

計畫編號：DOH102-DC-1202

行政院衛生署疾病管制局 102 年度科技研究發展計畫

計畫名稱：高風險類鼻疽疫情區域之地理、氣候、感
染源與傳播途徑之相關性

研究報告

執行機構：國立高雄師範大學 生物科技系

計畫主持人：陳亞雷

研究人員：陳培詩、陳堯生

執行期間：民國 102 年 1 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目錄

中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
前言	(5)
材料方法	(6)
結果	(9)
討論	(13)
結論與建議	(15)
計畫重要研究成果及具體建議	(17)
參考文獻	(18)
圖	(21)
表	(27)
審查問題執行追蹤	(29)

中文摘要

本計畫使用類鼻疽個案(2005-2011)之空間與時間序分析所界定之類鼻疽高風險區域(高雄左營、楠梓地區)為研究區域，並藉由具有 *B. pseudomallei* 高分離率之藍田農地與蓮池潭作為污染點，驗證高風險區域類鼻疽疫情是藉由污染的空微粒所傳播。結果顯示藍田農地之 *B. pseudomallei* 於土壤的垂直分布有季節性的變化，特別易於夏季(雨季)期間由表層土中分離，而與類鼻疽好發於雨季有關。但蓮池潭受人為調節潭水的影響，垂直分布與疾病發生間的相關性並不顯著。*B.*

pseudomallei 污染的空氣微粒在高風險核心區域有明顯的地理分布與時間分布的聚集，這些聚集與類鼻疽通報個案的時空聚集有統計相關。經過空氣微粒的粒徑分析，*B. pseudomallei* 主要是附著 PM10 的空氣微粒，並且可以存活 3 日。高雄左營、楠梓地區之 PM10 空氣微粒濃度為台灣地區之冠，並且受季風影響有季節性的濃度變化。夏末、秋初季節，是高風險區 PM10 空氣微粒濃度明顯增加的期間，也是 2004-2013 年間類鼻疽通報病例最多的季節。本研究結果符合計畫之假設，即特定氣候(如:雨季)的條件下，*B. pseudomallei* 可由污染源的深層土壤浮出至地表，污染的地表土可能隨著季節性的強風、豪雨形成 PM10 的污染微粒，進而觸發類鼻疽疫情的發展。

關鍵字：類鼻疽、極端氣候、高風險區域、傳染模式、地理分布、空氣微粒

英文摘要

By analyzing geographical and temporal distribution of melioidosis cases, a region (Zouying and Nanzih in Kaohsiung) was defined to a high risk concerning as occurrence of melioidosis. It was previously demonstrated that, in this region, both paddy field and a lake were shown to high isolation rates of *B. pseudomallei*. In this study, the transmission modes involving in dissemination of contaminated particulate aerosols were evaluated. Our results revealed that alteration of vertical distribution of *B. pseudomallei* in paddy field but not in a lake was following to seasonal changes. The distribution of aerosols contaminated with *B. pseudomallei* was geographically clustered in this high risk region and temporally clustered in the summer. We found that, in summer (rainy season), *B. pseudomallei* was commonly isolated from surface lands of paddy field, the aerosols contaminated with *B. pseudomallei* were easily detected, and the most melioidosis cases were notifiable from local hospital. It is demonstrated that *B. pseudomallei* mainly adhered to PM10 aerosols and be able to survive over 3 days. Moreover, the concentration of PM10 aerosols in the high risk region was higher than that in other region, in Taiwan. The PM10 concentration was gradually increased in following as seasonal changes from the end of summer to initiation of fall. These results implied that, under specific climatic condition (for example, rainfall or typhoon), *B. pseudomallei* can move from deep soil to surface land after flooding. If PM10 aerosols were generated from contaminated surface land in this moment, susceptible people were dangerous when they inhale aerosols contaminated with *B. pseudomallei* into lung

Key words: melioidosis, extreme climate, high risk region, transmission modes, geographical distribution, aerosols

