

利用脈衝電泳分型法探討中部某托嬰中心爆發之 百日咳聚集感染事件

李孟訓¹、許桂貌¹、李翠鳳¹、姚淑滿²、羅惠智¹、李永盛³、邱乾順^{1*}

1. 行政院衛生署疾病管制局中區分局
2. 行政院衛生署疾病管制局檢驗研究中心
3. 行政院衛生署疾病管制局東區分局

*通訊作者

摘要

百日咳是經由飛沫傳播的呼吸道疾病，過去在無疫苗時期百日咳具有高發生率與高致死率，直到開始施打疫苗後方才受到控制。現今百日咳流行已不常見，一般發生大多以零星的家庭聚集感染案件為主。2005年4月台中市出現一起嬰兒百日咳病例，追蹤採檢家庭與托嬰中心之接觸者，驗出病例的祖母、托嬰中心負責人與托嬰中心保母為帶菌者。本研究應用脈衝電泳分子分型法分析病例與3名接觸者所分離之菌株，以探討病例與3名接觸者間之流行病學關係，4株菌株也同時和 *Bordetella* DNA 圖譜資料庫之菌株比對，探討菌株之流行動態變化。PFGE 分析結果顯示，4株菌株有完全相同

之 PFGE 圖譜，說明病例與接觸者受到一同源菌株所感染，與資料庫菌株圖譜之比對，則顯示此菌株曾在西元 2000 年時出現於台灣中部、北部與東部之病例，顯示此菌在當年曾引發全國性之流行；帶菌之接觸者很有可能就是病例之感染來源，唯接觸者皆無血清 IgA/IgM 抗體明顯上升情形，顯示接觸者皆可能為初感染者，因此無法推測此聚集事件感染過程，是由托嬰中心帶菌者傳染給嬰兒，再由嬰兒傳給祖母，或是由祖母傳給嬰兒，再由嬰兒傳給托嬰中心之工作者。本研究顯示對百日咳病例追蹤採驗之重要性，特別是嬰幼兒聚集之托嬰中心，若工作人員為帶原者，對嬰幼兒極具危險性。

前言

百日咳是由百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) 所引發之呼吸道傳染病，在台灣被歸類為第三類法定傳染病；百日咳菌為好氧的革蘭氏陰性菌，人類是其唯一的宿主(1)，主要是藉由患者帶有病原的飛沫進行傳播。當百日咳菌附著於呼吸道的纖毛上皮細胞後，約有 7 至 10 天的潛伏期，此期間白血球的浸潤會逐漸增加，並產生大量的分泌物，導致氣管阻塞引發咳嗽，所以感染時會產生嚴重的咳嗽吼聲症狀(2)。

百日咳主要藉由施打疫苗來預防，在疫苗預防注射尚未普及之前，百日咳病例相當多，全世界每年約有 35 萬人喪生(3)，病例以幼兒及孩童為主。自 1940 年普遍實施預防注射起，世界各地的發生率則逐年下降(4)。台灣在 1954 年實施預防注射之後，百日咳明顯受到控制，到 1970 年以後僅有零星個案出現，只偶而出現家庭聚集感染事件；根據 Lee 等人之報告(5)，在 1992 年花蓮地區與 1997 年台北地區曾爆發小規模的百日咳流行。近年來台灣通報之百日咳臨床個案數不多，在 170~200 例之間，而確定病例都在 20 人以下(6)，病例大多屬未完成預防接種的嬰幼兒為主，但仍有已完成接種的孩童及成人病例。

2005 年 4 月，台中市出現一剛滿兩個月的小女嬰感染百日咳菌病例，該女嬰出生後健康狀況良好，無其他疾病，起初咳嗽就診時被醫師診斷為感冒，

爾後咳嗽症狀加劇未改善並有哮聲及發紺的現象，經住院治療，二週後檢驗分離出百日咳菌。患者白天安置在托嬰中心，晚上才帶回家中，這期間有咳嗽症狀出現，進一步追蹤採驗其家人與托嬰中心接觸者共 20 人的檢體，結果在 3 名接觸者檢體中培養出百日咳菌。因此病例與 3 名接觸者分離菌株間之流病關係，有必要加以探討，以釐清感染來源與感染過程。

