

蛇毒蛋白應用研究及抗蛇毒血清製造技術

劉健信^{*}、李佳蓉、李蓉、許靜侖、陳昭宏、張筱琦、謝文欽

摘要

臺灣常見的六大毒蛇依照生態分布可分為地棲的百步蛇 (*Deinagkistrodon acutus*)、龜殼花 (*Protobothrops mucrosquamatus*)、鎖鏈蛇 (*Daboia russelli siamesis*)、雨傘節 (*Bungarus multinctus*) 及眼鏡蛇 (*Naja atra*) 等及半樹棲型赤尾青竹絲 (*Viridovipera stejnegeri*)。而蛇毒是毒蛇從毒腺中分泌出來的一種液體，主要成分除了蛇毒蛋白，另外還有輔助酶等。蛇毒成分十分複雜，不同蛇毒的毒性、藥理及臨床症狀各有特點，單就藥理學作用來分類則可分成神經性蛇毒、出血性和混合性蛇毒。蛇毒蛋白的研究基礎就是利用其藥理上特性，進而分離純化特殊蛇毒蛋白，結合分子生物學及結構化學等方式，加以應用在現在製藥、檢驗和抗蛇毒血清的製造。現今已上市藥物如利用蛇毒蛋白，具有抗凝血功能的肽化合物，被用來治療心絞痛，另外像消炎、糖尿病、高血壓、慢性疼痛及腦中風藥物中都可看到應用蛇毒蛋白的蹤跡。在臨床檢驗方面，疾病管制署自製抗雨傘節及眼鏡蛇毒馬血漿中，已成功分別純化出抗雨傘節毒及眼鏡蛇毒的專一性抗體，並嘗試用免疫沉澱加上質譜分析的方法，鑑定此專一性抗體所能辨認之蛋白質身分。未來若成功發展此偵測平臺技術，將可加速臨床蛇咬病人的蛇毒鑑別診斷，進而提高病人治癒成功率。面對毒蛇咬傷中毒的個案，及時注射正確的抗蛇毒血清製劑仍是目前最有效的治療方式。馬匹仍是國際公認最常用、能大量取得、且操作安全的抗蛇毒血清製造用動物。將蛇毒抗原免疫至馬匹體表，使馬匹體內的免疫系統產生能中和蛇毒蛋白的抗體，接著採集馬匹血液分離血漿，再以胃蛋白酶 (pepsin) 消化及鹽析純化處理，分裝和真空凍結乾燥，成為治療用抗蛇毒血清。根據資料顯示疾病管制署產製的抗蛇血清凍晶注射劑，可有效治療本土性毒蛇咬傷病患外，亦無明顯副作用。

關鍵字：毒蛇；蛇毒；抗蛇毒血清

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心
通訊作者：劉健信^{*}
E-mail: liuch@cdc.gov.tw

投稿日期：2014 年 4 月 1 日
接受日期：2014 年 7 月 15 日
DOI: 10.6524/EB.20150224.31(4).001

前言

臺灣地處亞熱帶地區，地型多高山，森林茂密，氣候溫暖潮濕，非常適合蛇類生長。從日據時代起就開始蛇類的研究，從早期羽鳥重郎進行的臺灣蛇類分類，中間有山口謹爾的臺灣蛇毒血清學研究及之後的血清學療法等基礎研究，到後來杜聰明博士開啓臺灣蛇毒的藥理及毒理學研究之濫觴，促使臺灣蛇毒研究享譽國際，進而在世界舞臺發光發熱，使蛇毒研究立下臺灣本土基礎科學不可抹滅的重要里程碑。

本篇文章將從臺灣毒蛇生態的角度簡介現今臺灣蛇類分類，進而介紹蛇毒蛋白應用研究和抗蛇毒血清製造的方式，在溫故知新這項臺灣之光榮的同時，也希望藉此能扭轉大家聞蛇色變的刻板印象，啟發蛇毒對人類健康促進及疾病治療的無限可能。

一、臺灣毒蛇生態簡述：臺灣毒蛇可依生態表現型及毒腺與毒牙等特徵來分類。

(一) 依生態表現型分類：Seymour(1987) [1]將臺灣的毒蛇依生態表現型，區分為水棲(Aquatic)、半水棲(Semi- Aquatic)、地穴居(Fossorial)、地棲(terrestrial)及樹棲(Arboreal)等五大類。依其定義歸納：臺灣典型的水棲毒蛇，以蝙蝠蛇科(Elapidae)的海蛇亞科(Hydrophiinae)為代表，其終生不上陸地；半水棲蛇類則主要在水中活動覓食，不同種類有不同比例的時間在陸地上活動，以蝙蝠蛇科的闊尾海蛇亞科(Laticaudinae)及水蛇科(Homalopsidae)為典型；地穴居蛇類，則是棲息於土壤的縫隙及枯枝落葉層中，臺灣並不具有此類型的毒蛇；地棲蛇類，活動空間以地面為主，臺灣常見毒蛇均屬此一生態表現型，如百步蛇、鎖鏈蛇、雨傘節及眼鏡蛇等；樹棲蛇類的體型多半呈現細長型，尾部比例長且纏繞性良好，體色亦多以綠色及褐色系為主，如：大頭蛇；還有一些蛇類的特性，介於地棲與樹棲之間，並遊走於此兩類型的棲息環境，形成所謂的半樹棲(Semi- arboreal)類型，如：茶斑蛇、赤尾青竹絲等。

(二) 依毒腺與毒牙分類：目前分布於臺灣符合廣意定義的毒蛇，共有六科31種，依毒蛇毒牙生長相對位置的前後及結構，蛇毒注射效率由高至低，依序可區分為：前管牙(solenoglyphos)、前溝牙(proteroglyphous)及後溝牙(opisthoglyphos)等三大類[2]。然而，過半數以上的種類，棲息在與人類活動的空間相聚較遠的環境，如：隨著洋流四處移動的海蛇；或數量稀少，如：瑪家龜殼花、菊池氏龜殼花等；且攻擊性不強，如：蝙蝠蛇科的三種赤蛇：環紋赤蛇、梭德氏代紋赤蛇及羽鳥氏帶紋赤蛇，這些“毒蛇”雖具有毒牙與毒腺，卻甚少或從未曾發生過咬傷人的案例。

二、蛇毒蛋白成分分析及藥理作用

蛇毒是從毒蛇毒腺分泌出來的一種毒液，一般呈淡黃至黃褐色之蛋清狀黏稠液體，有特殊腥味。當中成分除了佔絕大比例的水分外，另外還有干擾生理機能的毒素及各類輔助蛋白酶。新鮮蛇毒在常溫及空氣中容易變質，喪失活性及毒力，故採真空或凍結乾燥處理，可保存長達十數年以上。

分析臺灣常見六大毒蛇，其所含有的蛇毒蛋白成分及藥理作用機制各有特點，導致表現出的蛇咬臨床症狀也有所不同，分析說明如下：

(一) 神經性蛇毒：例如雨傘節及飯匙倩。

1. 雨傘節蛇毒中依據其毒理作用位置不同可成為突觸前神經毒素(Pre-synaptic neurotoxin; 又稱 β 神經毒素， β -bungarotoxin)及突觸後神經毒素(Post-synaptic neurotoxin; 又稱 α 神經毒素， α -bungarotoxin) [3]。 β 神經毒素具有與乙醯膽鹼受體 (acetylcholine receptor) 結合的專一特性，故可阻斷乙醯膽鹼 (acetylcholine) 釋放磷脂類成分，中斷神經至肌肉的傳導。另外 α 神經毒素則作用在運動神經末端，他可競爭乙醯膽鹼在肌細胞膜上受體的位置，抑制乙醯膽鹼的釋放，而產生不可逆的神經至肌肉傳導阻斷作用，故遭雨傘節咬傷之患者會出現劇烈麻痺的症狀。
2. 眼鏡蛇毒中的主要蛇毒蛋白成分有：磷脂水解酵素(Phospholipase A2, PLA2)、心臟毒蛋白 (Cardiotoxin, CTX) 及神經毒素(Neurotoxin, NTX)。磷脂水解酵素PLA會使紅血球產生破裂進而引起溶血，主要作用方式是造成細胞內游離酸增加，使膜蛋白發生異常乙醯化，進而影響細胞功能，另外還會造成肌肉壞死、水腫、內出血及發炎現象等[4;5]。另外心臟毒蛋白被認為是眼鏡蛇毒中最主要成分，約佔蛇毒蛋白的45-55%，主要作用機制認為是造成鈣離子調解受到影響，進而造成心肌及骨骼細胞的壞死，或是破壞細胞膜上的雙層磷脂結構，進而造成細胞死亡。而毒性成分NTX，屬於突觸後膜神經毒素，作用與雨傘節的 α 神經毒素相似。

(二) 出血性蛇毒：例如龜殼花、赤尾青竹絲及百步蛇，其特色說明如下：目前已知的出血性蛇毒中同時擁有造成出血及凝血的藥理機制分子存在。其中ADPase，X-fibrinogenase及RGD containing peptide此三種蛇毒蛋白成分會抑制血小板凝集造成出血。然而有部分出血性毒蛇，如百步蛇毒含有一種類凝血酶 (Thrombin-like enzyme)，可使纖維蛋白原轉變為纖維蛋白，引發凝血作用。

(三) 混合性蛇毒：例如鎖鏈蛇。其蛋白酶能活化第五、第十等凝集因子，使血管栓塞；其磷酯 又具有降血壓及神經毒性的特性；所以此類蛇毒呈快速血壓下降、血栓且兼有麻痺現象的複雜症狀。

