

2011–2014年臺灣類鼻疽菌分子型別之分析

陳嘉綾*、邱詩惠、慕蓉蓉

摘要

類鼻疽是由類鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)所引起之疾病，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，2005至2010年止，確定病例共256例，多集中於臺灣西南部，以高雄市為最主要盛行縣市。本研究中分析2011至2014年臺灣類鼻疽罹病率，發現期間之盛行區域集中於高屏區，並利用脈衝式電泳，探討114例類鼻疽感染個案菌株之分子型別，發現共可區分為7型，其中4型為自2004年來新出現之型別，而88.6%菌株為第VI型，且集中出現於高屏區，該型亦有成為主流型別的趨勢。臨床上，醫護人員對於有國內外流行區域旅遊史之可疑病患，也應將類鼻疽列入考量。

關鍵字：類鼻疽；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*)所引起之疾病。類鼻疽伯克氏菌為腐生性、具有運動性及嗜氧之革蘭氏陰性桿菌，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。所引起之症狀可為臨床下感染，或因症狀不明顯而被忽略為感冒，較嚴重者可造成肺炎、菌血症，甚至導致死亡。

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%[1]。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[2]。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]。臺灣首例類鼻疽為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[3]。依據文獻，1982至2000年間臺灣通報確診類鼻疽17例，其中4例為境外移入[4]。疾病管制署(以下簡稱疾管署)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。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗

及疫苗研製中心

通訊作者：陳嘉綾*

E-mail : clchen@cdc.gov.tw

投稿日期：2015年06月02日

接受日期：2015年07月06日

DOI : 10.6524/EB.20151208.31(23).002

臺灣在2000至2005年7月之病例均為散發病例，2005年7月因海棠颱風過境，造成二仁溪區域大規模之類鼻疽群聚事件[5]。依疾管署「傳染病個案通報系統」統計，2005至2010年間，全國平均罹患率為每10萬人0.19例，各縣市之類鼻疽平均罹患率最高為高雄市（每10萬人0.893例），其次依序為澎湖縣（每10萬人0.531例）、臺南市（每10萬人0.500例）及屏東縣（每10萬人0.392例），此4縣市每年之平均罹患率一直遠高於其他地區，若以發生病例數分析，同時期類鼻疽確定病例共計256例，其中以高雄市148例為最多，其次依序為臺南市51例及屏東縣21例，此3縣市病例約占全國之85.9%，顯示臺灣西南部為類鼻疽主要盛行區域。亦有研究針對2004至2010年間臺灣類鼻疽病例之菌株進行分子分型，結果顯示共可區分為24型，且其分佈在地理上及時間上呈現特定分子型別聚集之情形，該期間內，第VI、X、XI、XV及XVI型都曾為主要流行之型別，而二仁溪盆地為此病在臺灣之主要盛行區域，可能與颱風造成此區域淹水有關[6-7]。

脈衝式電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)為目前針對大片段DNA進行分子分型的有力工具，可應用於判定類鼻疽群聚事件及時間地域上菌株相關性之分析[6, 8-9]。本研究希望利用PFGE分子分型的方法，分析類鼻疽病例菌株在地域上的分布性，以了解各區域主要盛行之類鼻疽菌分子型別，亦可藉由與過去研究已知之菌株分子分型比較，了解臺灣各地區盛行的類鼻疽菌型別及其分布是否隨時間而有所不同。

材料與方法

一、病例資料來源及菌株

2011至2014年期間類鼻疽確定病例資料取自於疾管署「傳染病個案通報系統」及「傳染病疫情調查系統」，經確認檢驗結果為類鼻疽陽性，且API20NE生化試驗或基因定序鑑定完整之個案，擷取其相關的疫情調查資料，並利用個案之菌株進行分子分型。

二、API20NE生化鑑定

API 20NE(biomérieux, France)用於進一步確認類鼻疽菌株，依據廠商操作說明進行，試驗後所得之電腦編碼再以APIWEB軟體進行分析，確認為類鼻疽菌。

三、基因定序

自類鼻疽鑑定培養基Ashdown agar上沾取2-3個菌落，懸浮於150 µl 二次水中，以100°C水浴滅菌後離心吸取上清液，以此為模板，並針對類鼻疽菌LPS基因特異性片段進行PCR反應，引子F: CTCTCAGATTGC TGACAAACCC, R: CGCATGAACTCGAAATCCACC G, 反應條件為95°C 5分鐘，再以94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 45秒重複進行40個循環，以電泳膠確認產物大小後，進行定序確認為類鼻疽菌。

