

## 衛生署疾病管制局「應用流行病學專業人才訓練班」

### 93 年第19 期學員招生

- ◎ 報名時間：即日起至93 年4 月30 日止（掛號郵寄報名）
- ◎ 甄選方式：書面資料審查及口試
- ◎ 錄取名額：十二名（如成績未達標準，得不予錄取）
- ◎ 報名資格：一、已具醫師、牙醫師資格或國內外各公私立醫學院醫學系、中醫學系、牙醫系或農學院獸醫系之畢業生，有志從事公共衛生、預防醫學、國際衛生工作者。  
二、醫學相關領域畢業得有學士（含）以上學位，且有相關工作經驗二年以上者；或碩士（含）以上學位取得過程中，有相關實務工作經驗者。及其他獲有經教育部立案之國內外大學學位或同等學歷（含）以上，具有二年以上衛生醫療工作經驗者。
- ◎ 醫學系公費畢業生參加本項計畫，報經行政院衛生署同意者，可抵服務年資。其它關於公費生服務年限之事宜則依照「行政院衛生署公費生服務管理要點」相關規定辦理。
- ◎ 簡章索取：即日起至93 年4 月25 日止，或至疾病管制局網站下載（<http://www.cdc.gov.tw>）
- ◎ 聯絡人：唐麗慧小姐，電話：02-23967764 轉3859  
所有招生事宜以本局學員招訓簡章所列為準

## 境外移入感染宋內志賀氏菌 (*Shigella sonnei*) 峇里島旅遊案件之分子流行病學調查

### 摘 要

2003 年 11 月 7 日至 17 日發生的五件旅行團赴峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件所分離出之 38 株菌株經鑑定確認為宋內志賀氏菌 (*Shigella sonnei*)，為分析案件感染原，本研究選擇台灣北部地區經分子分型比對為主要型別之新竹、宜蘭地區 *Shigella sonnei* 群突發案件分離株各 2 株及疾病管制局昆陽實驗室(以下簡稱本實驗室)所蒐集 2003 年度台灣北部地區 *Shigella sonnei* 散發案件分離菌株 8 株共同分析比對，以瞭解此次案件之菌株與台灣北部地區本土分離菌株之間是否有關聯性。本研究分別經由紙錠藥物敏感性試驗 (disk antimicrobial susceptibility test) 表現型 (phenotype) 及隨機引子分型試驗 (AP-PCR)、質體分析 (plasmid profile analysis) 與脈衝式電場電泳分子分型試驗 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 等基因型 (genotype) 分型試驗，分析其分子流行病學相關性。

紙錠藥物敏感性實驗結果顯示，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件所分離出之 38 株 *Shigella sonnei* 菌株，只出現對 Sulfamethoxazole (SXT) 的抗藥性，與台灣北部地區分離之 *Shigella sonnei* 菌株普遍具有 Ampicillin (AM)、Sulfamethoxazole (SXT) 與 Nalidixic acid (NA) 等三種抗藥性明顯不同。以質體型別區分，分析 20 kb 以下的質體，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件呈現一致性的 P8 型，有別於台灣北部地區群突發及散發案件分離株分成的 P1~P7 型，P8 型主要有 2.8 kb、4 kb、9 kb、12 kb 及 20 kb 等 5 條質體。Xba-I 脈衝式電場電泳圖譜顯示，分析 48 kb 至 485 kb 大小的 DNA 片段，差異在 4 條 DNA 片段為主要區分，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件仍出現一致性的 X7 型，有別於台灣北部地區群突發及散發案件分離株分成的 X1、X1a、X1b、X1c、X1d、X2、X3、X4、X5 及 X6 等型，其主要差異在峇里島旅遊

集體感染桿菌性痢疾案件多出 242.5 kb~291.5 kb 之間的 3 條片段；*Sfi*-I 脈衝式電場電泳圖譜顯示，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件分離株仍出現一致性的 S7 型，有別於台灣北部地區群突發及散發案件分離株分成的 S1~S6 等型。紙錠藥物敏感性實驗顯示峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件分離株的表現型相同，但是有別於本土台灣北部地區菌株的抗藥型態；隨機引子分型試驗、質體分析與脈衝式電場電泳分子分型試驗等基因型分型試驗結果指出峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株主要分子型別為 P8、X7 與 S7 圖譜，皆出現明顯的一致性，其中 *Xba*-I 脈衝式電場電泳圖譜的菌株親源性樹狀圖相似性高達 95% 以上，顯示其菌株彼此間的密切分子關聯性。綜合峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株的表現型及基因型試驗結果，推斷此次案件為同一感染原，並且極可能源自印尼峇里島境外移入。