前言

類鼻疽(melioidosis)係由土壤腐生菌之 *B. pseudomallei* 所引起的感染性疾病，盛行於東南亞及澳洲北部(Currie, 2008)。台灣將類鼻疽歸屬於第四類法定傳染病，其致病菌之 *B. pseudomallei* 也歸屬於 Risk Group (RG) 3，進行管控。類鼻疽的臨床症狀很複雜，包括有急性的全身性感染(伴隨多種器官膿瘍)、局部皮膚潰爛與長期潛伏感染等。類鼻疽最嚴重病徵是急性敗血性休克，病人可於 24-48 h 內死亡，死亡率達 20-40% (Leelarasame, 2004; Phuong *et al.*, 2008)。自 1984 年起，台灣發現首件類鼻疽病例後，類鼻疽的病例數在台灣就逐年增加(Lee *et al.*, 1985; Hsueh *et al.*, 2001)。並且於 2005 年後，類鼻疽集中於南台灣地區，通常在極端氣候(颱風、強降豪雨)之後的 4-21 日，會出現聚集感染(Su *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010)。按本計畫第一年之前期研究，將類鼻疽病患(2004-2011)進行地理空間以及發生之時間序進行分析，發現類鼻疽疫情自 2008 年以後，就有高雄楠梓與左營地區的聚集現象，成為類鼻疽的高風險區域(Dai *et al.*, 2012; Mu *et al.*, 2013)。

類鼻疽雖然可藉由直接接觸、消化道或吸吸道感染而致病(Dance, 2000)，但每一次聚集感染的相關傳播途徑，仍需進一步澄清。特別是 *B. pseudomallei* 棲息於深層土壤 (30-60 cm)，一般狀況下民眾不易接觸。因此，可接觸土壤之 *B. pseudomallei* 分離率，就會直接與類鼻疽發生的風險有關(Inglis and Sapripanti, 2006)。例如：類鼻疽盛行區之 *B. pseudomallei* 土壤分離率約為 10-62.5% (Vuddhakul *et al.*, 1999; Kaestli *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010)；但在非盛行區之陽性分離率則僅有 0-5% (Chen *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2012)。不過，極端氣候或特殊事件(如：颱風、豪雨、海嘯等)會是驅動類鼻疽疫情的環境因子 (Inglis and Sapripanti, 2006)。前期研究亦藉由台灣(2004-2011)疾病發生與氣候因子(雨量、風速、風向等)進行分析，證明類鼻疽於颱風過後之 3-9 日會明顯出現聚集感染。經過多變數分析後，顯示雨量是最主要的影響因子(Mu *et al.*, 2013)。其原因可能係洪水使土壤的含水量飽和，促使居於深層土壤的 *B. pseudomallei* 有機會漂移至地表並且孳生，而增加了民眾接觸的機會。同時浮出於地表的 *B. pseudomallei*，亦可能隨著強風或洪水為載體，散布於周遭環境，並且爆發疫情 (Inglis and Sapripanti, 2006; Hassan *et al.*, 2010)。

台灣類鼻疽疫情有幾個特殊現象。包括:(1) 類鼻疽個案於熱點地區之 5 km² 的範圍內聚集發生(Dai *et al.*, 2012); 5 km² 範圍外有山丘屏障, 跨越屏障後, 則少有類鼻疽通報的個案 (Mu *et al.*, 2013)。(2) >70% 類鼻疽個案屬於肺性類鼻疽, 僅有 3%類鼻疽個案有明顯的皮膚潰爛。(3) 接受疫情調查的類鼻疽病患有>90% 個案表示沒有明顯的傷口、赤足習慣或有接觸感染源(土壤或水源); 類鼻疽病患沒有飲食習慣的交集。(4) 疾病聚集感染與颱風事件有關(Mu *et al.*, 2013)。(5) 熱點地區可以檢測出 *B. pseudomallei* 污染的土壤與水源, 距離類鼻疽病患的居住址約有 2.5-7.5 km (Dai *et al.*, 2012)。(6) 熱點地區的空气微粒可以測量到 *B. pseudomallei* 的 DNA 片段。整體來看, 這些結果暗示類鼻疽的疫情是藉由特定的污染源, 並經由空氣傳播所導致。