四、脈衝式電泳(PFGE)分子分型

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 µg/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 µg/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。為與2004至2010年間臺灣類鼻疽病例之菌株分子分型進行比較，基因型之分歧性(diversity)及相關性(relatedness)，則以3% optimization及2% tolerance為參數，選取80%相似性(similarity)加以分析。

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」統計出2011至2014年間類鼻疽之全國年平均罹病率為每10萬人0.135例，確定陽性個案共128例（表一），全國22個縣市中有14個曾出現陽性病例，各縣市之類鼻疽平均罹患率最高為高雄市（每10萬人0.868例），其次依序為澎湖縣（每10萬人0.505例）和屏東縣（每10萬人0.260例），且全國僅此3縣市高於全國年平均罹病率。若以病例數分析，以高雄市96例佔第一位，其次依序為屏東縣9例，臺中市6例與臺南市5例，此4縣市病例約占全國之90.6%。其中臺南市相較2005至2010年，不論罹病率或病例數排序，在2011至2014年間皆呈現下降之情形。

若以臺灣六大區域區分以了解類鼻疽病例區域分布，圖一顯示2011至2014年期間，確定病例皆主要集中出現於高屏區（高雄市、屏東縣和澎湖縣），其次依序為中區（臺中市、彰化縣和南投縣）、南區（雲林縣、嘉義縣市及臺南市）、臺北區（基隆市、臺北市、新北市、宜蘭縣、金門縣和連江縣）、北區（桃園縣、新竹縣市和苗栗縣）及東區（花蓮縣和臺東縣）。

