

2004-2012年臺灣再發性類鼻疽個案之感染情形分析

陳嘉綾、劉好嫻、慕蓉蓉

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

摘要

類鼻疽是由類鼻疽伯克氏菌所引起之人畜共通疾病，主要流行地區包括東南亞及澳洲北部。臺灣疾病管制署傳染病監測系統資料顯示，2004至2013年止，確定病例共計363例。再發性感染(recurrence)一直是類鼻疽最重要之併發症，統計顯示有大於6%的人雖經過完整抗生素治療，仍會出現再發性感染，另依據再發性感染與初次感染菌株相同與否，又可區分為復發(relapse)與再感染(reinfection)。本研究中利用脈衝式電泳分子分型進行菌株分子分型探討臺灣2004至2012年間20例再發性感染個案，發現皆屬復發而非再感染。此外分析比較個案之背景資料，顯示酒癮可能為造成復發之危險因子，而糖尿病、高血壓、腎臟病、心臟病、肝臟病及癌症等因子則無顯著影響。另依文獻顯示，抗生素治療方式亦為影響復發的重要因素之一，建議臨床醫師於治療病患時，能加強依據醫囑接受完整抗生素療程的觀念，並可強化酒癮患者之相關衛教，藉以減低類鼻疽復發的情形。

關鍵字：類鼻疽、再發性感染、脈衝式電泳分子分型

前言

類鼻疽(Melioidosis)是由類鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)所引起之人畜共通疾病。此疾病的病原菌最早是於1911年，由緬甸病理學家Alfred Whitmore及其助手C.S. Kishnaswamies[1]，從解剖的屍體中所分離，雖所造成的臨床病症和「鼻疽」無法區分，但利用實驗室之培養特性不同，確認為不同於「鼻疽」之致病菌。此菌最初命名為*Bacillus pseudomallei*，之後經歷數次更名，於1922年更改為*Burkholderia pseudomallei*，並沿用至今。

類鼻疽伯克氏菌為革蘭氏陰性桿菌，通常以腐生方式存在於土壤或水中，主要傳染途徑為經由皮膚傷口接觸受污染的土壤或水，或經吸入、食入而引起感染，一般而言並不會直接由人傳染給人。而感染類鼻疽的危險因子，則包括糖尿病、地中海貧血、腎臟疾病、惡性腫瘤、男性性別、酗酒等[1]。

類鼻疽分布於南北緯20度之間，主要流行區域包括東南亞及澳洲北部，東南亞主要的盛行國家有泰國、越南、馬來西亞、緬甸等，其中在泰國東北部致死率可達50% [2]。在澳洲達爾文地區，為引起致死性社區肺炎(community-acquired pneumonia)之最常見原因[3]。其他區域雖亦有案例，但多為曾至流行區域旅行而受感染者，僅少數偶發之本土案例[1]。臺灣之類鼻疽病例多為散發性個案，首例為1982年的境外移入病例，個案

於菲律賓馬尼拉附近河川溺水而感染[4]。依據文獻，1982至2000年間臺灣共有15人通報確診類鼻疽17例，其中2例為2位病人發生之再發性感染(recurrence)，4例為境外移入[5]。臺灣疾病管制署自2000年將類鼻疽納入傳染病監控系統，並在2007年10月納入第四類法定傳染病，以進行監測。依統計，2004至2013年間，臺灣之類鼻疽確定病例共計363例。

類鼻疽的再發性感染一直是該疾病最重要的併發症(complication) [2, 3]，造成治療上的困難，即使依照建議之抗生素治療方式，仍有大於6%的人會出現再發性感染[6]。在泰國，約有13%的類鼻疽首次感染存活者會出現再發性感染[7]。再發性感染又可區分為復發(relapse)與再感染(reinfection)，前者為同一病原菌潛伏於體內且再度發病，後者則為感染不同基因型之病原菌，根據研究統計結果顯示，復發通常與第一次發病的間隔期小於12個月，再感染則大多超過12個月[2, 3, 6]。而復發通常較再感染容易發生[8, 9]，在泰國東北區域一個共有141位再發性感染個案的研究中，基因分型分析顯示有65%的個案為復發，35%為再感染[6]。此外，在初次感染類鼻疽時有多病灶感染(multifocal infection)與菌血症者，較有可能出現復發的情形，至於再感染則無特定之風險因子[2]。為進一步瞭解臺灣地區類鼻疽再發性感染的狀況，本文針對2004至2012年再發性感染個案之多次送驗菌株進行脈衝式電泳分子分型分析，藉以區分復發與再感染，並利用比對分析個案之疫調資料，探討發生再發性感染之可能危險因子。

