

本土性小川型霍亂弧菌 (*Vibrio Cholerae* O1,Ogawa) 感染案件之分子流行病學分析

陳光燼、蔡金來、葉姿暖、邱秀櫻、楊季融
曾士展、周振英、江春雪、蘇勳璧、吳和生
衛生署疾病管制局 研究檢驗中心

摘要

九十四年 6 月台南市北區爆發二例小川型霍亂弧菌 (*Vibrio Cholera* O1 El Tor Ogawa) 感染個案，罹病者均為女性、台南籍、分別於 6 月 21 日與 28 日因腹痛、腹瀉與發燒等症狀而住進奇美醫院，由醫院通報為「腹瀉症候群」案件採檢，送行政院衛生署疾病管制局 (以下簡稱本局) 南部四分局分離檢驗後，經昆陽細菌實驗室進行聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 及逆被動乳膠凝集 (reverse passive latex agglutination, RPLA) 證實具有毒素的小川型霍亂弧菌感染，案例經嚴密消毒防疫措施後，疫情並無擴散跡象。經疫情調查顯示，二病例均為台南人，發病時間接近，近期無國內外旅遊史，極可能為本土性霍亂感染個案。脈衝電泳圖譜分析顯示，二病例臨床分離株與環境株 (分離自患者家中廚房洗手槽)，分子型態完全相同，研判應來自相同感染源，進一步比對 80、82 年 (印尼旅遊團) 與 88 年 (中國旅遊團) 分離的境外移入株顯示，本次案件與 80 年印尼境外移入株，完全一致的分子型態，菌株親緣性相似指數高達 95%，與 82 及 88 年菌株亦極為接近，僅有 2-3 條 DNA 片斷差異，相似指數亦為 85%。因此，推測本次案件極可能來自 80 年境外移入菌株進入本土環境中蟄伏，而患者則為伺機性感染，感染原因可能為水產品或飲用水受到霍亂弧菌污染所導致。

關鍵字：小川型霍亂弧菌、本土感染案件、分子流行病學。

前言

霍亂是由霍亂弧菌引起的一種急性腸道傳染病，依其膜外的多醣體抗原可

區分約 150 種不同血清型，其中主要致病株為產生腸毒素之 O1 血清型霍亂弧菌，而 O2~O138 則統稱不產毒的非 O1 群。O1 群依其溶血特性，有二種生物型別 (Biotypes)：O1 典型 (cholera classical)、O1 埃爾托型 (El Tor)，又依其本身之體抗原 (somatic antigen, O-Ag) 可細分成 A、B 及 C 三種血清型，含 A、C 者稱為稻葉 (Inaba)，含 A、B 者稱為小川 (Ogawa)，含 A、B 及 C 者為彥島型 (Hikojima)，這三種血清型以 Ogawa 較常見，因分泌的腸毒素類似，故臨床症狀也相似。19 世紀世界性大流行主要是典型 O-1 血清型，1961 年以後流行多為 E1 Tor 型為主，如 1991 年中南美洲大流行亦為 E1 Tor 型。另一種能產生腸毒素之霍亂弧菌血清型 O139 (*Vibrio cholera* serogroup O139)，為新發現之菌種 (非 O1 型亦非 non O1 之 O2~O138 型中任何一種型)，在 1992-1993 年印度及孟加拉曾爆發流行之 O1 變種。

霍亂弧菌在自然界是存在於水中，它們一般在夏天活躍。在攝氏四、五度海水中可生存六十天，但離開水後便很快死亡。霍亂主要傳染方式 (Mode of transmission) 是經由病人和帶菌者糞便、嘔吐物、污染的食物、飲水、手指及用具等，也可經由蒼蠅、蟑螂為之媒介，其中以水源的污染最為嚴重，一般常因生食受污染的水產品而感染。一般而言，通常必須吃入量約 1 百萬的細菌才會致病，但胃酸不足、胃部切除過或免疫功能較差者，只要少量的細菌就會致病，感染後有數種抗體會增加，如殺弧菌抗體、抗毒素抗體和凝集抗體等，可抵抗再次感染，尤其是對同一型細菌持續時間更長。而傳統霍亂疫苗效果不佳且副作用大，目前較少使用。