以上結果顯示，高雄市不論在罹病率或病例數，皆為全國最高之縣市，若以區域區分，則以高屏區為最高。

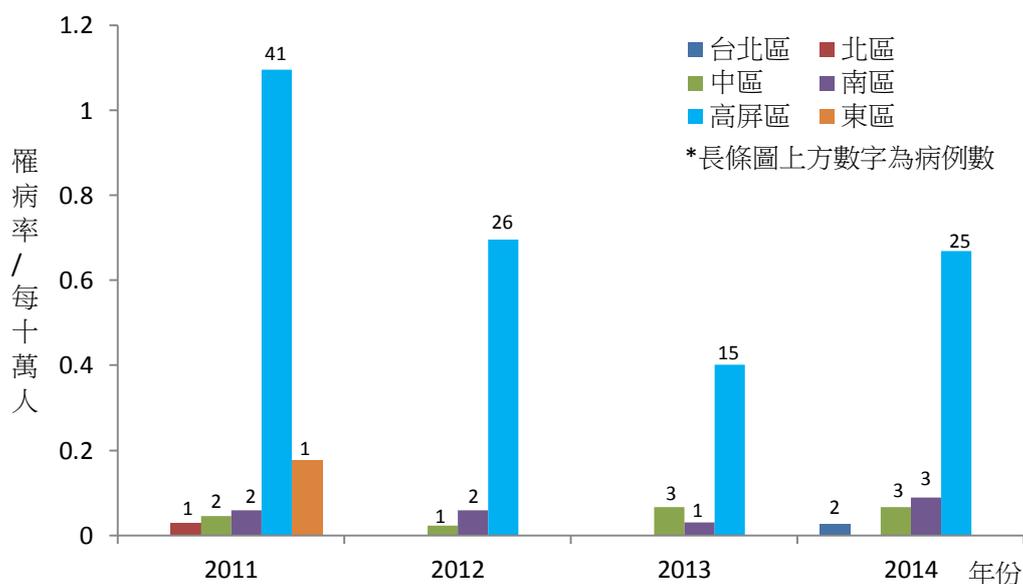
表一、台灣各縣市 2005–2014 年類鼻疽罹病率及病例數統計

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2005-2010		2011-2014		2005-2014	
											平均罹病率	總病例數	平均罹病率	總病例數	平均罹病率	總病例數
台北市	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.040/1	0.000	0	0.010	1	0.004	1
新北市	0.027/1*	0.027/1	0	0.080/3	0	0	0	0	0	0.030/1	0.022	5	0.008	1	0.016	6
桃園縣	0.054/1	0	0.050/1	0	0.050/1	0.050/1	0.050/1	0	0	0	0.034	4	0.013	1	0.025	5
新竹縣	0	0	0	0.200/1	0	0	0	0	0	0	0.033	1	0	0	0.020	1
台中市	0.078/2	0.039/1	0.039/1	0.115/3	0.038/1	0	0.040/1	0.040/1	0.040/1	0.110/3	0.051	8	0.058	6	0.054	14
南投縣	0	0	0.190/1	0	0	0	0	0	0.190/1	0	0.032	1	0.048	1	0.038	2
彰化縣	0	0.076/1	0.080/1	0	0	0.080/1	0.080/1	0	0.080/1	0	0.039	3	0.040	2	0.040	5
雲林縣	0	0.137/1	0	0	0	0.140/1	0	0.140/1	0	0	0.046	2	0.035	1	0.042	3
嘉義市	0	0	0	0	0.370/1	0	0	0	0	0.370/1	0.062	1	0.093	1	0.074	2
嘉義縣	0	0	0	0	0	0.180/1	0	0.190/1	0	0	0.030	1	0.048	1	0.037	2
台南市	1.397/26	0.214/4	0.375/7	0.267/5	0.480/9	0.267/5	0.110/2	0	0.050/1	0.110/2	0.500	56	0.068	5	0.327	61
高雄市	1.490/41	0.472/13	0.253/7	1.048/29	0.939/26	1.154/32	1.410/39	0.760/21	0.540/15	0.760/21	0.893	148	0.868	96	0.883	244
屏東縣	0.445/4	0.670/6	0.340/3	0.340/3	0.450/4	0.110/1	0.230/2	0.460/4	0	0.350/3	0.392	21	0.260	9	0.340	30
澎湖縣	0	1.085/1	0	0	1.060/1	1.040/1	0	1.020/1	0	1.000/1	0.531	3	0.505	2	0.521	5
花蓮縣	0	0	0	0	0.290/1	0	0	0	0	0	0.048	1	0	0	0.029	1
台東縣	0	0	0	0	0	0.430/1	0.440/1	0	0	0	0.072	1	0.110	1	0.087	2
全國	0.33/75	0.12/28	0.09/21	0.19/44	0.19/44	0.19/44	0.20/47	0.12/29	0.08/19	0.14/33	0.190	256	0.135	128	0.17	384

