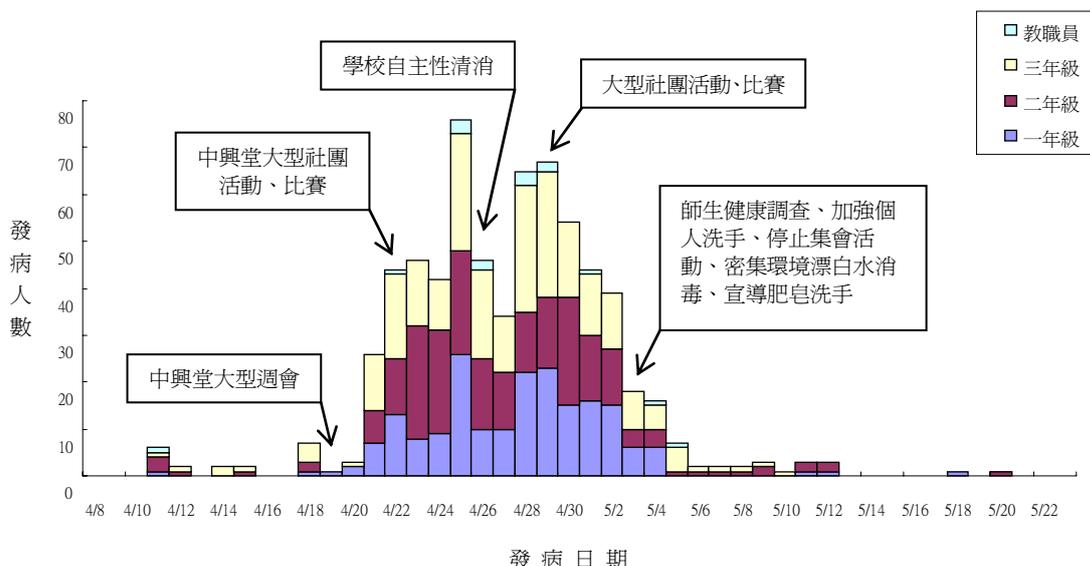




創刊日期：1984年12月15日  
 出版機關：行政院衛生署疾病管制局  
 發行人：張峰義  
 總編輯：吳怡君  
 執行編輯：吳麗琴、劉繡蘭  
 電話：(02) 2395-9825  
 地址：台北市中正區林森南路6號  
 網址：<http://teb.cdc.gov.tw/>  
 文獻引用：  
 [Author].[Article title].Taiwan Epidemiol Bull  
 2011;27:[inclusive page numbers].

根據實地調查瞭解，本案發病者(病例定義為出現腹瀉、嘔吐、噁心、腹痛或發燒任一項病毒性腸胃炎之症狀者即列為可能病例，排除有喉嚨痛、流鼻水或咳嗽等出現呼吸道症狀者)於4月11日起至5月20日

期間累計 665 名可能病例 (侵襲率為 38%)，流病曲線請見圖。該校自 4 月 11 日起，各年級即陸續皆有零星學生出現疑似症狀，於 4 月 21 日起個案數急劇升高，之後每日新發病例皆超過 40 人以上，於 4 月 25 日出現第一波高峰(76 人)，並於 4 月 29 日出現第二波高峰(67 人)，自 5 月 6 日以後每日發病人數降為 5 例以下，各年級學生及教職員工發病人數、侵襲率情形詳如表，有病例班級分布於各棟建築物，部分學生於監測期間曾出現過兩次腸胃炎情形；可能病例之症狀分布以腹瀉(77%)為主，其次為嘔吐(58%)、噁心(53%)、發燒(52%)、腹痛(3%)；此外並有少數可能病例表示亦曾出現頭痛、全身酸痛或關節疼痛等症狀，發病師生中僅有 1 人接受住院治療，其他發病者均以急診或門診就醫，個案健康情形恢復良好。



圖、屏東某高中腹瀉群聚事件流行病學曲線

表、各年級發病人數、侵襲率與病毒性檢驗結果

	發病人數	班級侵襲率	糞便檢體數	病毒性病原檢驗結果		
				諾羅病毒	輪狀病毒	諾羅+輪狀病毒
一年級	194	6-54%	4	0	2	0
二年級	217	21-67%	1	0	0	0
三年級	239	17-63%	7	1	1	1
教職員	15	13%	2	0	0	1
總計	650		13	1	3	2

為進一步釐清感染源及傳播途徑，衛生調查訓練班與分局於 5 月 4 日針對較早發病之學生進行第一波問卷晤談，另於隔日抽樣 12 個班級學生進行問卷填答以調查發病人員、時間、症狀及行為調查，共回收 449 份問卷，由分局協助衛生調查訓練班進行病例對照分析。

## 二、學校活動與環境調查

學校環境雖大致整潔，環境皆由學生負責打掃清潔，然而學生廁所的地板溼滑骯髒且有少數積水現象，洗手台上之肥皂塊缺乏(或過小)且多半骯髒，廁所由固定班級進行清掃，此外班級垃圾桶皆擺放於走廊上，且並未加蓋。

飲水及食物方面，該校一般用水及飲用水源為地下水，而飲用水為透過飲水機逆滲透處理之地下水，飲水機之水質抽驗結果皆於標準值內，師生有時會訂食校外飲料；學校地下水井及化糞池之管線間隔 15 公尺以上，而儲水塔未有例行之消毒；師生之餐食來源主要透過訂購便當、至校外購買、從家裡攜帶或購自校內福利社。

學校於中興堂週二舉行全校性週會及週五有社團活動，於 4 月 22 日及 4 月 29 日亦於中興堂舉辦全校藝文比賽，皆有超過上百人參加；校方週一至週四晚間固定開放大會議室及圖書館等場地供學生晚自習，因接近學測，晚自習人數每日超過 50 名以上，以三年級學生為主；校內游泳池於 4 月 11 日開放，僅有一年級生有例行游泳課程，但每日傍晚仍會開放泳池供學生游泳，但每週游泳人數有限。

## 三、檢體檢驗

本案共採集肛門拭子 11 件和糞便檢體 13 件；肛門拭子皆來自發病學生，糞便檢體包含發病學生 11 件與老師 2 件；實驗室判定細菌性(沙門氏桿菌與志賀氏桿菌)檢驗結果皆呈陰性，而病毒病原檢驗結果陽性者為諾羅病毒 1 件、輪狀病