台灣地區霍亂主要有二次大流行，民國 35 年有 3809 人感染霍亂，其中 2210 人死亡，另一次為民國 51 年，有 383 人感染，24 人死亡。此後，在台灣每年僅有零星霍亂病例報告，多為個案或境外旅遊受到感染而移入的病例。最近一次為 89 年出現 8 例本土病例，而近幾年來僅 4 起零星的境外移入個案，分別來自印尼、泰國與菲律賓境外移入病例。然而本次二例來自台南新營霍亂病例，並無國外旅遊史，發生時間極為接近，極有可能為 5 年來「本

土性霍亂」首例病例，須藉由實驗室分子分型技術進行菌株比對分析，以釐清彼此相關性及其感染源。

材料與方法：

病人症狀與檢體菌株來源

二位霍亂病例均為女性，台南人，年齡分別為 82 與 85 歲，均有胃部切除手術之病史。於 94 年 6 月 21 日與 28 日因腹痛、腹瀉與發燒等症狀，由奇美醫院通報為「腹瀉症候群」案件送檢，疾病管制局南部四分局初步檢驗為霍亂弧菌，經昆陽細菌實驗室進行聚合酶鏈反應及逆被動乳膠凝集法證實為具有毒素的小川型霍亂弧菌感染，立即通知相關單位採取必要防治措施，並進行疫情調查及環境與接觸者採檢工作。

菌株分離與鑑定

病人糞便檢體經 SS agar、XLD 及 MacConkey agar 培養基進行培養，挑取疑似菌落，再接種至 Triple Sugar Iron (TSI)、Lysine (Lys) 及 Sulfide-Indole-Motility (SIM) 培養基；結果呈 A/A，Oxidase (+)，Nitrate (+)，Motility (+)，Lysis (+)，Urea (-)，VP (-) 等生化反應符合霍亂弧菌特性，並以特定菌體抗原之抗血清，確定其血清群及型別屬於小川型。此外，經由細菌自動生化鑑定儀(VITEK system)進一步確認為霍亂弧菌。

霍亂毒素測定

一、逆被動乳膠凝集 (reverse passive latex agglutination, RPLA)

使用生研 (Denka Seiken co., Japan) VET-RPLA Latex agglutination test 之霍亂弧菌毒素 (cholerae-enterotoxin) 鑑定組，依試劑檢附標準程序操作，使用 V 型微量盤取 25 μ L 稀釋液，及加入檢體 25 μ L 作連續稀釋，加入致敏化乳膠反應液，試驗盤中亦做陽性與陰性對照組，於室溫靜置 18-20 小時後判讀結果。

二、聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)

PCR 混和液 50 μ L，含 1 \times reaction buffer (10mM Tris-HCl pH 8.8, 1.5mM

MgCl₂, 50mM KCl) ; 100nM each primer ; 1.25U Tag polymerase; 0.2mM dNTP; 1μL 模板DNA。反應以Gene Amp 9700 (Perkin Elmer, New Jersey) 聚合酶儀中進行，引子序列如表一所示。反應條件設定 94°C 2 分 30 秒，60°C 1 分，72°C 2 分鐘，進行 1 個循環後，再進行 29 個循環之 94°C 1 分，60°C 1 分，72°C 2 分鐘；最後 72°C 10 分鐘。將 10μL PCR 增值產物，進行 1.2% 瓊膠分析，100V 電壓值，0.5% TBE 緩衝液，電泳時間 25 分鐘，以 100bp DNA 標誌來對照產物大小。

