

2016年臺灣霍亂弧菌之監測與分析

邱淑君、林智暉、陳光燾、邱乾順*

摘要

本研究以法定傳染病監測系統與實驗室診斷結果，分析2016年我國霍亂之檢驗、受感染者流行病學資訊及分離菌株基因型別。結果自60件疑似霍亂個案與170件個案接觸者總計230件臨床檢體及122件醫療院所分離疑似菌株中，有11株產毒性O1群小川型(O1-Ogawa)霍亂弧菌；其中9株來自病例，2株來自某病例之無症狀家人。11位受感染者有7名男性與4名女性，年齡介於13至82歲，6位65歲以上受感染者中有5位(83.3%)具有糖尿病或高血壓等慢性病史。患者均有食用未煮熟之海鮮(包括生魚片)或生熟食砧板未分開等容易導致霍亂弧菌污染的食材處理方式。唯飲食溯源調查，均並未能追查到確切的感染源。菌株經PulseNet標準化脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)之圖譜送至美國疾病管制中心進行比對，發現關島、菲律賓、韓國等地均有偵測到具相同VcN09.012:VcX01.015基因型圖譜之菌株，推測此菌株可能已廣泛分布於環太平洋海域。台灣的環境以及公共衛生條件均達已開發國家水準以上，民眾只要確實做好自身衛生管理，避免生食易帶菌之食材，烹飪器材確實落實生熟食分開，便可有效避免感染。

關鍵字：霍亂弧菌、O1-Ogawa

前言

霍亂屬急性細菌性腸道傳染病，在我國歸屬於第二類法定傳染病，是國際間公共衛生管理重點監測疾病之一。霍亂的致病原為霍亂弧菌，雖屬於海洋弧菌的一種，主要生存在海水與河海口，但霍亂弧菌仍可生存於淡水，因此容易引發大規模流行感染。霍亂弧菌隨著病人或帶菌者之糞便或嘔吐物污染食物或飲水，

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：邱乾順*

E-mail：nipmcs@cdc.gov.tw

投稿日期：2017年05月17日

接受日期：2017年07月19日

DOI：10.6524/EB.20171107.33(21).001

感染主要是食用未煮熟受污染的水產品（特別是貝類或甲殼類）或生熟食交叉污染的食物與受污染的飲水。感染後發病與否也與食入之菌量以及人體的免疫力有關，特別是老年人、慢性病患者，以及免疫功能不全者，均為高危險群[1]。發病潛伏期為數小時至5天。症狀為無痛性大量米湯樣水性腹瀉(rice water stool)、嘔吐、快速脫水以及循環衰竭等，病情輕重程度因人而異。霍亂弧菌自1817年便已發生過全球性的大流行，當時造成百萬人喪生。自1961年印度霍亂大流行鑑定出O139血清型至今，霍亂弧菌依其脂多醣體O抗原種類分型，目前已有超過200種的O血清型被鑑定出，其中O1與O139兩種血清型曾引發大規模的流行[2]。

近年來全球持續爆發霍亂疫情。2016年在非洲包括索馬利亞、南蘇丹、肯亞等，以及亞洲葉門均有大規模的霍亂流行。在美洲則有多明尼加、海地、厄瓜多以及墨西哥等出現霍亂病例[3]。我國鄰近國家菲律賓出現霍亂流行，至2016年10月中共累計約1萬4千例疑似病例，有56例確診病例。2017年2月底又在維薩亞斯群島(Visayas)之中部薄荷島(Bohol)及宿霧省卡內薩島又再度爆發霍亂疫情，至少有100人確診為霍亂病例[4]。位於高緯度的韓國也於2016年8月檢測到該國15年來第一例本土霍亂病例[5]，並於2017年2月再公布一例自菲律賓移入之霍亂個案，顯示霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*)在我周邊鄰國有日趨活躍的現象。我國自2004年至2013年十年間，有515例經疾病管制署（以下簡稱疾管署）檢驗鑑定為霍亂弧菌感染，其中有28例為產霍亂毒素(cholera toxin)的霍亂弧菌[6]，因此過去十年平均每年只有不到3例法定霍亂病例。而2014年確定病例為4例，2015年增加為10例，2016年亦有9例霍亂確定病例，顯示霍亂有增加趨勢[7]。

