

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-134511

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：細菌性傳染病病原體變化之分析研究

年度/全程研究報告

執行單位：研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：江春雪

研究人員：陳英彥、姚淑滿、周聖萍、張仁哲

執行期間：108 年 01 月 01 日至 108 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目錄 (包括目次、圖次、表次、附錄)

中文摘要	3
英文摘要	4
本文	
一、前言	5
二、材料與方法	10
三、結果	14
四、討論	18
五、結論與建議	24
六、計畫重要研究成果及具體建議	26
七、參考文獻	28
八、圖、表	32
附錄	39
期末審查意見回復表	40

中文摘要

關鍵字：退伍軍人病、退伍軍人菌、資料庫、抗生素敏感性

免除疾病威脅是本署的首要任務，要達成此任務，需要正確且即時地偵測病原體、釐清感染源及傳播路徑，進而擬定防治策略、有效控制疾病及避免群聚感染。近年，各種傳染病病原體的變異速度比以往更快，威脅也更大，因此，持續研究病原體之變化在偵測病原體及群聚感染上愈顯重要。退伍軍人病在 1999 年納為第三類法定傳染病，是退伍軍人菌感染的一種嚴重傳染病，多為偶發，但退伍軍人菌可以存在任何的水環境中，所以，國際上幾乎每年都有大規模的退伍軍人病群聚感染的發生。有鑑於此，本署自 2016 年開始，對於退伍軍人病陽性個案的感染源追蹤，亦將重點轉往公共環境相關的水檢體採集與檢驗，目標便是群聚感染的早期偵測及防治。配合此一政策，本計畫為 106-109 年的四年期計畫，屬於細菌傳染病病原體變化之分析研究，目標為建立一個完整的台灣退伍軍人菌的 PFGE 及 SBT 的資料庫，是一個即時性和回溯性的資料庫，以提供權責單位進行群聚感染的監測。同時，配合全球性的抗藥危機，本計畫也將監測退伍軍人菌的藥物敏感性情形，以提供權責單位及醫療單位的防治及用藥參考。到目前為止，我們建立 315 株臨床菌株的 PFGE DNA 指紋圖譜，其中顯示已經確認的群聚感染，也顯示數組待釐清的可能的群聚感染；建立 267 株臨床菌株的 SBT 資料，型別相當分歧，確實可做為提供另一鑑別菌株來源的有效工具；建立 399 株臨床菌株的抗藥性反應分布範圍，是第一個較大規模數量且包含各地理區域的資料庫。我們也分析 2000-2019 年退伍軍人菌的檢驗及流行病學資料，平均年發生率每十萬人口為 0.46 人，2005 年後年發生率呈增加的趨勢，由 2005 年的 0.17 人到 2019 年的 0.95 人，本署六個分區的年發生率也顯現增加的趨勢，東區的年發生率高於其他五區。

英文摘要

Key words: Legionnaires' disease, *Legionella*, database, antimicrobial susceptibility

Being free from disease threat is the major goal of our Center. In order to reach this goal, we need to be able to correctly and timely identify pathogens, reveal agent sources and clarify transmission routes, as well as to design strategy, effectively control diseases and prevent outbreaks. In recent years, infectious agents mutate faster and become more threatening than ever, therefore, continuously monitoring variations in pathogens becomes more important in detection of both pathogens and outbreaks. Legionnaires' disease (LD), being listed in the third category of notifiable diseases in Taiwan in 1999, is caused by *Legionella*. LD is often sporadic. However, *Legionella* is present ubiquitously in every aquatic environments and large scale outbreaks occur every year globally. Therefore, our Center has shifted the focus in finding agent sources to public environments for cases of LD since 2016, aiming at early detection and prevention of outbreaks. Based on this new strategy, this four-year project, a study of variations in bacterial pathogens, aims to establish a PFGE and SBT database for *Legionella* in Taiwan. This will be both an on-going and retrospective database, providing information to monitor outbreaks for decision makers. In the meantime, in order to participate in the global drug-resistant crisis, the antimicrobial susceptibility of *Legionella* will also be monitored. The information will be provided to decision makers and hospitals as references for disease prevention and treatment. So far, we have applied PFGE to 315 *Legionella* strains isolated from LD patients, and found several confirmed outbreaks and several undetermined possible clusters of outbreaks. We also applied SBT to 267 isolates and proved that this is an alternative database. We also established the antimicrobial susceptibility data for 399 clinical isolates collected from 2009 to 2018. We also analyzed LD cases. In 2000-2019, the average annual incidence of LD is 0.46 per 100,000 population. Since 2005, the incidence has increased, from 0.17 in 2005 to 0.95 in 2019. A similar trends were found for all 6 different Regions classified by CDC in Taiwan. The Eastern Region has a higher incidence than the other 5 Regions.

本文

一、前言（包括研究問題之背景與現況、研究目的等）

2015年初，實驗室收到北區管制中心的通知，請求協助調查新北市前一年不尋常地增加的數例退伍軍人病(Legionnaires' disease)個案是否為群聚感染，當時針對這幾個個案的臨床分離菌株進行脈衝式電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分析並比對所產生的DNA指紋圖譜，發現確實有幾例的圖譜相同，根據以往幾次對退伍軍人菌感染源調查的經驗，知道具有相同PFGE圖譜的退伍軍人菌菌株應該是流行病學上具有相關性的菌株，不過，疫調最後並沒有找到這些個案之間的相關性。當時，深感實驗室若擁有一個完整的台灣退伍軍人菌的PFGE圖譜或者其他分子分型的資料庫，包括臨床菌株和環境菌株，也包括時間和相關地理位置，也許更能協助區管中心，找到個案之間或者與環境之間的相關性。

退伍軍人病是由伍軍人菌感染的一種急性疾病(1-3)。西元1976年，美國有200多名退伍軍人參加退伍軍人團體的聚會之後，陸續發生不明原因的肺炎症狀，其中34名病患死亡，經研究人員調查之後終於找到病原菌，並將此細菌命名為嗜肺性退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)(4)。依臨床症狀，退伍軍人菌感染可分為兩種，一種為龐提亞克熱(Pontiac fever)，患者症狀較為輕微，類似感冒，不會發生肺炎；另一種為退伍軍人病(Legionnaires' disease)，患者多數會發展成肺炎。退伍軍人病潛伏期一般約2-10天，開始時有厭食、身體不適、肌痛與頭痛等症狀，通常在1天內會快速發燒且伴隨畏寒，出現乾咳、腹痛及下痢等症狀，體溫通常高達39.0-40.5°C，患者胸部X光會出現肺部堅質化且會擴散至肺兩側，最後則出現呼吸衰竭，一般患者的死亡率約8-12%，若患者免疫能力有缺失，死亡率可能更高，而院內感染者的死亡率約15-34%(3)。退伍軍人病的實驗室鑑定方法有數種，細菌培養仍為黃金標準(gold standard)，其他常

用的有尿液抗原檢測、血清學檢測以及分子生物學方法的檢測，基於未治療的退伍軍人病的高致病率與死亡率，臨床上對退伍軍人病的最優先處置，便是早期診斷和立即使用有效的抗生素做治療。

一般人都可能受到退伍軍人菌感染，但大多數健康人對此菌都有抵抗力，而容易感染退伍軍人病的危險因子(1)，包括吸煙、高齡、酗酒、糖尿病、慢性心血管或者肺部疾病、惡性腫瘤以及免疫受抑制者，最容易罹患退伍軍人病，罹患者男女之比例約為 2.5:1。多數退伍軍人病患者的年齡大於 50 歲，通常個案的年齡越大，病情越嚴重，臺灣自 2000-2015 年共有 1,384 個確定病例，50 歲以上有 1,120 人，佔 80.9% (1,120/1,384)，其中 65 歲以上個案有 717 人，佔 50 歲以上個案的 64.0% (717/1,120)。

退伍軍人菌為革蘭氏陰性桿菌，目前已知至少有 59 個菌種及 70 個血清型(serogroups)(5)，包括嗜肺性退伍軍人菌(*L. pneumophila*)及其它退伍軍人菌種(*Legionella species*)，其中約有一半會造成人類呼吸道疾病，而且大部份是由嗜肺性退伍軍人菌所造成，其中又以血清型第一型(serogroup 1)最為有關(1-3)。退伍軍人菌普遍存在自然以及人為的水環境中，包括溪流、井水、飲用水、中央空調的冷卻水塔、溫泉浴池、蓮蓬頭的霧滴等，可存活於 5-65°C，pH 5.5-9.5 之間溫暖潮濕的環境，尤其在 35-45°C 為最適溫度，對氯忍受度很高，可在經氯處理過的自來水中存活數月之久。退伍軍人菌的傳染途徑通常是藉由空氣中的水霧傳播，在人為環境中包括冷卻水塔、水龍頭、淋浴設備，甚至溫泉與游泳池、醫院、飯店等公共場所之用水都有可能成為傳播媒介(1, 6, 7)，也可經由吸嚥入受污染之水而致病(8)。雖然大家一直認為退伍軍人菌不會人傳人，但是 2016 年葡萄牙報導了一例可能是人傳人的案例(9)。

退伍軍人病多為偶發的(sporadic)，不過，歷史上不乏許多廣為人知且

規模不小的退伍軍人病群聚感染，如其菌名由來的 1976 年美國費城退伍軍人聚會(空調系統)、1999 年荷蘭 Bovenkaspel 的花卉展(展示場內的噴泉)、2001 年西班牙 Murcia 的醫院(冷卻水塔系統)、2008 年日本 Miyazaki 的公共浴池(循環系統)、2012 年加拿大 Quebec 的速食餐廳(冷卻水塔系統)及 2014 年美國密西根州的 Flint 社區(更改水源河流)(3)，由於退伍軍人菌可能存在任何的水環境中，因此，能盡早偵測到群聚感染，並找出感染來源，避免演變成影響數十、甚至數百人大規模感染的社會事件，是各國公共衛生單位防治退伍軍人病的首要重點。