三、蛇毒對於藥品開發之前景

自然界用於治療人類疾病的藥物來源不外乎動物、植物及真菌等，大部分來自於植物及真菌，只有少數的藥物來自於動物，原因是自動物的毒液中萃取有效成分發展成藥物，需要進行繁瑣的步驟，從尋找有毒的動物、毒液的萃取，再利用各種方式如：層析法、X光散射技術(X-ray scattering techniques)及核磁共振光譜學(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)分析蛋白質，找出可能具有藥物活性的胜肽序列、取得候選藥物與標的的分子立體結構，預測藥物與標的結合的位置及作用機制，其後再進行合成胜肽、研究生物活性機制等，通過一連串臨床試驗，才能變成藥物。目前已上市藥物案例，如表一，例如默克藥廠的Tirofiban[6]，是鋸鱗蝰蛇毒液中的蛋白胜肽，具有抗凝血anti-platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors的功能，被用來治療心絞痛；Amylin製藥的Exenatide[7]，是希拉毒蜥毒液中的蛋白胜肽化合物，被用來治療糖尿病；必治妥施貴寶藥廠的Captopril[8]，於矛頭蝮蛇的毒液中發現，應用於治療高血壓；最後是愛爾蘭製藥的Ziconotide[9]，由芋螺的毒液中萃取而得，可以治療慢性疼痛。而Ancrod(或稱Viprinex) [10]，由馬來亞蝮蛇的毒液中所萃取出來的化合物，被認為有抗凝血defibrinogenase的功效，可用來治療腦中風，現階段正進行臨床第三期試驗(未登入表中)。

表一、動物的毒液發展為上市藥物案例

藥名	功用	製造藥廠	來源
Tirofiban	心絞痛治療	Merck	<i>Echis carinatus</i>
Amylin	糖尿病治療	Amylin Pharma	<i>Heloderma suspectum</i> (Gila monster)
Captopril	高血壓治療	Bristol-Myers squibb	<i>Bothrops alternatus</i> (Brazilian lance head snake)
Ziconotide	慢性疼痛治療	Elan Corporation	<i>Conus magnus</i>

另日前訪臺新加坡籍Gopalakrishnakone博士也進行不同方向的蛇毒藥品開發[11-12]，例如：

(一) 抗菌抗發炎：CB-AM13.A1 peptide

它是利用蠍毒的primary structures與蛇毒的PLA2 protein合成，在微生物及動物實驗中皆證實CB-AM13.A1 peptide對具有抗藥性細菌的*Staphylococcus aureus*之具有良好的抑制作用。

(二) 止痛：Prohanin

因眼鏡王蛇毒液在老鼠身上有止痛效果。因此利用層析法分析篩選出一段胜肽，命名為Prohanin，已知作用機轉為阻斷Arginine與nitric oxide之路徑連結，可使痛覺不傳遞。Prohanin止痛效果在老鼠實驗發現較Aspirin佳，且Prohanin無成癮性、雖Prohanin為胜肽，但因分子量小，不會造成抗體。

(三) 抗發炎：PIP (PLA2-inhibitory protein)

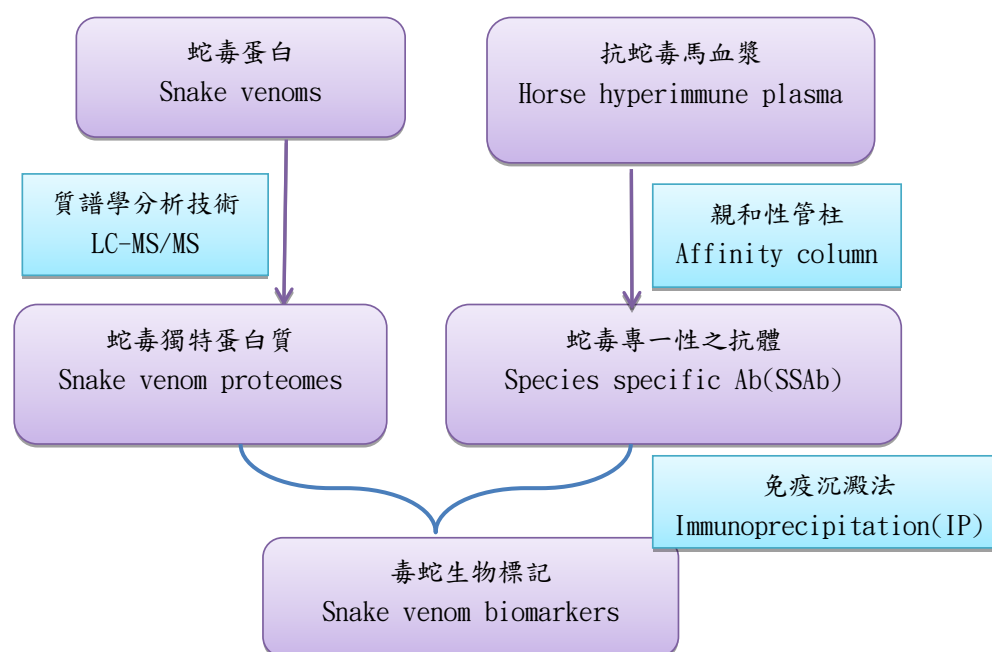
骨盆腔發炎有些原因是來自於PLA2 (Phospholipase A2 inhibitors) 造成，而有些蛇毒成分含PIP，對於PLA2有抑制效用。藉由NMR分析Phospholipases A2與PIP Peptides候選藥物兩者的分子結構，挑選合適的PIP對PLA2有明顯抑制。

目前在醫療上常用於抗菌、止痛、消炎等用途之藥物，大都由化學合成而得，其實從動物毒液成分的研究可以發現，自然界早已經存在一些有療效的物質，與其他現有藥物的比較上，從毒液萃取、重組的胜肽應用在醫療上之實驗看來，有藥效佳且更減少對生物體的傷害等等的競爭優勢，雖然這些成分還在動物測試或臨床試驗，但可以想見動物毒給予開發人類醫療用藥的科學家們一個新方向。

四、開發毒蛇咬傷檢驗試劑

毒蛇咬傷常造成嚴重的傷害甚至死亡，在臨床上如何快速、正確的診斷咬傷毒蛇的種類，是非常重要的議題。在國外開發許多臨床診斷方法，包含：快篩片、ELISA[13]。而國內亦有許多醫院及學術單位正積極研發毒蛇咬傷快速檢驗試劑。

以長庚大學分子醫學研究中心蛋白體核心實驗室為例，該實驗室正系統性分析由衛生福利部疾病管制署(簡稱疾管署)所提供之臺灣六種常見毒蛇的蛇毒蛋白質及抗蛇毒馬血漿。以質譜學(LC-MS/MS)鑑定六種臺灣常見毒蛇之每一種蛇毒中所有可能蛋白質，並相互比較分析這些鑑定的蛋白質以找出每一種蛇毒中可能的獨特蛋白質。再製備六種蛇毒之親和性管柱，以這些親和性管柱從蛇毒免疫之馬血漿中純化出具蛇種專一性之抗體(species-specific antibodies, SSAb)。以蛇種專一性抗體對蛇毒做免疫沉澱 (immunoprecipitation)，尋找蛇種專一性抗體之相對應抗原，並以質譜學鑑定此相對應抗原之蛋白質身分，最後在結合質譜學及免疫學兩種分析方法找到之各蛇毒特有蛋白質，並尋找出最適合之毒蛇咬傷生物標記，詳如圖一毒蛇咬傷快速檢驗試劑研究方法流程圖。



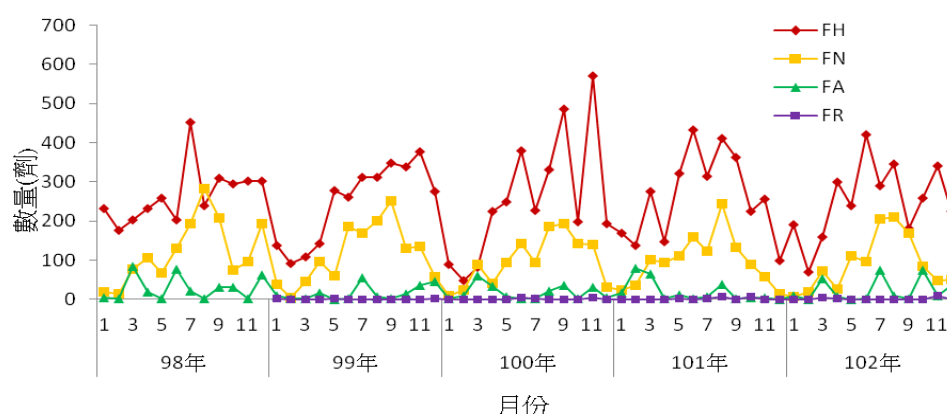
圖一、毒蛇咬傷快速檢驗試劑研究方法流程

初步發現，各種蛇毒大約都有20-30個特有蛋白質(胺基酸序列具獨特性)，這些獨特分子有潛力作為特定毒蛇咬傷之生物標記。目前已針對眼鏡蛇蛇毒特有蛋白質(cobra venom factor)生產抗體，使用此自製抗體(anti-cobra venom factor antibody)以免疫學技術對六種蛇毒進行偵測，此抗體只對眼鏡蛇蛇毒產生訊號，再次證實此蛋白質cobra venom factor是眼鏡蛇特有之蛋白質。

而從疾管署申請之抗雨傘節與眼鏡蛇馬血漿中，已成功純化出雨傘節專一性抗體與眼鏡蛇專一性抗體，且專一性測試結果非常好，已嘗試以免疫沉澱加上質譜分析之方法學，鑑定此專一性抗體所能辨認之蛋白質身分，目前已鑑定出數個候選分子。未來將蛇種專一性抗體放入在生物快篩試劑及生物檢測儀，此兩種檢驗平臺進行測試。若測試結果良好，則會開始利用成功發展的偵測平臺技術進行動物實驗與臨床試驗。

