 14 日起至 11 月 18 日在日本動物醫藥品檢查所 National Veterinary Assay Laboratory (NVAL) 進行為期五天的訓練，課程最主要是實驗室技術實作，並安排藥廠參觀、參訓人員分享各國抗藥性現況及抗藥性研討會。NVAL 的主要業務為確認動物用藥品的安全性，對於藥品的開發、製造及流通等階段進行審核把關，同時監測動物（家畜）來原之細菌抗藥性，執行日本獸醫抗藥性監測計畫（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System, JVARM）。

### 壹、 實驗室技術實作

實驗室技術實作為本次訓練重點，包含檢體細菌分離到進行藥物感受性試驗的完整流程：

#### (一) 細菌分離鑑定：

大腸桿菌及沙門氏菌是動物來源的重要抗藥性檢測菌種，NVAL 建議使用選擇性培養基搭配酵素培養基(chromogenic agar)，可以區別多種腸內菌科細菌。DHL 培養基及 DHNL 培養基（添加抗抗生素 Novobiocin）是選擇性培養基，沙門氏菌在其上的菌落是白色（若會產生 H<sub>2</sub>S 的菌株則會帶黑色），大腸桿菌成粉紅色菌落而克雷博氏菌則是呈現藍色；而 DHNL 培養基因為添加了抗生素，能抑制除了沙門氏菌以外細菌生長，提高沙門氏菌的分離率。針對沙門氏菌的部分，可搭配 *Salmonella* chromogenic agar，沙門氏菌會呈現紫紅色（magenta），而大腸桿菌、克雷伯氏菌及志賀菌等則是成藍色菌落。當挑選出可能是沙門氏菌及大腸桿菌的菌落後，配合 API 20E 套組進行後續的鑑定確認。

(二) 藥物感受性試驗：訓練中介紹的紙錠擴散試驗（disc diffusion method）、肉湯微量稀釋法（broth microdilution method）及瓊脂稀釋法（agar dilution method）等實驗方法都是以 CLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute）標準，並

在日本國家型計畫 JVARМ 使用，個別簡介如下：

1. 紙錠擴散試驗 (disc diffusion method)：將含有少數細菌 (0.5 McFarland) 的菌液塗到特定的培養基 (例如 Mueller Hinton Agar) 上，在培養基表面貼上代測抗生素紙錠，由於藥物在培養基中擴散，起了抑 (殺) 菌作用，形成了不長菌落的抑制圈。抑制圈的大小，反映某一抗生素對該菌抑菌的程度。此方法雖然有著需要人工丈量抑制圈耗時，且人為判讀時易有誤差的缺點；但此方法需要的設備簡單、操作容易且只要有商品化的抗生素紙錠，可依計畫目的即時更換檢測的抗生素種類，因此適合作為初階篩選、檢測。
2. 瓊脂稀釋法 (agar dilution method)：將事先配置好濃度的抗生素，分別加於融化並冷至 45°C 的定量瓊脂培養基中，搖晃混勻，等到培養基冷卻固定後即為含有藥物濃度遞減的培養基，接種測試菌於該培養基上，經培養後觀察，被檢菌生長情況，最低藥物抑制細菌生長者，即最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration ; MIC)。這個方法的缺點是製備培養基步驟繁複，人員訓練到能上手操作的時間長，優點則是能在同個培養基上同時作多株菌 MIC 測定，結果可靠，且可立即發現是否有汙染菌存在，抗生素的稀釋濃度可依計畫目的自行調整。
3. 肉湯微量稀釋法 (broth microdilution method)：NVAL 是使用日本商品化的 96 孔微量盤，盤底已含有不同稀釋濃度的抗生素。將隔夜培養之菌液調製成 0.5 McFarland 菌懸液，以 Mueller Hinton broth 1 : 1000 稀釋後，每孔中加 100  $\mu$ l，置於 35°C 培養 16~20 小時後判讀結果。以在小孔內完全抑制細菌生長的最低藥物濃度為 MIC，同時陽性對照孔 (即不含抗生素) 內細菌明顯生長試驗才有意義。相較於瓊脂稀釋法，肉湯微量稀釋法製備和操作都更為容易，而且使用量大的情況可以請廠商客製專用的 96 孔微量盤。