台灣在退伍軍人病的防治歷史，於 1989 年行政院衛生署預防醫學研究所自美日引進退伍軍人菌檢驗技術，1993 年臺灣發生醫院工作人員感染退伍軍人病，受醫界重視，1994 年臺大醫院請美國匹茲堡大學教授 Dr. Yu 來臺對此病作一系列之研討，1995 年衛生署規定區域級以上醫院如發現病例要通報，以研究計畫方式監測，1999 年正式納入第三類法定傳染病通報與監測，2004 年 6 月開始對通報個案採集痰液、尿液及血清三種檢體送驗，2004 年 7 月開始對陽性個案採集疑似感染源的相關環境水檢體送驗，2004 年 12 月退伍軍人菌統一由昆陽實驗室檢驗，2005 年開始對陽性個案血清型相同的臨床分離菌株與環境檢體分離菌株進行 PFGE 指紋圖譜分析，2013 年開始由認可的醫療機構執行尿液抗原檢驗，2016 年初開始對陽性個案不再採集疑似感染源的住家相關環境水檢體，不過，疑似感染源的公共環境相關環境水檢體則維持採檢送驗，這個改變，主要的考量便是公共環境可能會造成嚴重的群聚感染。

群聚感染或者感染源的調查，除了流行病學上的相關性之外，最重要的是實驗室能證明群聚感染患者的臨床株，或者患者的臨床分離菌株與疑似感染源的环境株是相同的菌株，而實驗室用於分辨菌株是否相同的方

法，必須有適當的分辨力、再現性、穩定度等等條件(10)。對於 *L. pneumophila* 血清型第一型菌株，有一個可以利用單株抗體的快速方法可用(11)，不過其解析度有限，只能將菌株分成 8-10 類左右，其他的分子生物學的分型方法(typing method)，以脈衝式電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)以及 Sequence-based typing (SBT)最常被使用於退伍軍人菌。PFGE 是近年來被廣泛使用的分子分型技術(12)，細菌之染色體經酵素切割與電泳之後所產生的 DNA 指紋圖譜(PFGE patterns)，可作為分析菌株間親源關係之依據，此技術具有相當高的分型效力及再現性，分型結果可有效應用於進一步追蹤感染源(6)，美國 CDC 在 1996 年建立的 PulseNet 網絡便是根據此方法，而本實驗室亦於 2005 年開始將此法應用於分析陽性個案血清型相同的臨床分離菌株與環境檢體分離菌株的關聯性。SBT(13-15)是一種類似多位點序列分型(multilocus sequence typing, MLST)的方法，是歐洲退伍軍人病監測網絡(ELDSNet, European Legionnaires' Disease Surveillance Network)所使用的方法，使用七組基因的 DNA 片段序列來看菌株的相關性，許多研究建議嗜肺性退伍軍人菌並不是一個很純系的生物(clonal organism)(16, 17)，它會進行相當的基因重組，但是在 SBT 方法所使用的七組基因處發生基因重組的機率很低，一般新等位基因(new alleles)的出現最可能是來自點突變(point mutation)，而非基因重組，所以，以 SBT 方法所定出的菌株序列型(sequence type, ST)可以用於分辨菌株的異同，尤其適用於群聚感染的調查(18)，目前 SBT 的資料庫已將嗜肺性退伍軍人菌分成超過 2,194 型(2016.08.16 資料擷取)，逐漸成為國際性的標準方法。近年，全基因體定序(whole genome sequencing)也成為一個可能的分辨方法，也許此法有成為那個最終的分辨方法的潛力，不過可能要先精煉化全基因體序列資料的處理過程，當然也

要待價格更加平易近人之時。

臨床上用於治療退伍軍人病的抗生素，以 macrolides、fluoroquinolones 和 cyclins 類家族的藥物為主，直到 1990s 為止，erythromycin 是治療退伍軍人病的第一選擇，不過，azithromycin 和 tetracycline 有較少的副作用，fluoroquinolones 在動物實驗的效果優於 erythromycin，因此目前推薦治療退伍軍人病的抗生素為 azithromycin 和 levofloxacin，這些藥物效果很好，逐漸成為健康和免疫有缺失的退伍軍人病病患的主要用藥(3)。退伍軍人菌的藥物敏感性試驗並沒有特別的規定，加上退伍軍人菌的營養需求異於其他細菌，因此有許多方法被用於測定其最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)(19, 20)，不過，臨床上很少進行退伍軍人菌的藥物敏感性試驗，治療多以臨床經驗為主。

本計畫為四年期計畫，是屬於細菌傳染病病原體變化之分析研究，目標為建立一個完整的台灣退伍軍人菌的 PFGE 及 SBT 的資料庫，包括臨床菌株和環境菌株，也包括時間和相關地理位置，將是一個包含即時性和回溯性的資料庫，以提供權責單位進行群聚感染的監測，同時，為配合全球性的抗藥危機，本計畫也將監測退伍軍人菌的藥物敏感性情形，以提供權責單位及醫療單位防治及用藥參考。

本報告為此四年期計畫的第三年，將以第一年建立之 PFGE 及 SBT 分子分型方法持續應用於臨床菌株，以建立臨床菌株的資料庫，用於比對菌株和菌株之間的相關性，協助偵測臨床個案是否有疫調不明顯的關聯性；及以第二年建立之退伍軍人菌藥物敏感性試驗方法持續應用於臨床菌株，以建立台灣地區臨床菌株(wild type)抗藥性反應分布的描述性資訊與資料庫，以供即時鑑別具抗藥性的菌株與其相關機制。

二、材料與方法

1. 檢體收集及病人基本資料

符合退伍軍人病通報定義，由各醫院採集檢體並依傳染病通報模式送至疾病管制署呼吸道細菌實驗室，進行菌株之培養及鑑定，同時提供病人的基本資料。

2. 痰液檢體之菌株分離鑑定

痰液經過酸處理後，取 0.5 mL 接種到選擇性培養基，內含 BCYE 培養基(Buffered charcoal yeast extract agar)，生長要素添加物 L-cysteine 以及抗生素添加物 PNV(polymyxin B, natamycin and vancomycin)，置於二氧化碳培養箱中，溫度 35°C、CO₂ 濃度 2.5-5.0%，相對溼度 60-90%條件下培養，每天觀察，若觀察到可疑菌落則挑出來再次培養，並進行革蘭氏染色、L-cysteine 生長需求測試、抗體乳膠凝集試驗，以及直接免疫螢光抗體試驗(DFA)，確認其菌種及血清型。

3. 環境水檢體之菌株分離鑑定

首先使用孔徑 0.2 μm 的濾膜過濾水檢體 500 mL，加入 3 mL 滅菌水並加以震盪，使濾膜上的殘留物再度懸浮於水中，取出其中 1 mL 溶液進行酸處理與培養，酸處理的過程與上述痰液檢體處理過程相同，使用的選擇性培養基為 BCYE 培養基添加 L-cysteine 以及 MWY，接下來的培養、觀察與鑑定的方法同痰液檢體。因為環境檢體時常發現不止一種退伍軍人菌，所以盡可能挑選許多菌落做進一步的鑑定後，再以直接免疫螢光抗體試驗確認其菌種及血清型。

4. 菌株血清型鑑定

採用直接免疫螢光抗體試驗法和 m-TECH 抗體，檢驗過程參照產品使用手冊，將待測菌落挑出重新培養 48 小時之後，取部份菌量溶解於 1% 福馬林中，吸取少量菌液滴在玻片上，自然風乾之後過火固定，加入不同血清型之抗體共軛物，於室溫反應 20 分鐘。取出玻片以 PBS 及蒸餾水沖洗，自然風乾，封片後以螢光顯微鏡檢視。

5. 菌株的脈衝式電泳(PFGE)分子分型

將待測菌株培養 48 小時，挑取適當菌量加入 2 mL 緩衝溶液(100 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0)，調整適當濁度，另外配製 1% agarose 溶解於 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)，將菌液與 agarose 等體積混合後注入模具。凝固的膠塊放入 proteinase K 溶液(20 mg/mL Proteinase K, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% Sarcosine)，在 56°C 反應 2 小時，以滅菌水清洗 2 次，TE Buffer 清洗 4 次，每次皆在 56°C 水浴槽搖晃 15 分鐘。以 *Sfi* I 限制切割酵素(New England Biolabs, MA, USA)於 50°C 反應 4 小時，每管 200 μ L 溶液內含酵素 10 Unit，反應完成後將膠條黏貼上模具，以 1% agarose 鑄膠，接著使用 Bio-Rad CHEF MAPPER 電泳儀(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)進行電泳。電泳條件為電場梯度 6 V/cm、電場角度 120°，變換間距 3 秒至 40 秒，電泳總時間 20 小時。電泳完成後以 ethidium bromide 染色並照相，使用 BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)軟體進行分析。

6. 菌株的 Sequence-based typing (SBT)分子分型：Amplification primers

Gene	primer name	position	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp	Fragment size (bp)
<i>flaA</i>	fla-587F	568-587	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG	55 °C	414

	fla-960R	981-960	CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G		
<i>pilE</i>	pilE-35F pilE-453R	12-35 471-453	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA GCT GGC GCA CTC GGT ATC T	55 °C	460
<i>asd</i>	asd-511F asd-1039R	487-511 1062-1039	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC	55 °C	576
<i>mip</i>	mip-74F mip-595R	58-74 616-595	GCT GCA ACC GAT GCC AC CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C	55 °C	559
<i>mompS</i>	mompS-450F mompS- 1116R	430-450 1140-1116	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C	55 °C	711
<i>proA</i>	proA-1107F proA-1553R	1090-1107 1570-1553	GAT CGC CAA TGC AAT TAG ACC ATA ACA TCA AAA GCC	55 °C	481
<i>neuA</i>	neuA-196F neuA-634R	176-196 634-611	CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC	55 °C	459
<i>neuAh</i>	neuAh-L neuAh-R		ATCCAGCAGTTTTTAMAAATTTAGG TGGCTGCATAAAAYTAATTCTTTAGCC A		791-794

Sequencing primers:

As above except that *mompS*-1015R instead of *mompS*-1116R is used for the reverse sequencing reaction of the *mompS* target. *mompS*-1015R CAG AAG CTG CGA AAT CAG

7. 抗生素敏感性試驗

使用的 6 種 E-test 抗生素階梯濃度試劑條為 Azithromycin (AZ 256 0.016-256) , Clarithromycin (CH 256 0.016-256) , Ciprofloxacin (CI 32 0.002-

32), Levofloxacin (LE 32 0.002-32), Doxycycline (DC 256 0.016-256), Trimethoprim/sulfamethoxazole (TRIM/SULFA 1/19, TS 32 0.002-32)。菌株接種培養於 BCYE/L-cys 培養基 37°C 環境培養 48 小時後，取適量菌落以無菌水調整菌液濃度為 0.5 McFarland，以無菌棉棒均勻接種菌液於 15 公分 BCYE/L-cys 培養基，以消毒鑷子將 E-test 抗生素試劑條貼放於培養基面上適當間隔位置，37°C 培養 48 小時後紀錄結果，如生長情況不佳則再培養 24 小時後讀取記錄結果。使用 ATCC 33152 為實驗的參考菌株。