材料與方法

一、病例資料來源

2006至2012年期間類鼻疽確定病例資料取自於疾病管制署「傳染病個案通報系統」及「傳染病疫情調查系統」，且確認檢驗結果為類鼻疽陽性之個案，擷取其性別、發病年齡、學歷、潛在疾病、死亡情形和其他相關的疫情調查資料。

二、菌株

利用以上二系統確定之陽性病例中，比對篩選出2006至2012年間採檢送驗2次以上之個案及菌株。為擴大再發性感染送檢之菌株數，同步檢視由實驗室保存之2005年前，採檢送驗2次以上之個案及菌株。2005年前之個案，因無相關疫情調查資料，僅作為PFGE分型分析使用。

三、脈衝式電泳分子分型(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

將待測菌株以Tryptic Soy Agar(TSA)培養基37°C隔夜培養，刮取菌落至Cell Suspension Buffer(100 mM EDTA, 100mM Tris, pH 8.0)中，調整適當濁度。以TE buffer(10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)配製1% SKG agarose，取等體積菌液與agarose混合後注入模具。凝固之膠塊置於含100 μ g/ml Proteinase K的Cell Lysis Buffer中，於56°C水浴槽中shaking wash 2小時。依序以無菌二次水、TE Buffer於56°C水浴槽分別震盪洗滌3次及4次。將膠塊切成細長狀膠條，置入含有酵素SpeI(10 Units)的限制酵素專用緩衝溶液，於37°C中進行酵素反應16小時。以0.5X Tris-Borate EDTA(TBE)緩衝液配製1% SKG agarose電泳膠。將已被酵素處理後之膠條平貼於齒梳，將齒梳

直立於鑄膠台，倒入56°C之1% SKG agarose電泳膠。冷卻凝固後，於預冷至14°C的電泳裝置(Bio-Rad CHEF Mapper XA system)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2秒至40秒，總時間20小時。將膠片以1 μ g/ml之Ethidium bromide染色，利用Electrophoresis Documentation and Analysis System 290(Kodak; Rochester, NY)數位系統拍照，最後以BioNumerics(Applied Maths, Kortrijk, Belgium)分析軟體進行電泳膠圖譜分析。

結果

一、確定病例數

利用「傳染病個案通報系統」和「傳染病疫情調查系統」篩選出2006至2012年間之類鼻疽確定陽性個案共240人，其中2人未填寫相關疾病史，47人在第一次感染後死亡(14人確認直接死因為類鼻疽)。剩餘之191人中，17人發生再發性感染，其中4人死亡，皆因非類鼻疽造成之其他原因死亡。本研究中之後續資料分析樣本，將採用共191例陽性病例，其中174人為單次感染個案，17人為再發性感染之資料。