霍亂的發生與傳播與公共衛生息息相關，我國在公共衛生條件已達開發國家水準，但仍有民眾因警覺心不足並缺乏良好飲食及烹煮習慣，每年仍有散發性霍亂病例出現。本文描述2016年我國霍亂之檢驗、受感染者疫情調查結果及分離菌株之基因型別分析等，希望透過本文喚起臺灣社會大眾對於霍亂的警覺與防範。

材料與方法

一、霍亂檢體送驗與鑑定

霍亂在我國被指定為第二類法定傳染病，醫療院所依傳染病防治法須通報疑似霍亂病例與送驗疑似患者檢體或分離菌株至疾管署進行檢驗、鑑定與分析。疑似病例人口學資料亦經由網路通報至疾管署之「法定傳染病監測系統(National Notifiable Disease Surveillance System)」。霍亂檢體種類包括疑似患者與接觸者的糞便與醫療院所分離之菌株。糞便檢體送達實驗室後，以1% NaCl 的 peptone water 中增菌 6–8 小時之後，再將增菌液接種於 TCBS (thiosulfate citrate bile salt sucrose) 固態選擇性培養基，於 37°C 培養 16–18 小時後，挑取黃色疑似菌落，再次培養於 TSA (tryptic soy agar) 培養基，以獲得

新鮮菌落並進行後續鑑定。醫療院所檢出之疑似霍亂菌株，經次培養純化後重新鑑定；鑑定為霍亂弧菌之菌株，再進行血清型別分型、毒素、毒素基因檢測與基因型別分析。

二、霍亂菌株血清型別鑑定

菌株之血清鑑定依照疾管署標準檢驗方法進行[8]，分別取 TSA 培養基上的新鮮霍亂弧菌與 O1 群和 O139 群血清(Seiken, Tokyo, Japan) 進行凝集試驗，與 O1 群血清有凝集反應者，再以 Ogawa 及 Inaba 型別抗血清進行凝集反應以確認其血清型。Non-O1, non-O139 菌株則不再鑑定其血清型別。

三、霍亂菌株毒素及毒素基因檢測

O1 血清型別菌株先培養於 TSA 培養基，新鮮菌株再接種入 CAYE broth 培養基，依照疾管署標準檢驗方法進行霍亂毒素檢測。新鮮菌體進行 DNA 純化後，亦依照疾管署標準檢驗方法進行 PCR 擴增反應，以偵測霍亂毒素 A 與 B 單元基因片段，再以膠體電泳確認菌株 PCR 擴增產物 (*ctxA* 與 *ctxB* 毒素基因擴增片段長度分別為 380 bp 以及 548 bp) [8]。

四、霍亂菌株基因型別分析

菌株以 PulseNet 標準化脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)方法進行分析[9]，分別使用 *NotI* 與 *SfiI* 兩種限制酶切割基因體 DNA，進行膠電泳產生基因圖譜。PFGE 圖譜利用 BioNumerics 軟體 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)進行 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)演算[10]，建構出親緣關係樹，分析菌株間分子關聯性。同時將基因圖譜資料傳送至美國疾病管制中心進行比對，以了解臺灣分離菌株與環太平洋周邊國家之霍亂弧菌型別差異。

五、霍亂陽性個案疫情調查

霍亂陽性個案之疫情調查資料來自於疾管署各區管中心人員，會同各轄區衛生局所人員，前往個案住家及飲食場所進行訪視及調查後，由區管中心各業務承辦人彙整後產出之疫調報告。