1.*：罹病率/病例數

2. 罹病率：病例數/每十萬人

3. 基隆市、新竹市、苗栗縣、宜蘭縣、金門縣、連江縣在此期間中無病例



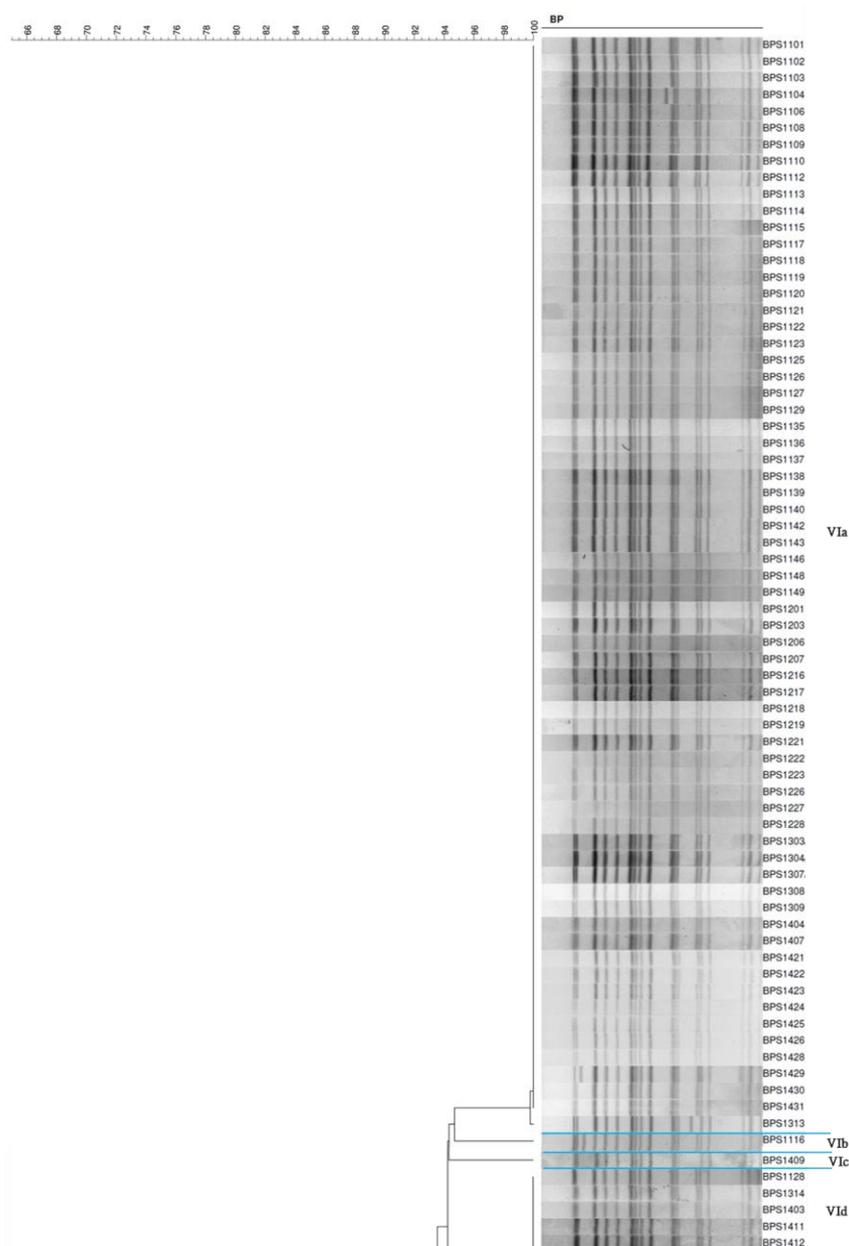
圖一、2011–2014 年類鼻疽各區發生情形

二、菌株

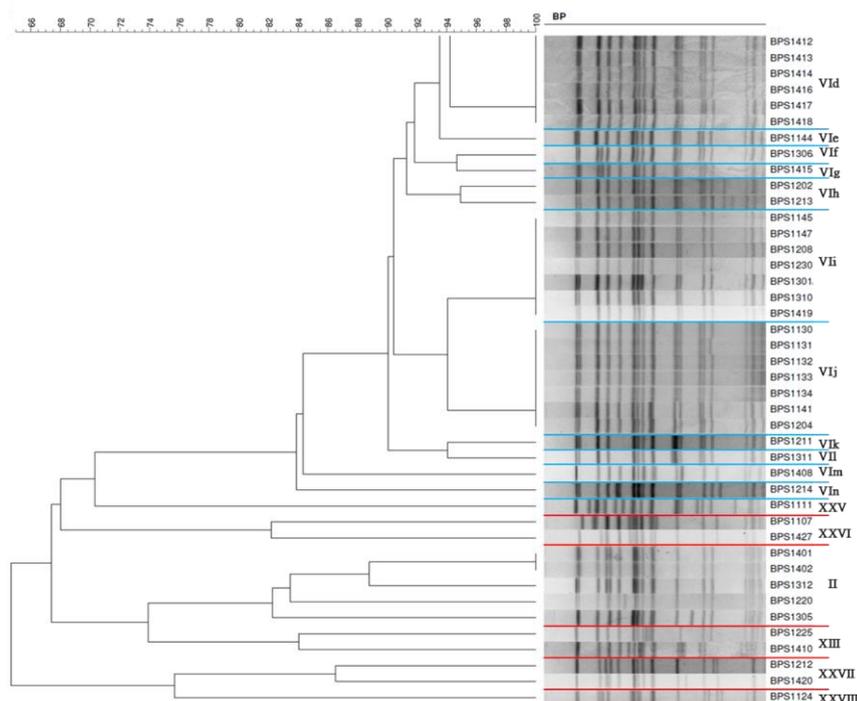
自前述128例個案中，篩選出本實驗室保有菌株，以API20NE生化試驗或基因定序鑑定完整之個案，並刪除同一人重複送檢之個案後，本研究將以114例個案共114株菌株進行PFGE分子分型，其中3例為有國外旅遊史之本國人，3例為泰國籍。

三、脈衝式電泳(PFGE)