毒 3 件和兩者為陽性者 2 件(其中 1 件來自老師)。

## 相關單位之防治作為

5 月 3 日分局會同衛生局人員實地勘查後，要求學校提供全校師生疾病之衛生教育、有急性症狀學生盡量請假在家、落實正確洗手步驟和方式，徹底以漂白水執行環境清消，特別是廁所環境並規劃專用廁所供具有疑似症狀之人員使用，要求學校停止當週之大型集體活動，如週會、社團活動、團體晚自習和游泳課等，以減少人傳人之機會，並建議校方保持教室之空氣流通(該校二、三年級為冷氣教室)、需增加廁所洗手台上的清潔用品供學生使用、校內垃圾桶需加蓋，以避免擦拭嘔吐物之紙巾直接暴露於空氣中等事項，並開立督導改善通知單請學校於限期內改善，以避免疫情持續擴散、並要求校方瞭解每日新發病人數及發病者症狀改善情形回報衛生局。

轄區衛生局除協助疫情調查、檢體的採集與送驗外，並提供校方漂白水、酚類消毒劑、藥皂、洗手乳、乾洗手液等物品給個人及環境清潔外，並提供洗手五步驟及病毒性腸胃炎認知之衛教單張，提升學校師生針對此類疾病的自我保護能力，每日追蹤該校師生健康情形回報分局。

衛生單位介入協調後，校方積極配合執行各項建議傳染阻絕等手段，加強正確的個人洗手習慣宣導、環境清消及暫停各項集體活動，包含預計於 5 月 6 日及 5 月 7 日舉行之校慶運動會等。

## 討論與建議

本案證實為諾羅病毒及輪狀病毒引起之校園腹瀉群聚，為近年校園病毒性腸胃炎群聚事件最大規模之疫情，從調

查發現多數發病者未能有良好衛生習慣(如：飯前便後之手部清潔、症狀者的自我規範、環境之清消方式等)且普遍缺乏病毒性腸胃炎的認知，造成疫情透過人傳人的方式而擴大。

病毒性腸胃炎常見引起之病原體包含輪狀病毒(Rotavirus)、諾羅病毒(Norovirus)、沙波病毒(Sapovirus)、星形病毒(Astrovirus)和腺病毒(Adenovirus)等數種[1]；其中輪狀病毒好發於5歲以下幼童，常見感染季節為冬季，而諾羅病毒則分布於各年齡層，容易發生於季節交替之時期，病毒主要由糞口途徑、人與人之間接觸或受污染的物體表面等途徑傳遞散播，平均潛伏期為1-3日，主要引起具腹瀉、嘔吐、噁心或腹痛等症狀之自限性急性腸胃炎，部份感染者亦出現發燒或全身疼痛等症狀，兩者易於人口稠密之環境中爆發集體感染，包含長期照護機構、監獄、學校等；於校園方面，2008年美國三個州中曾爆發3起大學校園諾羅病毒群聚感染，共造成近千人發病、超過10人住院治療及立即停止其中一個校園活動等結果[2]，此疾病最有效的防治方式為提升個人衛生習慣與加強環境的清消以阻斷病毒的傳播[3]。

於疫病通報方面，校方察覺因腹瀉請假人數日漸攀升，曾於4月26日動員執行校園消毒工作的同時，卻未能依循「傳染病防治法」第42條、「學校衛生法」第13條或由教育部制定「校園安全及災害防救通報處理中心作業要點」之規定，及時向衛生或教育主管機關通報並尋求協助，導致衛生單位遲至4月30日才經由1922民眾陳情案件瞭解此事；由於目前國中以上之教育單位未納入學校監測系統中，故衛生單位無法進行常規監測，相關教育單位實有必要加強學校於傳染病方面之監測及通報作業的宣導

及教育訓練，以避免類似情事發生；另當地數家醫療院所診治該校學生腸胃炎人數異常增加，然而當地衛生單位卻未曾接獲醫師通報，顯示醫療端的警覺性仍待提升，衛生主管機關或可透過當地醫師公會再加強醫師對於異常訊息通報之宣導，另衛生單位如接獲或可能疑似情事之通報時，應能更主動積極介入與處置，以爭取時效，並增加防疫效能。

於疫病防治方面，面對大規模腹瀉群聚事件，疾病管制局與衛生局人員連續數日進入校園實地調查，且期間多次與教育單位及校方進行跨單位協調防治作為，另於調查期間，衛生局藥物食品科人員、環保局人員亦共同參與協助調查，讓不同專業領域之人員能透過不同面向，對於疫情進行評估及提出建議，而校方人員能夠積極面對、持續執行防治作為，是讓新增病例急遽減緩，疫情得以控制最重要的因素。

## 致謝

本調查感謝屏東縣衛生局疾病管制科、轄下衛生所及疾管局研究檢驗中心的協助。

## 參考文獻

1. CDC. Viral Gastroenteritis. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/faq.htm>
2. CDC. Norovirus Outbreaks on Three College Campuses - California, Michigan, and Wisconsin, 2008. MMWR 2009; 58:1095-9.
3. 衛生署疾病管制局-諾羅病毒(Norovirus)感染控制措施指引。Available at: <http://www.cdc.gov.tw/public/Data/812116593971.pdf>

## 原著文章

### 卡介苗分子基因型別鑑定法對疫苗品管監控之效益評估

楊素鈴、李政道、鄭雅芬  
陳蓓諭、吳慧娟、方俞尹、古華蓉  
張靜芳、吳炳輝

衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

#### 摘要

台灣地區2歲以下嬰幼兒得到肺外結核的風險為2歲以上兒童的2.88倍，為預防嬰幼兒感染結核病，約98%新生兒接受過卡介苗預防接種，因每劑卡介苗（*Bacillus Calmette-Guérin*; BCG）之活菌含量多寡會影響預防接種成功與否，將本局產製卡介苗儲存在4°C、25°C及37°C不同溫度，各1、3及6個月不同時間，檢測產品力價的安定性試驗，結果在最差的儲存條件（37°C存放6個月）下，力價仍保留至45%，仍能符合世界衛生組織對該製劑的品管規範（在37°C儲存28天，力價須保留至20%）。卡介苗在例行品管檢驗中會出現2種菌落型，分別為Type I平滑型（smooth form）菌落及Type II粗糙型（rough form）菌落，以分子生物學方法鑑定這2種菌落的基因型別差異，發現卡介苗疫苗株主要以Type I菌落出現，其中儲存1、3及6個月等組，Type I平滑型菌落所佔比率分別約為85%、70%及60%以上。另以聚合連鎖反應（PCR）及DNA定序檢測RD16基因片段發現Type I較Type II短22個base pairs，最後以多重複性聚合連鎖反應（multiplex PCR）鑑定卡介苗的RD2, RD8, RD14及RD16基因，結果卡介苗在這些RD區域只有RD16基因之變異，其它無異，另對基因型別的研究顯示，長期在不同溫度儲存下無任何明