結果

2016年疾管署共檢驗60件疑似霍亂個案與170件個案接觸者，總計230件臨床檢體，以及122件醫療院所分離之疑似菌株。結果自6件糞便或肛門拭子檢體分離出霍亂弧菌；122株疑似菌株中有119株確認為霍亂弧菌（表一）。總計125株霍亂弧菌株中，15株為O1群小川型(O1-Ogawa)霍亂弧菌，當中11株為產毒性霍亂弧菌；這11株產毒性霍亂弧菌，有9株來自病例人體檢體，2株來自一病例之無症狀家人，因此2016年有9例符合法定霍亂病例定義。110株non-O1, non-O139之霍亂弧菌中，58株為腸道檢出之霍亂菌株；另外52株為來自包括血液、痰液、膽汁等其他非腸道來源之霍亂菌株，不符合我國法定霍亂病例之通報定義（表一）。

表一、2016 年疑似霍亂弧菌送驗檢體來源以及檢驗結果統計

檢驗結果	陽性數	
	糞便／肛門拭子／其他* (N = 230)	疑似菌株 (N = 122)
	n (%)	n (%)
產毒性 O1-Ogawa	2 (0.8)	9 (7.4)
非產毒性 O1-Ogawa	0	4 (3.3)
Inaba	0	0
O139	0	0
腸道檢體檢出之 Non-O1, non-O139	4 (1.7)	54 (44.2)
非腸道檢體檢出之 Non-O1, non-O139	0	52 (42.6)

*其他檢體種類包含水及嘔吐物。

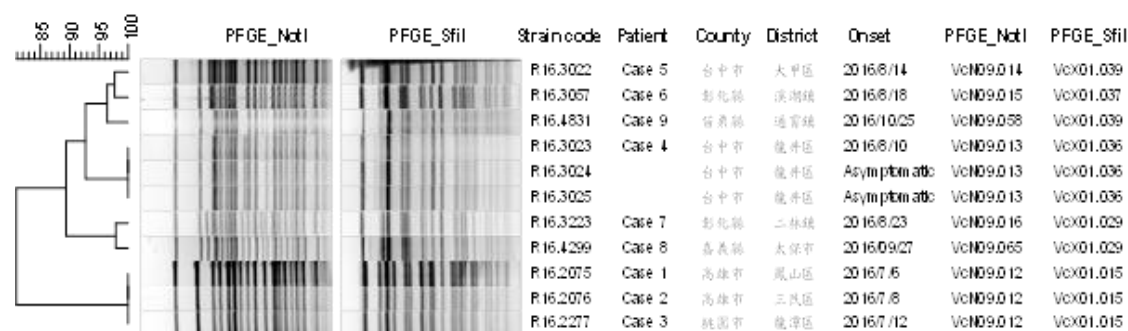
2016 年 9 例產毒性霍亂弧菌確診個案均為本土案例。包括臺中市、彰化縣與高雄市均分別為 2 例，桃園市、苗栗縣及嘉義縣各有 1 例。其中臺中市出現一起家庭群聚感染案件，個案的 2 名家庭成員糞便檢出病原菌，但未出現腹瀉等症狀，為非顯性感染者。11 位受感染者有 7 名男性與 4 名女性，年齡介於 13 至 82 歲。6 位 65 歲以上受感染者中有 5 位(83.3%)具有糖尿病或高血壓等慢性病史。臨床症狀以水樣便腹瀉及嘔吐為主（表二）。疫調結果顯示 11 位霍亂感染者飲用水均有經過煮沸或過濾，在發病前均有食用未煮熟之魚蝦貝類等海鮮食材，在家烹飪以及赴外飲食之餐館或餐廳亦多有生熟食砧板未分開的情形。這些陽性個案之食材來源並未發現有共通處，僅臺中群聚之 3 位受感染者（包含個案及 2 位無症狀接觸者）均食用自家烹飪食材。