## 貳、 藥廠參觀

參觀位於東京目黑的フジタ製藥株式会社（Fujita Pharmaceutical Co., Ltd.），成立於 1930 年，主要是生產動物用藥品，包含經濟動物抗生素製劑、犬心絲蟲藥等多種產品，目前約有 110 位員工，年營收約五百萬美金。該藥廠導入自行開發之 smart factory 系統，從原料、半成品、成品包裝到出貨，整個產程都以條碼（barcode）結合 smart factory 系統，隨時回報到工作人員的智慧型手機。不同階層的工作人員有分層負責的管理權限，可掌控備料、倉儲、批次良率、出貨進度、人員工時及工作狀況等，加上產線多以機械手臂取代傳統人力進行重複性或負重的工作，才能以較少的人力維持整個藥廠高效率的產能。

## 參、 各國抗藥性現況

NVAL 請參訓成員分享各自國家的抗藥性現況，分享內容主要為各國產食用動物在養頭數、抗生素每年使用量（包含治療及飼料添加）、在食用動物（food-producing animal）的抗藥性現況、是否有國家型的抗藥性監測計畫及針對食用動物抗生素使用的相關管理辦法。柬埔寨的主要飼養動物為家禽，以小規模飼養為主，目前尚未有相關的國家型監測計畫。蒙古主要飼養動物為綿羊和山羊，在游牧的模式下，不容易調查抗生素使用量。越南對於抗生素的使用量尚無全面性的調查，管理獸醫用藥和推廣農民用藥觀念是近年努力的目標，並自 2013 年起開始進行國家型計畫。泰國自 2016 起進行首次國家型計畫，主要針對家禽及豬產業，從牧場到零售商通路，調查 *Salmonella*、*E.coli*、*Enterococcus* 及 *Campylobacter* 四種指標性細菌對於 12 種抗生素的抗藥性，且自 2015 年 8 月起，全面禁止抗生素作為飼料添加。菲律賓除了企業化養殖型態，還有一部分是後院豢養模式（backyard），此飼養型態增加疾病控制及抗生素管理的難度，抗藥性調查主要是大學等單位進行小規模的研究。緬甸的抗藥性監測計畫為 ZELS（Approach for Surveillance and Control of Zoonosis in Emerging Livestock system），自 2013 年起為期 5 年，主要分析疾病風險及抗藥性監測，此計畫提升了緬甸國內的實驗室硬體及技術，並提升牧場產能及食品安全。香港除了衛生署（Department of

Health) 針對抗藥性菌株如 carbapenemase-producing *enterobacteriaceae* (CPE)、vancomycin-resistant *enterococci* (VRE) 及 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 被動監測外，另外由香港大學執行流浪犬貓、水產市場及屠宰場的抗藥性監測。台灣抗藥性現況資料則感謝行政院農業委員會動植物防疫檢疫局提供：2006 年至 2010 年間是針對牧場監測，2011 年起改由屠宰場調查肉雞及豬隻中 *E. coli* 及 *Enterococcus faecalis/faecium* 等指標性細菌抗藥性；在抗藥性管理政策部分，一方面是逐漸減少可用於飼料添加的抗生素項目，至今已有 36 種抗生素被禁止，可用抗生素僅存 9 種。另一方面是藉由教育訓練、研討會提升現場獸醫及牧場從業人員用藥知識，建立各種動物的飼養管理及安全用藥手冊。台灣近年更致力於建立溯源機制 (Backtracking system)，從落實牧場登記到回溯動物產品 (例如 2015 年蛋品建立 QR code 系統)，並配合抗藥性監測的結果，能發現藥物殘留的問題產品或是不當用藥的牧場，並追蹤後續責任，期望能從牧場到餐桌提供更安心的食物供應鏈。

#### 肆、 抗藥性研討會

11 月 15 日 NVAL 舉辦了抗藥性研討會，分享國家型計畫執行經驗、日本院內感染監測 (Japan Nosocomial Infections Surveillance, JANIS)、食源性 (foodborne) 抗藥性細菌風險分析及日本大腸桿菌及沙門氏菌抗藥性研究等，尤其是國家型計畫：日本獸醫抗藥性監測計畫 (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System, JVARM) 的執行經驗值得我們學習，簡介如下：

JVARM 至 1999 年開始，由 NVAL 及獨立行政法人農林水產消費技術中心 (Food and Agriculture Materials Inspection Center, FAMIC) 執行主要的資料收集分析，研究分子流行病學及抗藥性等，並彙整年度報告交由日本農林漁產省 (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan) 分析風險因子及規劃後續風險管理。JVARM 計畫主要分三部分，在此主要介紹 NVAL 在 JVARM 中扮演的角色：