8. 實驗室過去收集的菌株

菌株保存在 -80°C 冷凍櫃，使用前再次培養在 BCYE 培養基上。

三、結果

2019 年退伍軍人病個案檢驗及流病資料

本年度(2019 年)自 1 月 1 日至 11 月 7 日止，通報退伍軍人病 508 例，台北區 178 例最多，佔 35.0%，其餘五區個案數介於 28~94 例之間。以細菌培養、尿液抗原檢測及血清學檢測為檢驗方式，整體檢驗陽性率為 43.9%，北區 65.2%最高，中區 27.7%最低。確定個案數共 223 例，台北區 79 例最多，佔 35.4%，東區 10 例最少，佔 4.5%。今年共有 33 株臨床分離菌株，整體菌株分離率為 14.8% (33/223)，以中區 38.5%最高，高屏區 5.7%最少。分離菌株以台北區和中區各 10 株最多，各佔 30.3%。(表一)

今年 223 例確定個案的年齡分布，以 70 歲以上 94 例為最多，佔 42.2%，50 歲以上個案數合計 194 例，佔 87.0%，有 4 個年齡 19 歲以下的個案。整體年發生率為每十萬人口 0.95 人，以 70 歲以上 4.27 為最高。整體男性與女性個案數比例為 3.8，各年齡層介於 2.0~5.7 之間，差異最大的為 50-59 歲年齡層的 5.7。(表二)

2000-2019 年退伍軍人病個案檢驗及流病資料

退伍軍人病於 1999 年列為第三類法定傳染病納入監測，到 2019 年 11 月 7 日為止，一共通報 16,405 例個案，其中確定個案數為 2,120 例。2000~2005 年間，每年通報約 1,000-1,800 例，檢驗陽性率介於 2.9%~7.9% 之間；2006~2011 年間，每年通報約 550-750 例，檢驗陽性率介於 8.9%~13.7% 之間；2012~2016 年間，每年通報約 470-540 例，檢驗陽性率介於 16.9%~28.6% 之間；2017-2019 年每年通報約 440-510 例，檢驗陽性率高達 42.6-45.9%。(圖一)

2000-2019 年共 2,120 例確定個案，平均年發生率為每十萬人口 0.46 人，以本署六個分區來看，台北區、北區、中區、南區、高屏區和東區各

區平均年發生率每十萬人口分別為 0.51、0.35、0.34、0.39、0.47 和 1.73(資料未顯示)。以各年來看，自 2005 年之後，全國每十萬人口的年發生率呈現增加的趨勢，2005 年為 0.17，2019 年為 0.95，15 年間有 5.7 倍的增加。(圖二) 以各區各年來看，2005-2019 年間雖有些波動，整體都呈上升趨勢，特別是 2017-2019 近 3 年，台北區、北區和東區年發生率都有大幅增加。(圖三)

以 2000-2019 年確定個案來看各年的年齡分布，雖然有些波動，每年皆以 70 歲以上個案數最多，2004 佔 50.0%最高，2005 年佔 26.3%最低。50 歲以下個案數佔比，則介於 2007 年的 10.7%和 2003 年的 26.9%之間，平均約 18.9%。(圖四)

以 2000-2019 年整體 2,120 例確定個案來看年齡分布，70 歲以上 872 例為最多，佔 41.1%，50 歲以上個案數合計 1,756 例，佔 82.8%，年齡 19 歲以下的個案數有 13 例，佔 0.6%。整體男性 1,634 例與女性 486 例個案數比例為 3.4，以 50-59 歲年齡層的比例 5.8 差異最大，而 40 歲以下個案的男女性比例(1.0~2.3)明顯較 40 歲以上個案的比例(2.9~5.8)為低。(圖五) 各年齡層每十萬人口的年發生率，不論是整體或者分為男女性別，皆隨著年紀增加而上升，70 歲以上年齡層整體、男性和女性的年發生率分別為 2.54、3.94 和 1.24。(圖六)

2002-2019 年退伍軍人病臨床菌株分布

2002 年之後，實驗室開始從個案的臨床檢體分離出退伍軍人菌，截至今年，一共有 525 株，其中以嗜肺性退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)血清型第一型 458 株最多，佔 87.2%，非嗜肺性退伍軍人菌共有 17 株，佔 3.2%，以 *L. longbeachae* 9 株為最多。(圖七)

退伍軍人菌的脈衝式電泳(PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)分析

針對退伍軍人病的陽性個案，自 2004 年 7 月開始採集其相關的環境水檢體進行檢驗，以期釐清可能的感染來源之後，每當自個案的臨床檢體分離出的菌株和自環境水檢體分離出的菌株為相同的退伍軍人菌和血清型時，實驗室都會進一步執行配對菌株的 PFGE，以判斷兩者是否為相同來源。多年來歷經多位同仁的傳承，執行退伍軍人菌菌株的 PFGE 方法雖然大同小異，不過並不一致，在 2017 年的研究中，為了建立長久的資料庫，將執行方法的一些因子都考慮進去並固定下來。以 *Sfi* I 限制酵素於 50°C 切割 DNA 的反應時間，為了確保作用完全，最後訂為 4 小時。電泳時的變換間距，訂為 3 秒至 40 秒。

將 PFGE 應用於個案臨床菌株時，原本計畫書規劃以年度方式進行，緣於前言所述關於北區疑似群聚感染事件，希望能盡早偵測到與其具有相同 DNA 指紋圖譜的菌株，包括過去與近年的，因此 2017 年 PFGE 的執行以地區進行，2018 年之後則回歸為以年度方式進行。2017-2019 年合計執行了 315 株臨床菌株的 PFGE。(表三) 2019 年所獲得的 109 株 DNA 指紋圖譜如圖八所示，圖譜相當分歧，粗略比對有 11 組指紋圖譜相同的菌株出現，其中包含一組 5 株，為 2010 年南部一家醫院院內群聚感染的菌株，一組 4 株，為 2010 年中部一家醫院院內群聚感染的菌株，一組 2 株，為 2013 年南部一家醫院院內群聚感染的菌株，剩餘各組相同 DNA 指紋圖譜的菌株有跨年代跨地區，需要進一步釐清(圖八)。

退伍軍人菌的 Sequence-based typing (SBT)分析

退伍軍人菌的 Sequence-based typing (SBT)採用歐洲退伍軍人病監測網絡(ELDSNet, European Legionnaires' Disease Surveillance Network)所使用的方法，使用七組基因的 DNA 片段序列來看菌株的相關性，其相關的引子

序列及 PCR 的反應條件，皆參考網站上的資料。2017 年計畫完成並獲取 sequence type (ST) 型別的菌株包括 56 株臨床菌株和 31 株環境菌株，來自 2002-2006 年間，還有數十株已經進行但是尚未能獲取 ST 型別，有些是未完成七組基因的 DNA 片段序列，有些則是尚未出現的 ST 型別，等待進一步的釐清。2018-2019 年計畫完成 267 株臨床菌株的 ST 型別資料，個案年代為 2010-2019 年(表四)，最多的型別為有 28 株菌的 ST1，佔 10.5%，其次為 ST120、ST42 和 ST2369，分別為 21、15 和 13 株菌。有 75 株菌屬於不超過 5 株菌的 ST 型別，而 72 株菌則不隸屬於資料庫中已知的 ST 型別(表五)

退伍軍人菌的抗生素藥敏試驗

分析 2009 年至 2018 年由臨床感染個案分離到的菌株共計 399 株，其中 359 株 *L. pneumophila* serogroup 1、30 株 *L. pneumophila* non-serogroup 1 和 10 株 *Legionella* species 的抗生素藥敏試驗結果。(表六)

所有菌株對 6 種抗生素的抗藥性結果，包含 MIC、MIC₅₀、MIC₉₀ 與 MIC range 列於表七，大多數菌株的 MIC 值落於多數菌株 MIC 值所在的範圍內，Azithromycin、Ciprofloxacin 及 Levofloxacin 各有一株菌的 MIC 值落於主要範圍的邊緣，但此 MIC 數值與相關研究的數值相比仍屬相對較低之 MIC 值，可算做仍屬於一般 wild type 分布範圍內。試驗結果顯示，這 399 株臨床菌株中，並沒有抗藥性表現(MIC 值)較高之菌株。參考菌株的抗藥性試驗結果，均落在 wild type 分布範圍內。比較 *L. pneumophila* serogroup 1、*L. pneumophila* non-serogroup 1 與 *Legionella* species 菌株，其間的抗藥性結果並無顯著差異(表八)，比較不同年代以及不同地區的退伍軍人菌的抗藥性結果亦無顯著差異。(資料未顯示)

四、討論

我國自 1999 年將退伍軍人病納入第三類法定傳染病監測項目，持續監測國內退伍軍人病流行情形，截至 2019 年 11 月 7 日止，共有 2,120 例確定個案，2000-2019 年間平均年發生率每十萬人口為 0.46 人，自 2005 年之後，全國每十萬人口的年發生率整體呈現增加的趨勢，由 2005 年的 0.17 人到 2019 年的 0.95，有 5.7 倍的增加。退伍軍人病一向被認為是一個被低報的疾病，因此，這個增加有可能是真的增加，因為人口老化、高危險族群增加以及房屋供水系統老舊等等因素，也有可能不是真的增加，而是因為醫師比較注意以及疾病檢驗的增加，當然也可能兩者都有。國內退伍軍人病的尿液抗原檢測自 2013 年開始由認可檢驗機構檢驗，有些醫學中心將此項檢驗作為肺炎病人的例行性檢驗，應該也會增加個案數，尤其是病情較不嚴峻，原本可能不會被當成退伍軍人病檢驗的病人。美國通報的退伍軍人症，包含病情嚴重的退伍軍人病和病情較輕微的龐蒂亞克熱 (Pontiac fever)，也看到增加的趨勢，由 2000 年每十萬人口的 0.39 增加到 2011 年的 1.36 (21)。不過，歐盟的監測資料則呈現平穩的年發生率，2010-2014 年每十萬人口分別為 1.3、1.0、1.1、1.1 和 1.4 人(22)。如果以 2011 年的年發生率做比較，台灣、美國及歐盟分別為每十萬人口 0.42、1.36 和 1.0 人，顯示國內的年發生率低於歐美，同樣地這個差異有可能是真的，也可能是低報的結果，不過，由於國內的醫療普及，因此推測這個差異應該有相當程度是真的。