利用各種分型方法分析病原菌株，可分析菌株間之種源關係，進而探討病例或接觸者間之流行病學關係。目前用於分析百日咳菌之眾多分型法中，脈衝電泳(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)是目前最主要的分子分型法，PFGE 方法具高分型效力與高再現性，可偵測到在短期間內菌株基因體結構上的變化，適合用於百日咳爆發流行事件之調查(7,8)。本研究利用 PFGE 方法分析 4 株菌株，比對病例與 3 名接觸者所分離之百日咳菌株之種源關係，以探討病例與接觸者之流病關係，並推測 4 名感染者之感染順序；同時也和本實驗室建立之 *Bordetella* DNA 圖譜資料庫之菌株比對，追查過去是否有同型菌株之流行。

材料與方法

一、檢體採集與實驗室檢驗

以 Regan-Lowe 攜送培養基之採檢棒(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)，採集病例之家庭成員與托嬰中心工作人員及幼兒共 20 個接觸者之鼻咽拭子與血清，進行菌株培養與 IgA/IgM 血清力價測試(表一)。將鼻咽拭子直接塗劃於 Bordet-Gengou (BG)培養基，於 35-37°C 培養 3 至 5 天，挑選單一疑似菌落再純培養於 BG 培養基，菌體以抗百日咳血清(Difco, BBL)進行玻片凝集試驗，並同時參照 Li 等人(9)所發表之方法進行 PCR 反應，偵測其 porin 基因；菌株與百日咳抗血清呈專一凝集反應，同時 PCR 反應偵測到 porin 基因者，即認定為百日咳菌。IgA/IgM 血清(Hycor Biomedical GmbH)力價測試，則是藉由與陽性對照組的酵素呈色比值來判定。

二、脈衝電泳(PFGE)分析

以Popovic 等人(10)所發表之PFGE方法，略加部份修改後，用於本研究進行百日咳菌之包埋、溶解、膠體清洗步驟。細菌染色體DNA分別以限制酵素XbaI、SpeI與AflIII進行切割反應，並使用Bio-Rad CHEF Mapper脈衝電泳儀(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)，在 1% agarose進行DNA片斷之電泳分離，電泳條件為 6 V/cm (200 V)、120°電場角度與 4~40 秒的脈衝轉換時間，電泳 20 小時。以XbaI切割之 *Salmonella ser. Braenderup* H9812 基因體片段為大小參考標準。

三、資料分析

將已數位化的 PFGE 圖譜影像利用指紋圖譜軟體 BioNumerics 3.0 版 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)進行分析，再將菌株之 PFGE 圖譜存入 *Bordetella* DNA 指紋圖譜資料庫，並與菌株寄主(病例)之基本資料(包括性別、年齡、發病日期、接種情形等)聯結。菌株間若存有一條或以上之 DNA 片段的差異即視為不同 PFGE 型別。PFGE 分析之 4 株菌株圖譜，也和 *Bordetella* DNA 指紋圖譜資料庫其中的 56 株 PFGE 圖譜比對，並建構親緣樹狀圖(dendrogram)，即使用 BioNumerics 之 UPGMA 演算法與 Dice 係數建構菌株親緣樹狀圖。

結果

一、檢體之實驗室檢驗結果

本事件追蹤檢驗 20 名病例之家庭與托嬰中心接觸者鼻咽拭子與血清檢體；細菌培養在病例祖母、托嬰中心負責人與保母檢體分離到百日咳菌，其它接觸者則為病原體陰性(表一)；在血清 IgA/IgM 測試上，包括病例之所有血清皆無明顯 IgA/IgM 抗體上升情形，可能是感染期間尚短，尚未產生足量之 IgA/IgM 抗體。11 名托嬰中心之嬰幼兒皆未分離到病原體，也無 IgA/IgM 抗體明顯上升情形，11 名嬰幼兒皆已完成至少三劑百日咳疫苗接種，可能已產生足夠之保護力。

二、PFGE基因分型

病例與 3 名接觸者所分離之百日咳菌株，其染色體 DNA 分別經限制酵素 XbaI、SpeI 與 AflIII 切割後，其 PFGE 電泳圖譜完全相同（圖一），指出此 4 株菌株應該具同源關係，即 4 人應由同源菌株所感染。