顯差異，顯示本局產製卡介苗疫苗仍具有一定品質，符合WHO的規範。本研究所建立的分子基因型別鑑定方法對未來產製卡介苗在品管上的監控將有所助益。

**關鍵字：**卡介苗、效價試驗、多重複性聚合連鎖反應

#### 前言

卡介苗 BCG (*Bacillus Calmette Guérin*) 是 1908 年由法國 Calmette 和 Guérin 經過 230 次繼代培養所得的牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) 的活菌減毒疫苗，是目前人類歷史上使用最多及最久的疫苗之一，可以預防嬰幼兒的進行性初發性結核病（progressive primary tuberculosis）如結核性腦膜炎[1]。

台灣地區為預防嬰幼兒感染結核病，約98%新生兒接受過卡介苗預防接種，經回溯分析發現，自1996至2003年結核病總發病率於20歲以下族群為9.6/100,000人年，肺外結核（extrapulmonary TB）發病率於1-2歲嬰幼兒族群最高（3.29/100,000人年），2歲以下嬰幼兒得到肺外結核的風險為2歲以上兒童的2.88倍[2]。卡介苗自1979年起採用日本Tokyo strain 172菌株由本局血清疫苗研製中心所產製研發，該疫苗株的安全性高、副作用低，自2002至2006年間接種卡介苗引起骨髓炎發生率約為每百萬劑3.68人，全身散播性卡介苗炎症發生率約為每百萬劑0.92人，為世界衛生組織所容許範圍內[3]。

卡介苗是由本局疫苗中心所產製，經品管檢驗相關項目，卡介苗菌數多寡會影響接種成功與否，其中效價試驗是卡介苗菌數多寡的關鍵指標，卡介苗疫苗的效價試驗是將卡介苗菌液培養於呂顏二氏（Lowenstein-Jensen）斜

面培養基，經過4-5週後，取出並計算出菌落數來推算其效價。然在培養過程發現菌落會出現2種不同的外觀型別(morphology)，一為平滑型(smooth form)另一為粗糙型(rough form)。依據2006年日本學者Yamamoto[4]發現卡介苗菌落的外觀主要有2種型式呈現，這和我們檢測卡介苗的菌落外觀型別具有一致性，另在2007年Yamamoto等[5]更進一步以Real-time PCR方法將此2種菌落予以定量。然而目前國內產製卡介苗疫苗並無此相關的研究與探討，為進一步監控疫苗基因型別的變異與其效價的關聯，本研究將市售『卡介苗』分別儲放於4°C、23°C及37°C各一、三及六個月，在這些時間點計算出平滑型及粗糙型菌落的分佈比率及其是否會影響到疫苗的力價的改變，另建立PCR技術檢測RD16基因是否發生變異，探討該基因的差異是否會影響力價，最後以multiplex PCR方法檢測『卡介苗』經不同溫度、不同時間的儲存，是否有基因型別的變異。為監控疫苗及接種品質，與維護良好之疫苗品質，達到最好預防的效果，監控疫苗基因型別的變異與其效價的關聯實為必要，使其最終能達到品質最佳與保證的效益。

## 材料與方法

### 一、收集卡介苗樣本並分別儲放於不同溫度及時間

各取5種不同批號卡介苗作為本研究之樣本，分別將樣本存放4°C、23°C及37°C不同溫度，各1、3及6個月不同時間。

### 二、卡介苗平滑型及粗糙型的分佈比率

取5支卡介苗以無菌生理食鹽水(氯化鈉)稀釋至0.5毫克/毫升後混合均勻，再以無菌蒸餾水稀釋至 $2 \times 10^{-5}$ 、

$1 \times 10^{-5}$ 、 $5 \times 10^{-6}$ 三種稀釋液濃度。分別以0.1毫升接種於呂顏氏斜面培養基，前二種稀釋液濃度各接種5支，最後一種接種10支。置於溫度37°C，濕度80%之恆溫恆濕培養箱培養4-5週後，取出並計算出平滑型及粗糙型的分佈比率並記錄菌落數以計算效價。

### 三、卡介苗活菌數效價計算方式參照中華藥點第六版[6]

計算每一濃度培養 colony 的標準差，依下列公式計算：

先由所得之各菌落數算出  $\chi^2$ ， $\chi^2 = (nSx^2/Sx) - Sx$ 。

n:某一稀釋菌液接種之斜面數目。

Sx:某一稀釋菌液。

$Sx^2$ :所得之菌落數平方總合。

將P值(Probability)設為0.05，若n=5， $\chi^2$ 不得大於9.5；若n=10， $\chi^2$ 不得大於16.9；若所計算任一 $\chi^2$ 大於上述數值，則需複試。

計算各稀釋液所得之菌落平均數，分別以 $X_1$ ， $X_2$ ， $X_3$ 表示之。

適值 $\omega$ 定40。

若 $X_1 + X_2 + 2X_3 \leq 2\omega$ ，則菌落計數 =  $1/2 (X_1 + X_2 + 2X_3)$

若 $X_1 + X_2 + 2X_3 \geq 2\omega \geq X_2 + X_3$ ，則菌落計數 =  $(\omega \cdot X_1) / [2\omega + X_1 - (X_2 + 2X_3)]$

若 $X_2 + 2X_3 \geq 2\omega \geq 2X_3$ ，則菌落計數 =  $(\omega \cdot X_2) / (2\omega + X_2 + 2X_3)$

若 $2X_3 \geq 2\omega$ ，則菌落計數 =  $X_3$   
所得之菌落計數乘以稀釋倍數，即為每毫升疫苗可培養出的菌落數。

### 四、卡介苗之 genomic DNA 之萃取與純化

卡介苗菌落溶解於2 ml TEST 緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1M Na Cl, Triton X-100 1/200 v/v)，先加