綜觀類鼻疽發生的熱點地區屬於一個袋口的地形地貌, 北有彌陀高地、南有半屏山與壽山。藉由山岳之屏障, 強風豪雨過境可能會產生一股攜帶水氣的氣流。當 *B. pseudomallei* 污染的懸浮水氣或顆粒因為季節因素而由污染地生成, 再藉由當地的地形地貌造成氣流滯留, 讓民眾有長時間的暴露的機會, 導致類鼻疽疫情的發展。因此, 本計劃援以 2012 年的研究結果, 旨為證明高風險疫情區所爆發的類鼻疽疫情與空氣微粒污染 *B. pseudomallei* 有關。

材料方法

1. 個案、研究區域與資料收集

類鼻疽個案 (n=372) 資料取自於疾病管制署。研究區域係按 2008-2013 年期間之類鼻疽通報個案經過 local moran's I、SatScan 與 Reply's model (poisson distribution)等空間分析方法而設定之熱點地區 (5 km² 範圍), 並且向四周延展 7.5 km (依據 Reply's model 計算, 7.5 km 是類鼻疽聚集感染的最大半徑範圍)。地區人口資料取自民政單位, 氣象相關數據取自中央氣象局與本研究計畫所設置的氣象站。

2. 採樣

研究標地的空氣微粒之採樣密度約以 3.3 km² 設置採樣點與監測站(n=12, S1-S12)。因為類鼻疽疫情與颱風過境有關, 考慮颱風(逆時針旋轉)多會產生強勁的西北風, 因此位於類鼻疽熱點地區之西北方向設置 S1-S3 採樣點, 作為污染空

氣微粒可能出現的起始點。並在熱點的核心地區設置 S4-S7 採樣點，作為污染空氣微粒可能擴散的範圍。熱點地區之東南方有半屏山的屏障，因此在屏障之東南方之後設置 S8-S9 採樣點，作為污染空氣微粒可能無法跨越山岳限制的測量點。並且在熱點的外圍區域(>7.5 km)設置 S10-S12 的採樣點，作為污染微粒可能無法飄達的位置。

所有採樣分為固定採樣與特定採樣。固定採樣以 15 日為間隔，固定時間採樣之。特定採樣依據中央氣象局所發布颱風警報後，在 S6 採樣點實施每日定時的樣品收集。

採樣方法以 air sampler (20 L/min)抽濾大氣中的微粒於鐵氟龍濾紙(filter, 3.7 mm x 2.0 μ m)或以 air impinger (15 L/min)衝擊收集瓶內的選擇性培養液 (Ashdown's broth)，以及使用衝擊器(20L/min; MERCK MAS-100)直接衝擊選擇性培養基(Ashdown's media)。為確定 *B. pseudomallei* 附著於空氣微粒的大小，依採樣目的而做 PM10 (n=30)與 PM2.5(n=30)的粒徑分類。利用 filter 收集的總空氣微粒樣品數為 655 件 (S1, n=41; S2, n=41; S3, n=41; S4, n=41; S5, n=41; S6, n=144; S7, n=41; S8, n=41; S9, n=41; S10, n=41; S11, n=41; S12, n=41)，作為 *B. pseudomallei* DNA 萃取用。並取研究標地的陰性對照組(古坑地區)樣品 (n=29) 比較之。陰性對照組的地點係以 GIS (geographical information system)的 focusing test 檢驗所得，選取台灣地區最不可能發生類鼻疽病例聚集的地點為控制組。粒徑分析係選用 PEM4-2.5 (PM2.5; 流速: 4 L/min)或 PEM4-10(PM10; 流速: 4L/min)的濾頭而收集 S1-S12 之採樣區，當總微粒(total particles)之 *B. pseudomallei* DNA 為陽性時(n=30)，進行 PM2.5 與 PM10 收集器收集之微粒的 DNA 分析。

空氣微粒之 *B. pseudomallei* 菌體培養，是使用衝擊方法收集(impinger)之空氣培養液(n=68)或培養基(n=72)。

土壤採樣是以藍田農地為範圍，以 GIS 劃分 25 小格 (25 m²)，取 1 m² 為一樣點，以 fixed interval 方式進行。每個採樣點以鑿土器取表層(<5cm)、淺層(6-30cm)與深層(31-60 cm)各 100g 土壤，共計 105 檢體。水樣採集以蓮池潭為標