## 前 言

志賀氏菌屬 (*Shigella*) 為革蘭氏陰性桿菌，屬於腸內桿菌科 (*Enterobacteriaceae*)，其引起的桿菌性痢疾 (*Shigellosis*) 是一種高度傳染性的腸胃道疾病，感染後常見的症狀有嘔吐、發燒、腹瀉或伴隨血便等不同程度的症狀(1)。志賀氏菌屬依生化和血清學特性的不同，可以分為四個屬，分別是 A 屬為痢疾志賀氏菌 (*S. dysenteriae*)；B 屬為副痢疾志賀氏菌 (*S. flexneri*)；C 屬為鮑氏志賀氏菌 (*S. boydii*) 及 D 屬為宋內志賀氏菌 (*S. sonnei*)。鮑氏志賀氏菌及宋內志賀氏菌腹瀉的症狀較輕微且病程短，病患出現水瀉或血便(2)；副痢疾志賀氏菌通常腹瀉的症狀較嚴重且病程長，病患糞便中帶血；痢疾志賀氏菌，特別是血清型第一型會產生嚴重腹瀉，具有高致死率(3,4)。經由 O 抗原分類，可以將痢疾志賀氏菌、副痢疾志賀氏菌及鮑氏志賀氏菌三個菌種再分成 45 種血清型，而宋內志賀氏菌只有 1 種血清型(5)。由全球流行病學的統計資料可以得知副痢疾志賀氏菌及宋內志賀氏菌的發生率較高，副痢疾志賀氏菌主要發生在開發中國家，而宋內志賀氏菌則好發

於工業先進的已開發國家(6)。

2003 年 11 月 7 日至 11 月 17 日期間，包括世宇、時報、桂冠、康福及雄獅等國內五家旅行社赴印尼峇里島( Bali Island )旅遊返國的旅客 4,107 名中，有 176 名出現嘔吐、發燒、腹瀉等症狀，經本局北區分局機場防疫人員採檢送驗及追蹤採檢，本實驗室確認其中 38 名旅客感染宋內志賀氏菌( *S. sonnei* )。利用分子生物學技術，例如核糖核酸分類( ribotyping )、聚合酶連鎖反應( polymerase chain reaction, PCR )、質體輪廓分析( plasmid profile analysis, PPA )及脈衝式電場電泳分析( pulsed-field gel electrophoresis, PFGE )等方法，已經成功地運用在許多種致病病原菌的分型研究上(10~16)，可以釐清案件菌株之間的分子關聯性。本實驗室持續蒐集台灣北部地區宋內志賀氏菌的群突發及散發案件菌株，利用目前分子分型效果最佳的脈衝式電場電泳分析(10, 14)，輔佐以質體輪廓分析及隨機引子快速分子分型技術，探討造成台灣北部地區及東北部地區不斷增加的群突發事件、聚集案件及散發案件的感染原之間的分子關聯性。此次爆發的峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件經鑑定確認為宋內志賀氏菌，為了在疫情爆發早期迅速釐清感染原，本實驗室利用已經建立的台灣北部地區宋內志賀氏菌菌種指紋資料庫挑出主要型別菌株，與此次峇里島境外感染宋內志賀氏菌案件進行分子流行病學關聯性調查。

## 材料與方法

### 1. *Shigella sonnei* 菌株分離及生化、血清鑑定

採集疑似患者與患者親密接觸者之糞便或肛門拭子檢體，以Cary-Blair運送檢體培養基，在冷藏下運送至本局昆陽辦公室細菌實驗室檢驗。在入境台灣前已經有痢疾桿菌感染症狀的患者由本局第二分局在機場進行採檢工作，並且由本局北區分局對於患者同旅行團及其親密接觸者進行詳細的疫情調查採檢工作。本實驗室收到的檢體先培養於 *Salmonella-Shigella Agar* 與

Hektoen Enteric Agar等選擇性培養基 ( Difco Laboratories, Detroit, MI, USA )，經 35°C，18~24 小時隔夜培養後，挑出可疑之非發酵菌落接種於 Triple Sugar Iron Agar ( TSI, Difco )、Lysine Iron Agar ( LIA, Difco )及 Sulfide-Indole-Motility medium ( SIM, Eiken Chemical Co., Tokyo, LTD. Japan )等培養基進行生化實驗。所篩選之菌落生化反應符合TSI為紅色/黃色、H<sub>2</sub>S為陰性、SIM不具運動性及LIA之Lysine 發酵反應為陰性者，再以 *Shigella* Antisera ( II )試劑組 ( Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Japan ) 進行血清學分型鑑定凝集試驗，菌株最終以SYSTEK No. 1 生化試劑套組 ( Eiken Chemical Co., LTD. Tokyo, Japan ) 進行確認。

## **2. 瓊脂紙錠藥物敏感試驗( Agar disc diffusion test)**

紙錠藥物敏感試驗選擇使用 Ampicillin ( AM )，10µg；Chloramphenicol ( C )，30µg；Trimethoprim/sulfamethoxazole ( SXT )，1.25µg/23.75µg；第三代頭孢黴素類抗生素 Ceftriaxone( CRO )，30µg 及 Ceftazidime ( CAZ )，30µg；第一代 Quinolone 類抗生素 Nalidixic acid ( NA )，30µg；第二代 Quinolone 類抗生素 Ciprofloxacin ( CIP )，5µg 及 Norfloxacin ( NOR )，10µg 等八種抗生素紙錠進行實驗；在 Tryptic Soy Broth ( TSB )液體培養基中調整菌液濃度為 Mc Farland No. 0.5 硫酸鋇標準懸浮液 ( barium sulfate ) 濁度，將菌液以無菌棉花棒平均塗抹於 Mueller-Hinton medium ( M-H medium, Difco ) 上，置於 35°C 一般培養箱隔夜培養( 16 ~ 18 小時 )，觀察抑制環大小，依據已訂定之 NCCLS 抗藥判讀標準，判斷為感受性 ( S : Susceptible )、中間性 ( I : Intermediate )或抵抗性 ( R : Resistant )。