三、過去菌株之親緣關係比較

為探討本次事件分離之菌株與過去分離菌株之親緣關聯性，追查過去是否有此基因型菌株之流行，特利用 BioNumerics 鑑定程式比對 XbaI-PFGE 圖譜，並建立圖譜間之親緣樹狀圖。根據限制酵素 XbaI 切割的 PFGE 圖譜比對所建立之樹狀圖（圖二），可觀察到各菌株間之親緣遠近程度，相似度高則表示同源性高，反之則低。圖譜比對結果顯示，56 株菌分成 25 種 XbaI-PFGE 圖譜型別，當 PFGE 圖譜相似度在 55% 時可分成 I~III 群，而相似度設定在 70% 時第 III 群又可分成 A 與 B 兩群，設定在 85% 時可將第 A 群再分成 A1、A2、A3、A4 與 A5 共五小群（圖二），A 群中主要以 A2 與 A4 為主，A1、A2、A3、A4、A5 分別佔總 A 群的 15%、42.5%、2.5%、37.5%、2.5%。本事件之 4 菌株皆為 A4 群之 P018 基因型，P018 是 A4 群之主要基因型，佔 A4 群之 80%。根據收集在 *Bordetella* DNA 指紋圖譜資料庫之菌株資料，P018 型菌株在西元 2000 年時已出現過，曾在中部地區分離到 4 株菌株，同時也在北部和東部各分離到 2 株菌株，可見此菌株在 2000 年時曾在台灣流行過。

討論與建議

台灣中部地區在過去五年內百日咳的通報病例數都維持在 20~40 例之間，確定之陽性個案皆為個位數，分離之菌株數相當少，顯示這五年來中部地區的百日咳發生率相當低，主要發生模式多屬小型的家庭聚集感染，大多數病例屬尚未完成預苗接種之嬰幼兒，其感染源大多來自帶菌的照顧者。本次與台中市托嬰中心相關的百日咳群聚感染事件亦如此；病例是剛滿兩月大的嬰兒，其感染來源最可能是家庭或托嬰中心的照顧者；由接觸者追蹤，查出病例之祖母與托嬰中心負責人與嬰兒的保母皆有帶菌情形（表一），證明病例之感染來源，應該就是她的照顧者。由於 4 名百日咳菌感染者之 IgA 與 IgM

抗體都無明顯升高情形，表示這些人可能也是剛受到感染，無法推測感染之前後順序，而此事件的感染順序是由祖母傳到嬰兒，再由嬰兒傳給托嬰中心的照顧者，或由托嬰中心之照顧者傳給嬰兒，再由嬰兒傳給家中照顧的祖母，則無法由實驗室得到之資料加以確定。不過，本事件顯示追蹤疫情的重要性，由於追蹤採檢病例之接觸者，追查到照顧病例之托嬰中心負責人和保母也是帶菌者，因此採取防疫措施，避免此兩名帶菌者將病原再傳染給托嬰中心的嬰幼兒其接觸者及其他人。

根據流行病學統計資料，百日咳以每 3~5 年為一週期發生流行，預防注射是防治百日咳最有效的措施。雖疫苗能有效控治百日咳的流行，但仍無法改變其週期性的流行(11)，過去研究的結果也指出百日咳的流行具有季節性(12)，大多發生在春夏季期間。而本次事件的發生也正好在春夏期間，且 PFGE 圖譜分析指出本事件分離菌株屬 P018 型，P018 型菌株曾在西元 2000 年期間在中部地區造成流行（圖二），但此型別菌株在 2001-2004 期間，卻皆未在中部地區被分離到，2005 年再現蹤跡，是否意味著此菌株將再度引發流行，值得密切注意；而 P018 型菌株在潛伏多年後，又能再度現蹤，菌株之主要潛伏方式為何，很值得探究。

百日咳大多好發於五歲以下的孩童，特別是疫苗預防注射尚未完成之嬰幼兒為主要的危險群；本事件中之病例只有兩月大，疫苗注射只打第一劑，可能因此尚未產生足夠的抗體才受到感染而發病，而其他的嬰幼兒則大多完成四劑接種，尚有少數幾個只完成三劑，可能原因是未照規定時間施打，然已有足夠的抗體保護才不致受感染。病例之祖母、托嬰中心負責人與保母被檢驗出百日咳菌陽性，但 3 名成年人未出現症狀也未傳染其他接觸者，是為健康的帶原者，這些帶原者應距離最後一次施打疫苗的時間太久，個體之抗體力價可能已不具足夠之保護能力或是帶原者個體之免疫力下降所致(13,14)。最近的研究曾指出美國接種疫苗後的青少年與成人受感染情況有增加的趨勢(15)，本事件之帶原接觸者皆為成人，顯示帶菌之成年人，是不可忽視的感染來源。

本研究以 PFGE 分型法分析菌株，探討病例與接觸者之流行病學關係，PFGE 是目前被認為最具分型效力之細菌分型法，由於使用區別力相當的三種限制酶 *Afl*III、*Spe*I 與 *Xba*I(16)切割產生之 PFGE 圖譜皆無法區別菌株，因此推斷 4 株菌株為同源。*Bordetella* DNA 圖譜資料庫收集過去台灣所分離之大部份菌株之 PFGE 圖譜資料與寄主相關之流行病學資料，由於 PFGE 分析的操作流程皆已標準化，此資料庫將可做為台灣百日咳長期監測與探討百日咳菌演化之基礎。