入 2 mg/mL Lysozyme 置於 37°C 作用 30 分鐘，再加入 4% sodium dodecyl sulphate (SDS) 及 2 mg/mL proteinase K，置於 50°C 隔夜 (overnight) 作用將之溶解 (lysis)，最後以 phenolchloroform-isoamylalcohol (25:24:1) 純化萃取，並復溶於含有 potassium acetate (最終濃度為 0.3 M) 保存之。

#### 五、以聚合連鎖反應 (PCR) 及多重複性聚合連鎖反應 (multiplex PCR) 技術檢測 RD 基因 (RD2, RD8, RD14, RD16) [7-9]

設計出卡介苗 RD16 基因的引子 (primer)，RD16 的正向 (RD16l) 序列引子為 ATCGTTCACGGACAGCCGTAGT，逆向 (RD16r) 序列引子為 CTCGATCCAAGTTCAACCACG。將總量為 20  $\mu$ L PCR 反應試劑置於 TaqMan Universal PCR 機器 (Applied Biosystems, cat. 4304437)，每份反應試劑中含有 RD16 基因的正向及逆向序列引子各 1 mM，1 mM 探針 (probe)，20 ng DNA，反應步驟先於 50°C 作用 2 分鐘，再於 95°C 作用 10 分鐘，接著進行 40 次循環於 95°C 作用 15 秒及 60°C 作用 1 分鐘步驟使 PCR 產物增幅。multiplex PCR 以 4 組 primer (RD2l:CCAGATTCAAATGTCGACC/RD2r:GTGTCATAGGTGATTGGCTT) (RD8l:ACTCCTAGCTTTGCTGTGCGCT/RD8r:GTA CTGCGG GATTTGCAGGTTC) (RD14l:CAGGTTGAAGGAATGCGTGTC / RD14r:CTGGTACACCTGGGGAATCTGG) (RD16l:ATCGTTCACGGACAGCCGTAGT/RD16r:CGATCCAAGTTCAACCACG) 各 0.4 mM of all primers, 作用在 100 ng of template DNA 及

0.2 mM dNTP mix, 1.5 U Taq DNA polymerase，反應步驟先於 50°C 作用 2 分鐘，再於 94°C 作用 10 分鐘使酵素活化，接著進行 30 次循環於 94°C 作用 1 分鐘 5 秒、55°C 作用 1 分鐘及 72°C 作用 2 分鐘，最終以 72°C 作用 10 分鐘結束。使 PCR 產物增幅，將所得 PCR 產物置於 2% 洋菜膠 (agarose gel) 中。

#### 六、DNA 定序

以自動定序儀 (model 3730, Applied Biosystem) 定序 RD16 基因，並鑑定出變異序列。

### 結果

將卡介苗數批分別儲放於 4°C、23°C 及 37°C 不同溫度，各 1、3 及 6 個月不同時間，分別進行效價試驗，發現儲存 1 個月後，效價試驗的力價有降低，其中儲存在 23°C 雖然較 4°C 力價降低，但仍保留至 70%，儲存在 37°C 亦較 4°C 力價降低，但仍保留至 50%；且儲存 3 個月後效價試驗結果與儲存 1 個月的結果相近；在儲存 6 個月後效價的結果較 1 及 3 個月試驗結果更低，其中儲存在 23°C 力價降低但仍保留至 50%，另儲存在 37°C 力價亦明顯降低，但仍保留約 45% (表一)。

將卡介苗數分別存放於 4°C、23°C 及 37°C 等不同溫度，各 1、3 及 6 個月後，分別取出並培養在呂顏氏斜面培養基上，計算出 Type I 平滑型及 Type II 粗糙型菌落的分佈比率，結果在 23°C 及 37°C 各儲存 1、3 及 6 個月後，大多以平滑型為主。其中儲存 1 個月平滑型菌落所佔比率約 80% 以上；儲存 3 個月該平滑型菌落所佔比率約 70% 以上；在儲存 6 個月後該平滑型菌落佔約 60% 以上 (表二)。

表一、卡介苗儲存於 4°C、23°C 及 37°C 各一、三及六個月力價的結果

『卡介苗』儲存在不同溫度的一個月力價			
儲存溫度	4°C	23°C	37°C
BG039701	2.25 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>	1.05 x 10 <sup>7</sup>
BG039702	1.8 x 10 <sup>7</sup>	1.25 x 10 <sup>7</sup>	0.95 x 10 <sup>7</sup>
BG039703	2.8 x 10 <sup>7</sup>	2 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>
BG039704	2.3 x 10 <sup>7</sup>	1.55 x 10 <sup>7</sup>	1.1 x 10 <sup>7</sup>
BG039705	2.05 x 10 <sup>7</sup>	1.45 x 10 <sup>7</sup>	1.05 x 10 <sup>7</sup>
BG039801	2.15 x 10 <sup>7</sup>	1.55 x 10 <sup>7</sup>	1.1 x 10 <sup>7</sup>
BG039802	1.8 x 10 <sup>7</sup>	1.3 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>
相較 4°C 平均百分比%	--	70.0%	51.2%
『卡介苗』儲存在不同溫度的三個月力價			
儲存溫度	4°C	23°C	37°C
BG039701	1.8 x 10 <sup>7</sup>	1.2 x 10 <sup>7</sup>	0.8 x 10 <sup>7</sup>
BG039702	1.5 x 10 <sup>7</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>	0.5 x 10 <sup>7</sup>
BG039703	1.6 x 10 <sup>7</sup>	1.6 x 10 <sup>7</sup>	0.6 x 10 <sup>7</sup>
BG039704	1.9 x 10 <sup>7</sup>	1.6 x 10 <sup>7</sup>	0.8 x 10 <sup>7</sup>
BG039705	1.5 x 10 <sup>7</sup>	1.2 x 10 <sup>7</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>
BG039801	1.6 x 10 <sup>7</sup>	1.1 x 10 <sup>7</sup>	1.2 x 10 <sup>7</sup>
BG039802	1.5 x 10 <sup>7</sup>	0.6 x 10 <sup>7</sup>	1.1 x 10 <sup>7</sup>
相較 4°C 平均百分比%	--	72.8%	52.6%
『卡介苗』儲存在不同溫度的六個月力價			
儲存溫度	4°C	23°C	37°C
BG039701	1.1 x 10 <sup>7</sup>	0.6 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>7</sup>
BG039702	0.6 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>7</sup>	0.2 x 10 <sup>7</sup>
BG039703	0.7 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>7</sup>
BG039704	0.9 x 10 <sup>7</sup>	0.6 x 10 <sup>7</sup>	0.4 x 10 <sup>7</sup>
BG039705	0.6 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>7</sup>	0.2 x 10 <sup>7</sup>
BG039801	0.8 x 10 <sup>7</sup>	0.5 x 10 <sup>7</sup>	0.5 x 10 <sup>7</sup>
BG039802	0.6 x 10 <sup>7</sup>	0.4 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>7</sup>
相較 4°C 平均百分比%	--	56.6%	41.5%