1. 抗生素銷售管控系統：藥廠產品審核及核發上市許可，從抗生素產量做源頭管控。
2. 牧場動物監測系統：此部分之抗藥性針對人畜共通細菌如 *Salmonella* spp. 及 *Campylobacter* spp.、指標菌（indicator bacteria）如 *E. coli* 及 *Enterococcus* spp.，及動物臨床病例病原菌。牧場採樣、細菌分離及藥物感受性試驗的工作由全日本 170 個家畜保健衛生所（livestock hygiene service centre）執行，相關菌株及抗藥性資料彙整給 NVAL 做後續分析研究；NVAL 則是提供家畜保健衛生所持續的教育訓練、技術及建議。
3. 屠宰場監測系統：抗藥性監測同樣是針對 *Salmonella* spp.、*Campylobacter* spp.、*E. coli* 及 *Enterococcus* spp.，只是改由 NVAL 認證合格的民營機構負責屠宰場採樣、細菌分離及藥物感受性試驗的工作，NVAL 則是定期要比對、確認民營機構能力以控制品質。

在 JVARM 計畫中可看到明確的分層分工，NVAL 位於核心的位置，負責訓練第一線單位如家畜保健衛生所及民營機構的實驗室能力及技術諮詢，由第一線單位進行大量的菌株收集及抗藥性初步篩選，由 NVAL 彙整資料及後續抗藥性研究，並提出年度報告交由農林水產省分析其中的風險因子。這樣的分層網絡才能有效率的執行大規模抗藥性監測，進而主動發現問題，舉例來說：在日本，頭孢子素（cephalosporins）禁止用於家禽，但自 2003 年起，在健康肉雞及蛋雞分離的 *E.coli* 菌株中卻發現頭孢子素的抗藥性明顯上升，追溯才發現原來是種雞場為了降低蛋內感染，以仿單標示外使用（Off-label Use）將頭孢子素注射於蛋內。當 2011 年起明訂禁止頭孢子素蛋內注射的使用後，對於頭孢子素的抗藥性立刻顯著下降。

JVARM 更進一步與 JANIS 進行整合並互相分享資訊，動物抗藥性監測資料與人類院內感染抗藥性監測結果比對，對於人畜共通及公共衛生議題能提供更全面的視角，舉例而言：兩相比較後，*E.coli* 對於頭孢子素的抗藥性在肉雞與人類

院內感染的結果大相逕庭；在肉雞方面自 2011 年起明顯下降（與前述提及禁止頭孢子素蛋內注射的政策有關），而人類院內感染的情形卻是每年逐年上升，顯示動物和人類產生抗藥性菌株的成因或源頭不同。進一步分析抗藥性基因（ $\beta$ -lactamase gene），動物和人類主要的基因型別不同，也支持兩者抗藥性菌株源頭不同的推論。因此，不同抗藥性監測系統及領域的整合更顯重要，NVAL 對於日後抗藥性研究的期望是能夠擴大結合水產、寵物及環境領域，甚至是亞洲 OIE 會員國間互助合作，實現 One Health 的理念。

## 第 3 章心得與建議

### 心得

本次訓練期間著重的是實驗室基本能力，包含大腸桿菌、沙門氏菌的分離、鑑定；抗藥性檢測的紙錠擴散試驗（disc diffusion method）、肉湯微量稀釋法（broth microdilution method）及瓊脂稀釋法（agar dilution method）等實驗方法。雖然除了瓊脂稀釋法，其他實驗方法本所細菌實驗室已建立，本次訓練中仍收穫良多，特別是實驗技巧、抗藥性結果判讀基準有更進一步的實作及討論，重點提升實驗能力。在抗藥性現況分享部分，我國、香港、泰國等對於抗藥性這個全球性重要議題已有部分監測成果，雖然計畫規模相對於 OIE 要求仍有距離，然而本次 NVAL 訓練目的之一，乃是藉由資訊交流提升各國抗藥性意識並能持續投注心血。國家監測計畫經驗分享是另一個重點，NVAL 在日本獸醫抗藥性監測系統（JVARM）中扮演核心角色，建立細菌分離、鑑定標準，由各地動物疾病診斷中心、經能力認證的民間公司收集菌株，交由 NVAL 進行抗藥性篩檢及後續分析，以網絡合作的方式能有效執行大量的、全國性的監測，爰能提供全面性的結果。

### 建議

藉由本次受訓的機會，建立與其他國家實驗室交流的管道，預留日後合作的空間，本所已具備抗藥性監測等相關實驗室能力，NVAL 於訓練結束時表示，將以本次訓練期間之意見回饋為依據，未來將擬定更進階之技術訓練，屆時希望本所能有機會參與。在抗藥性監測系統的部分，參考 JVARM 執行模式，應規劃「分工」、「合作」的網路，由地方防治單位、其他實驗室與本所之間，農方及衛生福利部間，能建立有效、互信且緊密合作的工作網路，相信對於抗藥性監測的量能及效率可大幅提升。

## 第 4 章附圖

圖 1.