二、再發性感染個案菌株

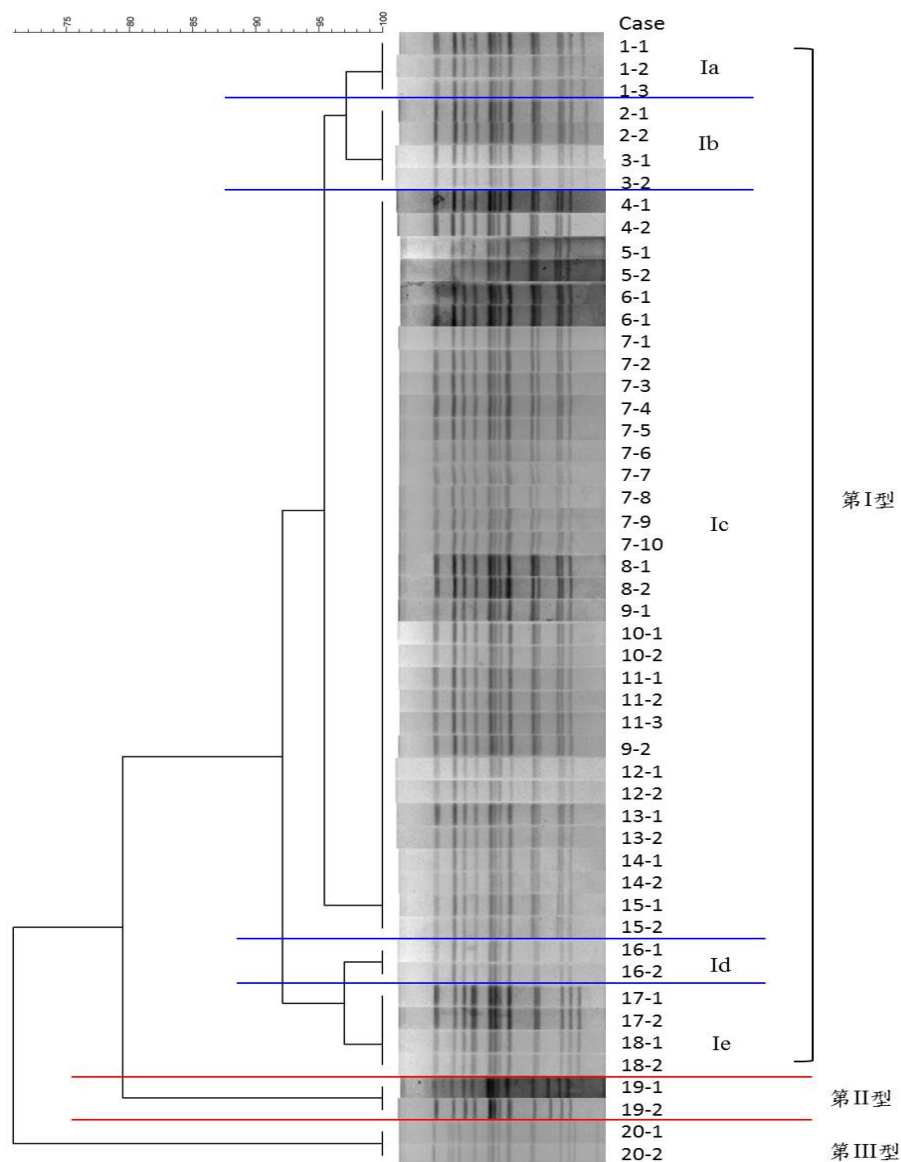
2006至2012年間17位再發性感染個案共送驗類鼻疽桿菌陽性菌株43株，除其中1個案發生9次再發性感染，共送檢10菌株，以及1個案送檢3菌株外，其餘個案皆為送檢2菌株。由實驗室保存之菌株中篩選出2004至2005年間同一個案重複採檢送驗之陽性菌株共3位個案7株菌株，除其中1個案送檢3菌株外，其餘2個案皆為送檢2陽性菌株。故2004至2012年共計多次送驗陽性個案20例個案，陽性菌株50株，其中2006至2012年間有26株為再發性感染送驗。

三、PFGE

利用PFGE分析來自20例個案的50株菌株，實驗結果顯示同一個案之再次送檢菌株皆與初次或前次感染之菌株分子分型相同(圖一)，表示每一個案之再發性感染皆為「復發」而非「再感染」。另外，根據1995年Tenover等人發表之文章，PFGE圖譜中相差3條bands以內，皆可視為高度相似(closely related)之菌株[10]，依此原則比較此20例個案間的相關性，發現主要可區分為3型，其中18例同屬第I型，而第19、20例則分屬第II、III型。而第I型又可再區分為Ia、Ib、Ic、Id及Ie等五群，其中以Ic群為主要型別，共計12例，不過五群間之相似度皆達到90%以上。