## **3. 質體輪廓分型法 ( Plasmid profile analysis )**

使用 High Pure Plasmid Isolation Kit ( Roche, Mannheim, Germany ) 抽取菌株質體 DNA，依據試劑組所附之標準步驟操作，使用 0.5× Tris-borate-EDTA ( TBE )電泳緩衝液配製 1.2 % SeaKem LE agarose ( BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA )跑膠，電泳條

件為 100 伏特，電泳時間 3.5 小時，以電泳圖譜分析菌株質體大小，依菌株所攜帶不同之質體大小作為分型依據（分析範圍：1-20 kb）。

#### **4. 隨機引子快速分子分型技術 (AP-PCR)**

使用M13 單條正股 21 bp引子（序列：5'-TTA TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'），進行隨意引子聚合酵素反應，反應條件為 94°C 60 秒，36°C 60 秒，72°C 120 秒，進行 45 個循環，取產物 7µl進行分析，使用 1× Tris-acetate-EDTA (TAE) 電泳緩衝液配製 1.5 % Agarose SFR™ Bioteriological grade (AMRESCO, Solon, OHIO, USA) 洋菜膠跑膠，電泳條件為 100 伏特，電泳時間 35 分鐘，進行DNA大小片段分析。

#### **5. 脈衝式電場電泳分析 (Pulsed-field gel electrophoresis : PFGE)**

依據美國CDC所建立之脈衝式電泳標準程序操作 (Gautom,1997) 作部分修改，將菌株接種在Tryptic Soy Agar (TSA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 進行 35°C 隔夜培養，次日將菌株菌落重懸浮在細胞懸浮緩衝液 (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0)，測波長 610 nm，調整菌液濃度至 1.15~1.25 之間，取等體積 1 %的SeaKem Gold agarose (BMA, Rockland, ME, USA) 加入 20µl Proteinase K (20 mg / ml) (Sigma, St Louis, MO, USA) 與菌液均勻混合，分裝入填充模型 (plug mold, Biometra, Goettingen, Germany)，靜置室溫 10 分鐘使其凝固，取出填充物置入 Lysis buffer (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0, + 1% Sarcosine, +20µl 20 mg / ml Proteinase K / reaction)，54°C 震盪 2 小時，接著以預熱過的一次蒸餾水 (dH<sub>2</sub>O) 清洗兩次，每次 15 分鐘，再以TE緩衝液 (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) 清洗四次，每次 15 分鐘，清洗的過程皆在 50°C 水浴中進行。切下 2.0~2.5 mm厚的填充物薄片，分別以限制酵素 *Xba-1* (37°C) (MBIF ermentas, Hanover, MD, USA) 及 *Sfi-I* (50°C) (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA) 30 單位進行限制酵素切割反應，水浴震盪 4 小時；以電泳槽Rotaphor Type V (Biometra, Goettingen, Germany) 跑 1 %的SeaKem

Gold agarose ( BMA, Rockland, ME, USA ) , 0.5× Tris-Borate-EDTA ( TBE ) 電泳緩衝液，溫度 13°C、變換時間方式 5~30 秒(對數變換設定)、變換電場方式 110~120 秒(線性變換設定)，電泳時間為 23 小時，以Lambda Ladder PFG Marker ( New England Biolabs Inc., MA, USA )當作片段大小指標；0.5 µg/ml ethidium bromide染色 30 分鐘，清洗 2 小時，以紫外光照射顯像。

#### **6. 親緣性樹狀圖**

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，其原理是利用電泳圖譜的片段相似程度，以 UPGMA ( unweighted pair group method using arithmetic averages ) 的方式畫出樹狀圖( dendrogram )，藉由樹狀圖可以看出案件中各菌株間及不同案件的菌株間分子的相關性。

### **結 果**

#### **瓊脂紙錠藥物敏感試驗**

峇里島旅遊境外移入集體感染桿菌性痢疾案件所分離出之 38 株宋內志賀氏菌菌株的抗藥性型態完全相同，皆只出現對Sulfamethoxazole ( SXT )的抗藥性；對Ampicillin ( AM )、第三代頭孢黴素類抗生素Ceftitriaxone ( CRO )、第一代Quinolone類抗生素Nalidixic acid ( NA )及第二代Quinolone類抗生素Ciprofloxacin ( CIP )等為感受性 ( Susceptible )。2001 年所收集的台灣北部地區 *Shigella sonnei* 群突發案件菌株對Sulfamethoxazole ( SXT ) 與Nalidixic acid( NA )具有抗藥性，其中新竹縣群突發案件No. 6 號的菌株是具有AM、SXT、CRO 及NA 等 4 種抗藥性的多重抗藥性菌株。2003 年度蒐集的台灣北部地區 *Shigella sonnei* 散發案件菌株 8 株對AM、SXT及NA具有抗藥性，此外值得注意的是對第三代頭孢黴素類抗生素 Ceftitriaxone ( CRO )也由感受性 ( Susceptible )轉變為中間性