利用 PFGE 分析選定之 114 株菌株 (圖二), 並以 80% 相似性比較彼此間的分子型相關性, 發現主要可區分為 7 型, 經由與 2004 至 2010 年臺灣類鼻疽病例之菌株分子分型進行比較[7], 可發現本研究中有 3 個型別曾於 2004 至 2010 年中出現, 包含第 II、VI 及 XIII 型, 在本文中將使用相同型別編號, 而其餘 4 型為自 2004 年來新發現之型別, 接續編號為第 XXV–XXVIII 型。其中 101 例同屬第 VI 型, 5 例屬第 II 型, 第 XIII、XXVI 及 XXVII 型各有 2 例, 而第 XXV 及 XXVIII 型皆僅有 1 例。而第 VI 型若以 95% 相似性進一步分析, 可再區分為 14 群(VIa–VIh), 其中 VIa 群共 66 例, 佔第 VI 型之 65%。故臺灣以第 VI 型最常見, 又以其 VIa 群為最多。



圖二、脈衝式電泳分子分型結果



圖二(續)、脈衝式電泳分子分型結果

四、分子型之地理分布情形

在曾有陽性個案出現之14個縣市中（表二），第VI型出現在其中12個縣市，並以高雄市80例為最多，其次為屏東縣有8例，最北的縣市為新北市，但未於其以北之縣市及東部發現，可見第VI型集中出現於高屏地區。而病例數占第二位的第II型，則出現在臺中市（2例）、臺南市（2例）及澎湖縣（1例），第XIII、XXVI及XXVII型各有2例，第XXV及XXVIII型則各為1例，分別來自高雄市及臺東市，其中第XXV與XXVI型此3例個案皆來自泰國，且未有本國人屬於此二種型別。以縣市角度分析，僅臺中市、臺南市、高雄市、屏東縣與澎湖縣有2種以上之型別，而彰化縣2例個案為同一分子型，其他縣市則因僅有1例個案而為單一分子型。

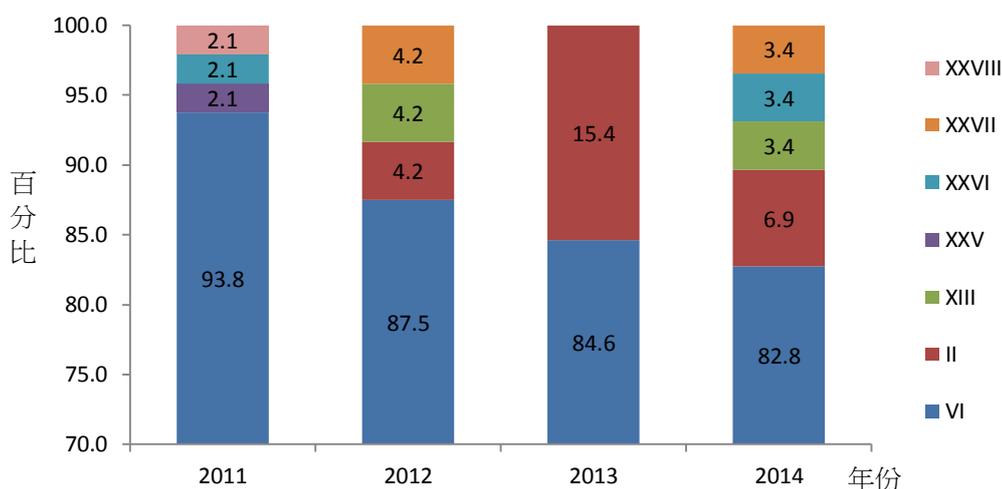
表二、臺灣地區類鼻疽菌*SpeI* PFGE分子分型縣市分布情形

縣市/分子型	II	VI	XIII	XXV	XXVI	XXVII	XXVIII	總計
臺北市						1		1
新北市		1						1
桃園縣		1						1
臺中市	2	2			1*			5
南投縣		1						1
彰化縣		2						2
雲林縣		1						1
嘉義市		1						1
嘉義縣		1						1
臺南市	2	2			1*			5
高雄市		80	1	1*				82
屏東縣		8	1			1		10
澎湖縣	1	1						2
臺東縣							1	1
總計	5	101	2	1*	2*	2	1	114