以本署台北區、北區、中區、南區、高屏區和東區的六個分區來看，2000-2019 年各區退伍軍人病平均年發生率每十萬人口分別為 0.51、0.35、0.34、0.39、0.47 和 1.73，顯示東區的發生率高於其他五區，由於 2002-2004 年間東區的陽性個案數不尋常地偏高，因此，若僅以 2005-2019 年來

看，各區平均年發生率每十萬人口分別為 0.56、0.40、0.40、0.48、0.51 和 0.90，東區的發生率依然高於其他五區，為各區的 1.6-2.3 倍高。東區的人口數少於其他各區，2000-2019 年間平均人口只有其他五區的 8%~17% 之間，因此只要增加幾例個案，年發生率便會顯著高於其他各區，不過，除了這個因素之外，也許和族群結構、人口的社經地位、環境有關，值得進一步探討，美國一篇關於 2002-2011 年紐約市的退伍軍人病的調查指出，發生率跟著社經地位走，最貧窮的地區的發生率最高(21)。

對於退伍軍人病的檢驗，這些年檢驗陽性率持續提高，確實有很大的進步，由於自 2005 年至今的檢驗方法及陽性判定標準並沒有改變，因此這個進步應該要歸功於醫師精準的臨床判斷，以及前述某些認可檢驗機構將退伍軍人菌尿液抗原檢測項目作為肺炎病人的例行性檢驗，提高陽性個案的被診斷出來。然而，尿液抗原檢測項目被普遍用於肺炎病人的例行性檢驗，雖然有助於發現個案，不過尿液抗原檢測只能檢驗出血清型第一型嗜肺性退伍軍人菌的感染，至於其他的退伍軍人菌或者非血清第一型的嗜肺性退伍軍人菌的感染則偵測不到，因此，就算尿液抗原檢測為陰性，但是臨床症狀又值得懷疑的個案，建議還是採集痰液和血清送本署檢驗，以免錯過非血清第一型的嗜肺性退伍軍人菌感染的個案。

針對 2010-2019 年全國 315 株退伍軍人菌臨床菌株所做的 PFGE 的 DNA 指紋圖譜相當的分歧，根據過去執行退伍軍人病陽性個案的臨床菌株和環境菌株的 PFGE 分析的經驗，PFGE 分型方法對於退伍軍人菌有相當高的分型效力及再現性，如果沒有流行病學上的相關性，幾乎沒有遇見過 DNA 指紋圖譜相同的退伍軍人菌菌株，因此 DNA 指紋圖譜相同的菌株幾乎可以相當肯定它們有相同的來源，因此 315 株臨床菌株的 DNA 指紋圖譜很分歧是預期中的結果。也就是因為退伍軍人菌菌株具有 PFGE 的

DNA 指紋圖譜相當分歧的特性，才覺得這個資料庫可以應用於比對菌株之間的相關性，協助偵測臨床個案是否有疫調上不明顯的關聯性，以期早期偵測出群聚感染。

在 2017-2018 年所獲得的 206 株菌株的 PFGE DNA 指紋圖譜中，有 5 組相同指紋圖譜，一組含 4 株菌，其中 3 株菌株來自前述北區疑似群聚感染的 3 名新北市中和區和三重區陽性個案，新增的 1 株是來自 2016 年 1 名新北市蘆洲區的個案，顯示具有這個 DNA 指紋圖譜的退伍軍人菌的感染源依然存在，可能就存在新北市的某處，持續感染新的個案；一組含 3 株菌，分別來自 2013 年台北市士林區、2017 年士林區和 2017 年松山區的個案；一組含兩株菌為 2014 年新北市淡水區的社區群聚感染。今年新增的 109 株菌株 PFGE DNA 指紋圖譜依然相當分歧，包含一組 5 株為 2010 年南部一家醫院院內群聚感染的菌株，一組 4 株為 2010 年中部一家醫院院內群聚感染的菌株，一組 2 株為 2013 年南部一家醫院院內群聚感染的菌株，顯示以 PFGE 的相同 DNA 指紋圖譜來偵測可能的群聚感染的這個計畫構想是可進行之方案，只是在時間上須更及時，此後我們將進行即時的比對，找到潛在的群聚感染的相關個案，積極配合與導入區管中心對個案的詳細疫調，找到與鑑別感染源，進行即時防治措施導入，以降低可能的新病例個案發生的機會。

ST 型別資料亦相當分歧，2010-2019 年的 267 株菌，最多菌株的前 4 型共 77 株，佔全部菌株的 28.8%，超過 5 株菌的 ST 型別共 11 型合計 120 株菌，佔 44.9%，不超過 5 株菌的 ST 型別合計有 75 株菌，佔 28.1%，而尚不隸屬於資料庫中已知的 ST 型別合計有 72 株菌，佔 27.0%，由此可知 ST 型別資料庫確實可做為提供另一鑑別菌株來源的有效工具，在其他的研究中也顯現這個 ST 型別分析工具的多樣性與歧異性(19)。

關於退伍軍人菌抗藥性資料庫，考慮到可在一般臨床微生物實驗室進行、可複製、再現性佳及可例行性進行，我們以 E-test 方法建立台灣地區自 2009 至 2018 年從臨床病患分離之退伍軍人菌感染株的抗生素藥敏試驗資料，是第一個較大規模數量，且包含台灣各地理區域的臨床菌株呈現退伍軍人菌抗藥性反應的資料庫。這個資料結果中並未發現針對這 6 種藥物抗藥性反應數值特別離群或特別高的菌株，因此結果可以呈現台灣區域性 wild type 菌株的抗藥性分布範圍，未來並可隨時作為即時鑑別發現對此些類藥物產生抗藥性菌株之分布範圍資料庫，並進行其相關機制的探討。

退伍軍人菌的培養條件中需加入 charcoal 以吸附中和生長中有毒物質，然而相關報告中發現 charcoal 會導致許多藥物體外試驗中的 MIC 值升高(19, 23)，無 charcoal 的培養環境卻又會導致退伍軍人菌生長狀況不佳難以進行抗藥性的試驗，因此目前多數相關的抗藥性研究仍使用 BCYE/L-cys 的培養條件以得到最好的生長效果，並與使用相同方法與培養條件的相關研究參照。在 Bruin JP 等人同樣以 E-test 進行臨床菌株抗藥性反應試驗的報告中(19)，其分析進行了 183 株退伍軍人菌 *L. pneumophila* serogroup 1 的抗藥性反應試驗，並呈現 ECOFFs (epidemiological cut off values) 做為判定菌株對該藥物是否有抗藥性傾向，其 ECOFFs 並列於 EUCAST guidelines (24)，作為進行此類抗藥性試驗之參考。其 ECOFFs 分別為 Azithromycin 1.0 mg/L，Clarithromycin 0.5 mg/L，Ciprofloxacin 1.0 mg/L，Levofloxacin 0.5 mg/L，Doxycycline 8 mg/L，我們本研究所有菌株的 MIC 值均低於上述 ECOFFs 數值。進一步比較 Bruin JP 報告中與本研究菌株之 MIC₉₀ 值，分別為 Azithromycin 0.25 對 0.19、Clarithromycin 0.25 對 0.032、Ciprofloxacin 0.5 對 0.19、Levofloxacin 0.25 對 0.094 及 Doxycycline 8 對 2，結果顯示本研究之 MIC₉₀ 與 MIC range 數值均較 Bruin JP 報告中的

數值為低。當與另一篇同樣以 E-test 進行 *L. pneumophila* serogroup 1 抗藥性反應試驗的報告比較，結果相似(25)，MIC₉₀ 分別為 Azithromycin 1 對 0.19、Clarithromycin 0.5 對 0.032、Ciprofloxacin 0.5 對 0.19、Levofloxacin 0.5 對 0.094、Doxycycline 2 對 2，本研究之數值比較低，特別是 Clarithromycin 與 Levofloxacin。Trimethoprim/sulfamethoxazole 為廣效性藥物，本研究中首次呈現退伍軍人菌對其 MIC 的結果與分布。

另外兩篇以 E-test 進行環境退伍軍人菌抗藥性反應試驗的報告(20, 26)，其 MIC₉₀ 分別為 Azithromycin 0.19 及 0.25、Clarithromycin 0.023 及 0.125、Ciprofloxacin 0.094 及 0.19、Levofloxacin 0.016 及 0.094 與 Doxycycline 2 及 2；其針對 *L. pneumophila* serogroup 1 的 MIC₉₀ 分別為 Azithromycin 0.19 及 0.5、Clarithromycin 0.023 及 0.125、Ciprofloxacin 0.094 及 0.38、Levofloxacin 0.016 及 0.094 與 Doxycycline 2 及 3。在這兩篇針對環境菌株的報告中，部分數值與本研究相近，包括 Clarithromycin 與 Levofloxacin 的數值。這些比較結果顯示，本研究結果與其他使用相同方法的抗藥性結果 MIC 數值頗為一致，本研究所呈現的台灣地區抗藥性資料具參考性與代表性價值。這兩篇環境退伍軍人菌抗藥性試驗的報告中亦報告了抗藥性反應在 *L. pneumophila* serogroup 1 與 non-*L. pneumophila* serogroup 1 間不同，De Giglio O 等人的報告中 Azithromycin，Ciprofloxacin，Levofloxacin，Moxifloxacin 與 Tigecycline 的 *L. pneumophila* SG1 MIC 值有意義的高於 non-SG1-*L. pneumophila* 的 MIC 值；在 Torre I 等人的研究，則是 Doxycycline 與 Tigecycline 在型別間互有高低。

退伍軍人菌的生長仍受許多因素影響，因此不同方法進行的抗藥性試驗結果間有所差異(19)，也因著這些變異因素與培養的困難度，至今沒有一個公認標準方法以決定退伍軍人菌的抗藥性反應，加上其體外測得之抗

藥性反應結果與實際體內達到的治療濃度與效果間，仍存在很大的疑問與待解決議題，以便正確解讀這些體外測得的抗藥性結果，因此在這些問題釐清之前，臨床上還是需要小心判定與解讀退伍軍人菌的 MIC 結果。雖然退伍軍人菌的抗藥性少被發現與報告，然而臨床上確實出現過對藥物治療反應不佳的案例，雖未有直接證據說明無效果的治療來自於細菌產生的抗藥性作用，確曾在感染個案檢體分離到對 Ciprofloxacin、Fluoroquinolone 出現抗藥性的菌株(27-29)。