的，GIS 平均劃分 8 (S1-S8)個樣點區，每個樣點取底泥(100g, n=24)，深層水(>60 cm, n=24)與表層水(0-10 cm, n=24)進行 PCR 檢測與活菌培養。採樣時間按月實施，並以季(3 月期間)為單位進行數據分析。

3. 檢體處理

為抽取 DNA 的檢體，水樣(2 L)經粗濾後以 0.45 μm 濾膜過濾之，所得之濾紙與其他檢體(包括土壤, 1g; 空氣微粒濾紙, 3.7 mm x 2.0 μm ; 底泥, 1g 等)均分別以 3 ml PBS(phosphate buffered saline)覆蓋，並以超音波震盪之。震盪後的液體，經離心後抽取 DNA。

B. pseudomallei 以 Ashdown's media 於 42°C 培養之，連續觀察 7 d。若需滋養土壤的活菌，係將 15g 土壤與 PBS 強烈震盪後，置於 Ashdown's broth，每日進行三區劃線後(至少三片)。菌株鑑定依 ID32 GN profile (API system; bioMerieux, France)與 *fliC* specific amplicon 確認之。

4. PCR 定性與定量分析

Total DNA 係使用 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 萃取之。*B. pseudomallei*-specific amplicons 係以 *fliC* 之 central region (423 bp)與 TTSS (type III secretion system) *orf2* 之 specific 115-bp region 為 PCR 檢出標靶 (Chen *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2011)。*fliC* primer 為 forward: CTCACGCAAAGCATGTTCGGCG; reversed: TTAGTACGCGC CCG; *orf2* primer 為 forward: CGTCTCTATACTGTTCGAG; reversed: CGTGCACA CCGGTCA。反應條件以 ABI PRISM 7500 Sequence Detection System 建置之。約略以 Denature: 94°C、1min.; Anneal: 55°C、30sec; Extention: 72°C、1min 為標準。茲為確定濾紙確實收集有 G(-)細菌的 DNA，故使用 G(-)菌之 16S RNA V3 region (200 bp) 的 conserved primer (forward: CCTACGGGAGGCAGCAG; reversed: ATTACCGCGGCTGCTGG)檢視 DNA 萃取品質之控制。qPCR 的反應條件為 48°C、30 min, 95°C、10 min, 最後以 95°C、15 sec 與 60°C、1 min, 重複 40 個循環(Rotor-Gene 6000 series thermocycler [Corbett life Science, Australia])。所有實驗以二重複實施之。所有陰性樣本以 10 倍與 100 倍稀釋後，再進行 qPCR 反應。若有必要則以 purification kit 移除 humic acid (TAKARA, Japan)。qPCR 檢量線的

DNA 標準品(pGemT-easy/orf2)由明欣生技公司合成之,本研究之檢量線 $r^2=0.99$ 、斜率於-3.6 至-3.1(qPCR 效率為 90%-110%)。

5. 懸浮微粒與 LPS 的檢測

空氣懸浮微粒係以直讀式儀器(TSI Model 8760 IAQ-CALCTM Meters [TSI,USA]偵測。LPS 之 3-OH 脂肪酸係將大氣收集之微粒經(1)鹼性水解[皂化]、(2)甲基化、(3)萃取、(4)衍生與(5)清潔(洗滌)處理之(Lin *et al.*, 2006)。處理程序是將定量檢體於 15% methanolic NaOH 內進行加熱 5 min(100°C)後,劇烈振盪 10 sec,繼續加熱 18 h (100°C)。反應後,加入 acid metholic solution (1083 μ l of 6N HCl and 917 μ l of methanol),再於 80°C 加熱 1 h。作用完成,取 1.25ml hexane 加入試管內,並輕度旋轉作用 10 min 後,加入 3ml methanol 與 3ml 0.24M NaOH 反應之。取有機層(上層)經氮氣吹乾後,溶於 50 μ l TMS 衍生劑衍生,同時加入內標準品,於 80°C 作用 15 min。作用完畢,取 1 μ l 注入氣相層析質譜儀分析。GC-MS 係使用 GC DP-23 (Palo Alto, CA)與 Mass HP 5953N mass selective detector (MSD) 利用適當的介面連接。GC 分離管柱係使用 HP-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film),條件設定為:splitless injection; helium flow rate: 0.6 ml/min; injection pore: 260°C; interface: 280°C。分離管柱的分離程式設定為: starting: 150°C; holding: 1min; increasing to 280°C at 20°C/min; holding: 3.5 min。