表二、2016 年產毒性 O1 群小川型霍亂弧菌感染者人口學資訊及臨床症狀統計

編號	身分	性別	年齡	住所	症狀	慢性病史
1	個案	男	48	高雄	腹痛、嘔吐、水樣便	無
2	個案	女	65	高雄	腹瀉	高血壓
3	個案	女	13	桃園	腹瀉、嘔吐、發燒	無
4	個案	女	73	臺中	腹痛、嘔吐、水樣便	糖尿病、高血壓
5	接觸者	男	76	臺中	無	糖尿病、高血壓
6	接觸者	男	52	臺中	無	無
7	個案	男	82	臺中	水樣便、腹痛	慢性阻塞性肺疾(COPD)、 B 型肝炎帶原、免疫疾病
8	個案	男	68	彰化	嘔吐、水樣便	糖尿病、部分胃切除
9	個案	男	53	彰化	嘔吐、水樣便	糖尿病
10	個案	男	17	嘉義	腹痛、水樣便	無
11	個案	女	65	苗栗	嘔吐、水樣便	無

2016 年 11 株產毒型 O1 群小川型霍亂弧菌菌株以 *NotI* 以及 *SfiI* 兩種限制酶進行切割分析，產生 7 種 PFGE 基因型別，分別有 2 組各有 3 株菌株具有相同基因型別，其它 5 株菌株分屬不同基因型別（圖一）。使用菌株 PFGE 圖譜進行群組分析(clustering analysis)，結果顯示 7 種基因型別分屬 2 個明顯不同的群組。7 月份出現於高雄市與桃園市的 3 名病例，其菌株具有相同基因型別（PFGE 基因型

VcN09.012: VcX01.015)，而臺中市龍井區家庭群聚感染的 3 株菌株亦有相同基因型別 (PFGE 基因型 VcN09.013: VcX01.036)。進一步將 PFGE 圖譜至美國疾病管制中心進行比對，發現其霍亂菌株基因圖譜庫內有 11 株具有「VcN09.012 與 VcX01.015」之基因圖譜；這些基因圖譜的菌株分別來自關島、菲律賓與 2016 年韓國某病例，由此比對結果推測此菌株可能已廣泛分布於環太平洋海域。



圖一、2016 年產毒性 O1 群小川型霍亂弧菌遺傳關係樹圖與對應之 PFGE 圖譜 (遺傳關係樹圖使用菌株之 PFGE_NotI 與 PFGE_SfiI 圖譜，以 UPGMA 演算法所建構)

討論

近年來由於全球暖化，溫室效應導致海水溫度逐年上升，推測可能是全球霍亂弧菌再度活躍流行的原因之一[11,12]。霍亂疫情發生，除了可能是當地的公共衛生或飲水系統出現問題以外，環境的驟變或民眾飲食習慣也有很大的關聯。海地在大地震以前已數十年沒有霍亂流行，然而 2010 年發生大地震，聯合國部隊進入該地協助救援，卻也帶進了霍亂弧菌。由於海地缺乏完善的公共衛生基礎建設，導致霍亂弧菌污染水源，至今疫情仍持續不斷[12,13]。霍亂弧菌主要存在淡海水交界水域，臺灣是位於亞熱帶的海島，漁產豐富，漁產貝類帶有霍亂弧菌的機率也相對較高[14]。2016 年檢出之 11 位產毒型 O1-Ogawa 霍亂弧菌感染者，轄區衛生局進行調查發現患者均有食用未煮熟之海鮮（包括生魚片）或生熟食砧板未分開等容易導致霍亂弧菌污染的食材處理方式，只是衛生局的溯源調查，均並未能追查到確切的感染來源，是值得加強改善之處。2016 年臺灣的霍亂病例仍屬於散發性的感染事件，非公共衛生環境崩壞所導致的流行。確實做好衛生管理，避免生食易帶菌之食材，便可有效避免感染。

2016 年 9 例 O1-Ogawa 霍亂弧菌感染案例中，有 1 例包含其同住家屬發生家庭群聚感染。患者為具慢性病史之 72 歲女性，然經採檢家庭接觸者檢驗，同住之個案 74 歲丈夫與 50 歲兒子雖無症狀，但糞便檢體亦分離出產毒性 O1 群小川型霍亂菌株。該案家裡經營燒烤店，疫調報告顯示，該案可能由於處理食材時，生熟食砧板未分開使用導致交叉污染[15]。2012 年彰化縣亦發生一起類似的家庭群聚感染案件，該案患者為一對從事蜆貝養殖的老夫妻，其中丈夫具慢性病史，推測因食用了未煮熟或生熟食交叉污染的自家生產貝類而導致感染[16]。兩案相似