*表示非本國人

五、分子型之時間分布情形

2011至2014年間各型別出現比例之分布（圖三），除第VI型可見於4年間任一年份外，其餘型別於其中1–3年中出現，且各年度皆以第VI型為最主要之型別。近年因第VI型以外之型別案例出現增多，因而造成第VI型之比例有逐年略為下降之趨勢。



圖三、2011–2014年類鼻疽菌分子型別分析

討論

在臺灣，類鼻疽以西南部地區為主要盛行地區，且穩定地集中出現於臺南市、高雄市、屏東縣及澎湖縣，其他縣市則多為偶發型之病例。臺中市近年罹病率雖低，但有穩定發生病例之現象。2005年因海棠颱風過境，造成位處二仁溪盆地旁的臺南市及高雄市病例大量增加，但其中臺南市相較於2005至2010年，近4年之罹病率則已顯著下降($p = 0.048$)，使2011至2014年之盛行區域集中於高屏區。

第VI型為臺灣類鼻疽最主要之型別，佔本研究所分析之4年期間所有菌株的88.6%，若將第VI型以95%相似性加以分析，可再區分為14個群，以VIa群為最多數，佔第VI型之65%，VIId群佔9.9%為第二位，VIi及VIj群則皆佔6.9%，且此4群個案皆來自罹病率高於全國平均值之縣市，包含高雄市、屏東縣、澎湖縣及臺南市，或來自案例數較多的臺中市，惟VIa群其中2例來自彰化縣(BPS1104及BPS1313)，此2菌株雖經軟體分析後歸為VIa群，但由PFGE圖譜可發現其與該群其他菌株比較，皆有1個條帶明顯位移之微小差異，而VIj群中BPS1301菌株來自桃園縣，但該個案之通報縣市為高雄市，推測可能有其他未記載於疫調系統之接觸機會，另VIi群中有1個案則來自南投縣(BPS1301)，其餘群組則多為僅有單一個案。綜合以上，可發現臺灣以第VI型為最主要型別，且在罹病率明顯不同之區域間，分子型別仍有些微的差異性。

來自臺北市的個案自述，曾在潛伏期期間至墾丁、知本及花蓮的海灘步行及爬山，其分子型屬第XXVII型，本研究中此型別共計2例，另1例來自屏東縣車城鄉，與臺北市個案潛伏期之活動區域有重疊情形，推測本例雖居住於臺北市，但可能於墾丁活動時感染類鼻疽。第XXVIII型之個案來自臺東縣，而該型別未於其他縣市出現，且與第VI型之相似性僅約65%，為所有本土個案中最低。已有文獻指出，受到類鼻疽菌汙染的水源是傳播該疾病之有力媒介，並與病例數增加呈現正相關性[10]，故推測此現象可能因中央山脈在地形上為東西部水系之分水嶺，使臺東縣與臺灣西南部縣市各自屬於不同之水系所致。

111例本國籍個案中，有3例具國外旅遊史，分別為泰國、柬埔寨吳哥窟及中國武夷山，其中具泰國及柬埔寨旅遊史之個案亦屬於第VIa型，而具中國旅遊史之個案來自新北市，曾在武夷山當地從事山林或野地活動，其菌株之分子型雖亦屬於第VI型，但為此型中相似度較低的VI_m群，相似性約為84%，不能排除在中國感染之可能性。但此3例個案因無法與各國當地之菌株進行比對，故無法完全確認其感染地。

本研究之114個案中有3人為泰國籍外籍人士，其分子型分屬第XXV及XXVI型，且無任一本國人屬於此二個型別，此外與臺灣的主要型別第VI型相似性較低，分別約為68%及70%，而這二個型別彼此的相似性為68%。在一個泰國東北部37例本土散發性類鼻疽的研究中可發現[11]，若以65%相似度檢視，可區分為4個分子型別，以50%相似度區分則有75.7%的案例屬於同一型別，但若相同地以65%相似度檢視本研究中之臺灣類鼻疽菌株，則皆屬於同一型別（皆使用*SpeI*, Dice Coefficient進行分析），推測泰國本地菌株分子型彼此間相似性可能較臺灣本地菌株間低，較具多樣性，且臺灣與泰國所流行之分子型別相似度可能偏低。