( Intermediate )，顯見台灣地區抗生素濫用的問題仍需進一步監控改善。雖然常用於治療桿菌性痢疾的第一代Quinolone類抗生素 NA 普遍無效，但目前仍未發現第二代Quinolone類抗生素 CIP 的抗藥性菌株。紙錠藥物敏感試驗結果顯示峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株的抗藥性型態表現型與台灣北部地區菌株不同。

#### **隨機引子快速分子分型技術**

針對同一批次進行M13 AP-PCR反應的 16 株菌株進行分析，觀察 1~10 kb大小的DNA片段，可以明顯由圖譜區分成M1~M4 四種M13 AP-PCR分型(見圖二)。其中，新竹縣群突發案件No. 1、宜蘭縣群突發案件No. 2 及 2003 年度台灣北部地區散發案件No. 4 皆為M1 型；新竹縣群突發案件No. 6、標準菌株ATCC 25931、2003 年度台灣北部地區散發案件No. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 等皆為M2 型；宜蘭縣群突發案件No.16 為M3 型；峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株No. 1, 2, 12 等皆為M4 型。

#### **質體輪廓分型法**

有鑒於 20 kb以上的片段可能是細菌的染色體或大質體容易在培養過程中喪失，並且在高pH值抽取時不穩定等因素，會影響分型結果，故通常不作為分型依據( 10, 15, 16 )，本實驗主要分析 20 kb以下的質體。峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株的質體型態呈現一致的P8 型，P8 型主要由 2.8 kb、4 kb、9 kb、12 kb 及 20 kb等 5 條質體組成(見圖三)。台灣北部地區群突發及散發案件分成的P1~P7 型，其主要型別為P1 型，P1 型主要由 1.7 kb、2.8 kb、9 kb及 20 kb等 4 條質體組成，本次實驗所選擇的新竹縣群突發案件No. 6 及宜蘭縣群突發案件No. 2 皆為P1 型。另外兩株參考株新竹縣群突發案件No. 1為P7 型(1.7 kb、2.3 kb及 9 kb )及宜蘭縣群突發案件No.16 為P7 型( 7 kb、9 kb及 20 kb )。2003 年度台灣北部地區散發案件菌株No.1, 3 為P7 型，其餘皆為P1 型。

#### **脈衝式電場電泳分析**



經由限制酵素 *Xba*-I 切割的脈衝式電場電泳圖譜顯示，分析 48 kb 至 480 kb 大小的 DNA 片段，依據彼此 DNA 帶狀片段的相對位置，差異在 4 條 DNA 片段為主要區分，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株出現一致的 X7 型 (見圖一)，此外，利用限制酵素 *Sfi*-I 切割亦呈現相同的脈衝式電泳圖譜。有別於台灣北部地區群突發及散發案件分成的 X1、X1a、X1b、X1c、X1d、X2、X3、X4、X5 及 X6 等型，其主要差異在峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株多出 242.5 kb~291.5 kb 之間的 3 條片段；*Sfi*-脈衝式電場電泳圖譜顯示，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件仍出現一致性的 S7 型，有別於台灣北部地區群突發及散發案件分成的 S1~S6 等型。

### 親緣性樹狀圖

親緣性樹狀圖結果顯示，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株的質體輪廓分型圖譜與參考菌株之間的親緣相似度在 16 %-70 % (見圖四)；峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株經 *Xba*-I 切割的脈衝式電場電泳圖譜與參考菌株之間的親緣相似度在 35 %-80 % 之間，顯示峇里島案件菌株與台灣北部地區菌株不同 (見圖五)。

### 討 論

桿菌性痢疾 (Shigellosis) 之症狀有：腹瀉、伴隨發燒、噁心；或有毒血症、嘔吐、痙攣及裏急後重，潛伏期 1~3 天，症狀持續約 3~5 天。志賀氏菌屬 (*Shigella* spp.) 在我國的傳染病防治法被歸類於第二類乙種法定傳染病，是一種具高度傳染性的腸胃道細菌，需要通報及隔離治療。台灣地區桿菌性痢疾發生的情形，根據本局民國 84 年至民國 88 年 (1995~1999) 期間的統計資料顯示，台灣北部及中部地區以副痢疾志賀氏菌最多，少數為宋內志賀氏菌。然而自民國 89 年 10 月花蓮某高中發生大規模的宋內志賀氏菌群突發案件之後，東部地區開始陸續出現感染宋內志賀氏菌的零星散發病例。民國 90 年出現大量感染的情形，北部地區包括台北縣市、桃園、新竹