本研究呈現了區域性 wild type 菌株的抗藥性範圍，可隨時即時鑑別發現對這些類藥物產生抗藥性的菌株，並進行其相關機制的探討。由於這些抗藥性反應數值資料存在地域性差異，仍應持續進行臨床與環境菌株抗藥性反應資料的建立，以期建立完整的台灣地區資料庫，環境菌株資料庫的建立將有助於鑑別環境中的退伍軍人菌是否帶有抗藥性傾向，以及人體是否會受到這些環境菌株的感染威脅等，並且建立的抗藥性數值資料庫，可提供做為界定 ECOFFs 與訂定臨床臨界值(clinical breakpoints)之參考。

五、結論與建議

退伍軍人病自 1999 年開始被納為第三類法定傳染病的監測項目，截至 2019 年 10 月止，共有 2,120 例確定個案，2000-2019 年間平均年發生率每十萬人口為 0.46 人，比較美國與歐盟的年發生率為低。全國退伍軍人病每十萬人口的年發生率，自 2005 年後呈現增加的趨勢，由 2005 年的 0.17 人到 2019 年的 0.95 人，有 5.7 倍的增加，這個年發生率增加的趨勢多半也顯現在本署的六個分區裡，另外，東區的年發生率高於其他五區。年發生率上升以及東區較高的年發生率，可能是很多因素影響的結果，如人口老化、高危險族群增加、房屋供水系統老舊、族群結構、人口的社經地位、相關環境、醫師注意增加以及疾病檢驗增加等等，值得進一步探討，以為退伍軍人病防治政策擬定時的參考資料。

近年，退伍軍人病的檢驗陽性率顯著提高，由於檢驗方法及陽性判定標準並未改變，因此要歸功於醫師精準的臨床判斷，以及某些檢驗機構將退伍軍人菌尿液抗原檢測項目作為肺炎病人的例行性檢驗。不過，尿液抗原檢測只能檢驗血清型第一型嗜肺性退伍軍人菌的感染，因此臨床疑似個案，就算尿液抗原檢測為陰性，仍建議採集痰液和血清送本署檢驗，以免錯過其他退伍軍人菌或者非血清第一型的嗜肺性退伍軍人菌的感染個案。

2010-2019 年 315 株退伍軍人菌的 PFGE 的 DNA 指紋圖譜很分歧，其中除了顯示已經確定的群聚感染，例如 2010 年南部某醫院院內感染、2010 年中部某醫院院內感染、2013 年南部某醫院院內感染、2014 年新北市淡水區社區感染之外，也顯示出尚未確認的可能的群聚感染，包含前言所述的北區疑似群聚感染，以及數組具有相同 PFGE DNA 指紋圖譜的個案。這結果顯示以退伍軍人菌 PFGE 的相同 DNA 指紋圖譜來偵測可能的群聚感染是可行的，因此，建議將資料庫建置更完整，進行即時比對，以

便及時的發現潛在的群聚感染的相關個案，配合區管中心對個案的詳細疫調，找到與鑑別感染源，進行即時防治措施導入，以降低新病例個案發生的機會。

2010-2019 年菌株 ST 型別分析結果發現，ST 型別也存在相當的分歧性，有高比例的菌株型別只出現 1-2 次或為新型別，ST 型別資料庫確實可做為提供另一鑑別菌株來源的有效工具，建議進行新型別的深入分析與申請，並釐清因定序結果不明確而造成需進行型別確認的原因，並強化資料庫資料建立。

退伍軍人菌抗藥性資料庫以可在臨床實驗室、再現性佳、可例行性進行之 E-test 方法建立，包含 2009 年至 2018 年共計 399 株臨床分離株的抗藥性反應分布區域範圍，也是第一個以較大規模數量，包含各地理區域的抗藥性反應資料庫，呈現台灣地域性 wild type 菌株的抗藥性分布範圍，可隨時作為即時鑑別發現對這些藥物產生抗藥性的菌株並進行相關機制探討。抗藥性反應數值資料存在地域性差異，建議仍持續進行臨床與環境株抗藥性資料建立，環境株資料庫的建立將有助於鑑別環境中菌株是否帶有抗藥性傾向，以及人體會否受到其威脅等，另外，建立的資料庫可提供做為界定 ECOFFs 與訂定臨床臨界值(clinical breakpoints)之參考。

六、計畫重要研究成果及具體建議

1. 本計劃檢驗本年度(2019)通報退伍軍人病個案的痰液及血清檢體，並分離鑑定出 33 株退伍軍人菌。
2. 退伍軍人病自 1999 年納為第三類法定傳染病，截至 2019 年 11 月 7 日止共 2,120 例確定個案，2000-2019 年間平均年發生率每十萬人口為 0.46 人。
3. 自 2005 年後，全國退伍軍人病每十萬人口的年發生率呈現增加的趨勢，由 2005 年的 0.17 人到 2019 年的 0.95 人，有 5.7 倍的增加，本署六個分區年發生率也顯現增加的趨勢，東區年發生率高於其他五區。
4. 2000-2019 年的 2,120 例確定個案中，50 歲以上佔 82.8%，70 歲以上佔 41.1%。男女性個案數比例為 3.4，以 50-59 歲年齡層的比例 5.8 差異最大，40 歲以下的男女性比例明顯較 40 歲以上的比例為低。各年齡層每十萬人口的年發生率，皆隨著年紀增加而上升，以 70 歲以上年齡層最高，整體、男性和女性的年發生率分別為 2.54、3.94 和 1.24。
5. 近三年退伍軍人病的檢驗陽性率顯著提高(皆高於 42.6%)，由於檢驗方法及陽性判定標準並未改變，因此應該歸功於醫師精準的臨床判斷，以及檢驗機構將尿液抗原檢測作為肺炎病人的例行性檢驗項目。
6. 退伍軍人病年發生率上升以及東區較高的年發生率，可能是很多因素影響的結果，如人口老化、高危險族群增加、房屋供水系統老舊、族群結構、人口的社經地位、相關環境、醫師注意增加以及疾病檢驗增加等等，值得進一步探討，以為退伍軍人病防治政策擬定時的參考資料。
7. 尿液抗原檢測只能檢驗血清型第一型嗜肺性退伍軍人菌的感染，因此臨床疑似個案，就算尿液抗原檢測為陰性，仍建議採集痰液和血清送本署檢驗，以免錯過其他退伍軍人菌或者非血清第一型的嗜肺性退伍軍人菌

的感染個案。

8. 2010-2019 年台灣各區 315 株退伍軍人菌的 PFGE 的 DNA 指紋圖譜，顯示已經確認的群聚感染，也顯示尚未確認的群聚感染，建議將資料庫建置更完整，進行即時比對，以便及時發現潛在群聚感染的相關個案，配合區管中心對個案的詳細疫調，找到與鑑別感染源，進行即時防治措施導入，以降低新病例個案發生的機會。
9. ST 型別分析顯示 ST 型別相當分歧，有高比例的菌株型別只出現 1-2 次或為新型別，ST 型別資料庫確實可做為提供另一鑑別菌株來源的有效工具，建議進行新型別的深入分析與申請，強化與持續資料庫資料建立。
10. 以可在臨床實驗室例行進行之 E-test 方法建立自 2009 至 2018 年共 399 株臨床株的抗藥性分布區域範圍，也是第一個以較大規模數量，包含各地理區域的資料庫，呈現台灣地域性 wild type 菌株的抗藥性分布資料，作為即時鑑別發現對這些類藥物產生抗藥性之菌株並探討相關機制。
11. 抗藥性反應數值資料存在地域性差異，建議持續進行臨床與環境株抗藥性資料的建立，環境株資料庫的建立將有助於鑑別環境菌株是否帶有抗藥性傾向，人體是否會受到其感染威脅等，並建立的數值可提供做為界定 ECOFFs 與訂定臨床臨界值(clinical breakpoints)之參考。

七、參考文獻（請依台灣醫誌編排方式）

1. Stout JE, Yu VL. Legionellosis. The New England journal of medicine. 1997 Sep 4;337(10):682-7.
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clinical microbiology reviews. 2002 Jul;15(3):506-26.
3. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. The Lancet Infectious diseases. 2014 Oct;14(10):1011-21.
4. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. The New England journal of medicine. 1977 Dec 1;297(22):1189-97.
5. Rizzardi K, Winiecka-Krusnell J, Ramliden M, Alm E, Andersson S, Byfors S. Legionella norrlandica sp. nov., isolated from the biopurification systems of wood processing plants. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2015 Feb;65(Pt 2):598-603.
6. Su HP, Tseng LR, Tzeng SC, Chou CY, Chung TC. A legionellosis case due to contaminated spa water and confirmed by genomic identification in Taiwan. Microbiology and immunology. 2006;50(5):371-7.
7. Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS, Genese CA, Nuorti JP, Fields BS, et al. Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. Lancet. 1996 Feb 24;347(9000):494-9.
8. Wei SH, Chou P, Tseng LR, Lin HC, Wang JH, Sheu JN, et al. Nosocomial neonatal legionellosis associated with water in infant formula, Taiwan. Emerging infectious diseases. 2014 Nov;20(11):1921-4.
9. Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, et al. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. The New England journal of medicine. 2016 Feb 4;374(5):497-8.

10. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007 Oct;13 Suppl 3:1-46.
11. Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C, Luck PC. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *Journal of clinical microbiology*. 1997 Nov;35(11):2841-5.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995 Sep;33(9):2233-9.
13. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Luck PC, Meugnier H, Etienne J, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology*. 2005 May;43(5):2047-52.
14. Mentasti M, Underwood A, Luck C, Kozak-Muiznieks NA, Harrison TG, Fry NK. Extension of the *Legionella pneumophila* sequence-based typing scheme to include strains carrying a variant of the N-acetylneuraminyl transferase gene. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014 Jul;20(7):O435-41.
15. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Luck PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of clinical microbiology*. 2007 Jun;45(6):1965-8.