四、確定病例資料

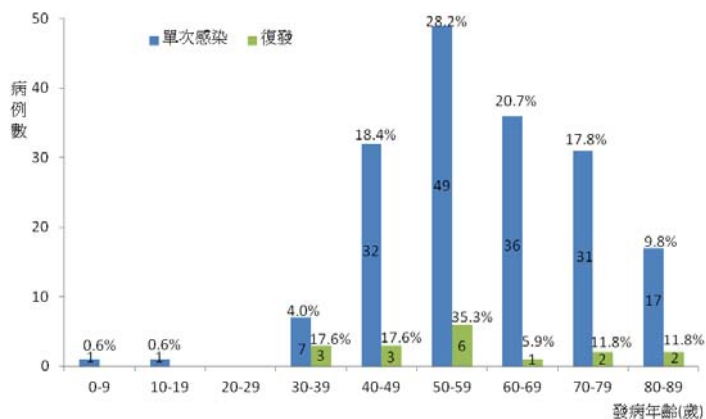
本研究中，單次感染個案之發病年齡平均為60.2歲(範圍為4.5-88.3歲、表一)，復發個案初次感染時之發病年齡平均則為56.1歲(範圍為30.3-86.6歲)，兩組發病年齡層之詳細分布如圖二，但兩組在發病年齡上並無顯著差異($p = 0.326$)。男女性別比方面，單次感染個案為4.3:1.0，復發個案為4.7:1.0，亦無顯著差異($p = 0.255$)。另教育程度之分布方面，單次感染個案有39位未作答，復發個案有1位未作答，兩組教育情形之詳細分布如圖三，但兩者間教育程度無顯著差異($p = 5.361$)。



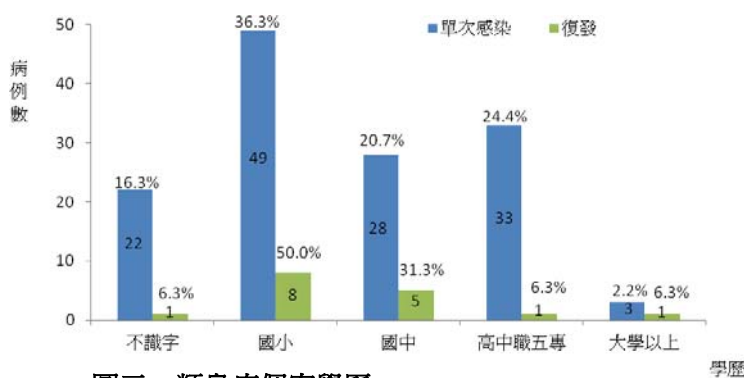
圖一、脈衝式電泳分子分型結果

表一、復發之危險因子

| | 單次感染 (n=174) | | 復發 (n=17) | | P 值 |
|----------------|-----------------|------|--------------|------|--------|
| 發病年齡(歲) | | | | | |
| 平均數 | 60.2 | | 56.1 | | 0.326 |
| 範圍 | 4.5-88.3 | | 30.3-86.6 | | |
| 男性數 | 141 | % | 14 | % | 0.255 |
| 潛在疾病 | (n=141) | | (n=14) | | |
| 糖尿病 | 96 | 55.2 | 11 | 64.7 | 0.675 |
| 高血壓 | 60 | 34.5 | 5 | 29.4 | 0.309 |
| 腎臟病 | 12 | 6.9 | 2 | 11.8 | 0.245 |
| 心臟病 | 14 | 8.0 | 3 | 17.6 | 0.131 |
| 肝臟病 | 4 | 2.3 | 2 | 11.8 | 0.081 |
| 癌症 | 6 | 3.4 | 2 | 11.8 | 0.127 |
| 酒癮 | 0 | 0.0 | 2 | 11.8 | 0.007* |
| 氣喘 | 4 | 2.3 | 1 | 5.9 | 0.312 |
| 過敏 | 0 | 0.0 | 1 | 5.9 | 0.089 |
| 尿酸 | 0 | 0.0 | 1 | 5.9 | 0.089 |