等地區也出現許多散發案件，其感染地區不再侷限於山地鄉原住民部落，平地鄉鎮城市亦有宋內志賀氏菌的零星散發案件發生。除本土持續有宋內志賀氏菌案件外，近年來由於國民旅遊頻繁，往來於東南亞鄰近國家工作或觀光旅遊的國內民眾不計其數，再加上外籍勞工、偷渡者帶來的各種疫病問題，不斷對於本局積極建立的防疫體系進行挑戰，此次峇里島旅遊境外移入集體感染宋內志賀氏菌案件為 2003 年度繼嚴重呼吸道症候群( SARS )之後，大型的境外移入感染案件，為迅速釐清此案件的感染原是否為境外移入，本研究利用藥敏試驗表現型，以及隨機引子快速分子分型、質體輪廓分型與脈衝式電場電泳分析等基因指紋資料作分子流行病學關聯性的探討。

實驗中使用的台灣地區參考菌株為本實驗室宋內志賀氏菌菌株指紋資料庫 2001 年新竹縣散發案件菌株 No. 1、No. 6 及 2001 年宜蘭縣散發案件菌株 No. 2、No. 16 等 4 株，此 4 株參考菌株是經比較 2001、2002 年台灣北部地區(包括新竹縣、新竹市、桃園縣、桃園市、台北縣、台北市、宜蘭縣及宜蘭市等地區) 宋內志賀氏菌桿菌性痢疾 75 件散發案件，14 件群突發案件，共 89 株宋內志賀氏菌菌株後，涵蓋 80 % 的主要脈衝式電場電泳圖譜型別，作為台灣北部地區宋內志賀氏菌菌株比較的參考依據。一同進行比對的還有今年度本實驗室蒐集到台灣北部地區 8 株散發宋內志賀氏菌案件菌株，所有菌株資料詳見表一。在藥敏試驗部分，峇里島旅遊境外移入集體感染桿菌性痢疾案件所分離出之 38 株宋內志賀氏菌菌株的抗藥性型態完全相同，皆只出現對 Sulfamethoxazole ( SXT ) 的抗藥性，與台灣北部地區菌株普遍對 Ampicillin ( AM )、Sulfamethoxazole ( SXT ) 與 Nalidixic acid ( NA ) 具有抗藥性明顯不同，根據研究資料顯示，印尼峇里島( Bali Island ) 地區有痢疾志賀氏菌( *S. dysenteriae* )、副痢疾志賀氏菌( *S. flexneri* ) 及宋內志賀氏菌( *S. sonnei* ) 感染案件，宋內志賀氏菌對 Ampicillin ( AM )、Sulfamethoxazole ( SXT ) 的抗藥百分比分別為 32 %、79 %，但是對

Nalidixic acid( NA )則不具抗藥性(17)，與本實驗結果相近。但是未能從藥敏試驗型別與質體輪廓分析、脈衝式電場電泳圖譜中比較出特殊抗藥性型態的差異，找出特殊的抗藥性質體型式。將峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株與台灣北部地區參考菌株進行同一批次M13 AP-PCR反應，觀察 1~10 kb大小的DNA片段，可以明顯由圖譜區分成M1~M4 四種M13 AP-PCR分型(見圖二)，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株No. 1, 2, 12 等皆為M4 型，由型別總數比較出M13 AP-PCR反應的分型能力比質體輪廓分型、脈衝式電場電泳分析差。質體輪廓分型主要分析 2.8~20 kb的質體，其原因為大質體會因pH值的改變而不穩定，容易喪失再現性，通常不作為分型依據。峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株的質體型態呈現一致的P8 型，P8 型主要由 2.8 kb、4 kb、9 kb、12 kb 及 20 kb等 5 條質體組成(見圖三)。質體型態的親緣性樹狀圖結果顯示，以峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株為主的質體輪廓分型圖譜，此次案件的質體輪廓分型圖譜完全相同，而其與參考菌株之間的親緣相似度在 16 %-70 %之間(見圖四)，顯見峇里島案件菌株的質體型態與台灣北部地區參考菌株不同。

經由限制酵素 *Xba*-I 切割的脈衝式電場電泳圖譜顯示，分析 48 kb 至 480 kb 大小的DNA片段，依據彼此DNA帶狀片段的相對位置，差異在 4 條DNA片段為主要區分，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株出現一致的X7 型(見圖一)，此外，利用限制酵素 *Sfi*-I 切割亦呈現峇里島案件菌株相同的脈衝式電泳圖譜。有別於台灣北部地區群突發及散發案件分成的X1、X1a、X1b、X1c、X1d、X2、X3、X4、X5 及X6 等型，其主要差異在峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株多出 242.5 kb~291.5 kb之間的 3 條片段；*Sfi*-I 脈衝式電場電泳圖譜顯示，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件仍出現一致性的S7 型，明顯有別於台灣北部地區群突發及散發案件分成的S1~S6 等型。利用UPGMA的方式畫出樹狀圖，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件菌株經 *Xba*-I 切割的脈衝式電場電泳圖譜與參考菌株之間的親緣相似度在 35

%-80 %之間，顯示峇里島案件菌株與台灣北部地區菌株不同(見圖五)。綜合抗藥性表現型( *phenotype* )及基因型( *genotype* )實驗的結果，初步研判此次峇里島旅遊集體感染宋內志賀氏菌案件之感染原為境外移入之宋內志賀氏菌菌株。