16. Coscolla M, Comas I, Gonzalez-Candelas F. Quantifying nonvertical inheritance in the evolution of *Legionella pneumophila*. *Molecular biology and evolution*. 2011 Feb;28(2):985-1001.
17. Gomez-Valero L, Rusniok C, Jarraud S, Vacherie B, Rouy Z, Barbe V, et al. Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. *BMC genomics*. 2011;12:536.
18. Underwood AP, Jones G, Mentasti M, Fry NK, Harrison TG. Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC microbiology*. 2013;13:302.
19. Bruin JP, Ijzerman EP, den Boer JW, Mouton JW, Diederren BM. Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012 Jan;72(1):103-8.
20. De Giglio O, Napoli C, Lovero G, Diella G, Rutigliano S, Caggiano G, et al. Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environmental research*. 2015 Oct;142:586-90.
21. Farnham A, Alleyne L, Daniel Cimini D, Balter S. Legionnaires' Disease Incidence and Risk Factors, New York, New York, USA, 2002–2011. *Emerging Infectious Diseases* 2014 Nov;20(11):1795-802.
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2015. Legionnaires' disease. Stockholm: ECDC; 2016. Available from:
https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/healthtopics/legionnaires_disease/surveillance/Documents/aer2016/AER-Legionnaires.pdf
23. García MT, Pelaz C, Giménez MJ, Aguilar L. In vitro activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test

- results. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Aug;44(8):2176-8.
24. EUCAST. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Legionella pneumophila*. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Legionella_guidance_document_20171208.pdf
25. Koshkolda T, Lück C. Antibiotic susceptibility of clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2018 Feb;73(2):541-542.
26. Torre I, Alfano R, Borriello T, De Giglio O, Iervolino C, Montagna MT, Scamardo MS, Pennino F. Environmental surveillance and in vitro activity of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila* isolated from hospital water systems in Campania, South Italy: a 5-year study. *Environmental Research* 2018 Jul;164:574–9.
27. Onody C, Matsiota-Bernard P, Nauciel C. Lack of resistance to erythromycin, rifampicin and ciprofloxacin in 98 clinical isolates of *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 1997 Jun;39(6):815-6.
28. Bruin JP, Koshkolda T, IJzerman EP, Lück C, Diederer BM, Den Boer JW, Mouton JW. Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2014 Oct;69(10):2869-71.
29. Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones in vivo: the case of *Legionella pneumophila* and humans. *EBioMedicine* 2015 Jul;2(9):1179-85.

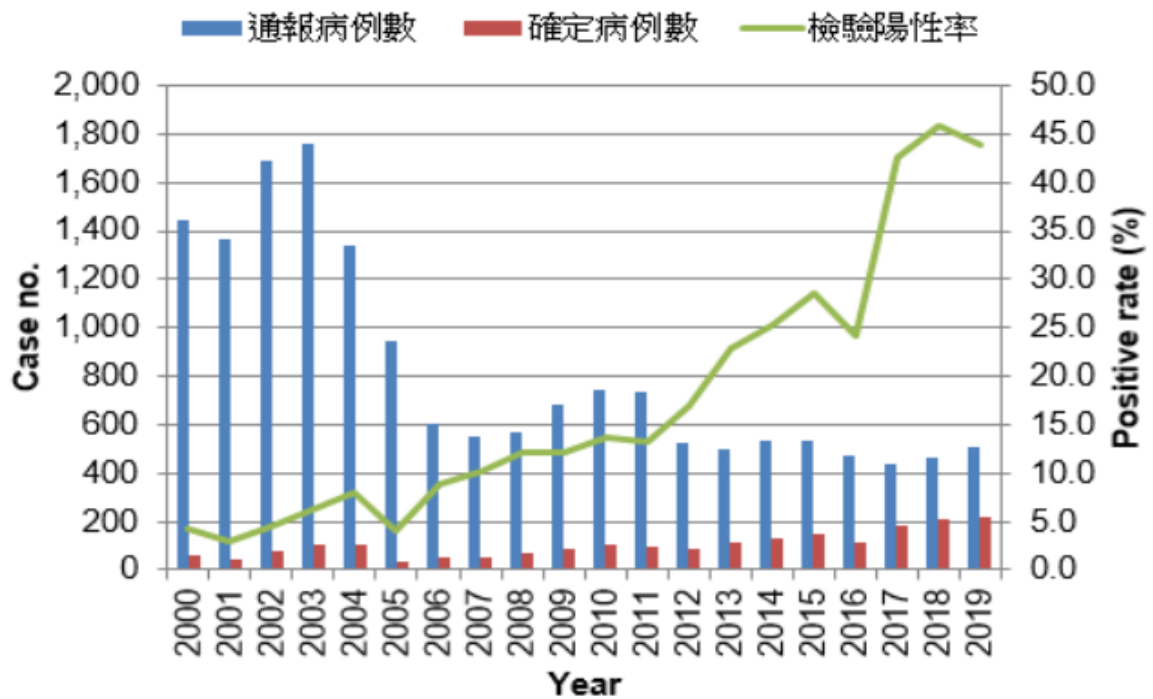
八、圖表

表一、2019年通報退伍軍人病個案的檢驗資料(2019/01~2019/10)

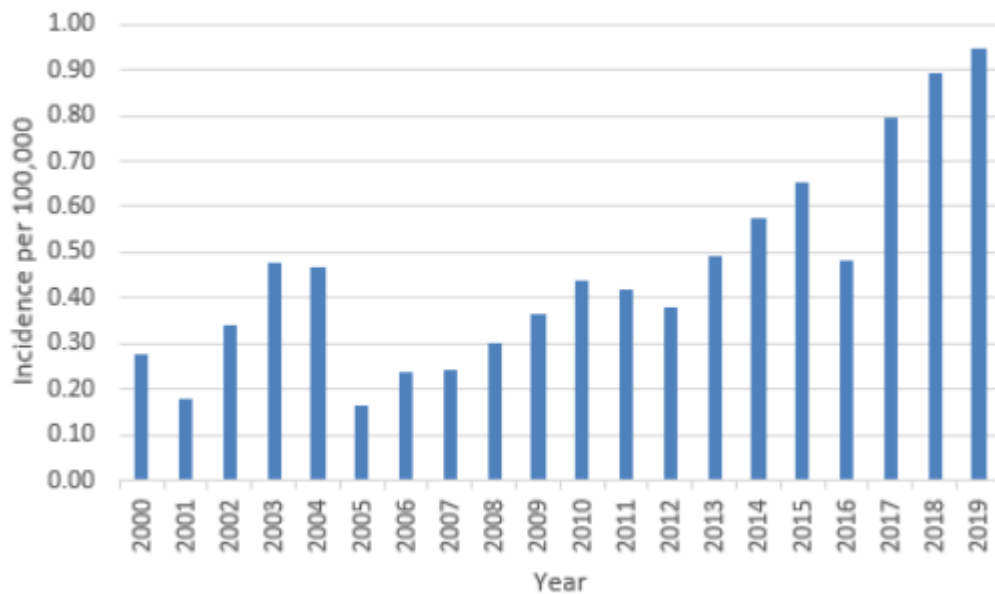
縣市區別	縣市	通報病例數	確定病例數	檢驗陽性率(%)	分離菌株數	菌株分離率(%)
台北區	台北市	62	27	43.5	2	7.4
	新北市	90	42	46.7	8	19.0
	基隆市	12	5	41.7	0	0.0
	宜蘭縣	12	3	25.0	0	0.0
	金門縣	2	2	100.0	0	0.0
	連江縣	0	0		0	
總計 台北區		178	79	44.4	10	12.7
北區	桃園市	41	28	68.3	2	7.1
	新竹縣	12	7	58.3	1	14.3
	新竹市	3	2	66.7	0	0.0
	苗栗縣	13	8	61.5	1	12.5
總計 北區		69	45	65.2	4	8.9
中區	台中市	63	18	28.6	7	38.9
	彰化縣	19	6	31.6	2	33.3
	南投縣	12	2	16.7	1	50.0
總計 中區		94	26	27.7	10	38.5
南區	台南市	29	11	37.9	4	36.4
	雲林縣	15	7	46.7	2	28.6
	嘉義縣	13	6	46.2	0	0.0
	嘉義市	7	4	57.1	0	0.0
總計 南區		64	28	43.8	6	21.4
高屏區	高雄市	48	23	47.9	2	8.7
	屏東縣	27	12	44.4	0	0.0
	澎湖縣	0	0		0	
總計 高屏區		75	35	46.7	2	5.7
東區	台東縣	5	1	20.0	0	0.0
	花蓮縣	23	9	39.1	1	11.1
總計 東區		28	10	35.7	1	10.0
總計		508	223	43.9	33	14.8

表二、2019年退伍軍人病確定個案年齡性別及發生率(2019/01~2019/10)

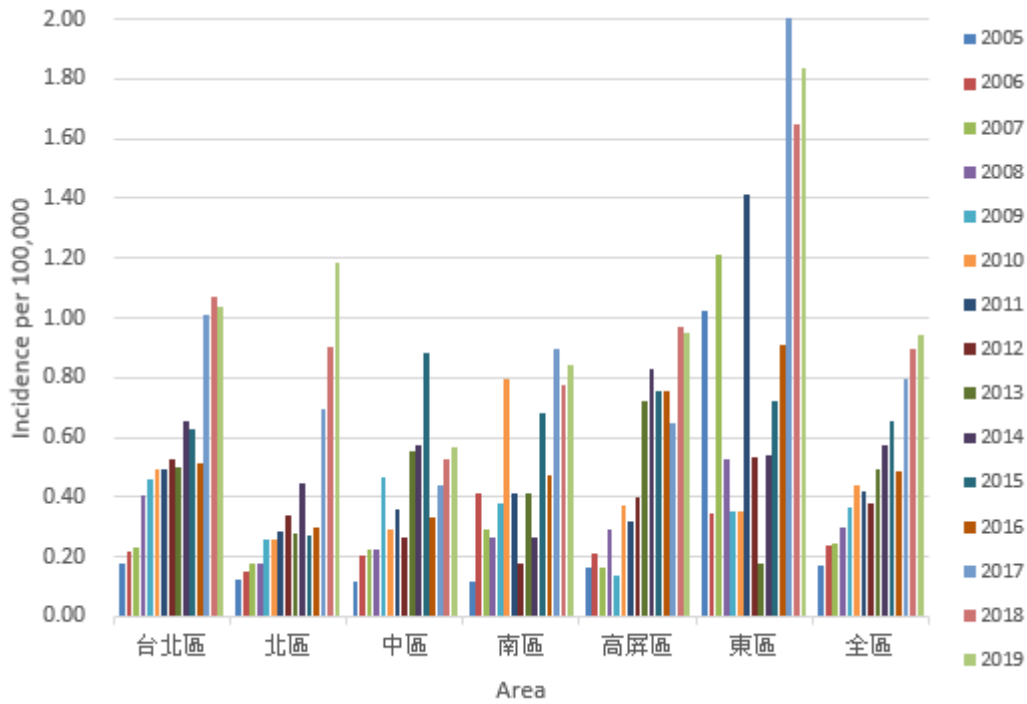
Age	Male	Female	Total	%	M/F	Incidence
0-19	3	1	4	1.8	3.0	0.09
20-29	0	0	0	0.0	NA	0.00
30-39	2	1	3	1.3	2.0	0.08
40-49	22	0	22	9.9	NA	0.59
50-59	34	6	40	17.9	5.7	1.10
60-69	47	13	60	26.9	3.6	2.00
70+	69	25	94	42.2	2.8	4.27
Total	177	46	223	100.0	3.8	0.95