隨機挑選兩批種不同批號卡介苗數 (BG039701與BG039703)，以PCR分析RD16基因，發現無論儲存在4°C、23°C及37°C溫度下，Type I平滑型菌落的RD16基因比Type II粗糙型菌落的RD16短（圖一），這結果與Honda[4]發現相符。

我們發現平滑型菌落與糙型菌落在RD16基因片段有著長度大小差異，並在該差異區域內有一特殊的特性，即粗糙型菌落的該區域具有HpyCH4 III限制酵素切割的作用位置，而平滑型菌落的RD16基因片段卻無此特性，因此以HpyCH4對RD16基因做進一步研究，結果發現儲存

1、3及6個月不同時間，粗糙型卡介苗菌落RD16基因皆存有HpyCH4 III限制酵素切割點，並且這段區域不會因儲存溫度不同、儲存時間長短而有變異（圖二），也再次確認平滑型的RD16基因片段與粗糙型的基因型別的差異性。

以DNA自動定序儀鑑定RD16基因的變異序列，發現無論儲存在4°C、23°C及37°C不同溫度，平滑型菌落的RD16基因皆比粗糙型菌落的RD16基因短少22個鹼基對(base pair, bp)(圖三)，顯示不同溫度的儲存不影響RD16基因型別的差異。

表二、『卡介苗』在室溫及 37°C 各儲存一、三及六個月菌落型別

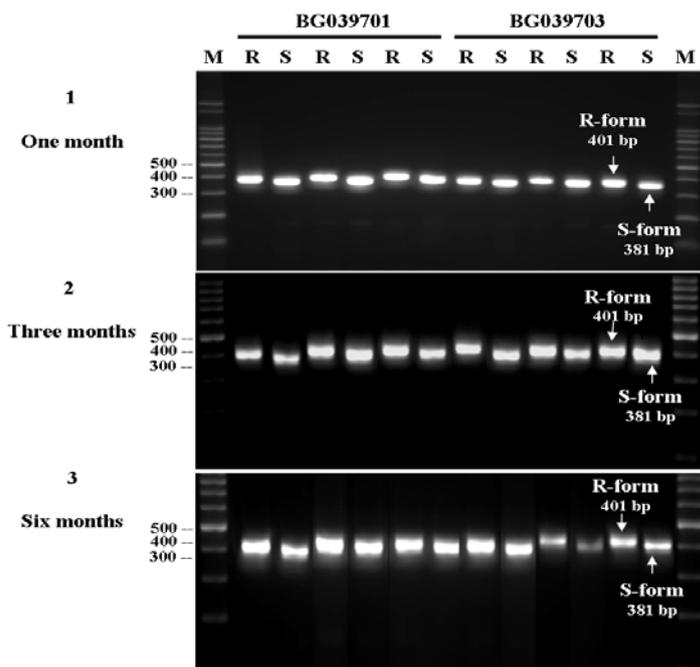
『卡介苗』儲存在不同溫度的菌落型別(一個月)						
菌落型別 儲存溫度	S-colonies(%)			R-colonies(%)		
	4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
BG039701	100	86.96	100	0	13.04	0
BG039702	89	100	100	11	0	0
BG039703	98	91	93	2	9	7
BG039704	99	100	100	1	0	0
BG039705	98	100	100	2	0	0
BG039801	96	83	95	4	17	5
BG039802	99	87	82	1	13	18

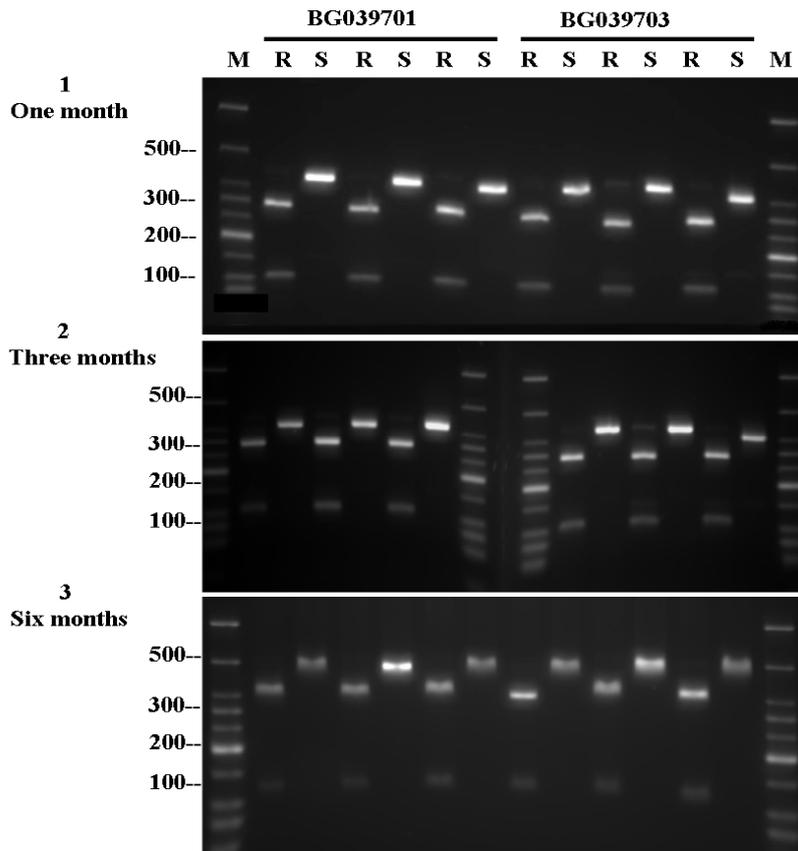
『卡介苗』儲存在不同溫度的菌落型別(三個月)						
菌落型別 儲存溫度	S-colonies(%)			R-colonies(%)		
	4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
BG039701	86	100	85	14	0	15
BG039702	73	80	92	27	20	8
BG039703	75	85	84	25	15	16
BG039704	70	82	100	30	18	0
BG039705	83	81	100	17	19	0
BG039801	95	75	82	5	25	18
BG039802	93	98	92	7	2	8