之處包括：案主均為高風險且具慢性病史之高齡族群，均有接觸海鮮貝類之高風險食材，以及有生熟食砧板未分開使用之烹煮習慣。調查結果顯示，類似的家庭群聚事件是可以避免的，民眾若能養成良好的飲食及烹飪習慣，高風險族群能避免生食海鮮貝類，在烹調食物的過程中保持手部清潔，尤其是處理生熟食的砧板與廚具確實分開，便可大幅降低霍亂感染風險[17]。

我國的霍亂檢驗主要偵測曾引發大規模流行的 O1、O139 兩種血清群菌株，其他型別的霍亂菌株則採取 WHO 監測規範，將菌株判定為 non-O1, non-O139 陽性非法傳霍亂結案。近年來多篇研究顯示，有些 non-O1, non-O139 血清型霍亂也會產生毒素，並造成群突發疫情，包括美國在 2003 到 2007 年間在喬治亞州、阿拉巴馬州以及南卡羅來納州均有發生產毒性 O75 型霍亂弧菌感染的案例，且之後佛羅里達州在 2011 年 3 月至 4 月間也發生產毒性 O75 型霍亂疫情，共有 10 例患者遭到感染[18]。佛羅里達州也曾發生民眾因食用牡蠣，以及紐澤西州因食用蛤蜊而感染產毒性 O141 型霍亂弧菌致病[19]。2016 年我國共有 110 株霍亂菌株為 non-O1, non-O139 型別，除了其中 52 株(47.3%)由於並非腸道檢出，非屬霍亂病例定義；另外 58 株(52.7%)由腸道檢出之 non-O1, non-O139 霍亂弧菌感染患者均有出現腹瀉、嘔吐等症狀。未來可考慮監測腸道檢出之 non-O1, non-O139 霍亂菌株，進行毒素、血清型別與基因型別檢測，以了解 O1、O139 以外的致病性霍亂弧菌，也可解決長久以來，染病民眾以及送驗機關對於非法傳霍亂的型別判定疑慮。

近年來分子生物技術應用於細菌檢驗的頻率大幅增加，尤其是 PFGE 是常用於食因性細菌疾病監測與突發疫情的關聯性分析黃金標準(gold standard)，可建立菌株短時距演化親緣關係，作為突發疫情流病調查的分型工具[20]。利用 PFGE 圖譜分析 11 株產毒型 O1-Ogawa 霍亂弧菌株，有助於解釋流行病學調查的結果：(1)臺中家庭群聚感染案 3 名感染者之菌株具有相同 PFGE 基因型別(VcN09.013: VcX01.036)，基因分型結果支持該家群成員是攝食同一污染食物而遭致感染的流病分析結果；(2) 7 月高雄 2 例與桃園 1 例之菌株有相同基因型別(VcN09.012: VcX01.015)，這三例皆曾生食魚肉，雖然攝食地點不同，卻有可能吃到同批或同區域受污染的進口海魚；(3)其他 5 病例調查無流病關聯，其菌株也呈現不同基因型別，支持這些病例是散發性感染的流病分析[9]。疾管署使用國際食媒疾病分子分型監測組織—PulseNet 的菌株標準化 PFGE 分析方法，產生之 PFGE 圖譜可跨實驗室進行比對，有助於國際間交換流行菌株圖譜資料，進行國際防疫合作。在 2016 年 7 月病例出現後，疾管署即傳送菌株圖譜資料至美國疾病管制中心進行比對，發現該機構之霍亂菌株基因圖譜庫內有 11 株具有相同圖譜(VcN09.012 與 VcX01.015)，相同基因圖譜的菌株分別來自關島、菲律賓與韓國 2016 年某病例，由此推測此菌株可能已廣泛分布於環太平洋海域。因貿易全球化貨物快速流佈，氣候變遷海洋水溫持續上升，將有利於包括霍亂弧菌的海洋弧菌存活，未來霍亂病例仍有發生的風險，且高緯度地區如韓國也無法避免霍亂的流行。