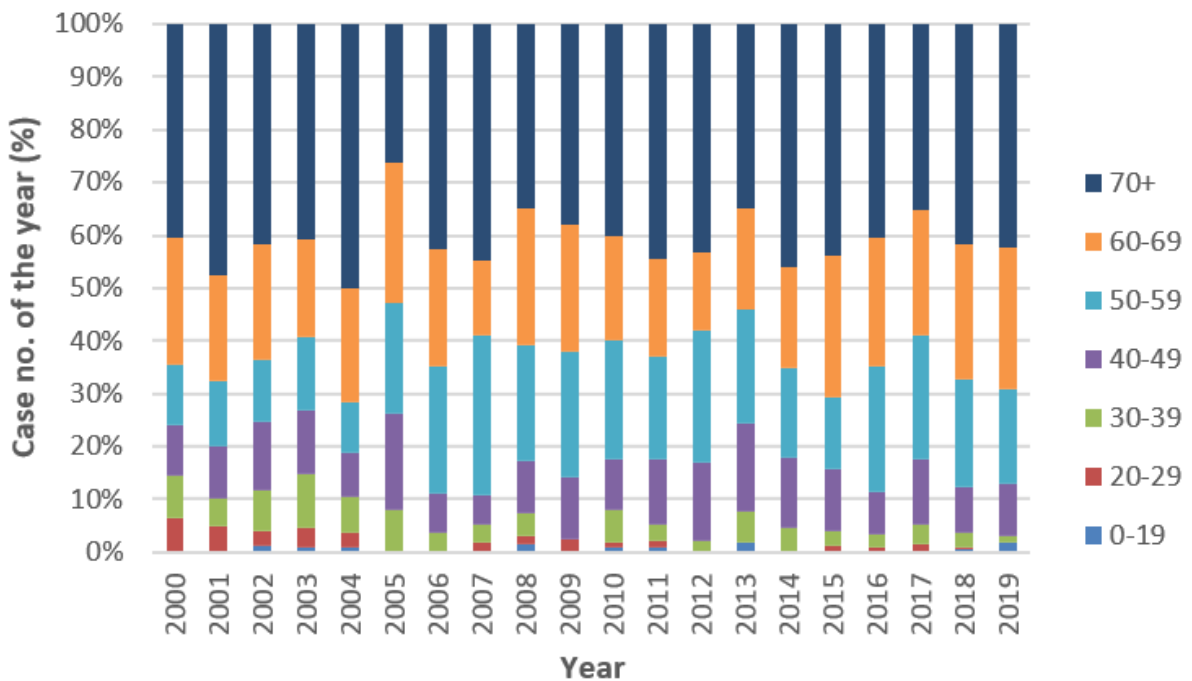
圖一、2000-2019 年退伍軍人病通報及確定個案數及檢驗陽性率



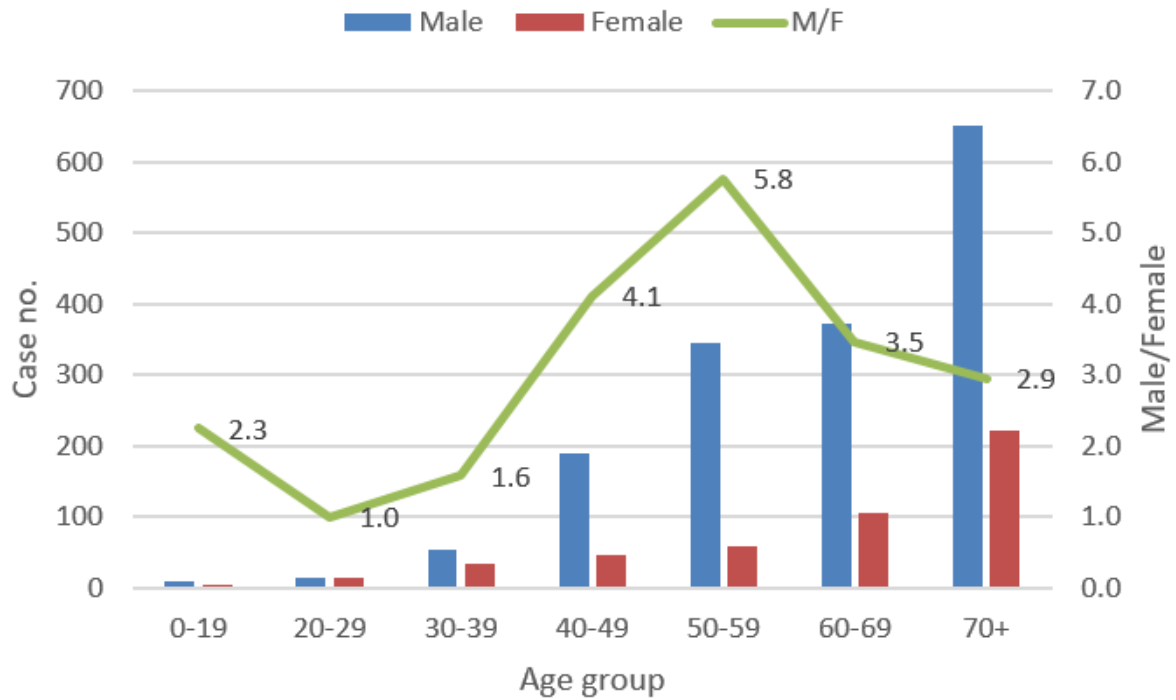
圖二、2000-2019 年退伍軍人病分年每十萬人口的年發生率



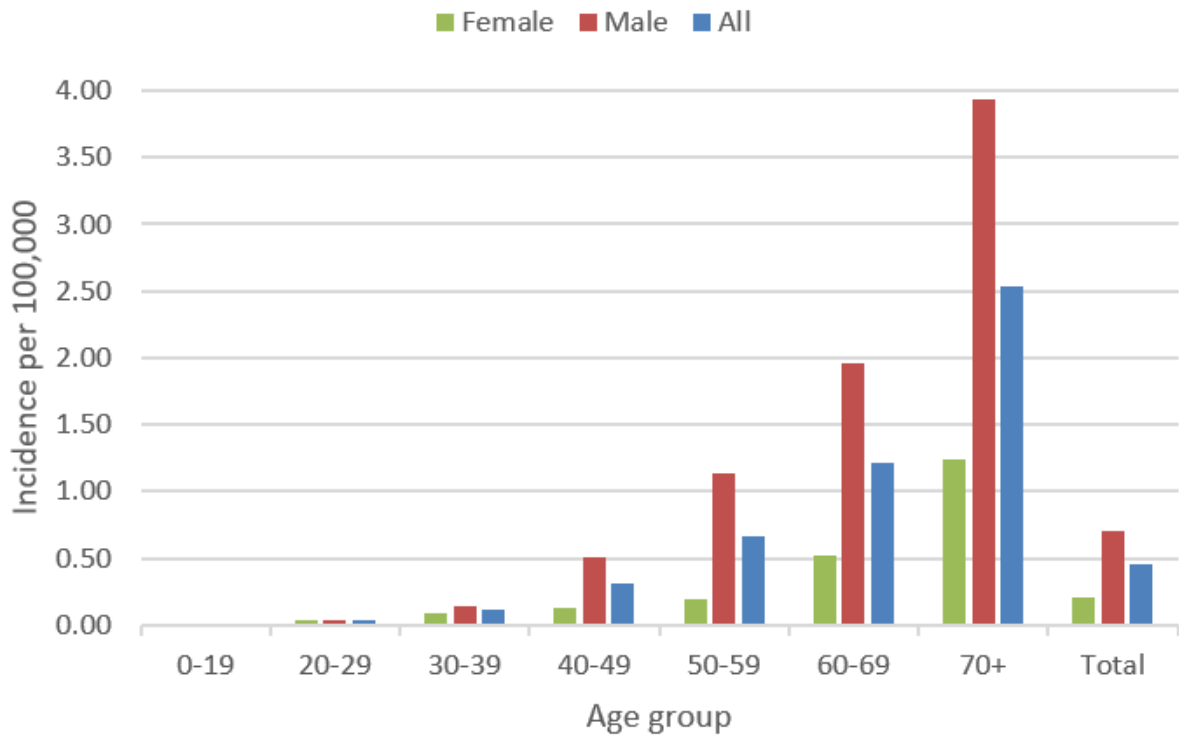
圖三、2005-2019 年退伍軍人病分年分區每十萬人口的年發生率



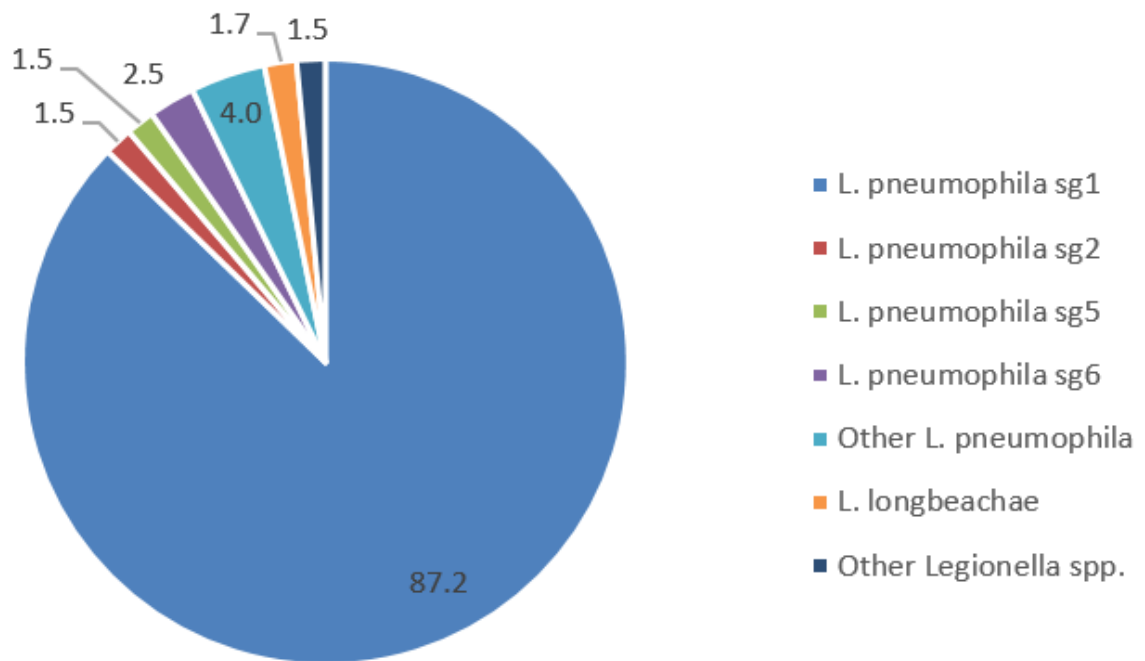
圖四、2000-2019 年退伍軍人病分年確定個案的年齡分布



圖五、2000-2019 年退伍軍人病全部確定個案年齡分布及性別比



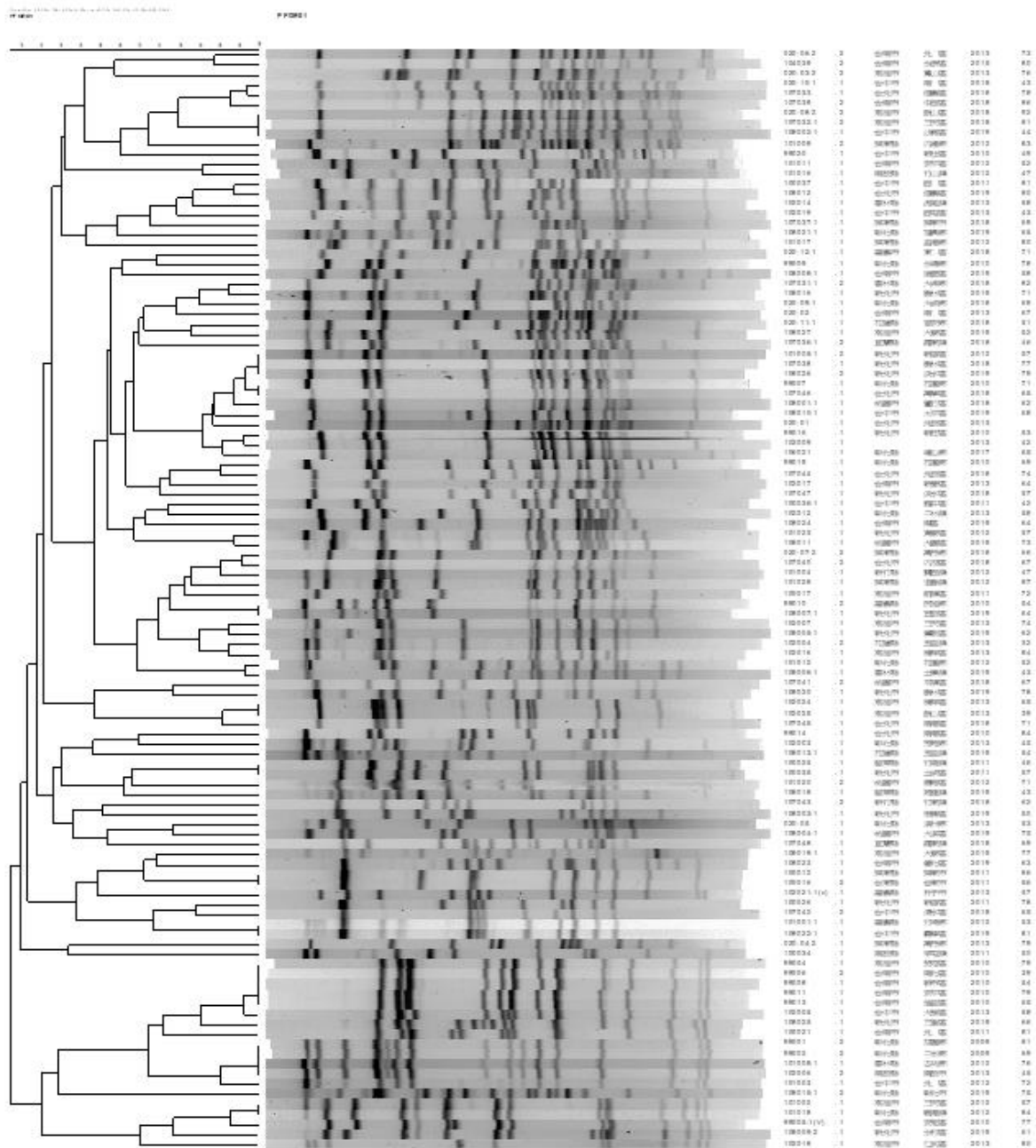
圖六、2000-2019 年退伍軍人病各年齡層發生率(每十萬人口)



圖七、2002-2019 年退伍軍人菌分布

表三、退伍軍人菌 PFGE 的個案分布

年分	台北區	北區	中區	南區	高屏區	東區	總計
2010	6	0	6	6	1	0	19
2011	8	1	3	1	2	1	16
2012	14	4	4	3	4	0	29
2013	13	1	7	6	10	1	38
2014	18	6	6	4	7	3	44
2015	16	1	8	6	3	0	34
2016	14	4	5	4	4	1	32
2017	15	6	5	5	3	0	34
2018	13	7	8	2	13	1	44
2019	9	4	5	4	2	1	25
總計	126	34	57	41	49	8	315



圖八、2019 新增退伍軍人菌 PFGE 的 DNA 指紋圖譜

表四、退伍軍人菌的 SBT 個案分布

	台北區	北區	中區	南區	高屏區	東區	總計
2010	4	0	0	0	0	0	4
2011	6	0	0	0	0	0	6
2012	12	2	0	0	0	0	14
2013	13	1	3	5	9	0	31
2014	18	6	6	4	7	3	44
2015	16	1	8	6	3	0	34
2016	14	4	5	4	4	1	32
2017	15	6	5	5	3	0	34
2018	13	8	8	2	13	1	45
2019	8	3	5	4	2	1	23
總計	119	31	40	30	41	6	267

表五、退伍軍人菌的 SBT 分析

ST	No.	%
1	28	10.5
120	21	7.9
42	15	5.6
2369	13	4.9
496	7	2.6
507	7	2.6
624	7	2.6
37	6	2.2
118	6	2.2
22	5	1.9
48	5	1.9
Others	75	28.1
0	72	27.0
Sum	267	100.0

表六、退伍軍人菌抗藥性試驗的個案分布

	台北區	北區	中區	南區	高屏區	東區	不明	總計
2009	13	3	7	6	3	2	0	34
2010	11	4	9	15	8	1	1	49
2011	13	3	9	5	4	3	0	37
2012	14	4	4	3	5	0	0	30
2013	15	1	8	7	10	1	2	44
2014	22	6	6	4	8	3	0	49
2015	20	1	9	7	3	0	0	40
2016	14	4	5	4	4	1	0	32
2017	16	6	5	6	3	0	0	36
2018	15	9	9	2	12	1	0	48
總計	153	41	71	59	60	12	3	399

表七、退伍軍人菌抗藥性試驗分析

Antimicrobial Agent	No. of isolates for which the MIC (mg/L)																	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)