脈衝電泳分析(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

使用 *Xba*I、*Not*I 二種限制酶進行菌株分型實驗，以脈衝電泳儀 Rotaphor Type V (Biometra, Goettingen, Germany)，變換時間：2-8 秒 18 小時與 10-20 秒 5 小時，電場值為 6V/cm²，200V 電壓值，23 小時電泳時間，使用 1.2% SeaKem Gold agarose (BMA, Rockland, ME, USA) 及 0.5xTBE 電泳液，以 Low Range PFG Marker (New England Biolabs Inc., MA, USA) 當作片段大小指標；0.5μg/mL ethidium bromide 染色 30 分鐘，清洗 2 小時，照像存檔。

親緣性樹狀圖 (dendrogram)：

使用 *Xba*-1 限制酵素之脈衝圖譜，利用電腦將圖片掃描儲存成圖片檔，接著以套裝軟體 Phoretix 1D gel analysis advanced version 5.01 (Nonlinear Dynamics, UK) 對菌株進行親緣性樹狀圖分析，其原理是利用不同 DNA 片段電泳圖譜進行分析，以 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 的方式畫出樹狀圖 (dendrogram)，由樹狀圖對應出相似指數，分析菌株間分子關聯性。

結果與討論

霍亂是一種急性細菌性腸道傳染病，潛伏期為數小時至五天，通常為兩至三天，症狀為無痛性大量水性米湯樣腹瀉，伴有嘔吐，造成脫水、酸中毒和循環衰竭。未治療嚴重患者可在數小時內死亡，致死率超過百分之五十，但如加以適當治療，則可降至百分之一以下。霍亂在我國已屬罕見病例，近 4

年來僅 4 起零星的境外移入個案，分別來自印尼、泰國與菲律賓，本土案例自民國 89 年出現 8 例後，就有效防治至今。本案件二病例均為台南人，發病時間極為接近，且近期內無國內外旅遊史，菌株經實驗室聚合酶鏈反應顯示，有 380bp 及 548bp 大小毒素基因產物（圖一），而檢測霍亂毒素的逆被動乳膠凝集試驗亦呈陽性反應，證實為產毒性小川型霍亂弧菌。此極可能為 5 年後首例本土性霍亂病例，除醫療單位對病人隔離治療外，衛生防疫單位基於疫情防治需求，需進一步追溯病例感染源和疫情可能擴散方向。

利用 *Xba I* 與 *Not I* 二種限制酶脈衝電泳圖譜，分析個案菌株與環境分離株（廚房洗手槽）的關聯性顯示，病人臨床株與環境株分子型態均完全一致的 X1 型別（圖二），顯示本次案件菌株有共同感染源。但疫情調查資料指出二病例間雖然分離時間接近，卻無地緣關聯性，何以會有相同分子型態出現。為進一步探討何處是本案件感染的源頭，比對由民國 80、82 與 88 年所分離的境外移入菌株，這些菌株為國外旅遊進而感染霍亂的報告病例。*Xba I* 電泳圖譜結果顯示，案件菌株與民國 80 年印尼境外移入株為相同 X1 型別，有極相似的分子型態，與其他 82 與 88 年菌株則有 2-3 個 DNA 片斷的分子型態上差異，這些差異有可能是時間演化或變異所導致，在分型上亦屬於 X1a、X1b 亞型（subtypes）是具有關聯性的菌株。

將脈衝電泳圖譜利用電腦的套裝軟體 Phoretix 1D gel analysis advanced version 5.01 (Nonlinear Dynamics, UK) 對菌株進行親緣性樹狀圖分析，由親緣性相似指數高低來研判菌株彼此相關性為何。由 *Xba I* 脈衝圖譜親緣相似指數（圖三）顯示，本案件菌株與 82 年境外移入株高達 0.95 相似指數，顯示彼此菌株間有極高關聯性，與其他 82 與 88 年所分離的境外移入株，則為較低的菌株親緣性（0.80% 相似指數）。另一種 *Not I* 限制酶脈衝圖譜有相同結果（資料未顯示）。由結果推測，本案件菌株，極可能源自 80 年境外移入菌株植入本土環境中潛在蟄伏，而患者則為伺機性感染，感染原因可能為水產品或飲用水受到霍亂弧菌污染所導致。