『卡介苗』儲存在不同溫度的菌落型別(六個月)						
菌落型別 儲存溫度	S-colonies(%)			R-colonies(%)		
	4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
BG039701	90.6	84	100	9.4	16	0
BG039702	87	100	100	13	0	0
BG039703	89	88	92	11	12	8
BG039704	89	91	92	11	9	8
BG039705	100	71	80	0	29	20
BG039801	90.6	64	100	9.4	36	0
BG039802	87	100	100	13	0	0



圖一、在 4°C、23°C 及 37°C 各儲存 1、3 及 6 個月不同時間後，發現平滑型菌落的 RD16 基因片段比粗糙型菌落的 RD16 短



圖二、4°C、23°C及 37°C各儲存 1、3 及 6 個月不同時間，發現粗糙型的 RD16 基因片段存有 HpyCH4 III 限制酵素的切割位置，而此區域是平滑型菌落的 RD16 所缺乏的，再次確認平滑型的 RD16 基因片段與粗糙型的差異性

```

BG039701-4R
TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCACGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCCGAGGCGC
BG039701-4S
TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCAC-----TCCGAGGCGC
BG039701-23R
TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCACGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCCGAGGCGC
BG039701-23S
TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCAC-----TCCGAGGCGC
BG039701-37R
TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCACGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCCGAGGCGC
BG039701-37S
TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCAC-----TCCGAGGCGC
    
```

圖三、平滑型菌落的 RD16 基因片段比粗糙型菌落的 RD16 短 22 base pairs

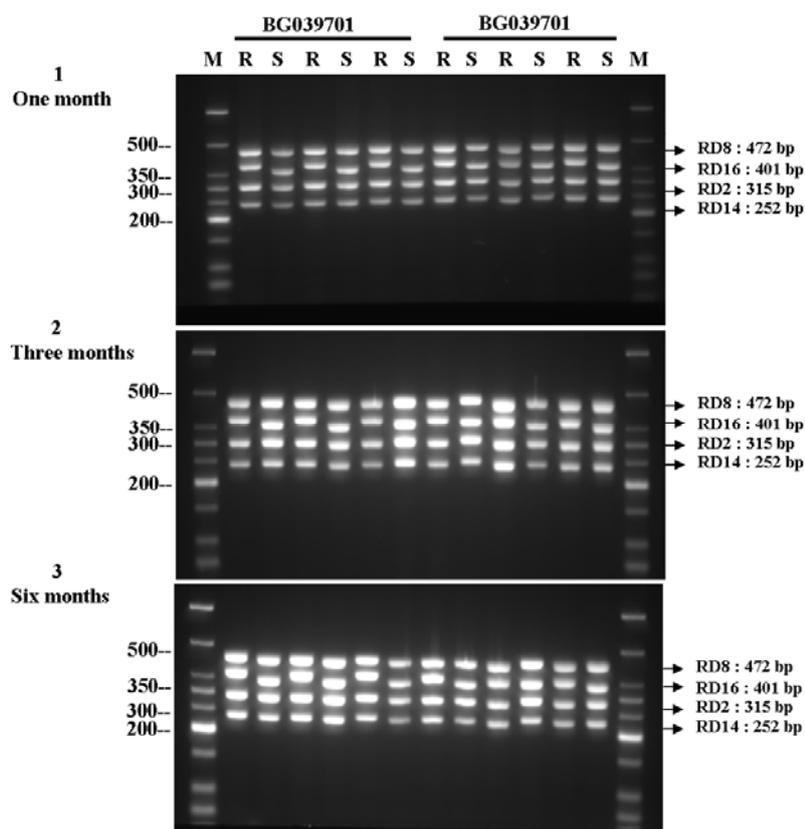
除了針對 RD16 區域, 其它 RD 基因, 例如 RD2、RD8 及 RD14 亦使用 multiplex PCR 技術[7-9]分析這些基因是否經不同溫度及不同時間的儲存而差異, 結果平滑型菌落與粗糙型菌落在 RD2 基因片段長度皆為 315 bp、RD8 基因片段長度皆為 472 bp、RD14 基因片段長度皆為 252 bp, 這 3 個基因的長度大小不因不同溫度、不同時間儲存有所差異, 顯示平滑型菌落與粗糙型菌落只在 RD16 基因有明顯差異, 其它在 RD2、RD8 及 RD14 基因型別及片段大小無異(圖四)。

### 討論

這個實驗結果顯示本局產製卡介苗存在著 2 種不同菌落型別的分布, 其中以 Type I 平滑型為顯著, 考量疫苗可能因其不斷的繼代培養造成菌落型別及基因型別的差異, 本研究結果發現平滑型菌落的 RD16 基因片段比 Type II 粗糙型菌落的

RD16 短 22 bp, 這樣的結果與 Honda 等[4]的研究結果相符, 但其機制至今仍不明確, 依據文獻報導[5]這 22 bp 片段是座落在一轉錄調節蛋白 (transcriptional regulatory protein) 的基因座, 平滑型菌落可能藉由減少這 22 bp 片段提早結束此蛋白質的轉譯, 而改變了此轉錄調節蛋白質的生化功能, 然此蛋白質的真實功能及其生物意義至今尚不明確, 但是能確定的是它不會影響到菌落的存活率。目前世界各國所產製的卡介苗菌種大多缺少這段基因[8], Type I 菌落已經被證實在試管外(*in vitro*)及小鼠內(*in vivo*)的生長皆較 Type II 來的優異[10], 可能是缺少這個 22 bp 片段有助於細菌的生長, 或這 Type I 菌可能還含有未知的基因改變促使其優異的生長。

卡介苗儲存於 4°C、23°C 及 37°C 不同溫度, 各 1、3 及 6 個月不同時間, 其平滑型及粗糙型菌落的分布, 絕大多數(大於 64%) 是以平滑型菌落為主, 比對 DNA 基因序列