圖二、類鼻疽個案發病年齡



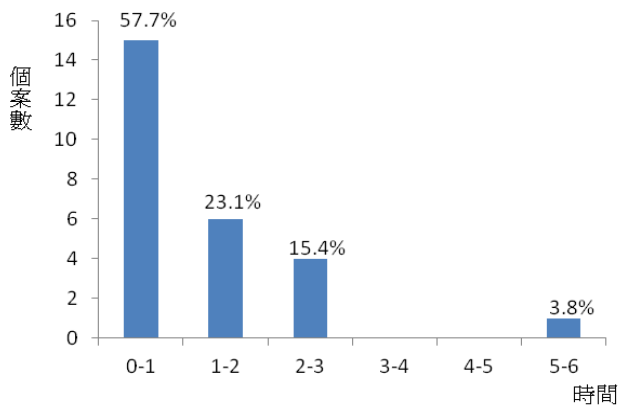
圖三、類鼻疽個案學歷

五、復發之危險因子

17位復發個案中有14位患有潛在疾病，為探討潛在疾病是否為造成復發之危險因子，以復發個案所發生的潛在疾病作進一步分析，兩組之潛在疾病詳細情形如表一，並利用卡方或費雪精確檢定法確認上述潛在疾病是否與復發有關，其結果顯示在多種潛在疾病中，僅有酒癮具有顯著之關聯性($p = 0.007$)，而其餘糖尿病、高血壓、腎臟病、心臟病、肝臟病、癌症、氣喘、過敏及尿酸因子則在兩組間無顯著差異。

六、復發週期

統計初次發病至第一次復發之發病間隔，以及每次復發與前次發病之發病間隔時間，總計17位個案中，共有26次復發，發病間隔之中位數為283.5天，平均為430.3天，範圍為25-1845天，多數病例為小於1年即再次發病(圖四)。



圖四、類鼻疽復發間隔時間

討論

人體最初感染類鼻疽伯克氏時，菌體與接觸位置的表皮細胞接合後進入細胞內，並於細胞質中存活與複製，菌體經複製增生後，造成細胞破裂並釋放至胞外，更進一步地感染趨化至發炎部位的吞噬細胞(phagocyte，如PMN及macrophage)，類鼻疽菌同樣可在吞噬細胞中存活及複製[11,12]。此種可同時於吞噬細胞及非吞噬細胞中存活複製的特性，以及可利用特定機制抑制宿主細胞先天性免疫反應，如抑制phagosome-lysosome融合作用和phagosome酸化作用等，提高了類鼻疽菌在宿主細胞中的存活率，在部分病人中有類鼻疽菌持續培養陽性及復發的情形，顯示其PMN功能可能相較正常人低落[13]；此外類鼻疽菌可能利用於細胞內保持休眠狀態的方式進行潛伏以躲避免疫系統，直到宿主因免疫低落而被再度活化，依據病例報導文獻，潛伏期最長甚至可達62年[14]。

Cheng等人於2005年整合了多個類鼻疽相關研究，發現了數個感染類鼻疽的危險因子[1]，包含糖尿病、地中海貧血、腎臟疾病、惡性腫瘤、男性性別、酗酒等，切確之關聯性尚無法確認，但推測正可能與這些因子減弱了吞噬細胞的功能性有關。在部分臨床和實驗室觀察中發現，糖尿病、酒精過量與慢性腎病會削弱PMN發炎反應時的動員、運送、黏附與消化功能[12]。