圖 2.



圖 3.



圖 4.



圖 5.



圖 6.



圖 1，始業式，NVAL 成員、OIE 代表與受訓成員合照。

圖 2，歡迎晚會，受訓成員於會場中向 NVAL 成員及 OIE 代表致謝。

圖 3，實驗室技術訓練，此圖為操作瓊脂稀釋法。

圖 4，參觀フジタ製薬株式会社（Fujita Pharmaceutical Co., Ltd.）。

圖 5，各國抗藥性現況分享與抗藥性研討會現場。

圖 6，結業式，受訓成員與 NVAL 專家討論、提供建議及分享心得。

## 第5章附錄-Training program

OIE Collaborating Center Regional Short-term Training on Antimicrobial Resistance  
in National Veterinar Assay Laboratory, Tokyo, Japan, 14-18 November 2016

### Training Programme

Date	From	To	Content
14-11-2016 (Mon)	10:00	10:30	Opening Ceremony (Dr. M. Yamamoto & Dr. H. Kugita), Photo Session
	10:30	11:00	Introduction by OIE Asia Pacific (Dr. F. Dwi)
	11:00	12:30	Introduction by NVAL - NVAL Overview (DVD) - Introduction of NVAL and NIAH as OIE Collaborating Centre (Dr. T. Ogawa) - Introduction for AMR Training (Dr. M. Kijima)
	12:30	13:30	Lunch
	13:30	17:00	Preparation, Lecture (Dr. M. Ozawa & Dr. M. Uchiyama) Laboratory Work - <b>Disk diffusion method</b> (Dr. Ozawa & Uchiyama ) - <b>Broth microdilution method</b> (demonstration; Dr. T. Shirakawa & Ozawa) - <b>Inoculation of feces on selective agar</b> (Dr. Uchiyama & Shirakawa)
	17:00	18:00	Move to Tachikawa Palace Hotel
	15-11-2016 (Tue)	9:30	12:00
12:00		13:00	Lunch
13:00		14:40	Presentation from participants about current situation of their country on AMR - 10min x 8, Q&A
14:40		15:00	Coffee break
<b>AMR OneHealth Seminar 2016 in NVAL *</b>			
15:00		15:30	Lecture ( <b>National Action Plan on AMR</b> ) (Dr. Y. Okamura, JMAFF)
15:30		16:00	Lecture ( <b>Risk Assessment for foodborne antimicrobial-resistant bacteria</b> ) (Dr. H. Okura, Food Safety Commission)
16:00		16:30	Lecture ( <b>One health approach from JANIS (Japan Nosocomial Infections Surveillance)</b> ) (Dr. K. Shibayama, National Institute of Infectious Diseases)
16:30		17:00	Lecture ( <b>AMR situation in <i>Salmonella</i> and <i>E. coli</i></b> ) (Dr. M. Akiba, NIAH)
17:00		18:00	Move to Tachikawa Palace Hotel
19:00		21:00	<b>Welcome dinner (Tachikawa Grand Hotel)</b>
*with participants in charge of human healthcare in Asia			
16-11-2016 (Wed)	9:30	11:00	Laboratory Work (at NVAL!) - <b>Identification of <i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i></b> (Dr. Uchiyama & Kawanishi)
	11:00		Move to Manufacturer
	12:00	13:00	Lunch (on the way to the Manufacturer) <b>No need to bring lunch box!</b>
	13:30	16:00	Plant tour (Antibiotics Production Plant)
16:00	17:00	Move to Tachikawa Palace Hotel	
17-11-2016 (Thu)	9:30	12:00	Preparation, Lecture (Dr. M. Kawanishi) Laboratory Work - <b>Agar dilution method; plate preparation</b> (Dr. Kawanishi & Shirakawa)
	12:00	13:00	Lunch
	13:00	16:00	Laboratory Work - <b>Agar dilution method; bacterial inoculation</b> (Dr. Kawanishi & Shirakawa)
	16:00	17:00	Lecture (Presentation of <b>JVARM data</b> ) (Dr. Kijima)
	17:00	18:00	Move to Tachikawa Palace Hotel
	18-11-2016 (Fri)	9:30	11:00
11:00		11:30	Closing Ceremony (issuance of certification)
11:30		12:30	Move to Tachikawa Palace Hotel