Chen YL等人曾發表有關2004至2010年臺灣本土類鼻疽菌分子型分析之研究[6]，該文中第VI型為2004年最主要之流行型別，約佔該年型別之30%，2005年約為22%，但2006年起則不見該型別或比例相當低，而由本研究中結果顯示，自2011年起該型又再度成為主要型別，並持續至2014年，推測臺灣主要盛行之型別有轉換之現象，且第VI型自2011至2014年皆維持80%以上出現比例，顯示有成為主流型別(predominant type)的趨勢。該文中也指出，第VI型可同時於人體及土壤中發現，病例主要散布於南臺灣二仁溪沿岸，亦可於南臺灣及中臺灣的土壤中分離，為在人體及土壤中分布最廣的型別之一，而2005、2006、2009年的主要流行型別（分別為第XV、X及XI型），則皆不易自土壤中分離，已有文獻指出，土壤中可發現類鼻疽菌的區域，通常該疾病的發生率會隨之提高[7]，推論土壤對類鼻疽菌之保存及傳播可能扮演一定之角色，使易在土壤中分離的型別，藉由土壤的保存而造成後續流行，此即可能為第VI型成為主流型別之原因，反之，礙於類鼻疽不易直接人傳人的特性，造成再次流行之能力則較低，例如在2004至2010年的研究中，有多數病患來自茄苳區，但多為感染不易自土壤中分離之型別，故在本研究中，僅4例來自該區，且分子型皆為本文中的第VI型，而非該期間該區之主要盛行型別。

由型別與出現年分之比對，可見近年出現之其他型別雖略為增加，但仍以第VI型仍為最主要之流行型別，無主要流行型別轉換之現象。

在API20NE方面，因類鼻疽菌具有將硝酸鹽(nitrates)還原產生NO₂或N₂的能力，但無法產生indole以及無法發酵葡萄糖，因此編碼中的第一碼通常為1，但已有文獻顯示，少數情況下會有第一碼為0的情形發生[12]，顯示已有還原硝酸鹽能力產生變異之類鼻疽菌出現，在本研究中共有4例有此特性，且皆屬於第II型，推測還原硝酸鹽能力變異之菌株較易出現於此型別。

綜合以上結果，2011至2014年臺灣類鼻疽之盛行區域集中於高屏區，而菌株可區分為7種分子型別，其中4型為自2004年來新出現之型別，而第VI型為2011至2014年最主要型別，仍主要出現於高屏區，故臺灣類鼻疽在地理上呈現特定分子型別聚集之情形，且第VI型有成為主流型別的趨勢。臨床上，醫護人員對於有國內外流行區域旅遊史之可疑病患，也應將類鼻疽列入考量。

誌謝

感謝劉好嫩小姐於PFGE之協助，以及各醫療院所的醫護人員以及各縣市衛生局所同仁協助資料通報與檢體採集送驗。

參考文獻

1. Limmathurotsakul D, Chaowagul W, Chierakul W, et al. Risk factors for recurrent melioidosis in northeast Thailand. *Clin Infect Dis*. 2006;43(8):979-86.
2. 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.
3. Lee N, Wu JL, Lee CH, et al. *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 1985;22(3):352-4.
4. Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, et al. Melioidosis: an emerging infection in Taiwan? *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):428-33.
5. 吳智文、李翠瓊、簡大任等：颱風過後南台灣類鼻疽群聚感染病例之分析。疫情報導 2006;22(11):728-45。
6. Chen YL, Lin YC, Chen YS, et al. Characterisation of predominant molecular patterns of *Burkholderia pseudomallei* in Taiwan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107(3):165-9.
7. Su HP, Yang HW, Chen YL, et al. Prevalence of melioidosis in the Er-Ren River Basin, Taiwan: implications for transmission. *Clin Microbiol*. 2007;45:2599-603.
8. Chua KH, See KH, Thong KL, et al. DNA fingerprinting of human isolates of *Burkholderia pseudomallei* from different geographical regions of Malaysia. *Trop Biomed*. 2010;27(3):517-24.

9. Inglis TJ, Garrow SC, Adams C, et al. Acute melioidosis outbreak in Western Australia. *Epidemiol Infect.* 1999;123(3):437-43.
10. Dai D, Chen YS, Chen PS, et al. Case cluster shifting and contaminant source as determinants of melioidosis in Taiwan. *Trop Med Int Health.* 2012;17(8):1005-13.
11. 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.
12. Amornchai P, Chierakul W, Wuthiekanun V, et al. Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3774-6.