圖四、各儲存 1、3 及 6 個月不同時間後, 發現在這些 RD 基因只有 RD16 基因之變異, 其它無差異。

分析平滑型菌落的RD16基因比粗糙型菌落的RD16短22 bp，用HpyCH4 III再次確認平滑型與粗糙型菌落的RD16基因型別的差異，另以multiplex PCR技術檢測其它的基因RD區域RD2、RD8及RD14，顯示這些RD區域只有RD16基因之變異，其它無異，研究結果與Honda等結論相吻合[4-5, 7, 9]比對世界各地的卡介苗疫苗株，日本疫苗菌株的RD16基因是較其它疫苗菌株(俄羅斯Russia疫苗株、法國Pasteur疫苗株、丹麥菌株衍生的英國Glaxo菌株、瑞士南部Tice疫苗株及愛爾蘭共合國Connaught疫苗株)短22 bp。

台灣目前使用日本Tokyo172菌株產製卡介苗，對結核桿菌侵襲有相當的保護效力，既使儲存在最差的狀況(在37°C儲存6個月)力價仍保留至45%，仍能符合世界衛生組織[11-14]對卡介苗在加速安定性試驗的規範(在37°C溫度儲存28天，力價需保留原力價的20%)，另以分子生物學進一步研究基因型別差異，結果發現長期儲存在不同溫度，基因型別無任何差異，顯示本局自製的卡介苗產品品質穩定且製程技術具有一定的品質保證。

目前世界衛生組織對卡介苗的品管檢驗項目，並無相關規範如何鑑定基因型別的差異，因此建立一套標準化的多重複性聚合連鎖反應系統可快速、有效及簡便的鑑定基因型別差異及其穩定性，將有助於提昇卡介苗的品管監控。本計劃建立multiplex PCR快速檢定系統將有助於未來在品管基因型別的鑑定，未來仍須進一步鑑定這2種不同菌株的生物特異性及其對疫苗接種是否產生影響的研究。

#### 誌謝

感謝本局疫苗中心同仁檢驗的辛勞與吳主任炳輝協助校稿讓本研究能夠順利進行。

#### 參考文獻

1. Tripathy SP. Fifteen-year follow-up of the Indian BCG prevention trial. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1987; 62:69-73.
2. Chan PC, Huang LM, Wu YC, et al. Tuberculosis in children and adolescents, Taiwan, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(9):1361-3.
3. Victoria MS, Shah BR. Bacillus Calmette- Guérin lymphadenitis: a case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 1985;4:295-6.
4. Honda I, Seki M, Ikeda N, et al. Identification of two subpopulations of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine* 2006;24:4969-74.
5. Keigo Shibayama, Keiko Mochida, Tetsuya Yagi, et al. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals* 2007;35:139-143.
6. The Chinese pharmacopoeia sixth edition:165-6.
7. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, et al. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 2001;19:2146-51.
8. Keigo Shibayama, Keiko Mochida, Tetsuya Yagi, et al. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried. Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals* 2007;35:139-143.
9. Seki M, Sato A, Honda I, et al. Modified multiplex PCR for identification of BCG substrain Tokyo among clinical

- isolates. *Vaccine* 2005;23:3099-102.
10. Yamamoto T, Phalen S, Uchida K, et al. Protective efficacy of BCG Tokyo 172 in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Kekkaku* 2000;75:379-88. (in Japanese)
  11. Zhang Y, Wallace Jr RJ, Mazurek GH. Genetic differences between BCG substrains. *Tuber Lung Dis* 1995; 76:43-50.
  12. Milstien JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bull WHO* 1990;68:93-108.
  13. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for freeze-dried BCG vaccine. WHO Technical Rep Ser 1979;745.
  14. Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, et al. Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15-16 December 2003. *Vaccine* 2004;22:2675-80.

## 生安專欄

### 總編的話

2003 年 12 月我國實驗室發生研究人員感染嚴重急性呼吸道症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome) 案例，喚起國人對「實驗室生物安全」議題的重視。疾病管制局為我國傳染病防治之主管機關，對防止國內發生實驗室感染事件責無旁貸，故於 2005 年 9 月制定「感染性生物材料管理及傳染病病人檢體採檢辦法」，並於隔年 3 月起實施。藉由政府法令及行政措施等作

為，強化設置單位自主管理能力，提升實驗室工作人員安全防護意識，逐步建構並推動我國實驗室生物安全管理制度。近幾年在辦理實驗室生物安全查核及教育訓練時，常有受查核實驗室或參訓學員反映，國內欠缺獲取實驗室生物安全相關軟、硬體資訊及管理動態之管道。為能滿足各界需求，同時又能全方位提昇我國實驗室生物安全知能，自本期之疫情報導開闢嶄新的「生安專題」系列園地。冀望藉由該園地，將生物安全相關觀念及資訊，有系統、有條理、循序漸進的向各界宣導，並且提供一個與讀者互動及溝通的平台，以營造我國優質的生物安全文化。

## 實驗室生物安全概論

施玉燕、顏哲傑、吳文超

衛生署疾病管制局第五組

微生物實驗室除了支援一般臨床醫學診斷與科學研究之重要任務外，對於傳染病防治對策上亦扮演重大的角色，該等實驗室有效且安全的運作有利於臨床疾病的治療與傳染病防治策略之實施。

國際上，造成實驗室感染的病原體中，1979~1999 年代常見布氏桿菌屬 (*Brucella* spp.)、Q 熱 (Q fever)、肝炎病毒 (Hepatitis virus)、傷寒桿菌 (*Salmonella enterica* Serovar Typhi)、兔熱病桿菌 (*Francisella tularensis*)、結核桿菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) … 等，但自 2000 年後沙門氏桿菌屬 (*Salmonella* spp.) 則已少見[1]，反而是影響深遠的生物恐怖事件、新興傳染病原等生物安全事件受到注目，2001 年美國發生炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*) 郵件的生物恐怖攻擊事件，接續於 2003~2004 年間，新加坡、台灣以及北京發生震驚全球之實驗室

感染 SARS 事件[2]，2010 年美國加州實驗室發生經猴子感染之腺病毒科（Adenoviridae）不明病毒事件，另外國內校園實驗室亦於 2005~2006 年間發生感染登革熱（Dengue fever）與桿菌性痢疾（Shigellosis）事件，該等事件發生的原因可歸納為生物材料保全失當、人員個人防護不當、操作技術不佳以及設備不足等所致。