五、抗蛇毒血清的製造

依世界衛生組織(WHO)的報告評估，每年全世界至少421,000人被蛇毒咬傷，造成20,000人因此死亡，甚至有專家提出警告認為，被毒蛇咬傷的數據可能高達1,841,000人，而死亡的人更高達94,000人[14]，毒蛇咬傷病例發生的區域主要集中在南亞、東南亞及非洲等地。在臺灣，毒蛇分佈區域，除了百步蛇、鎖鏈蛇分佈較偏重南部及東部山區之外，其它四種毒蛇在全臺各地都可見，毒蛇咬傷之後，小則咬傷處局部腫脹疼痛，但嚴重時會出現全身性的症狀，甚至於危及生命。2007年世界衛生組織(WHO)將抗蛇毒血清製劑列入「世界衛生組織基本藥物清單」(WHO Model List of Essential Medicines)，由於在毒蛇咬傷中毒的個案中，及時注射正確的抗蛇毒血清製劑是目前最有效的治療方式[15]。臺灣每年大約有1,000位民眾被毒蛇咬傷後須接受抗蛇毒血清治療[16]，而臺灣是擁有全世界少數自行生產抗蛇毒血清製劑的國家，目前疾管署產製國內六種常見毒蛇之抗蛇毒血清，分別為抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清凍晶注射劑(FH)、抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑(FN)、抗百步蛇毒血清凍晶注射劑(FA)及抗鎖鏈蛇蛇毒血清凍晶注射劑(FR)四類，每年使用劑量及情形，如下圖二。近5年平均銷售量分別為FH：3,076±97瓶、FN：1,251±145瓶、FA：237±76瓶、FR：10±5瓶。



圖二、98~102年抗蛇毒血清凍晶注射劑銷售月線圖

抗蛇毒血清的取得方式是將蛇毒蛋白抗原免疫至馬匹身上，使馬匹體內的免疫系統產生能中和蛇毒蛋白的抗體，接著採集馬匹血液，分離出血漿，再經過純化精製步驟而成。抗蛇毒血清的製造雖有不同的方法，但基本上，可將每個方法都分成三個階段。第一階段：蛇毒抗原的動物免疫及抗血漿採集；第二階段：抗蛇毒血清的純化；第三階段：抗蛇毒血清的充填和包裝，即所謂的「成品」。

在第一階段中，免疫用蛇毒蛋白的製備為抗蛇毒血清製程的首要步驟，疾管署的毒蛇飼養室會定期進行不同種類的毒蛇毒液採集，由專業技術人員將毒蛇毒液擠出集中收集，然後盡速進行凍結乾燥，儲存於-20℃，即所謂的「粗毒」。收集至一定存量後，再將塊狀的粗毒研磨成細緻粉末再分裝至小玻璃瓶中，這些蛇毒粉末即為免疫動物的蛇毒抗原。

大部分用於產製抗蛇毒血清的動物皆為馬匹，由於馬匹體型大，可產出大量血漿，個性易馴服，且可適應大部分的氣候型態，屬於非偶蹄類動物，可排除感染普利昂蛋白(Prion)的風險，加上長年以來使用馬匹血漿所製成的抗蛇毒血清都證實其安全性及有效性[17]，這些特點使馬匹成為目前免疫蛇毒的最佳選擇。亦有報導以羊為蛇毒抗原的免疫動物，但較不常見。

馬匹依既定的免疫時程表注射蛇毒蛋白抗原，這些蛇毒蛋白抗原在生物安全櫃內調製，降低馬匹免疫注射部位的感染。將免疫毒以適當溶液回溶後以無菌過濾器過濾，再與佐劑混合形成黏稠的乳狀液體保存於低溫。免疫注射部位一般會選擇較靠近馬匹主要淋巴結的位置，例如頸部及背部，以皮下注射的方式每個注射點注射小體積(約0.05-0.2mL)的蛇毒蛋白抗原，增加抗原與抗原呈現細胞的接觸機會，以促進免疫反應。馬匹接受蛇毒蛋白抗原注射後，會定期採取血液樣本偵測血漿中的抗體力價，當抗體力價達到標準以上，且經評估馬匹健康狀態許可之下，採集約馬匹體重的1.5%血液量。採血是以靜脈穿刺的方式採集馬匹外側頸靜脈血液，在採血前採血部位必須先剃毛消毒。採血時以磅秤監控採血量，避免採血過量造成馬匹身體負擔。

採集的血液在潔淨室內靜置隔夜後，再進行血球與血漿之分離，分離後的血球以無菌生理食鹽水溶液進行懸浮，再回灌到馬匹體內；分離所得之血漿則冷藏保存，進行製程品質管制：抗體力價測試、負荷菌試驗及細菌內毒素試驗等，確認血漿之品質符合標準後，才能進入後續的純化精製步驟。

第二階段-抗蛇毒血清的純化，依純化過程是否有加入酵素處理，分成三大類，分述如下：1、完整的IgG免疫球蛋白：在抗蛇毒血清的純化過程中，未經酵素(enzyme)處理過。2、F(ab')₂片段(F(ab')₂ fragment)：於抗蛇毒血清純化過程中，加入胃蛋白酶處理，利用胃蛋白酶切割IgG免疫球蛋白的恒定區(constant region；Fc)片段，目前疾管署採行此法。3、Fab片段(Fab fragment)：於抗蛇毒血清純化過程中，加入木瓜素(papain)進行處理，僅剩

蛇毒分子的結合片段存在。此三大類的抗蛇毒血清分子量不同，造成它們在人體內所展現的藥物動力特性（pharmacokinetic property）也有所差異，例如，Fab片段，進入人體後，分佈範圍最廣，因分子量較其他二者小，約50kDa（kiloDalton），所以相對而言，可在最短時間內離開血管進入血管以外的組織間隙中，進行血管外組織間隙的蛇毒抗原清除作用，但也因分子量小的緣故，所以在人體內代謝率也較其他二種抗蛇毒血清快，無法長時間停留在人體內，半生期(half-life)約4-24小時，而，F(ab')₂片段和IgG免疫球蛋白的分子量依序分別約為100kDa及150kDa，雖到達血管外的組織間隙的時間較Fab片段長，但它們在人體內的半生期皆較長，約2-4天，且因分子量較大，當與蛇毒抗原結合後，可形成較穩定且較易被清除的免疫複合體(immune complex)，而Fab片段與蛇毒抗原的結合則較不穩定。

除了利用酵素進行抗蛇毒血清免疫球蛋白的切割處理外，另外，純化過程主要目的是要降低抗蛇毒血清內的不純物，提昇免疫球蛋白濃度。在不同的純化製程中，目前較被採用的為鹽析方法(salting-out procedure)、辛酸(caprylic acid或稱octanoic acid)純化方法，另外，亦有在酵素進行切割處理抗蛇毒血清免疫球蛋白後，進行透析(diafiltration)及層析(chromatography) [18]。鹽析法的原理，主要是利用在不同的酸鹼值中，蛇毒血清內的蛋白質，對鹽離子的溶解度有所差異，而將需要的成分或雜質取出或去除之，常用的鹽類有硫酸銨(ammonium sulfate)和硫酸鈉(sodium sulfate)，一般而言，鹽析法，例如硫酸銨，在抗蛇毒血清免疫球蛋白的純化回收率約為40%-50%，而辛酸純化方法，其回收率則約為60%-75%。疾管署產製的抗蛇血清凍晶注射劑，其純化方法先以胃蛋白酶消化，移除免疫球蛋白的恒定區(Fc)片段，再利用硫酸銨進行鹽析並透析製成，回收率雖不如辛酸純化方法的回收率高，但可有效治療本地被毒蛇咬傷的病患，且臨床使用鮮少有明顯副作用[19]。

第三階段抗蛇毒血清的充填和包裝，會因抗蛇毒血清的運送方便性、存放效期和經濟的考量，決定是否進行真空凍結乾燥(lyophilization)，抗蛇毒血清經過真空凍結乾燥處理後，與液體製劑相較之下，有較長的保存期限，且方便儲存與運送，以疾管署產製的四種抗蛇毒血清凍晶注射劑產品為例，均有經過真空凍結乾燥製成，冷藏存放有效期為5年。

結語

疾管署現為我國唯一生產供應抗蛇毒血清製劑之機構，每年供應涵蓋4種抗蛇毒血清製劑共約5,000劑，提供全國各地醫療院所甚至是海外相關研究或臨床單位使用，數十年來已拯救無數個病患生命。但未來因應PIC/S GMP法規政策，考量其昆陽園區現有疫苗製造廠房軟硬體設施老舊及場地限制，已無法符合與時俱進的相關規範。故相關馬匹飼養、血漿採集、分離及製造純化等工作，將會陸續轉移

到其新建於國立屏東科技大學內的國家免疫馬匹畜牧場及財團法人國家衛生研究院，以確保後續抗蛇毒血漿及抗蛇毒血清產品的穩定供應無虞。也希望藉由本篇內容以鑑往知來，讓未來蛇毒相關研究不論是在實體應用或產品製造上，能夠在這棵古老的樹上綻放美麗的新花。

致謝

感謝國立屏東科技大學舉辦抗蛇毒血清製造指引/診斷技術之國際論壇，也感謝國立宜蘭大學毛俊傑老師提供相關資料，及長庚大學分子醫學研究中心蛋白質核心實驗室的老師提供相關諮詢，同時亦感謝本中心同仁協助文獻之收集及提供。

參考文獻

1. Seymour RS. Scaling of cardiovascular physiology in snakes. *Amer Zool* 1987;27:97-109.
2. 毛俊傑：抗蛇毒血清製造指引/診斷技術論壇，台灣毒蛇生態概述。2013。
3. Yang CC. Snake neurotoxin. *The snake* 1984;16:90-103.
4. Fletcher JE, Jiang MS. LYS49 phospholipase A2 myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. *Toxicon* 1998;36:1549-55.
5. Jeng TW, Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:600-4.
6. Valgimigli M, Tebaldi M. Safety evaluation of tirofiban. *Expert Opin Drug Saf* 2010;9:801-19.
7. Bhavsar S, Mudaliar S, Cherrington A. Evolution of exenatide as a diabetes therapeutic. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9:161-93.
8. Heel RC, Brogden RN, Speight TM, et al. Captopril: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1980;20:409-52.
9. Pope JE, Deer TR. Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14:957-66.
10. Atkinson RP. Ancrodin the treatment of acute ischaemic stroke. *Drugs* 1997;54(Supply 3):100-8.
11. Thwin MM, Satish RL, Chan ST, et al. Functional site of endogenous phospholipase A2 inhibitor from python serum. *Eur J Biochem* 2002;269:719-27.
12. Samy RP, Thwin MM, Stiles BG, et al. Therapeutic potential of peptides with neutralizing ability towards the venom and toxin (CaTx-I) of *Crotalus adamanteus*. *Curr Top Med Chem* 2011;11:2540-55.
13. Pardal PPD, Souza SM, Monteiro MRDD, et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2004;98:28 - 42.