	0.004	0.016	0.023	0.032	0.047	0.064	0.094	0.125	0.19	0.25	0.38	0.5	0.75	1	1.5	2	3			
Azithromycin		2	38	85	118	86	18	5	9	26	11	0	0	1				0.047	0.19	0.016-1
Clarithromycin		96	161	105	33	4												0.023	0.032	0.016-0.064
Ciprofloxacin						1	41	153	169	32	2	0	1					0.19	0.19	0.064-0.75
Levofloxacin			23	92	103	92	71	15	2	0	1							0.047	0.094	0.023-0.38
Doxycycline										1	1	11	57	121	110	75	23	1.5	2	0.25-3
TRIM/SULFA	1	1	3	6	21	45	66	132	74	42	8							0.125	0.25	0.004-0.38
Trim/Sulfa: Trimethoprim/sulfamethoxazole																				

表八、退伍軍人菌型別與菌種之抗藥性試驗分析

Antimicrobial Agent	L. pneumophila sg 1 (359)			L. pneumophila non-sg 1 (30)			Legionella species (10)		
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)
Azithromycin	0.047	0.19	0.016-0.38	0.047	0.094	0.023-0.25	0.094	0.25	0.023-1
Clarithromycin	0.023	0.032	0.016-0.064	0.023	0.032	0.016-0.064	0.016	0.047	0.016-0.047
Ciprofloxacin	0.19	0.19	0.094-0.38	0.125	0.25	0.094-0.25	0.125	0.25	0.064-0.75
Levofloxacin	0.047	0.094	0.023-0.19	0.047	0.094	0.023-0.125	0.047	0.19	0.023-0.38
Doxycycline	1.5	2	0.5-3	1	2	0.75-3	1	1.5	0.25-1.5
TRIM/SULFA	0.125	0.25	0.023-0.38	0.064	0.19	0.047-0.25	0.032	0.064	0.004-0.25
Trim/Sulfa: Trimethoprim/sulfamethoxazole									

附錄（研究調查問卷、法規及其他重要資料均應列為研究報告附錄。）
無

衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-134511

計畫名稱：細菌性傳染病病原體變化之分析研究

計畫主持人：江春雪

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	沒有培養出菌株之病例要克服。	感謝委員意見，會繼續努力。	無
2	19 歲以下增加可與臨床醫師合作或病歷調閱，確認個案是否有免疫缺失。	感謝委員意見，將與防疫醫師合作。	無
3	持續增加的病人數目，需與感管組合作，制訂出必要的策略。	感謝委員意見。	無
4	退伍軍人症之菌株建議結合疫調之流病資訊分析，俾利防治策略與疾病風險評估。	感謝委員意見。	無
5			

備註：請將此表單附在計畫書後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。