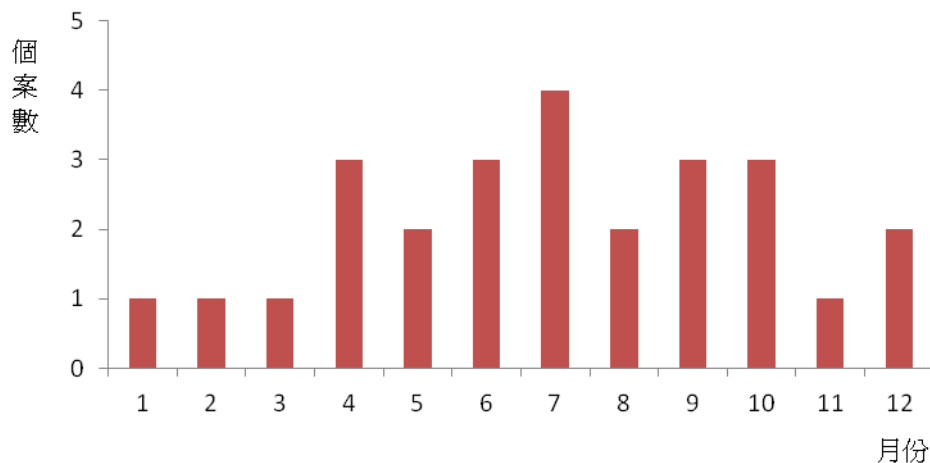
類鼻疽菌本身對多種抗生素具有抗藥性，即使在實驗室培養有效的抗生素，使用在臨床上也不一定有效。疾病管制署對於類鼻疽建議的抗生素治療方式，包含在急性期(intensive phase)使用第三代頭孢子素(ceftazidime)單一藥物靜脈注射，視臨床情況使用2~4週，以及急性期後合併使用多種藥物的清除期(eradication phase)，需長期口服20週的4合1抗生素(4-drug：Chloramphenicol、doxycycline及trimethoprim/Sulfamethoxazole)[15]。不過即便依照建議之抗生素方式治療，仍有大於6%的人會出現再發性感染[6]。而不完整的抗生素療程常造成復發率的增加[16]。

先前文獻顯示，類鼻疽病患在初次感染時，口服治療藥物的種類及服用時間的長短，是影響復發之最主要因子，如amoxicillin-clavulanic療法所造成的疾病復發率，相較於4-drug及3-drug(doxycycline及trimethoprim/Sulfamethoxazole)療法，皆有顯著增加，而口服抗生素12-16週約可減少90%的復發風險[2]。

在本研究中亦檢視潛在疾病是否為引起復發之危險因子，結果發現酒癮有顯著相關性($p = 0.007$)，其原因可能與前述過量酒精可減弱PMN發炎反應時之功能有關，使類鼻疽菌潛伏於細胞中伺機復發。另檢視個案之學歷，希望釐清教育程度是否會影響其醫囑服從性，或對自身疾病之重視度，間接影響抗生素治療成效，不過在單次感染個案的學歷項目，174位中有39位未作答，佔該組22.4%，因此可能影響此項因子在該組之代表性，若以僅有之資料進行分析，亦無顯著之關聯性($p = 5.361$)。

於2008年由Limmathuotsakul等人發展出一個可區分復發與再感染的簡易計分系統[3]，此方法不需分子分型技術，系統的預測因子包含 (I)初次感染時口服抗生素治療時間長短 (II)初次與再發性感染間隔時間長短 (III)雨季與否 (IV)再發性感染時腎臟功能。口服抗生素治療時間及再發性感染間隔時間越短，越可能為復發。反之，若再發性感染發生於雨季，以及發生時的腎臟功能越低，則增加為再感染之可能性。

本研究中初次與再發感染之間隔時間分析，57.7%復發者的發病間隔小於1年，而96%病例集中於3年內復發，僅1例約為5.1年，符合該預測系統之推測，也與其他國家的發現大致相同。不過依據疾病管制署之抗生素治療建議，至少2週之急性期治療以及20週口服維持療法，發病間隔小於22週之案例可能為未治療完全之同次感染，此現象在本研究中26個復發案例中出現2例，分別為3.6及14.3週，且皆來自同一病患，此病患為一42歲發病且患有糖尿病之女性，自2004年首次感染至2013年初死亡，期間血糖控制不佳，以致於引起傷口潰爛、脾腎發炎及截肢，同時期間反覆感染類鼻疽共計送驗10次，也因此長期服用治療類鼻疽之抗生素，是否因此產生抗藥性而造成不斷復發，可再針對該病患之菌株進行更進一步的抗藥性分析。發病月份方面，臺灣之雨季為每年7-9月[17]，但26個復發案例的分布並未集中於此3個月份(潛伏期高峰為9天)，亦符合該預測系統之推測(圖五)。至於抗生素治療與腎功能方面，由於相關資訊未記錄於疫調報告中，無法進一步分析是否符合此預測方法。