6. 統計分析

類鼻疽在鄉鎮層次(town-level)的顯著群聚,係使用 Local moran's I 方法分析疾病發生率(Crighton *et al.*, 2007)。類鼻疽的群聚空間之 poisson distribution model 係使用 SatScan (www.satscan.org)方法分析。類鼻疽聚集的距離範圍(multiple different distance),係使用 Ripley's K function 分析。對氣候因子與類鼻疽發生率的相關分析,分別使用 poisson (zero-inflated)與 negative binomial model (zero-inflated) 分析,因 negative binomial model 可得較好的相關,所以本研究沿用 negative binomial model 分析之。屬單變項分析(univariate analysis)係使用 Fisher's Exact test, 多變項分析(multivariable analysis)係使用 multivariable logistic regression analysis。以 $p<0.05$ 定義其具有顯著性差異。95% CI interval 與各類統計分析係使用軟體(NCSS 2004/PASS 2002)計算之。

結果

2012-2013 類鼻疽的熱點區域 按本計畫之第一年度已完成 2004-2011 期間之類鼻疽地理分布與時間聚集的分析，顯示 2008 年以後類鼻疽發生的熱點(host-spot)位於高雄左營與楠梓地區(Dai *et al.*, 2012)。2008-2011 年間於類鼻疽熱點地區有明顯的颱風過境與災情出現，但在 2012-2013 年間則無颱風造成熱點地區的災情。相對的，2012-2013 年間熱點地區之類鼻疽疫情也趨緩和。10 年來類鼻疽於南台灣的發生率圖形，顯示 2012-2013 年度之類鼻疽發生率變化非常類似 2006-2007 年間(圖 1A)，此 2 期間都沒有明顯的颱風災害。依據 2004-2013 之 10 年雨季平均水準，2012-2013 年之雨季期間較短，但 2012 年之總雨量並無短少，而 2013 年的總雨量則明顯偏低(圖 1B)。第一年度研究結論說明 2008-2011 年間之類鼻疽個案發生明顯與強風及降雨有關(Mu *et al.*, 2013)，但是 2012-2013 年間之類鼻疽總通報數目，可能因為沒有環境因子(豪雨或颱風)的驅動因子而降低。不過依據類鼻疽發生的地理分布，類鼻疽個案聚集於熱點地區的趨勢仍然沒有改變。計有 41% (2012 年)與 50% (2013 年)類鼻疽分布於本研究定義之熱點地區。

***B. pseudomallei* 由深層浮出表層** 按本(第一年度)計畫對熱點地區之隨機採樣調查結果，篩選藍田農地與蓮池潭作為 *B. pseudomallei* 的污染實驗場址。本年度為驗證 *B. pseudomallei* 污染之空氣微粒可能源自於污染地，因此進行藍田農地與蓮池潭之 *B. pseudomallei* 檢出率的垂直分布變化。結果顯示 1-3 月(第一季), 4-6 月(第二季)與 7-9 月(第三季)期間，深層(>60 cm)土壤的陽性檢出率逐漸下降，但表層(0-10 cm)土壤的陽性檢出率則逐漸增加(圖 2A)，並且 7-9 月期間(第三季)之表層土可以分離 *B. pseudomallei*。

對於蓮池潭的垂直分布調查結果，顯示 2013 年 6 月時之深層水(>60 cm)有最高的檢出率(約 37.5%)，底泥的檢出率由 2013 年 3 月(約 25%)開始逐漸下降，到達 9 月則為零檢出(圖 2B)，可能與池水底泥受到日光曝曬的影響有關。至於表層水，2012 年有 12% 的 PCR 陽性檢出率，同時得到 cultivated *B. pseudomallei*。但是 2013 年則出現零檢出(表一)。因為蓮池潭屬於人工湖，負責調節豪大雨所造成的都市積水。人為之蓄水與洩水因素，不但影響潭水的深度(如 2012 年平均