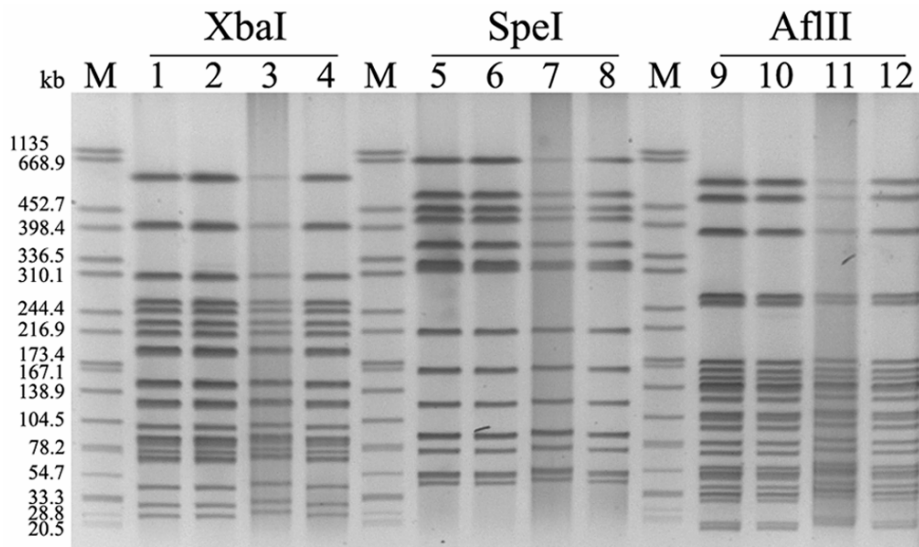
參考文獻

1. Parton R: Review of biology of *Bordetella pertussis*. *Biological* 1999; 27:71-76.
2. Lai HK and SF Tsai: Epidemiology of pertussis in Taiwan, 1993-1998, and its control measures. *Epidemiology Bulletin* 2000; 16 : 255-296.
3. Cherry JD: Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174 (suppl 3): S259-S263.
4. Black SM: Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16 (suppl 1): S85-89.
5. Lee YS, Yang CY, Lu CH, et al: Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* isolated in Taiwan, 1992-1997. *Microbiol. Immunol.* 2003; 47:903-9.
6. 傳染病防治工作手冊，行政院衛生署疾病管制局。93 年 12 月。
7. DeMoissac YR, SL Ronald, and MS Pepler: Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Bordetella pertussis* in a whooping cough outbreak. *J Clin Microbiol* 1994; 32:308-402.
8. Khattak MN and RC Matthews: Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digests resolved by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43:659-64.

9. Li Zhongming, Deborah L Jansen, Theresa M Finn, et al: Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32:783-9.
10. Popovic T, S Schmink, NA Rosenstein, et al: Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigation of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol* 2001; 39:75-85.
11. Fine PE and JA Clarkson: The recurrence of whooping cough: possible implication for assessment of vaccine efficacy. *Lancet* 1982; 1:666-9.
12. Feigin RD and JD Cherry: Pertussis. In: Feigin, R. D., Cherry, J. D., eds. *Textbook of pediatric infectious disease*. 3rd ed. Philadelphia Saunder: 1992; 1208-18.
13. Jenkinson D: Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10-year community study. *Br Med J* 1988; 296:612-14.
14. Fine PE: Adult pertussis: A salesman's dream-and an epidemiologist's nightmare. *Biological* 1997; 25:195-8.
15. Hewlett EL and KM Edwards: Clinical practice. Pertussis—not just for kids. *N Engl J Med* 2005; 352:1215-22.
16. Beall, B., P. K Cassidy, and G. N. Sanden: Analysis of *Bordetella pertussis* isolates from an epidemic by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3083-86.