圖五、類鼻疽復發發生月份

分子分型結果方面，再次送檢的菌株都與初次感染之菌株相同，表示皆為「復發」而非「再感染」，且其中之18例為第I型，佔90%，第II、III型各為1例，皆佔5%的比例，但是否代表第I型之菌種較易引起復發，或因類鼻疽的流行具有株生(clonality)現象[18,19]，則需比較其他191株未引起再發性感染之菌株分子分型才可定論。此外，屬第III型的第20例個案，初次感染時疫調顯示有越南及柬埔寨之旅遊史，此兩國皆屬類鼻疽之流行區域，可能即是造成該菌株在PFGE分子分型上，與其他菌株差異較大的原因。

綜合以上結果發現，自2004至2012年間，17例再發性感染類鼻疽病例皆為復發，且酒癮可能是造成復發的重要因子之一，此外，抗生素治療對復發之影響雖在本文中無法有明確的發現，但依據過去文獻資料，皆顯示完整之抗生素療程對避免復發是一重要因子，因此建議臨床醫護人員能加強病患完整抗生素療程，並教導患者配合完整療程之觀念，若有酒癮個案，也應加強宣導飲酒對於疾病復發之影響，防疫人員亦可在進行個案疫調時，加強該現象的訪查及相關衛教，以降低疾病復發之風險。

參考文獻

1. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):383-416.
2. Limmathurotsakul D, Chaowagul W, Chierakul W, et al. Risk factors for recurrent melioidosis in northeast Thailand. *Clin Infect Dis.* 2006;43(8):979-86.
3. Limmathurotsakul D, Chaowagul W, Chantratita N, et al. A simple scoring system to differentiate between relapse and re-infection in patients with recurrent melioidosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(10):e327.
4. Lee N, Wu JL, Lee CH, et al. *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 1985 Sep;22(3):352-4.
5. Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, et al. Melioidosis: an emerging infection in Taiwan? *Emerg Infect Dis.* 2001 May-Jun;7(3):428-33.
6. Maharjan B, Chantratita N, Vesaratchavest M, et al. Recurrent melioidosis in patients in northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse. *J Clin Microbiol.* 2005 Dec;43(12):6032-4.
7. Direk Limmathurotsakul , Wipada Chaowagul, Nicholas P. J. Day, et al. Short report: patterns of organ involvement in recurrent melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81(2):335 - 7.
8. Koonpaew S, Ubol MN, Sirisinha S, et al. Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with melioidosis in Thailand. *Acta Trop.* 2000;74(2-3):187-91.
9. Vadivelu J, Puthuchery SD, Drasar BS, et al. Stability of strain genotypes of *Burkholderia pseudomallei* from patients with single and recurrent episodes of melioidosis. *Trop Med Int Health.* 1998;3(7):518-21.
10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
11. Lazar Adler NR, Govan B, Cullinane M, et al. The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis : how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease? *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(6):1079-99.
12. Currie BJ, Fisher DA, Howard DM, et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2000;31(4):981-6.
13. Jones AL, Beveridge TJ, Woods DE. Intracellular Survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun.* 1996;64(3):782-90.
14. Ngaay V, Lemeshev Y, Sadkowski L, et al. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2):970-2.

15. 疾病管制署>傳染病介紹>第四類法定傳染病>類鼻疽>治療照護>治療照護
<http://www.cdc.gov.tw/professional/page.aspx?treeid=BEAC9C103DF952C4&nowtreeid=018CD9C9F57A009C>.
 16. 陳盛生、李欣蓉、顏慕庸等：類鼻疽：臺灣新起的致命性感染疾病。疫情報導 1998;14:47-53。
 17. 周好羚、劉定萍、黃志傑等：2006~2010 年臺灣地區類鼻疽流行病學概況及臨床分析。疫情報導 2013;29:115-22。
 18. Currie BJ, Mayo M, Anstey NM, et al. A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(3):177-9.
 19. Currie B, Smith-Vaughan H, Golledge C, et al. *Pseudomonas pseudomallei* isolates collected over 25 years from a non-tropical endemic focus show clonality on the basis of ribotyping. *Epidemiol Infect.* 1994;113(2):307-12.
-