深度<60 cm; 2013 年平均深度>60 cm), 也可能影響潭水季節性出現的自然翻滾, 進而影響本研究對 *B. pseudomallei* 於潭水中之垂直分布的預估。

污染空氣微粒的地理與時間分布 為證明類鼻疽的熱點區域存在有污染 *B. pseudomallei* 的空氣微粒, 因此設置 12 樣點區進行空氣微粒的採集與分析(圖 3A)。有效收集空氣微粒的樣品須符合(1) GC-MS 測量濾膜之 C_{14:0} 3-OH FA (LPS indicator)濃度介於 5-50 µg/mm³, 說明濾膜收集有 G(-)細菌; (2)濾膜萃取之 DNA 可以測得 universal 16S RNA 的基因片段, 說明濾膜 DNA 已被成功萃取出。有效樣品分析的結果顯示, 2012-2013(20 月期間)之類鼻疽發生熱點核心地區(S4-S7) 有 14-29%的 *B. pseudomallei*-specific DNA 陽性檢出率, 相較於熱點以外區域 (S1-S3; S8-S12)的陽性率(2-9%), 明顯偏高(圖 3B)。S8 與 S9(受到半屏山屏障)之樣點區, 分別為 9%及 2%的陽性檢出率。特別是 S9 樣點區完全被半屏山遮蔽, 該地點之 *B. pseudomallei* 的陽性率與控制組(古坑地區)的陽性率幾近。如果假設 S3 區域之藍田農地為污染源, 則各個採樣區所得之陽性率會完全符合該地區主要季風風向與地環因素影響空氣微粒分布的研究假設。茲為確定 *B. pseudomallei*-specific DNA 濃度變化的季節性效應, 本研究於 2012/3/1-2013/10/31 進行 S5 樣點區之 DNA 濃度變化的縱向追蹤。結果發現 2012, 7-8 月與 2013, 6-8 月期間, 出現高濃度(>80 copies/m³)的陽性檢出 (圖 4)。顯示空氣微粒之 *B. pseudomallei*-specific DNA 會在夏季有高濃度的出現。

為了證明空氣微粒可能附著 cultivated *B. pseudomallei*, 因此模擬空氣微粒附著常見病原菌(包括: *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cenocepacia*)與 *B. pseudomallei* 之存活性比較。結果顯示 *B. pseudomallei* 附著空氣微粒後的存活性較其他病原菌差, 特別是 *B. pseudomallei* 附著於類鼻疽熱點地區所收集的空氣微粒, 3 d 後之存活率<10% (圖 5A)。可能是因為 *B. pseudomallei* 需於>10%的水含量與 pH>4.5 的環境下才能存活(Chen *et al.*, 2003), 而熱點地區空氣微粒乾旱, 並且受工業區排放 NO_x 影響 pH 值之原因所致。無論如何, *B. pseudomallei* 附著於空氣微粒 1 d 後, 仍有 20%的存活機會(圖 5B)。因此, 我們採取高緩衝力(10X PBS)與低營養(0.2% glucose)配置之選擇性液態培養基, 進行 12 h (25 L/min)的空氣衝擊。結果在 68 件 PCR 陽性檢體採集時間點中, 同時以 impinger 方式活培養 3 株 *B. pseudomallei*, 成功率約 4%。

PM10 生物性顆粒是主要附著 *B. pseudomallei* 的空氣微粒 既然 *B. pseudomallei* 可以存活於空氣微粒中，所以進一步分析空氣微粒的粒徑。因為 PM₁₀ 可視為粉塵，會被阻隔於外鼻道；PM10 通常屬於生物性微粒，雖有部分會被呼吸道攔阻，但仍屬於危險性空氣微粒；而 PM2.5 屬於金屬性微粒，可以不受阻隔的進入肺部深層，屬於高危險之空氣微粒(Kendall, 2007)。30 件 PCR 陽性之空氣微粒樣品，經過 PM10 與 PM2.5 的粒徑分析，結果 PM10 約有 35% 的陽性檢出，而 PM2.5 僅有 4% 的陽性檢出 (表二)，顯示大部分 *B. pseudomallei* 附著於 10 μm 的空氣微粒。