霍亂由於曾引發歷史上大規模流行與對病患生命嚴重危害，一直是世界衛生組織長期監測的高風險傳染病。霍亂個案的發生，除了對染病患者健康造成直接危害，也會造成經濟重大損失，重創國家對維護公共衛生的努力與損害國家的國際觀光形象。我國衛生條件已達已開發國家水準，飲水與污水排放系統等公共環境衛生建設也相當完善，然而近兩年來臺灣每年仍有將近 10 例的散發病例，但不致於發生霍亂流行。民眾除了避免生食具高風險的海鮮貝類食材外，做好食材的低溫保存，生熟食餐具分開以避免生熟食交叉污染，與注重個人衛生習慣，便可有效避免感染。

誌謝

感謝各醫療院所的醫護人員以及各縣市衛生局所同仁進行疫情調查，協助資料通報與檢體採集送驗。

參考文獻

1. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, et al. Cholera. *Lancet* 2012; 379: 2466–76.
2. Safa A, Nair GB, Kong RY. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol* 2010; 18: 46–54.
3. WHO. Epidemic focus: Cholera. Available at: <http://www.who.int/wer/2016/wer9123.pdf?ua=1>.
4. ProMED-mail. Cholera, diarrhea&dysentery updated (35): Africa, Asia. Available at: <http://www.promedmail.org/post/20170524.5059018>.
5. ProMED-mail. Cholera, diarrhea&dysentery updated (24): Asia (South Korea). Available at: <http://www.promedmail.org/post/20160825.4441081>.
6. 林秋香、王秀帆、周玉民等：我國民眾感染霍亂弧菌之流行病學探討。疫情報導 2015；31(11)：266–74。
7. 衛生福利部疾病管制署：傳染病統計資料查詢系統。取自：<https://nidss.cdc.gov.tw/ch/>。
8. 衛生福利部疾病管制署：傳染病標準檢驗方法手冊：霍亂。取自：<https://www.syndriver.com/portal/#/sharing/fdd9dbef878c450a9fafb86462f3fb74>。
9. Copper KL, Luey CK, Bird M, et al. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 51–8.
10. Michener CD, Sokal RR. A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution* 1957; 11: 490–9.
11. Constantin de Magny G, Colwell RR. Cholera and climate: a demonstrated relationship. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2009; 120: 119–28.

12. Chowdhury FR, Nur Z, Hassan N, et al. Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Ann clin Microbiol Antimicrob* 2017; 16(1): 10.
13. Chin CS, Sorenson J, Harris JB, et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N Eng J Med* 2011; 364: 33–42.
14. Tey YH, Jong KJ, Fen SY, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus* in the Aquacultural Environments of Taiwan. *J Food Prot* 2015; 78: 969–76.
15. 許瓊文、丁之絜、林杜凌等：2016 年臺灣首件霍亂家庭群聚疫情調查報告。疫情報導 2017；33(13)：238–43。
16. 廖盈淑、魏嵩璽、魏孝倫等：彰化縣霍亂家庭群聚事件。疫情報導 2013；29(22)：343–9。
17. WHO. Prevention and control of cholera outbreak: WHO policy and recommendations. Available at: http://www.who.int/cholera/prevention_control/en/.
18. Tobbin-D'Angelo M, Smith AR, Bulens SN, et al. Severe diarrhea caused by cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* serogroup O75 infections acquired in the southeastern United States. *Clin Infect Dis* 2008; 47(8): 1035–40.
19. Crump JA, Bopp CA, Greene KD, et al. Toxigenic *Vibrio cholerae* serogroup O141-associated cholera-like diarrhea and bloodstream infection in the United States. *J Infect Dis* 2003; 187(5): 866–8.
20. 邱乾順、劉儼毅、廖盈淑：細菌基因分型技術在食媒疾病分子流行病學上的應用。疫情報導 2017；33(2)：22–30。