14. WHO Neglected tropical diseases snakebites. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/
15. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins 2012;114-28 .
16. 劉健信、江大雄、連偉成等：2002-2005年台灣地區使用抗蛇毒血清的流行病學分析，疫情報導。2009;466-78。
17. Zhang J. The structural stability of wild-type horse prion protein. J Biomol Struct Dyn.2011;29:369-77.
18. Jones RGA, Landon J. A protocol for ‘enhanced pepsin digestion’ :a step by step method for obtaining pure antivody fragments in high yield from serum. Journal of Immunological Methods 2003;275:239-50.
19. Chen JC, Bullard MJ, Chiu TF, et al. Risk of immediate effects from F(ab)₂ bivalent antivenin in Taiwan. Wilderness and Environmental Medicine 2000;11:163-67

困難梭狀芽孢桿菌國內外現況分析

洪羽屏^{*1,2}、蘇資茜²、黃一修²、林建州¹、吳和生¹

摘要

困難梭狀芽孢桿菌(*Clostridium difficile*)是一種革蘭氏陽性、會產生內孢子的人類致病菌，通常與抗生素所造成的腹瀉相關。困難梭狀芽孢桿菌感染症(CDI)的症狀包括腹瀉(diarrhea)、偽膜性腸炎(pseudomembranous colitis)和巨結腸症(megacolon)等，通常是服用廣效性抗生素(broad-spectrum anti-microbial agent)而破壞了正常菌叢(indigenous microbiota)所提供的定殖抗性(colonization resistance)所導致。造成 CDI 相關症狀的主因為 TcdA 和 TcdB 兩種毒素，目前 CDI 的治療，先建議停止目前使用的抗生素，再依照其疾病嚴重程度使用甲硝唑乙醇(metronidazole)及萬古黴素(vancomycin)。新型抗生素 fidaxomicin 可針對再復發之 CDI 做更有效的治療。在預防方面，目前尚無有效的疫苗可供預防，而以不活化 TcdA 和 TcdB 為基礎的疫苗正在研究中。北美與許多歐洲國家，高致病性菌株的出現以及高致死率，是導致 CDI 愈來愈嚴重的主因，在亞洲國家的發生率也逐漸攀升。臺灣的一份研究報告指出，2003-2007 年間，65 歲以上的病人 CDI 感染個案增加了 5-6 倍，所以感控人員應注意 CDI 案例的增加趨勢，必要時需進行分子型別調查(molecular typing)。由於 *C. difficile* 的擴散及傳播快速，增加區域性的監測有其必要性。

關鍵字：困難梭狀芽孢桿菌；困難梭狀芽孢桿菌感染症；正常菌叢；定殖抗性；分子型別調查

前言

困難梭狀芽孢桿菌感染症(*Clostridium difficile* infection, CDI)是抗生素相關性腹瀉最常見的原因，症狀包括腹瀉(diarrhea)、偽膜性腸炎(pseudomembranous colitis, PMC)和巨結腸症(megacolon)等等，通常是服用廣效性抗生素(broad-spectrum anti-microbial agent)所導致。過去的 10 到 15 年間，CDI 的病例增加快速[1]，不僅在歐美國家，在其他亞洲國家，中國、日本、南韓發生率也逐漸攀升[2]。除了抗生素之外，老年化也是危險因子之一，65 歲以上老人 CDI 的發生率較高；另外一個重要的危險因子在醫療照護體系，許多流行疫情發生在醫療院所及長照安養機構的院內感染[3]。

¹衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

投稿日期：2014 年 3 月 6 日

²國立成功大學醫學院微生物與免疫學研究所

接受日期：2014 年 4 月 28 日

通訊作者：洪羽屏^{*1,2}

DOI：10.6524/EB.20150224.31(4).002

E-mail：Yu-ping@cdc.gov.tw

北美與許多歐洲國家，CDI 發生率攀升的原因為高致病株 the North American Pulse Field type (NAP1)/ribotype 027 的出現[4]。在美國，1984-1993 年間，從健康照護機構共分離超過 6,000 個菌株，其中 14 株為 NAP1/ribotype 027，所佔的比例小於 0.02%，但在 2000 年到 2003 年發生的 8 次大流行疫情，187 個病例中，NAP1/ribotype 027 就占了 96 株，超過 50%[5]。許多報告也指出，這些新出現的高致病性菌株，是造成 CDI 越來越嚴重的原因之一[4-6]。也由於這些流行疫情的發生，美國疾病預防控制中心(CDC)從 2011 年開始，在 10 個州(約 11 萬人口)進行 CDI 病例的監測，初步的監測報告已公佈(http://www.cdc.gov/hai/eip/cdiff_techinfo.html)。

病原菌

Clostridium difficile (困難梭狀芽孢桿菌)為革蘭氏陽性、含內孢子、對氧氣極端挑剔的絕對厭氧菌，最早是在1935年被Hall 和O' Toole等人發現[7]。*C. difficile*所產生的孢子，因呈休眠狀態生長代謝停止，對於物理性或化學處理具有抗性，可在一般環境下存活非常長的時間，所以孢子被視為主要的傳播方式，並且與CDI反覆發作有關[8]。

*C. difficile*存在於人類及動物的大腸，分為產毒及非產毒的菌株，只有產毒菌株才能造成人類疾病。引起腸炎的兩個關鍵因素在於宿主對*C. difficile*的定殖抗性(colonization resistance)及免疫反應。人類大腸內有超過4,000種正常菌群，這些微生物群落藉由競爭營養源及附著生長空間提供了定殖抗性來抵禦致病原入侵，一旦抗生素破壞了這些屏蔽的正常菌群而降低了定殖抗性，便給予腸道致病菌入侵的機會，正常菌群的豐度分布與*C. difficile*致病與否也有相關[9]。而年長、營養不良、免疫不全及其他疾病合併的病人具有較差的免疫保護力。

傳染途徑及致病機轉

*C. difficile*被視為抗生素相關性腹瀉的主要病因，儘管有研究報告[7]曾在小於一歲的健康嬰兒糞便中分離出*C. difficile*，暗示人類感染為內源性。但更多證據支持*C. difficile*可被傳播並藉由外在途徑攝入，尤其在一些群聚及爆發流行的情況，是經由感染病人排出糞便中之孢子散布，研究報告也指出[10]，*C. difficile*是一個重要的院內感染致病因。

造成CDI相關症狀的主因為毒素A(TcdA)和毒素B(TcdB)，均為醣基轉移酶(glycosyltransferase)[11]，藉由醣基化蘇胺酸殘基(Thr)使Rho GTPase無法活化，造成細胞肌動蛋白(actin)無法聚合，使得細胞型態改變，上皮細胞間隙受到破壞，造成細胞死亡，並引發一連串的發炎反應，導致腹瀉及偽膜性腸炎。所有的產毒株都含有*tcdB*基因，但 *tcdA*基因則不一定同時存在。某些菌株會產生第三種毒素，為二元毒素，藉由不可逆的二磷酸腺苷核醣基化(adenosine diphosphate ribosylation)肌動蛋白，可長期誘導宿主細胞微管突出，幫助細菌附著[12]。

臨床症狀與治療

診斷CDI應結合臨床症狀與實驗室發現。CDI病例定義[3]為：出現水瀉症狀(24小時內出現三次以上不成形糞便)，且從糞便*C. difficile*毒素試驗檢出陽性或分離出產毒的*C. difficile*菌株，或者藉由大腸結腸鏡、病理組織切片檢查發現偽膜性腸炎。CDI復發之診斷標準也相同[3]。

CDI的治療，首先建議停止目前使用的抗生素，再依照其疾病嚴重程度使用甲硝唑乙醇(metronidazole)及萬古黴素(vancomycin)作治療。針對輕度或中度疾病使用metronidazole，而vancomycin則使用在較嚴重的疾病[13]。2011年5月美國食品藥物管理局(FDA)核准新型抗生素fidaxomicin(屬於macrolide類)上市，可針對再復發之CDI做更有效的治療，臺灣已於2012年7月核准上市，但健保尚未給付。歐洲臨床微生物和感染學會(European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases, ESCMID)在2013年10月更新了CDI的治療指引[14]，指引中依建議強度(Strength of Recommendation, SoR)和證據等級(Quality of Evidence, QoE)將病患區分為不同群組，包括非嚴重的CDI、嚴重的CDI、第一次復發或有復發風險的CDI、多次復發的CDI、及無法口服抗生素的CDI等，分別進行治療。指引中整理了最新的研究證據，也將fidaxomicin納入。此外，指引當中也提到，腹瀉會帶走病患大量的電解質及水分，所以補充電解質和水分是必要的。而針對多次復發的CDI病人建議使用細菌或糞便腸道移植進行治療。

實驗室診斷[3] (表一)