如果 *B. pseudomallei* 主要附著於 PM10 空氣微粒，則熱點地區 PM10 空氣微粒的懸浮，可能成為類鼻疽發生的環境危險因子(高雄楠梓與左營是全台 PM10 濃度含量最高的區域)。依據 2005-2012 期間台灣空氣品質監測數據，PM10 空氣微粒於熱點地區有明顯的季節性變化，6-8 月是 PM10 空氣微粒濃度最低的季節，此後隨著夏末、秋冬季節的來臨，PM10 空氣微粒濃度則逐漸上升。2005-2012 期間熱點地區之類鼻疽亦有 6-10 月發生時間聚集之趨勢(PM10 vs melioidosis cases, $r^2=0.8114$)(圖 6)。暗示熱點地區，一旦發生 PM10 附著 *B. pseudomallei*，則可能因為季節性發生高濃度之 PM10 空氣微粒，而助長類鼻疽疫情的發展。此外，我們選用其他七種空氣品質參數(包括 PM2.5、NO_x、SO₂、CO、CH₄、NMHC 與 THC)，於相同期間進行分析，結果都沒有出現類似 PM10 明顯的季節性變化，因此與類鼻疽通報個案間的相關性很低($r^2<0.03$)。

特殊事件之追蹤

2012 年 06 月 27 日為了避免颱風所帶來的洪水氾濫，蓮池潭的潭水抽降 8.8 公尺，使得底泥露出。當日為 WSW 轉 SSW 風向，風速 4.5-4.9 m/sec。6 月 29 日蓮池潭東北方之 S7 樣點的空氣微粒呈現 PCR 陽性，6 月 30 日蓮池潭北方 S6 樣點的空氣微粒呈現 PCR 陽性反應。7 月 3 日-4 日風向由 W 轉 WNW，風速 2.2-2.7 m/sec。蓮池潭南岸偵測到本研究期間最大的 DNA 濃度，7 月 15 日蓮池潭培養出 *B. pseudomallei*。2013 年 6-9 月持續在蓮池潭南、北岸進行空氣微粒、蓮池潭池水的檢測，以及空氣及水樣品的菌株培養。2013 年蓮池潭的潭水雖抽降，但抽降當日有烈日，蓮池潭底泥的陽性檢出率也降低。但是空氣微粒仍於 6-9 月期

間有最大量及最頻繁的陽性檢出；同時 S7 樣點區之蓮池潭北岸，得到空氣微粒之 cultivated *B. pseudomallei*，並且當日風向主要為 WNW。綜合所述，2012 年數據然暗示蓮池潭是主要的污染源，但本項暗示無法在 2013 年得到相同的經驗。

討論

本計畫首次嘗試以 *B. pseudomallei* 附著之空氣微粒的地理分布位置與發生時間序，解釋台灣類鼻疽聚集感染是藉由空氣傳播模式。縱向追蹤的研究結果顯示，2012/3-2013/10 (20 月區間) 污染 *B. pseudomallei* 空氣微粒之地理分布，主要座落於 S4-S7(陽性率=21.4-35.7%)的採樣區。本項結果與第一年研究利用類鼻疽病患之地理分布及時間聚集分析所定義之類鼻疽高風險疫情區(左楠地區、5 km²)相符(Dai *et al.*, 2012)。相對的，S1-S3 與 S8-S12 的採樣區屬於非類鼻疽發生的熱點地區，陽性率僅有 0-7.1%。特別是 S8 與 S9 採樣區位於 S4-S7 採樣區的南邊(相距 <2.5 km)，但可能因為受到半屏山的屏障而阻隔空氣微粒散布，因此陽性率只有 2-9%。此外，空氣微粒之 *B. pseudomallei* 陽性檢測的時間序分析，污染的空氣微粒主要出現在 6-9 月，與類鼻疽好發季節於 6-9 月相符。本實驗結果符合本計畫之假設，即類鼻疽熱點地區，*B. pseudomallei* 雖可藉由空氣微粒而散布，但卻因為地環因素限縮了散布範圍，因此高雄楠梓與左營形成了類鼻疽的熱點地區。