結論與建議

近年來國民旅遊日益頻繁，往來於東南亞鄰近國家之民眾不計其數，再加上外勞、偷渡者帶來之疫病問題，對我們的防疫體系帶來重大挑戰。本次案件證實為台灣地區 5 年來首例本土性產毒性霍亂感染個案，引發國內衛生單位極大重視，經實驗室分析比對顯示，病人分離株與環境分離株分子型態一致，並與 80 年印尼旅遊團境外移入株，有完全一致性分子型態，顯示極可能源自境外移入株，由於病例並無國外旅遊史，因此推測極可能為食用遭受污染的食物（疑為三色蛋）而伺機感染，再者，二位罹患病例即為年長且動過胃部切除手術的病人，屬於霍亂的高危險群。一般而言，霍亂弧菌對胃酸抵抗力很低，需攝食很高的菌量(10 的 6 次方)才會致病，但當胃酸不足、胃部切除過或免疫機能較差者，只要少量的細菌就會發病。

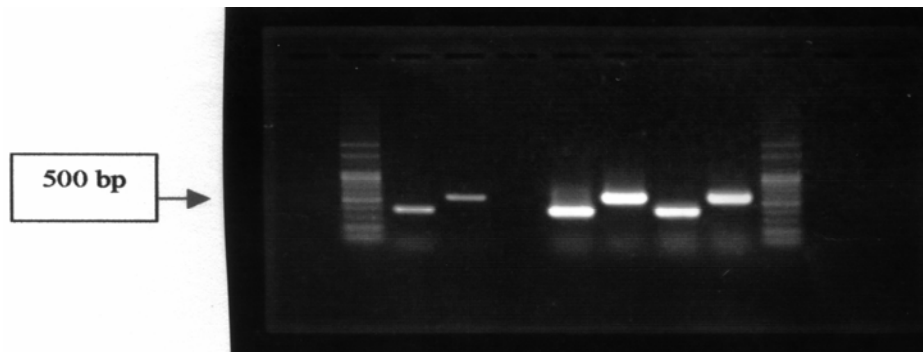
霍亂為我國第一類法定傳染病，病例需要通報及強制隔離治療，由於霍亂屬於國際疫病，個案需通報到世界衛生組織（WHO）。如果造成流行或擴散，將對我農產畜牧及水產品出口，影響至極。農政、衛生防疫單位除加強對畜牧與水產品進出口檢疫措施，基於疫情監測需求，應對南部重要城鎮或港口，建立對環境中霍亂弧菌存在監測系統或計畫，以了解環境是否存有高產毒性 O1 型霍亂弧菌。而實驗室除提供快速、正確檢驗外，還需要建立霍亂分型技術及其菌株分子基本資料庫，以利日後相同案件時提供比對分析。

參考文獻

1. Bradford, A. K., C. A. Bopp, and J. G. Wells. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens, In I. K. Wachsmuth, P. A. Blake, and Ø. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1994. p.3–26.
2. Cameron, D. N., F. M. Khambaty, I. K. Wachsmuth, R. V. Tauxe, and T. J. Barrett. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 1994. 32 : 1685–1960.

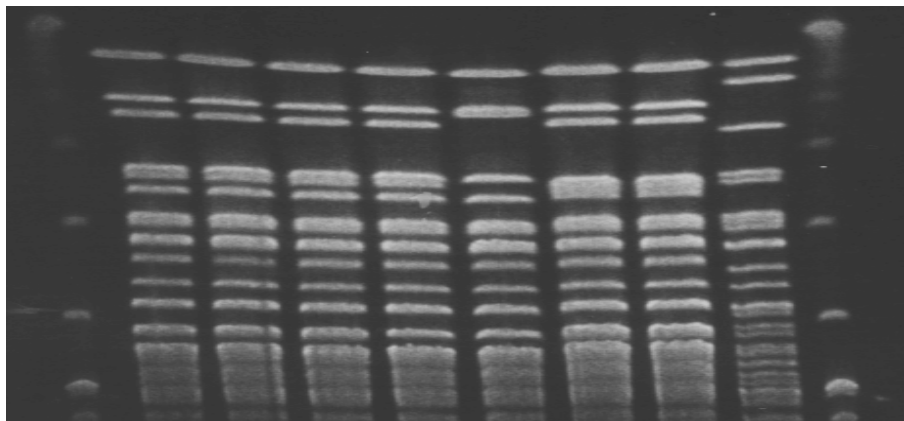
3. Centers for Disease Control and Prevention. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis: training manual. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga. 2000.
4. Colwell, R. R., and A. Huq. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*, In I. K. Wachsmuth, P. A. Blake, and Ø. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1994. p. 117–133.
5. Corkill, J. E., R. Graham, C. A. Hart, and S. Stubbs. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 2000.38 : 2791–2792.