總括來說影響實驗室生物安全四大要素為生物材料、工作人員、設施環境以及自主管理等，它涉及跨領域知識及多權責機關之協調。實驗室生物安全要以生物材料為中心，任何工作人員對於生物材料的風險要有一定程度的認知，且遵守已備妥的相關作業流程規範、文件指引等來進行作業，而所處環境設施亦應遵循標準規定來設計建置，讓工作人員的健康安全得以保障，而這些規範、指引等會涉及到微生物學、風險評估、建築設計、空調通風、水電管路、感染控制等專業領域，可見涉及到政府許多部門的權責，所以設置單位落實自主管理是很重要的，藉由文件的建立，包括實驗室各項操作規範、作業指引以及各項查核表單(人員訓練查核表單、能力評估表單以及生物材料運送查核表單)…等，持續記錄及進行資料分析與管控，擬定相關應變計畫，最後透過內外部稽核及早發現安全疏漏，立即改善以降低風險之發生[3-5]。

近年來，由於地球暖化造成新興傳染病伺機而動，以及人類對抗生素的濫用產生的抗藥性病原，故實驗室人員進行檢驗及研究工作時，暴露於潛在且不明病原體的機會亦隨之增加，因此工作人員的教育訓練更顯重要，要有居安思危觀念，遵循作業規範，強化應變能力，配合政府相關政策規定，共創維護個人、社區民眾健康及確保環境安全，朝「實驗室感染零發生」的目標邁進。

## 參考文獻

1. BELGIAN BIOSAFETY SERVER. Laboratory-acquired Infections. Available at: [http://www.biosafety.be/CU/LAI/Table1\\_LAI.html](http://www.biosafety.be/CU/LAI/Table1_LAI.html)
2. WHO. The WHO laboratory network to enhance laboratory biosafety and biosecurity in developing countries. 2009. Available at: <http://www.oie.int/doc/ged/D6418.PDF>
3. CEN WORKSHOP AGREEMENT. CWA15793 : 2008 Laboratory Biorisk Management. Available at: <ftp://ftp.cenorm.be/PUBLIC/CWAs/wokrshop31/CWA15793.pdf>
4. Taiwan CDC. The biosafety level 3 of laboratory manual 2nd ed. 2001.
5. WHO. Biorisk management. Laboratory biosecurity guidance 2006. Available at: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_EPR\\_2006\\_6.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2006_6.pdf)

## 我國實驗室生物安全管理現況

施玉燕、吳文超、顏哲傑

衛生署疾病管制局第五組

自2003年嚴重急性呼吸道症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS）冠狀病毒肆虐全球，後續於新加坡、台灣及中國大陸發生三起實驗室感染SARS事件，引發各國對於實驗室生物安全之重視，進而立法或訂定相關規範，確保工作人員之安全。

我國於2004年1月20日再次修正傳染病防治法（全文共計75條），增訂第32條及45條作為有關感染性生物材料及實驗室生物安全相關管理事項之法源基礎[1]，又於隔年9月26日以行政院衛生署署授疾字第0940000614 號令發布「感染性生物材料管

理及傳染病病人檢體採檢辦法」(以下簡稱本辦法),自2006年3月26日施行,該辦法全文共計19條[2],為我國實驗室生物安全管理法制化之基石。

疾病管制局為強化我國實驗室生物安全管理機制,於2004年4月成立「行政院衛生署生物安全委員會(於2006年改制為「行政院衛生署傳染病防治諮詢委員會—生物安全組」),為有關實驗室生物安全政策之專家諮詢管道;並依據前述辦法規定,落實設置單位生物安全管理組織自主管理能力,加強感染性生物材料異動、核備與輸出(入)管理,實施新設生物安全第三等級(以下簡稱BSL-3)以上實驗室之啓用審議規定,以及針對操作第三級以上感染性生物材料之實驗室進行查核作業並限期改善缺失等[2]。

我國對持有、保存或使用第二級以上感染性生物材料之設置單位,依法規定其工作人員達五人以上者,應成立生物安全委員會;未達五人者,應指定專人管理。截至2011年3月底止,共計499家設置單位向本局提出生物安全委員會或專人管理之核備[2]。另依法,實驗室進行第二級以上感染性生物材料之新增、銷毀、分讓或寄存等異動時,須經單位生物安全委員會或專人之同意,始可為之,但若屬於第三級以上感染性生物材料異動,則應先向本局核備後,始可為之[2]。截至2010年底本局共受理逾270件第三級以上感染性生物材料之異動核備案。目前全國約有第二級感染性生物材料164種,第三級感染性生物材料26種。

鑒於2003年SARS疫情之嚴峻考驗及防範各種新興感染症來襲,本局於2004年動用行政院嚴重急性呼吸道症候群防治及紓困特別預算,先後補助本局9家合約實驗室設置BSL-3實驗室,並參照「生物安全第三等級安全規範」之硬體設施標準建置,提升我國檢驗高感染性或未知病原體之量能。為督導BSL-3以上實驗室運轉安全,我國規定新

設之該等實驗室要接受啓用審議與定期查核作業。自2004年至2010年,共計19家BSL-3實驗室及1家BSL-4實驗室,經本局審議通過後啓用,本局並對已啓用之BSL-3以上實驗室進行定期查核。另對於執行結核分枝桿菌之鑑定及藥敏試驗之二級負壓實驗室(共34家),於2009年起亦納入查核對象。實驗室查核所列缺失,皆要求限期改善,並進行書面或現場複查,以確保缺失改善之有效性。

繼SARS感染事件經驗,凸顯提升實驗室人員生物安全操作及防護知能之重要,自2005年起配合業務推展重點,逐年辦理BSL-2以上實驗室相關工作人員教育訓練、座談會與研討會等活動,截至2010年累計參訓人數達2,578人次,另於2010年起開始建構實驗室生物安全數位教材,增加實驗室人員多元化之訓練管道。

本局基於主管機關權責,責無旁貸推動實驗室生物安全相關督導事務。惟真正落實生物安全管理,仍有賴各單位生物安全委員會或專人之自主管理。換言之,即除了積極主動要求執行各項實驗室生物安全管理事項外,更應具風險評估與異常管理之理念,配合品質管理手法達成持續改善,才能真正杜絕實驗室感染意外之發生[3]。

## 參考文獻

1. 衛生署疾病管制局:傳染病防治法。93年。
2. 衛生署疾病管制局:感染性生物材料管理及傳染病病人檢體採檢辦法。94年。
3. CEN Workshop Agreement. CWA15793:2008. Laboratory Biorisk Management Standard. Available at: <ftp://ftp.cenorm.be/PUBLIC/CWAs/workshop31/CWA15793.pdf>