礙於感染原產生的地點在國外，並且無法獲得印尼峇里島當地的宋內志賀氏菌流行病學資料，本實驗室在發現疫情的第一時間只能經由已經掌握的案件菌株與台灣本土菌株作比對，初步快速釐清感染原之間的分子關聯性。唯經本局疫情調查工作同仁根據旅行社所提供之旅行團行程資料及感染宋內志賀氏菌旅客調查資料，按照宋內志賀氏菌潛伏期 1~3 天推測，峇里島當地鶯鴨子餐廳的鶯鴨套餐可能為感染原。在本局機場檢疫人員對於赴峇里島旅客進行加強衛教宣導工作及建議旅行社更改旅行團行程或用餐地點，甚至全程於飯店內用餐及改喝包裝水後，自 2003 年 11 月 25 日以後已經沒有陽性個案的報告。在本局迅速分離鑑定出感染原並且採取防疫措施，所幸能及時防止疫情在國內蔓延擴散。

## 結 論

根據本局分離確定及統計的結果，此次旅行團赴峇里島旅遊境外集體感染宋內志賀氏菌案件時間為 2003 年 11 月 7 日至 24 日，自峇里島回國的台灣觀光客共有 111 名陽性個案，另外有 3 名接觸者感染，自 11 月 25 日以後已無檢出陽性檢體。本研究為達快速釐清感染原的目的，在疫情初期選擇 2003 年 11 月 7 日至 17 日發生的五件旅行團赴峇里島旅遊集體感染宋內志賀氏菌案件所分離出之 38 株經鑑定確認為宋內志賀氏菌( *Shigella sonnei* ) 菌株進行分子流行病學分析。為分析案件感染原來源，選擇台灣北部地區經分子分型比對為主要型別之新竹、宜蘭地區宋內志賀氏菌群突發案件各 2 株及本實驗室所蒐集 2003 年度台灣北部地區宋內志賀氏菌散發案件菌株 8 株共同進行分析比對，以瞭解此次案件之菌株與台灣北部地區本土分離菌株

之間是否有關聯性。本研究分別經由紙錠藥物敏感性試驗( disk antimicrobial susceptibility test ) 表現型( phenotype )及隨機引子分型試驗( AP-PCR )、質體分析( plasmid profile analysis )與脈衝式電場電泳分子分型試驗 ( pulsed-field gel electrophoresis, PFGE )等基因型( genotype )分型試驗，分析其分子流行病學相關性。

紙錠藥物敏感性實驗結果顯示，峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件所分離出之 38 株宋內志賀氏菌菌株表現型相同，一致只出現對 Sulfamethoxazole ( SXT )的抗藥性，與台灣北部地區 *Shigella sonnei* 菌株普遍具有 Ampicillin( AM )、Sulfamethoxazole ( SXT )與 Nalidixic acid( NA )等三種抗藥性明顯不同；其隨機引子分型別、質體輪廓型別及脈衝式電場電泳分子分型 38 株峇里島旅遊集體感染桿菌性痢疾案件皆相同，分別為明顯與台灣北部地區參考菌株有差異的 M4、P8 及 X7 型其中 Xba-I 脈衝式電場電泳圖譜的菌株親源性樹狀圖相似性高達 95 % 以上，顯示其菌株彼此間的密切分子關聯性。綜合峇里島旅遊境外移入集體感染桿菌性痢疾案件菌株的表現型及基因型試驗結果，推斷此次案件為同一感染源，並且極可能源自印尼峇里島境外移入。

## 致 謝

衛生署疾病管制局檢疫防疫組、北區分局

**撰稿者：**李祥吉、陳光爐、蔡金來、陳佳慧、葉姿暖、楊季融、王昱嵐、邱秀櫻、李智隆、蘇勳璧、林鼎翔

衛生署疾病管制局研究檢驗組

## 參考文獻

1. Benson AS. Control of Communicable Diseases Manual. 16<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 1995 : 421-425.
2. Keusch GT, Bennish ML. Shigellosis : recent progress, persisting problems and research issues. *Pediatr Infect Dis J.* 1989 ; 8 : 713-9.
3. World Health Organization. The management of bloody diarrhea in young children 1994. Geneva: World Health Organization; 1994.
4. 陳光燼、王添貴、蔡金來、李祥吉、葉姿暖、吳芳姿、李智隆、吳和生等: 國內首例分離產毒性痢疾志賀氏菌第一型 (*Shigella dysenteriae*, type 1) 菌株之分子流行病學分析。疫情報導 2003 ; 1 : 2-13。
5. Farmer JJ, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*, In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, et al., Manual of Clinical Microbiology, 5<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1991 : 360-383.
6. Dupont HL. *Shigella* species ( bacillary dysentery ). In : Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (ed.). Principles and practice of infectious diseases, 3<sup>rd</sup> ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990 : 1716-1722.
7. 行政院衛生署疾病管制局 中華民國八十七年台灣地區傳染病統計暨監視年報 2000 年 2 月 1-6 頁。
8. Farque SM, Haider K, Rahman MM, Alim AA, Ahamd QS, Albert MJ, Sack RB. Differentiation of *Shigella flexneri* strains by rRNA gene restriction patterns. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30: 2996-9.
9. Litwin CM, Storm AL, Chipowsky S, Ryan KJ. Molecular epidemiology of of *Shigella* infections: plasmid profiles, serotype correlation, and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1991 ; 29: 104-8.
10. Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, Shyr JM, Shi ZY, Tsai WS, Lin YH, Tseng CY.