致謝：有關本次霍亂案件釐清須感謝資源服務組 林建生先生提供歷年來保存霍亂菌株及四分局同仁 林建州技正 郭莉莉小姐與六分局 劉顏小姐提供相關境外移入菌株以供比對分析。



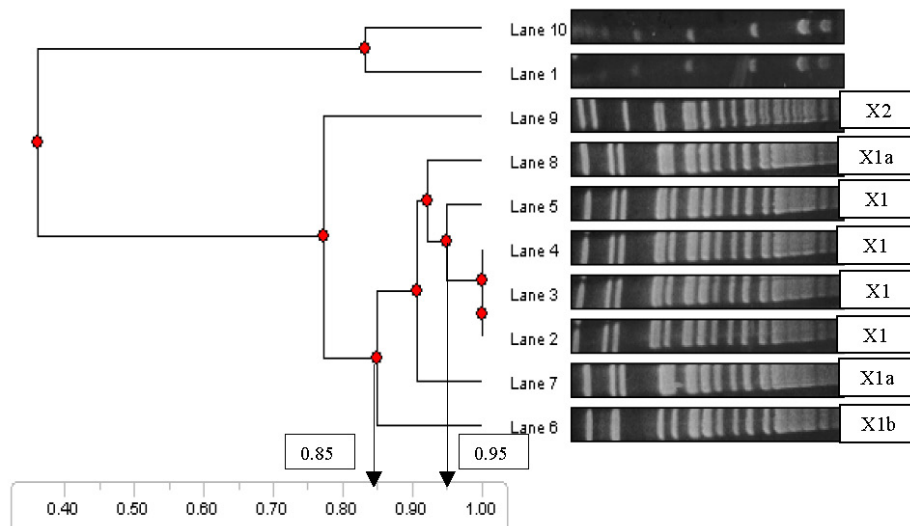
圖一：霍亂毒素 cholera toxin 的 PCR 檢測結果

(1) M：100bp DNA Marker；Lane 1：ctx-a 毒素基因陽性對照組；Lane 2：ctx-b 毒素基因陽性對照組；Lane 3：陰性對照組；Lanes 4-5：由 A 病例分離菌株之毒素基因；Lanes 6-7：由 B 病例分離菌株之毒素基因。(2) 電泳條件為 1.5% SemKem LE agarose，100V，35 分鐘。



圖二：霍亂案件菌株 *Xba*I 限制酶脈衝電泳分析圖譜。

(1) M：Low Lauge PFG Marker；Lane 2：A 病例霍亂分離株；Lane 3：B 病例霍亂分離株；Lane 4：環境分離株；Lane 5：80 年境外移入株；Lane 6：82 年境外移入株；Lanes 7-8：88 年境外移入株；Lane 9：Ineba 霍亂菌株。(2) 1.2% SeaKem Gold agarose, 5-35 秒變換, 120 度, 電泳時間 23 小時。



圖三：霍亂弧菌菌株 *XbaI* 脈衝電泳圖譜親緣性樹狀圖。

使用 *Xba-I* 脈衝電泳圖譜，以 X1 型為基準，由 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 的方式，經由 Phoretix1D Advanced Version 5.01 軟體分析，製成菌株親緣性樹狀圖 (dendrogram)，以菌株相似指數表示菌株親緣關係。