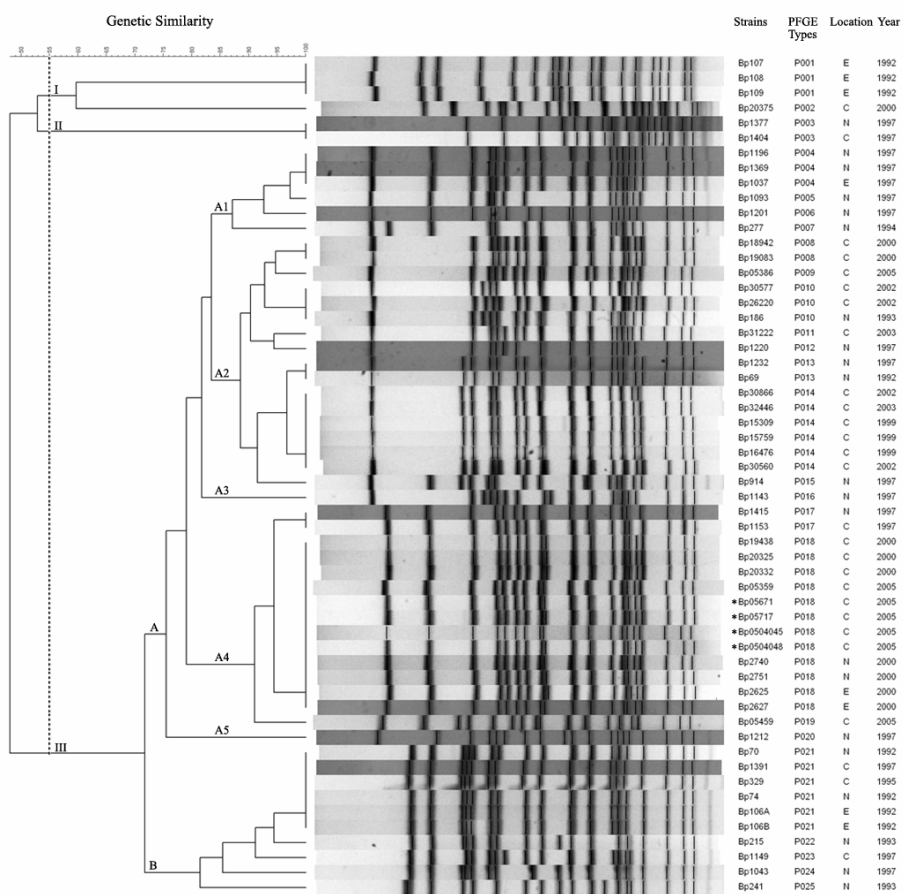
表一、某托嬰中心百日咳聚集事件之病例與其家庭和托嬰中心接觸者鼻咽拭子培養與血清 IgA/IgM 測試結果

關係	年齡	鼻咽拭子	IgA/IgM 反應	疫苗接種
病例	2 個月大	百日咳菌	-/-	完成一劑
病例父親	27 歲	陰性	-/-	完成四劑
病例母親	28 歲	陰性	-/-	完成四劑
病例祖父	58 歲	陰性	-/-	未接種
病例祖母	56 歲	百日咳菌	-/-	未接種
托嬰中心病例保母	28 歲	百日咳菌	-/-	完成四劑
托嬰中心負責人	48 歲	百日咳菌	-/-	完成四劑
托嬰工作者之一	28 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰工作者之二	23 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰工作者之三	23 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰中心幼兒一	5 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰中心幼兒二	4 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰中心幼兒三	3 歲	陰性	-/-	完成三劑
托嬰中心幼兒四	4 歲	陰性	-/-	完成三劑
托嬰中心幼兒五	3 歲	陰性	-/-	完成三劑
托嬰中心幼兒六	3 歲	陰性	-/-	完成三劑
托嬰中心幼兒七	4 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰中心幼兒八	3 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰中心幼兒九	3 歲	陰性	-/-	完成三劑
托嬰中心幼兒十	4 歲	陰性	-/-	完成四劑
托嬰中心幼兒十一	3 歲	陰性	-/-	完成三劑



圖一、病例與接觸者來源之 4 株百日咳菌菌株 XbaI、SpeI 與 AflIII 切割之 PFGE 圖譜。

M 為 *Salmonella* ser. Braenderup H9812 染色體 DNA，經限制酵素 XbaI 切割後的大小參考標誌。Lanes 1、5、9 為分離自病例菌株之 PFGE 圖譜；Lanes 2、6、10；Lanes 3、7、11；Lanes 4、8、12 各為分離自 3 名接觸者菌株之 PFGE 圖譜。



圖二、百日咳菌之 PFGE 圖譜親緣樹狀圖。

PFGE 圖譜來自 XbaI 切割菌株基因體之 DNA 片段電泳圖譜；親緣樹狀圖以 BioNumerics 軟體提供之 UPGMA 演化法在 2% optimization, 0.7% tolerance 設定條件下所建構而成。

*標示托嬰中心聚集事件分離之菌株；英文字 N、E、C 分別表示台灣北部、東部與中部。