- 一、檢體蒐集和運送：最適合用來診斷CDI的檢體為水狀、鬆散、不成形的糞便，肛門拭子的檢體通常不適合，會降低毒素試驗的靈敏性。在病人症狀發生期採集單一糞便檢體通常較為有效，且基於成本效益考量無須重複採檢送驗。
- 二、菌株培養分離：菌株培養分離為最直接的證據，也是分子流行病學調查所必須。臨床最常使用的選擇性培養基為CCFA，內含cycloserine、cefoxitin及fructose，額外添加牛膽酸鈉(taurocholate)或溶菌酶(lysozyme)可增加*C. difficile*的分離率，因可增加孢子的發芽率，另外以去氧處理過的培養基可得到較佳結果。在CCFA上的菌落型態為扁平、黃色、毛玻璃狀，周圍培養基成黃色暈開。此菌落有典型特殊的氣味，在wood's lamp照射下會發出螢光。革蘭氏染色呈現典型的革蘭氏陽性菌。觀察培養基上的菌落並以革蘭氏染色作確認，如未符合以上標準再進行生化反應試驗。
- 三、細胞毒素中和試驗：大部分實驗室使用human foreskin fibroblast cells來進行毒素中和試驗，其敏感性較佳，可偵測極低效價(1:160)的毒素存在。
- 四、Glutamate dehydrogenase assay(GDH)檢測：GDH為*C. difficile*的特異性抗原，以EIA方法進行，呈現較佳的敏感度(85%~95%)與特異性(89%~99%)、有較佳的陰性預測值(negative predictive value)可用於快速篩檢。

- 五、酵素免疫分析法(EIA)毒素偵測：市售有許多商業化偵測毒素的套組，有單獨偵測毒素A(TcdA)及B(TcdB)或同時偵測兩種毒素，敏感性為63%~94%，特異性為75%~100%。
- 六、核酸放大試驗(Nucleic acid amplification tests, NAAT)：利用聚合酶鏈鎖反應(PCR)偵測毒素基因，為高敏感度及高特異性，並且省時。

美國[3]及歐盟[14]建議以兩階段的方式進行檢測：先以EIA方法進行GDH或毒素TcdA/B篩檢，篩檢陽性的檢體再進行核酸放大試驗(NAAT)偵測毒素基因，以確定是否為產毒性的*C. difficile*。

表一、*C. difficile* infection糞便實驗室診斷方法的比較

檢驗方法	敏感度	特異性	應用
菌株培養分離	低	中等	臨床上並不實用，無法區分產毒與非產毒菌株。
產毒性培養	高	高	定義敏感性與特異性的黃金標準，太耗時因此臨床上不適用。
細胞毒素中和試驗	高	高	診斷取決於實驗人員操作能力、耗時。
GDH試驗	高	低	高敏感性，但無法區分產毒與非產毒菌株，需再利用EIA毒素偵測試驗確認產毒株。
酵素免疫分析法(EIA)毒素偵測	低	高	快速且具專一性。必須同時偵測毒素A和B。缺點為低敏感性，與GDH合併使用。
核酸放大試驗(NAAT)	高	高	以PCR方法為基礎的毒素基因檢測，適用於病人急性腹瀉症狀發生時。

表格資料來自參考文獻[13]

流行病學

*C. difficile*菌株的核酸分型 (ribotyping) 地理分布盛行區如表二，2003年高致病株NAP1/ribotype 027在加拿大及美國出現引發流行，其在毒素抑制基因*tcdC*上有點突變(point mutation)，增加*tcdA*及*tcdB*的毒素產生；此外NAP1/ribotype 027菌株也能產生二元毒素，與高致死率、復發率相關，並出現在社區。1998-2009年，美國的醫療院所診斷出的感染數由25,200例增加至110,600例，並於2008-2009年間達到高峰[13]。類似於北美的NAP1/ribotype 027菌株，ribotype 078菌株於2005年在歐洲造成流行，造成社區的傳播率上升，並且缺乏有效的抗生素治療與預防方法[6]。

雖然高致病性的ribotype 027在亞洲相當罕見，其變種*tcdA/tcdB*⁺ ribotype 017卻是東亞最主要的流行株[2]，在中國、日本、南韓、臺灣等地分離出具毒力 (toxigenic) 的菌株中佔23%~48%。而ribotype 018在東京及南韓也曾爆發流行。在亞洲，*C. difficile*在院內感染控制報告為低盛行率，然而因監測資料不足，真實的盛行率未知。一項2004-2008年在韓國進行的全國性研究[10]，發現在17個醫療院所中，發生率從每千人1.7位上升到每千人2.7位，較同期美國醫療院所的每千人8.75位低。另外2007-2008年中國上海單一醫院每千人中有1.7位的感染發生率[13]。

相較中國，香港有較多的研究調查進行，Cheng等人報告2009年間在五間醫療院所分離出的345株*C. difficile*具毒力菌株中，ribotype 002佔了9.4%，ribotype 017只佔0.7%，而且70%的strains並不屬於北美和歐洲盛行的23個ribotype之一，11.6%無法分型[15]。

印度一份2012年針對急性腹瀉病人的研究報告指出[13]，住院病人有8%培養出*C. difficile*，門診病人有1.3%培養出*C. difficile*。在巴基斯坦[13]，抗生素相關腹瀉(antibiotic associated diarrhea, AAD)的病人，有29%分離出*C. difficile*。新加坡則有高致病株ribotype 027造成散發性的院內感染群聚事件[13]。馬來西亞及泰國的研究報告[13]指出：AAD病人被檢測出TcdA的陽性率由14%上升到44%，而TcdB的陽性率從44%增加到46%，顯示*C. difficile*的發生率上升。菲律賓的研究報告[13]也指出44%結腸炎個案為*C. difficile*陽性，顯示菲律賓國家結腸炎的疾病流行模式由之前的阿米巴寄生蟲感染轉換為*C. difficile*感染。

在臺灣，2009年的一份研究報告指出，在2003-2007年間，65歲以上的病人CDI個案增加了5-6倍[16]。2013年Chia J等人針對北部某醫學中心2002~2007年間住院病人的檢體，分離出110株具毒力的*C. difficile*，利用瓊脂稀釋法(agar dilution)、多位點可變數目串聯重複序列分析(multilocus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA)、*tcdC*基因分型，發現70株具有*tcdA*及*tcdB*(A⁺B⁺)，40株具有*tcdB*(A⁺B⁻)，顯示這六年間，具毒力菌株(A⁺B⁺)明顯增加(p=0.05)，有七株(6.4%)抗藥性菌株被發現，包含2株抗metronidazole及5株抗vancomycin菌株[17]。另一項針對中臺灣六間醫院呼吸照護病房進行的研究調查，利用PCR ribotyping及MLVA方法分離149位病人的檢體發現：*C. difficile* infection (CDI)及*C. difficile* colonization的盛行率分別為4% and 19%[18]。至於分子型別方面，亞洲其他國家流行的ribotype 017曾被分離，然而北美及歐洲流行的高致病菌株(ribotype 027與078)尚未被發現[19]。這些研究結果顯示醫療院所中具毒力的*C. difficile*定殖率增加，感控人員應注意CDI案例的增加趨勢，必要時需進行*C. difficile*的分子型別調查。

表二、*C. difficile* 核酸分型分布地區

strain	地理分布
027	美國、加拿大、跨越歐洲(荷蘭、愛爾蘭、德國)、智利、東亞地區有少數報告
078	歐洲(西班牙、德國、法國)
017	中國、南韓、北歐(荷蘭、蘇格蘭)、日本
018	日本、南韓
014	美國、西班牙、法國、日本、中國、南韓
001	中國、日本、南韓、西班牙、德國、蘇格蘭
002	日本、香港、南韓

表格資料來自參考文獻 [13]

預防與感染防治措施[20]

目前尚無有效的疫苗可供預防，而以不活化毒素 A 及 B 為基礎的疫苗正在研究中[13]。CDI 相關的危險因子包括：抗生素治療，特別是 beta-lactam 類、腸胃道處置及手術、較年長者及抗生素濫用等。最有效的預防方式仍是限制抗生素使用。經由健康照護工作者的手將病原帶給病人是最可能暴露感染源的機制，因此洗手是最有效降低手部污染的方法，手套的使用可進一步減少病原的移轉(carry-over)。環境中 *C. difficile* 污染相當常見，特別是受到糞便污染的地方。直接接觸於被污染的病人照護用品 (如：直腸肛門溫度計)及病人房間常接觸的表面 (如：燈源開關)也被視為感染來源。對於 *C. difficile* 環境感染控制的建議為仔細清潔再以次氯酸鹽類消毒劑消毒，目前並無美國環保署(EPA)認可的產品可將 *C. difficile* 孢子去活化。

監測模式

北美與歐盟國家，由於 CDI 疫情已流行數十年，具有完備的流行病學監測資料。以美國來說，監測地區內的流行病學家會監控所有診斷實驗室的毒素檢測或分子檢測方法，一旦出現新的 CDI 感染個案，會持續檢測其糞便檢體至少 8 周，並進行疫調(含接觸史、臨床及風險因子等資訊)。新增個案會被分成三類[3]：

- 一、Healthcare facility-onset (HCFO)：檢體為入院 3 天後所採集或來自長照機構的居民。
- 二、Community-onset healthcare facility-associated (CO-HCFA)：檢體來自門診病人或入院 3 天內病人，具有醫療照護暴露病史(表示此個案已住院一段時間或是來自長照機構)。
- 三、Community - associated (CA)：檢體來自門診病人，無任何住院或醫療照護病史。個別醫院/實驗室會將陽性 CDI 個案報告給各地方的公共衛生機關，再匯整回報給美國 CDC 於網路上定期公告監測資料。而歐盟 CDC 的 13 個會員國在流行病學監測及傳染病控制的網絡架構下也已實施 CDI 之國家級規模的監測，並定期發布監測資料 (http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/annual_epidemiological_report/Pages/epi_index.aspx)。