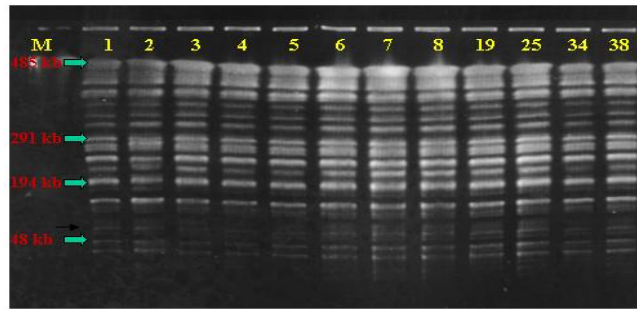
- Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. J Clin Microbiol 1995 ; 33: 1779-8.
- 11.Wong HC, Lu KT, Pan TM, Lee CL, Shih DY. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1996; 34: 1535-9.
- 12.Pan TM, Lin CS, Wang TK, Tsai JL, Ho SI, Lee CL. Molecular subtyping of *Salmonella enterica* serovar *paratyphi* A from Southeast Asia. J Food Drug Anal 1998 ; 6: 573-8.
- 13.Pan TM, Lin CS, Tsai CL, Ho SI, Wang TK, Lee CL, Chiou CS, Hsu SY, Huang HC, Wang GR. Preliminary report on genotyping of *Vibrio cholerae* non-O1 isolates in Taiwan by pulsed-field gel electrophoresis. J Microbiol Immunol Infect 1998 ; 31: 257-60.
- 14.Liebisch B, Schwarz S. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* isolates. J Med Microbiol 1996 ; 44: 52-9.
- 15.Casalino M, Nicoletti M, Salvia A, Colonna B, Maimone F. Characterization of endemic *Shigella flexneri* strains in Somalia: antimicrobial resistance, plasmid profile, and serotype correlation. J Clin Microbiol 1994 ; 32: 1179-83.
- 16.林建生、王添貴、蔡金來、何淑淇、李智隆、陳豪勇、潘子明等:台灣桃園地區宋內氏志賀氏菌(*Shigella sonnei*)感染事件之關聯性分析。疫情報導 2001 ; 4 : 168-180。
- 17.Subekti D, Oyoyo BA, Tjaniadi P, Corwin AL, Larasati W, Putri M, Simanjuntak CH, Punjabi NH, Taslim J, Setiawan B, Djelantik AA, Sriwati L, Sumardiati A, Putra E, Campbell JR, Lesmana M. *Shigella* spp. Surveillance in Indonesia: the emergence or reemergence of *S. dysenteriae*. 2001 ; 7: 137-40.

表一：峇里島旅遊境外感染***Shigella sonnei***案件菌株與台灣北部地區（包

括宜蘭、台北、桃園、新竹) *Shigella sonnei* 散發案件菌株基本資料與分子分型結果

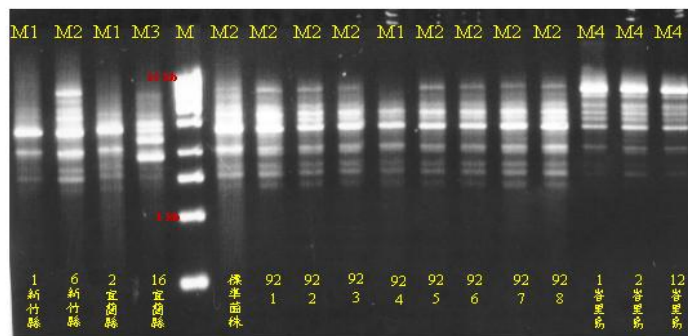
編號	縣市	分離日期	抗藥性試驗					M13	PPA	PFGE <i>Xba-I</i>
			AM	SXT	CRO	NA	CIP			
1	新竹縣	90.10.30	S	R	S	R	S	M1	P7	X1
6	新竹縣	90.10.30	R	R	R	R	S	M2	P1	X1c
2	宜蘭縣	90.09.10	S	R	S	R	S	M1	P1	X1
16	宜蘭縣	90.09.13	S	R	S	R	S	M3	P3	X1
1	桃園縣	92.01.16	R	R	I	R	S	M2	P7	X1d
2	台北縣	92.01.27	S	R	S	R	S	M2	P1	X1b
3	桃園縣	92.01.28	R	R	R	R	S	M2	P1	X1d
4	桃園縣	92.01.30	R	R	I	R	S	M2	P7	X1d
5	桃園縣	92.01.30	R	R	I	R	S	M1	P1	X1d
6	新竹縣	92.04.11	R	R	I	R	S	M2	P1	X1a
1	峇里島 (新竹市)	92.11.11	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
2	峇里島 (台北縣)	92.11.12	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
3	峇里島 (桃園縣)	92.11.11	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
4	峇里島 (台北縣)	92.11.12	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
5	峇里島 (桃園縣)	92.11.12	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
6	峇里島 (桃園縣)	92.11.11	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
7	峇里島 (桃園縣)	92.11.07	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
8	峇里島 (台北縣)	92.11.07	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
9	峇里島 (台北縣)	92.11.07	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
10	峇里島 (桃園縣)	92.11.07	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
11	峇里島 (新竹市)	92.11.20	S	R	S	S	S	M4	P8	X7
12	峇里島 (台北市)	92.11.20	S	R	S	S	S	M4	P8	X7