結語

亞洲方面對於 CDI 的疾病監測資料仍嫌不足。現今交通往來頻繁，疫病傳播快速，散布流行不無可能，況且臺灣過去只有個別醫療院所的零星統計報告[17-19]，實際 CDI 盛行率不明，隨著人口年齡結構老化，感染風險因子增加，增加 CDI 區域性的監測有其必要性。未來如要進行監測，可參考美國 CDC 建立的標準檢驗程序，以二階段檢驗系統進行偵測，並要求所有診斷實驗室(含醫院、健康照護機構、私人實驗室及官方實驗室)都須遵循。個別實驗室的監測資訊應被報告給地方衛生機關，中央主管機關可蒐集各實驗室的資訊匯整統計並每年公告出版，提供給臨床醫師及感控人員做為參考。可視疫情流行程度列入法定傳染病以利疫情監控。

參考文獻

1. Ananthakrishnan AN. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8 : 17-26.
2. Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. Epidemiology of Clostridium difficile infection in Asia. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013; 2 : 21.
3. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol. : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2010; 31 : 431-55.
4. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 2005; 366 : 1079-84.
5. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. *N Engl J Med.* 2005; 353 : 2433-41.
6. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of Clostridium difficile infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis.*2008; 47 : 1162-70.
7. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. *Am J Dis Child.*1935; 49 : 390-402.
8. Rodriguez-Palacios A, Lejeune JT. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in Clostridium difficile. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77 : 3085-91.
9. Johnson S. Recurrent Clostridium difficile infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect.* 2009; 58 : 403-10.
10. Kim YS, Han DS, Kim YH, et al. Incidence and clinical features of Clostridium difficile infection in Korea: a nationwide study. *Epidemiol Infect.* 2013; 141 : 189-94.
11. Voth DE, Ballard JD. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 : 247-63.
12. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, et al. Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog.* 2009; 5 : e1000626.
13. Burke KE, Lamont JT. Clostridium difficile Infection: A Worldwide Disease. *Gut and liver* 2014; 8 : 1-6.
14. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 : 1-26.

15. Cheng VC, Yam WC, Lam OT, et al. Clostridium difficile isolates with increased sporulation: emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30 : 1371-81.
16. 張上淳、蘇秋霞、周偉惠等:困難腸梭菌院內感染流行病學研究。疫情報導 2009; 25(3): 163-177。
17. Chia JH, Lai HC, Su LH, et al. Molecular epidemiology of Clostridium difficile at a medical center in Taiwan: persistence of genetically clustering of A(-)B(+) isolates and increase of A(+)B(+) isolates. PLoS One 2013; 8 : e75471.
18. Wei HL, Wei SH, Huang CW, et al. Molecular typing and epidemiology of Clostridium difficile in respiratory care wards of central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2013 pii: S1684-1182(13)00067-4.
19. Lin YC, Huang YT, Tsai PJ, et al. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of clinical isolates of Clostridium difficile in taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55 : 1701-5.
20. CDC Guidelines for environmental infection control in health-care facilities recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). MMWR 2003; 52 : 1-42.

2014 年臺南市某產後護理之家呼吸道融合病毒群聚事件

林佩宜^{*1}、邱韡禎²、廖悅淳¹、林巧雯¹、王仁德¹、劉碧隆¹

摘要

呼吸道融合病毒是造成嬰幼兒呼吸道感染的主要病毒之一，可經由飛沫或直接、間接接觸病人鼻咽黏液而感染，除易造成嬰幼兒高致病率，也容易在人口密集機構造成群聚疫情。本群聚事件發生在某產後護理之家，累計 9 名嬰兒發病；當中醫院採檢 3 人，疾病管制署檢驗 2 人，前述 5 人檢驗結果皆為呼吸道融合病毒陽性。衛生單位接獲通報即展開調查，相關強化之防治措施係評估機構處理態度、現行感控措施、住民特性，給予可行建議及未來改善方向。本次經驗可提供機構和公衛人員日後處理類似疫情參考。

關鍵字：產後護理之家；呼吸道融合病毒；群聚

前言

呼吸道融合病毒（Respiratory syncytial virus, RSV）為造成嬰幼兒病毒性細支氣管炎及肺炎的常見病原，一般而言，嬰幼兒感染後平均 4 至 6 天（範圍為 2 至 8 天）會出現流鼻水、食慾差等情況，接著 1 至 3 天會陸續出現咳嗽、打噴嚏、發燒等症狀，偶爾出現哮喘音，大部分會在發病後 1 至 2 週內痊癒。當嬰幼兒首次感染 RSV，有 25%至 40%會演變成細支氣管炎或肺炎，0.5%至 2%需要住院觀察治療，需住院者通常為 6 個月以下嬰兒。地處亞熱帶的臺灣，一年四季皆有病例，高峰約在春季及秋季[1, 2]。

感染 RSV 後 3 至 8 天皆具有傳染力，在嬰兒及免疫系統較差的個案，其傳染力可達 4 週。RSV 病毒可透過患者打噴嚏及咳嗽產生的飛沫而傳染他人，因病毒可在物品、環境表面上存活 6 小時，亦可藉由直接接觸、間接接觸患者口鼻分泌物而傳播。RSV 屬副黏液病毒科（paramyxoviruses）之一，其外膜為一核套膜（nucleocapsid），核套膜外再包圍一雙層的脂質外套膜（envelop），故可使用酒精性消毒劑清除病毒 [1- 4]。

¹衛生福利部疾病管制署南區管制中心

投稿日期：2014 年 11 月 26 日

²臺南市政府衛生局

接受日期：2015 年 1 月 29 日

通訊作者：林佩宜^{*1}

DOI：10.6524/EB.20150224.31(4).003

E-mail：peiyl@cde.gov.tw

RSV 病毒雖非法定傳染病，惟易造成嬰幼兒高致病率，也容易在人口密集機構造成群聚疫情。在高暴露危險群例如托嬰中心，其再感染（reinfection）比例可高至 60 至 80%；亦有報告指出，RSV 曾造成安養院 3 分之 2 的病患同時罹患肺炎[4]。因此，在人口密集機構中，如養育院、托嬰中心、產後護理之家等，如何預防機構內感染，及早發現感染個案及群聚事件，並妥適採取必要的感染管制措施，是衛生防疫人員平時輔導類似機構的重要課題。

事件緣起

2014 年 7 月 22 日上午，臺南市政府衛生局接獲電話通報，臺南市某產後護理之家發生疑似新生兒呼吸道融合病毒群聚事件，共 5 名嬰兒出現上呼吸道症狀，發病日自 7 月 12 日至 7 月 22 日，當中有 3 人住院，經檢驗診斷為 RSV 感染，1 人症狀較輕微，於機構單獨空間隔離。衛生單位立即進行相關的疫情調查和防治措施，避免疫情擴散。

病例定義

調查時間（2014 年 7 月 12 日至 8 月 12 日）內，於臺南市某產後護理之家通報出現咳嗽合併流鼻涕、鼻塞任一症狀者，為本群聚事件之個案。

疫情調查

該產後護理之家主要照顧產後婦女，以及未滿 2 個月的嬰兒，設置於某婦產科醫院的 5 樓和 6 樓；產後病房設於 5 樓，嬰兒室設於 6 樓。5 樓有一單獨房間作為有症狀嬰兒隔離區。機構可收住產婦 18 人，每名產婦均推行母嬰同室。疫情發生時，收住 18 名產婦及 17 名嬰兒。

首例嬰兒於 7 月 12 日發病。7 月 22 日通報時，當時收住 17 名嬰兒，共計 5 名嬰兒出現上呼吸道症狀，收住嬰兒侵襲率為 29.4%（5/17），症狀多為咳嗽及流鼻涕，當中 3 人先後住院，並由醫院確診為 RSV 陽性，餘 2 人於機構 5 樓隔離室隔離中。5 名發病嬰兒中，4 人的母親在嬰兒發病前即有感冒症狀；工作人員無人出現上呼吸道症狀。後續至 7 月 27 日止，未再新收嬰兒，累計 9 名嬰兒發病，收住嬰兒侵襲率為 52.9%（9/17），症狀為咳嗽、流鼻涕、鼻塞，皆就醫並住院，於症狀緩解後出院，無人住加護病房；7 月 28 日後未再新增發病個案（圖）。

衛生局採檢 4 例，為 7 月 21 日及 7 月 22 日發病共 2 名嬰兒及其有症狀的母親，檢驗項目為流感、腺病毒、呼吸道融合病毒、黴漿菌及腸病毒。2 名嬰兒驗結果為 RSV 陽性，2 名母親檢驗結果均為陰性。本案 9 名發病嬰兒中，醫院採檢 3 名，疾病管制署另檢驗 2 人，5 人皆為 RSV 陽性。

平時機構將健康嬰兒集中於 6 樓嬰兒室照顧，無固定安置位置，母親可隨時要求工作人員將自己的嬰兒帶出嬰兒室，進行餵奶或照顧，並可隨時送回，

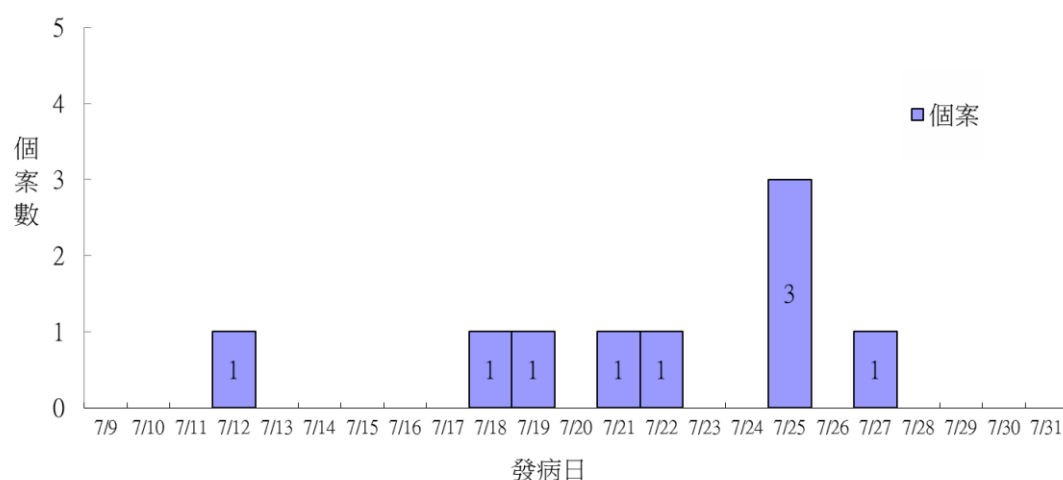
故嬰兒回母親房間及送回嬰兒室的時間不固定。配合國民健康署政策，機構鼓勵 24 小時母嬰同室。嬰兒室空間不大，同一時段若有 7 張嬰兒小推床即顯擁擠。嬰兒推床配有專屬乾洗手液，嬰兒室另有濕洗手設備，以及 1 臺 24 小時運轉的空氣清淨機（具 HEPA 過濾和紫外線消毒功能）。該機構對於在其產科醫院出生的新入住嬰兒、外院出生新入住嬰兒、有感冒症狀父母之嬰兒…等等不同暴露或帶原風險的嬰兒，在推回嬰兒室照護時，並未規劃固定區隔區塊進行。

機構明訂護理人員在接觸嬰兒前必須洗手，或以乾洗手液消毒手部。每日由大夜班護理人員以酒精進行嬰兒推床消毒，地板及工作臺則由打掃人員以稀釋漂白水進行清消。奶瓶及奶嘴的消毒，是洗淨後先以紫外線消毒鍋處理，再以高溫蒸氣鍋進行第 2 次消毒作業。嬰兒皆有專屬的洗澡盆，機構另購置大型消毒器，以每日消毒洗澡盆。

當嬰兒出現症狀，會立即被移往 5 樓隔離室，並要求醫護人員穿著專屬隔離衣，配有單獨清消用具。為讓空氣流通涼爽，雖成本較高，仍同時開啟空調及落地窗。

工作人員計 14 人，含護理師、護佐、清潔人員、及行政人員，配置小兒科醫師 1 名，每日巡診 1 次。工作人員有固定照顧區域，5 樓隔離室配置 1 人、6 樓嬰兒室配置 1 人；當班嬰兒室的工作人員每日量體溫並紀錄。本次疫情發生期間，工作人員無人出現上呼吸道症狀。

機構訂有陪伴及探視管理規範，每次訪客限制 2 人以下，進入機構及接觸新生兒時，需先行乾洗手；進入房間前，要求須全程配戴口罩。據機構負責人表示，雖然對陪伴者與訪客訂有相關規定，並公告於機構入口、各樓層明顯處及口頭提醒，仍會有配合度不佳、規勸不聽的訪客。



圖、2014 年 7 月臺南市某產後護理之家 RSV 群聚事件流行趨勢圖 (n=9)

疫情分析

此次疫情指標病例在 7 月 12 日發病，不排除是由有症狀之家人或訪客傳染，後續因機構嬰兒室未對有症狀父母之嬰兒分區照顧，且嬰兒室空間較擁擠，及不排除未注意接觸隔離措施，導致出現有人、時、地序列相關之嬰兒感染。

防疫措施

一、機構警覺疑似疫情時之處理

此次群聚疫情，機構在第 3 個嬰兒發病後的隔天（7 月 20 日），邀集住房的父母親召開疫情說明會，以透明公開的方式，說明嬰兒發病狀況，衛教加強個人衛生、以及請大家互相配合的事項等，並於 7 月 20 日起，全面禁止訪客入房。對於完全施行 24 小時母嬰同室之家庭，給予費用上的優惠。

機構也加強了內部的訊息流，透過口頭及書面的方式，讓相關工作人員知道疫情狀況，如何落實接觸隔離，如嚴格遵守洗手 5 時機、戴口罩、更換隔離衣、消毒環境與設備等措施；尤其在換床照護時，防治接觸感染之相關措施。

二、衛生單位接獲通報後之輔導

衛生單位接獲疫情通報後，實地至機構瞭解疫情（規模、防疫硬體及清消配備、人員設置等）與輔導相關感控措施。現勘得知負責人（為護理背景）具備感控基本觀念，工作人員亦循標準防護措施照顧嬰兒，相關軟硬體作業無問題。惟嬰兒家屬的個人防範及保護嬰兒等措施，機構除善盡提醒之責外，的確無法完全掌握，疫情期間已加強衛教宣導，並禁止訪客入房。因嬰兒室空間不大，為避免嬰兒在嬰兒室內交互感染，持續推行 24 小時母嬰同室。在疫情期間，未進行 24 小時母嬰同室的 5 名嬰兒，不再推回母親房間，每床備有隔離衣，供母親在哺乳室親餵照顧使用。此外，律定機構依衛生單位提供之健康監測表格，每日定時回傳產婦及嬰兒健康情形，以掌握疫情發展趨勢。

現勘發現該機構對於 RSV 感染症潛伏期的概念，以及對於不同暴露或帶原風險嬰兒的分區照護概念，仍有再進步的空間。實地輔導時，請機構需思考規劃擴大嬰兒室的空間；針對父母親有症狀、本院出生新入住、他院出生新入住等不同類別嬰兒，需規劃各自的照護區塊。若能分區塊照護，則可提醒工作人員多加注意觀察，並落實接觸隔離措施，以達到減少健康嬰兒的暴露風險。

討論與建議

因我國家庭型態轉以小家庭為主及華人具產後調養習俗等，產後護理產業應運而生，以照顧產後婦女及嬰兒。產後護理之家的設置係依據護理人員法相關規定辦理，當中明訂設置標準，並有評鑑作業以確保照護品質及保護消費者權益，除提供膳食與住宿服務外，尚包括產婦及嬰兒之醫療、護理服務及其他醫事服務。

因此類機構具集中照護的特性、管理出入訪客的困難，故應令管理者及其工作人員在預防機構內感染風險時，參考疾病管制署訂定的「產後護理機構感染管制措施指引」[5]，修訂內化為符合機構及住民特性、且實際可行的作業程序。

從此次群聚事件中，以下提出幾個面向的處理細節，供類似性質機構的防治參考。首先是機構對於疫情的警覺性，疾病管制署規範此類機構內需有負責監測並執行必要感管措施的人員且需接受感染管制相關課程；另外，負責人或醫護人員亦需每年接受至少 4 小時的訓練課程。地方衛生單位平時辦理傳染病防治及人口密集機構感染管制研討宣導，並輔以實際案例分享，可增進相關人員對疫情的敏感度，適時啟動應行的感控措施。本次群聚事件，機構於前二例嬰兒出現上呼吸道感染症狀後，即將發病嬰兒移至獨立空間隔離，由專人照護，惟接觸者的匡列及分區照顧，是可再精進的部分。

另外，警覺到可能發展為群聚疫情後，機構應讓工作人員清楚，執行照護時務需落實接觸隔離措施，加強手部衛生及環境清消。此次群聚的流行趨勢圖顯示，隨著時間進行，陸續出現更多具相關症狀個案時，不排除在共同照護區塊，具有交互感染的可能性。建議在疫情發展期間，機構內部可增加感控措施的查核頻率並記錄之，以確保感染防護措施的落實執行。

未發病嬰兒是 24 小時母嬰同室為妥？抑或集中至嬰兒室由工作人員照護為妥？並無定論。此機構因嬰兒室空間狹窄，且倡導 24 小時母嬰同室，故疫情期間配合施行 24 小時母嬰同室的嬰兒，不再推回嬰兒室，惟此措施執行時，需有相關配套，讓父母親不致出現反彈情緒。筆者認為，當啟動必要的感控措施及動線管制並落實時，則嬰兒安置於何處，可因地制宜彈性處理。

再來是機構服務內部顧客的資訊公開化，從此機構的經驗來看，在疫情初期即對內部顧客召開群聚事件說明會，除有助於釋疑與溝通互相配合的事項，亦可避免因隱匿疫情致媒體投訴之事件。

結論

本次 RSV 群聚疫情，從機構的主動配合，以及衛生單位持續追蹤個案症狀，給予機構具體感控作為建議並督導落實，使後續疫情獲得控制。本次疫情自 7 月 28 日起，監控 2 倍疾病潛伏期的時間（16 日）後，截至 8 月 12 日為止未再新增個案。

誌謝

感謝疾病管制署研究檢驗中心、臺南市政府衛生局（所）、及本案發生群聚機構全力配合及協助，謹此致謝。

參考文獻

1. Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory Syncytial Virus Infection. Available at: <http://www.cdc.gov/rsv/index.html>.
2. Lin YJ, Lin CH. Recent Literature Review on Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection in Infants and Children. J Pediatr Resp Dis 2013;9:6-10.
3. Hall CB, Douglas RG, Jr., Geiman JM. Possible Transmission by Fomites of Respiratory Syncytial Virus. J Infect Dis 1980;141:98-102.
4. 林本一、黃玉成、林奏延：呼吸道融合病毒之預防及治療。當代醫學 2001；28：324-31。
5. 衛生福利部疾病管制署：「產後護理機構感染管制措施指引」，2013。

日期：2015 年第 5 週(2015/2/1-2015/2/7)