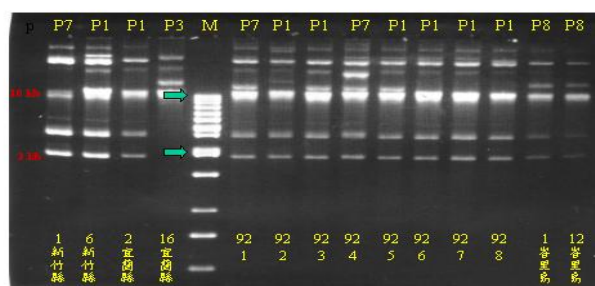
圖一: 峇里島旅遊境外感染 *Shigella sonnei* 案件脈衝式電場電泳 *Xba*-I 圖譜

- (1) Lane 1:  $\lambda$  Ladder PFG Marker; Lane 2~13: 峇里島旅遊案件檢體菌株, 菌株編號如圖上標示。
- (2) 1% 的 SeaKem Gold agarose, 0.5 $\times$  Tris-Borate-EDTA (TBE) 電泳緩衝液, 溫度 13 $^{\circ}$ C、變換時間方式 5~30 秒(對數變換)、變換電場方式 110~120 秒(線性變換), 電泳時間為 23 小時。



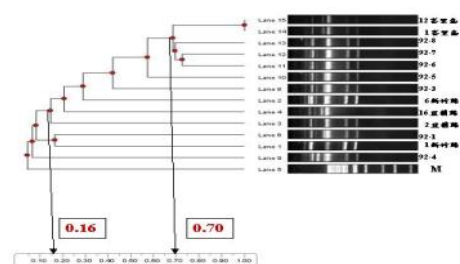
圖二: 峇里島旅遊境外感染 *Shigella sonnei* 案件 M13 AP-PCR 分型圖譜

- (1) Lane 5 M: 1 kb DNA Ladder; Lane 1、2: 2001 年新竹縣散發案件菌株; Lane 3、4: 2001 年宜蘭縣散發案件菌株; Lane 6: *Shigella sonnei* 標準菌株 ATCC 25931; Lane 7~14: 2003 年台灣北部地區散發案件; Lane 15~18: 峇里島境外感染案件檢體。
- (2) 1.5% Agarose SFR™ Bioteriological grade 胞膠, 電泳條件為 100 伏特, 電泳時間 35 分鐘。



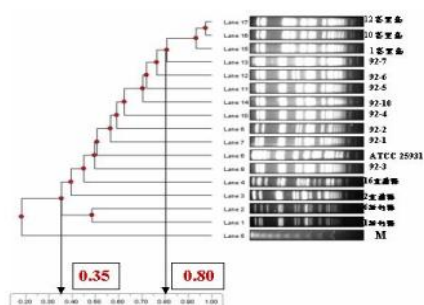
圖三:峇里島旅遊境外感染*Shigella sonnei*案件質體輪廓分析圖譜

- (1) Lane 5 Marker: 1 kb DNA Ladder; Lane 1、2: 2001年新竹縣散發案件菌株; Lane 3、4: 2001年宜蘭縣散發案件菌株; Lane 6~13: 2003年台灣北部地區散發案件; Lane 14、15: 峇里島境外感染案件檢體。
- (2) 1.2% SeaKem LE agarose 跑膠，電泳條件為100伏特，電泳時間3.5小時，依菌株所攜帶不同之質體大小作為分型依據(分析範圍: 1-20 Kb)。



圖四:峇里島旅遊境外感染*Shigella sonnei*案件質體輪廓分析親緣性樹狀圖

使用質體輪廓分析圖譜，以峇里島旅遊境外感染*Shigella sonnei*案件菌株為基準，以UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 的方式，藉由 Phoretix1D Advanced Version 5.01 軟體分析，製成菌株親緣性樹狀圖 (dendrogram)，以其菌株相似指數表示菌株親緣關係。



圖五:峇里島旅遊境外感染*Shigella sonnei*案件脈衝電場電泳圖譜親緣性樹狀圖  
 使用脈衝電場電泳分析圖譜，以峇里島旅遊境外感染*Shigella sonnei*案件菌株為基準，以UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 的方式，藉由 Phoretix1D Advanced Version 5.01 軟體分析，製成菌株親緣性樹狀圖 (dendrogram)，以其菌株相似指數表示菌株親緣關係。