DOI：10.6524/EB.20150224.31(4).004

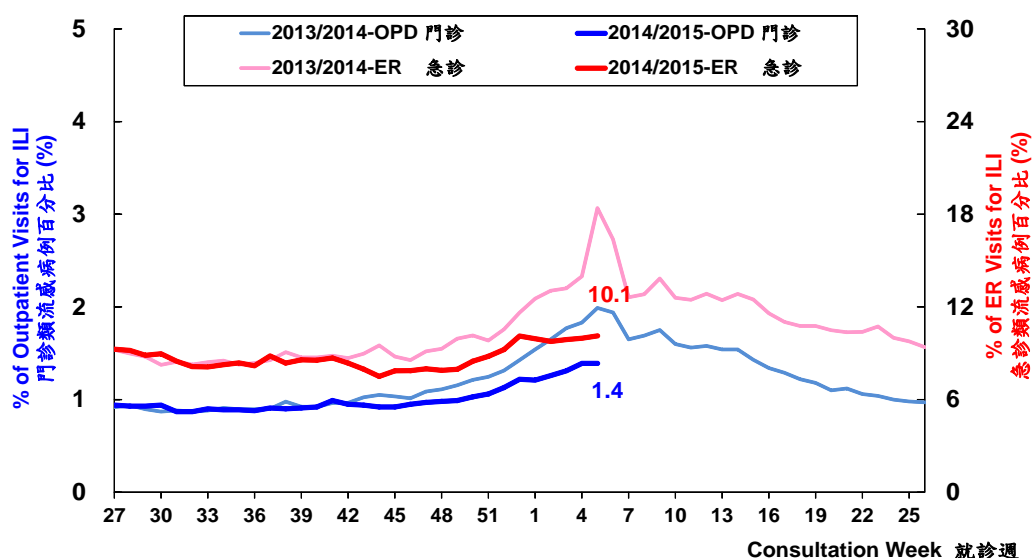
疫情概要：

國內流感疫情進入高峰期，近期流感重症、住院病例與門急診類流感就診人次有上升趨勢，惟較去年同期為低。社區檢出流感病毒以H3N2為主；1月份病毒抗原性監測顯示，五成H3N2病毒與疫苗株呈低效價反應，無抗藥性病毒株出現。目前同時為病毒性腸胃炎好發季節，籲請民眾落實勤洗手、不生飲生食等衛生習慣。

國際疫情部分，中國大陸南方省份及香港流感疫情持續上升。中國大陸持續傳出H7N9流感病例，請民眾前往流行地區勿走私及接觸禽鳥，並落實洗手等個人衛生習慣。西非幾內亞、賴比瑞亞及獅子山之伊波拉病毒感染疫情近期呈上升趨勢。

一、流感**(一)國內疫情**

1. 2014年8/1起修改病例定義為「流感併發重症」，2014年8/1-2015年2/9累計102例流感併發重症(37例H1N1、49例H3N2、3例A未分型、13例B型)，17例死亡。
2. 2015年第3週社區流感病毒陽性率為22.5%，檢出病毒以H3N2為主。
3. 2015年第5週門診類流感就診病例百分比1.4%，急診類流感就診病例百分比10.1%，均較前一週持平。



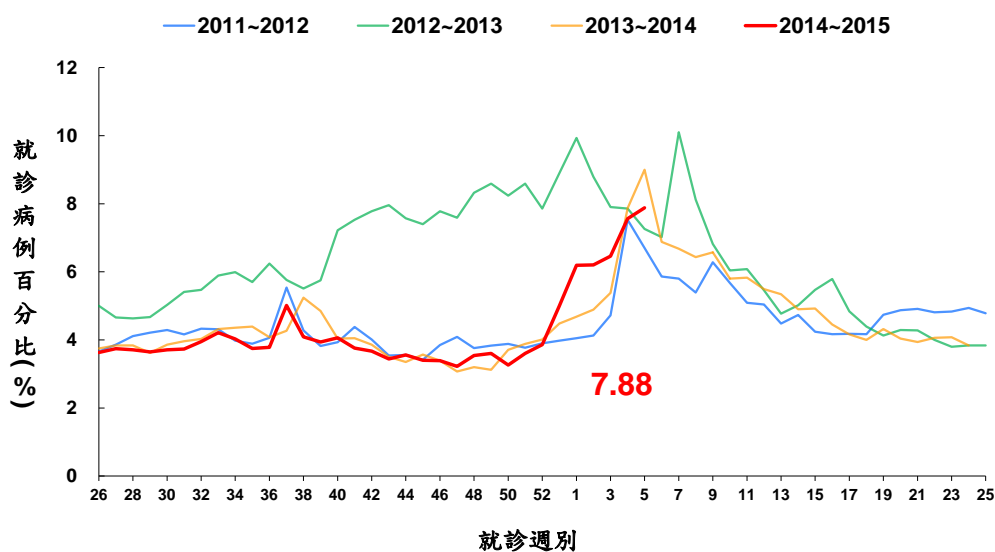
圖一、2014-15 年門診及急診類流感病例百分比趨勢

(二)國際疫情

- 1.中國大陸：南方省份流感活動仍處高峰，北方省份持續下降，第 5 週全國流感陽性率 18.8%，南方省份以 H3N2 型及 B 型(Yamagata 株)共同流行，北方省份以 H3N2 型為主；97.3%之 H3N2 型與疫苗株呈低效價反應。
- 2.香港：流感活動持續上升，超過前三個流感季的流行高峰，並有進一步上升機會，第 5 週流感陽性率達 38.4%，以 H3N2 為主。今年截至 2/9，累計 224 例成人及 11 例兒童重症病例，其中 145 例死亡。
- 3.日本：流感活動呈下降，惟仍處高點，以 H3N2 為主。
- 4.加拿大：流感活動持續緩慢下降，以 H3N2 為主，98.6%較疫苗株呈效價降低情形或與南半球疫苗株相似。
- 5.美國：流感活動持續下降，以 H3N2 為主，68.7%較疫苗株呈效價降低情形。
- 6.歐洲：流感活動呈下降趨勢，惟仍處高點，以H3N2為主，75%與現疫苗株不吻合。

二、腹瀉

國內腹瀉疫情呈上升，惟上升趨勢略緩，但疫情仍在高點，6歲以下幼兒發生率最高。病毒性腸胃炎群聚事件檢出病毒以諾羅病毒為多。



圖二、歷年急診腹瀉就診病例百分比趨勢

三、新型A型流感

(一) H7N9流感

1.中國大陸：福建省、廣東省、江蘇省、浙江省、新疆維吾爾自治區2/3-9公布新增36例病例(含6例死亡)，以福建省及廣東省為主。自2015年1月累計83例，19例死亡，病例數及死亡數均低於2014年同期，逾九成具活禽接觸或活禽市場暴露史，含3起家庭群聚；當局表示整體疫情無明顯變化，病例以散發為主，病毒無有效人傳人變異。

2.全 球：去年入秋(2014/10/1)以來累計131例，分別為中國大陸廣東省45例、福建省36例、浙江省18例、江蘇省14例、新疆維吾爾自治區8例、上海市3例、山東省(江蘇移入)、江西省及北京市各1例；香港2例(廣東移入)；加拿大2例(境外移入)。自2013年迄今累計584例，包含中國大陸565例、香港12例、臺灣4例、加拿大2例、馬來西亞1例，WHO於2/6更新204例死亡。

(二) H5N6流感

1.中國大陸：雲南省2/9公布1例人類感染H5N6流感病例，經由重症肺炎監測檢出，為迪慶藏族自治州44歲男性，發病前具野禽接觸史，1/27發病，2/3就醫住院，2/6死亡，目前所有密切接觸者無出現異常，當局表示此為偶發個案，未有人傳人情形。

2.全 球：自2014年迄2/9累計3例人類感染H5N6流感病例，分別為四川省、廣東省、雲南省，均具禽類接觸或活禽市場暴露史，其中2例死亡。

四、伊波拉病毒感染

WHO 2/6更新西非三國累計病例數為22,525例，9,004例死亡，其中醫護人員感染病例822例，488例死亡。病例數以獅子山最多，死亡數則以賴比瑞亞最多；住院者致死率約50-61%，近期疫情描述如下：

(一) 近期西非三國疫情反升，為今年首度疫情呈上升趨勢。

(二) WHO表示幾內亞及獅子山部分地區拒絕配合防治工作，且疫情呈地理擴散或廣泛傳播，因應工作仍面臨重大挑戰，提醒應盡可能於雨季(4-5月)前控制疫情，以免因天候影響而難以抵達偏遠地區協助。

五、國際間旅遊疫情建議等級表

疫情	國家/地區		等級	旅行建議	發布日期
人類禽流感	中國大陸	新疆維吾爾自治區、江蘇省、浙江省、廣東省、福建省、上海市、江西省、雲南省	第二級 警示(Alert)	對當地採取加強防護	2014/10/18-2015/2/10
		其他省市，不含港澳	第一級 注意(Watch)	提醒遵守當地的一般預防措施	2013/6/28
	埃及		第一級 注意(Watch)	提醒遵守當地的一般預防措施	2014/12/9
登革熱	東南亞地區 9 個國家：印尼、泰國、新加坡、馬來西亞、菲律賓、寮國、越南、柬埔寨、緬甸		第一級 注意(Watch)	提醒遵守當地的一般預防措施	2013/7/15
麻疹	中國大陸、菲律賓、越南				2014/1/21-4/10
中東呼吸症候群冠狀病毒感染症(MERS-CoV)	沙烏地阿拉伯		第二級 警示(Alert)	對當地採取加強防護	2014/4/23
	中東地區通報病例國家：阿拉伯聯合大公國、約旦、卡達、伊朗、阿曼		第一級 注意(Watch)	提醒遵守當地的一般預防措施	2014/5/30-2015/1/20
伊波拉病毒感染	幾內亞、獅子山、賴比瑞亞		第三級 警告(Warning)	避免所有非必要旅遊	2014/8/1
小兒麻痺症	巴基斯坦、敘利亞、阿富汗、以色列、伊拉克、喀麥隆、赤道幾內亞、衣索比亞、索馬利亞、奈及利亞		第一級 注意(Watch)	提醒遵守當地的一般預防措施	2014/5/7

創刊日期：1984 年 12 月 15 日

出版機關：衛生福利部疾病管制署

地址：臺北市中正區林森南路 6 號

電話：(02) 2395-9825

文獻引用：[Author].[Article title].Taiwan Epidemiol Bull 2015;31:[inclusive page numbers].[DOI]

發行人：郭旭崧

總編輯：李翠鳳

執行編輯：陳倩君、劉繡蘭

網址：<http://www.cdc.gov.tw/>