B. pseudomallei 可以吸附在 PM1.0-PM10 粒徑大小的空氣微粒中(Dabisch *et al.*, 2012)。並且證實 PM1.0-10 粒徑的微粒可以隨著適當的溫度、濕度與風速下，在 0.5 km 的核心範圍內擴散，並且最遠可漂浮至 5 km (Shi *et al.*, 2012)(類似於台灣類鼻疽熱點地區的分布範圍為 5 km²)。我們證明 *B. pseudomallei* 於乾燥且酸性的空氣微粒可以存活 3 日，同時也證明最適當附著顆粒大小為 PM10。因為類鼻疽的好發與 PM10 空氣微粒濃度有季節性的相關。因此，類鼻疽的盛行月份，需注意高 PM10 濃度可能增加 *B. pseudomallei* 附著在其上而傳播的機會。

在澳洲一項研究中發現 500 km 外的環境分離菌與類鼻疽群聚感染的臨床分離株，具有相同分子分型的圖譜(Inglis *et al.*, 2009)。並依據該地類鼻疽的時空聚集分析，發現歷年類鼻疽病例的地理分布與颶風行進方向有關(Inglis *et al.*, 2009; Cheng and Currie, 2005; Corkeron *et al.*, 2010)，但上述研究都欠缺空氣微粒可能攜帶 *B. pseudomallei* 的證據。我們則首次證明 *B. pseudomallei* 污染之空氣微粒與

類鼻疽發生間有地理分布與發生時間的相關性。並且 4% 空氣微粒有 cultivated *B. pseudomallei*，說明這些微粒可能具有感染性。但目前這些陽性的空氣微粒是來自於揚起到空氣中的土壤顆粒或水霧或來直接來自於存在於土壤或水源中的 *B. pseudomallei*，尚無法區別。但因為菌體必須附著於顆粒，才容易存活與擴散。因此，空氣微粒附著 *B. pseudomallei* 仍須加以注意。

類鼻疽的發生通常與暴露 *B. pseudomallei* 的污染環境有關 (Dance, 2000)。儘管 *B. pseudomallei* 可由土壤與水源地分離，但是菌體的真实濃度卻非常難決定，主要是因為 *B. pseudomallei* 非均勻的分布於土壤顆粒或水源地中(約 10-1200 cfu/g or ml)(Wuthiekanun *et al.* 2005; Kaestli *et al.* 2007)。其他仍有許多因素影響 *B. pseudomallei* 的分布因素，包括 UV 的照射與乾旱(Chen *et al.* 2003; Inglis and Sagripanti 2006; Palasatien *et al.* 2008)，以及土壤或水源菌中之拮抗菌的抑制作用等(Lin *et al.* 2011)。儘管類鼻疽疫情的發生與 *B. pseudomallei* 的環境分離率相關(Chen *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2012)，但都非常難解釋 *B. pseudomallei* 棲息於深層土壤或水源，敏感宿主如何接觸污染源。本研究則首次證明，*B. pseudomallei* 於污染源分布有季節性的垂直分布變化，特別是夏季(雨季)期間，*B. pseudomallei* 易於由表層土中分離，提供了敏感宿主暴露 *B. pseudomallei* 的機會。

雖然類鼻疽的傳播路徑仍有爭論，但人與人間的傳染則甚少發生(Dance 2000)。所以疾病不會隨著人的活動而散布全台，就如同現今所觀察到的特定(如左楠地區)地區之聚集現象。這種分布類似環境中的污染源非常固定或是有特定的載體所造成的空間與時序上的群聚 (Kitron and Kazmierczak 1997; Corkeron *et al.* 2010; Ditsuwan *et al.* 2011)。本研究界定藍田農地與蓮池潭可能為固定污染源，並且證明污染源之 *B. pseudomallei* 可隨著季節變化而由深層土壤浮出於地表。本研究也同時證明污染空氣微粒與類鼻疽疫情間有地理分布與發生時間序間的相關性。若後續進一步證明環境(深層與地表)、空氣微粒與臨床病人間之分離菌有分子分型圖譜的一致性，將可解決類鼻疽疫情是否可透過空氣傳播機制而擴散的爭議。

結論與建議

1. 2008-2013 年期間類鼻疽高風險疫情區的熱點(hot-spot)為高雄左楠地區。

本研究利用 2005-2013 年之數據，使用 local moran I 與 ScanSat 分析鄉鎮發生率的顯著聚集，以及使用 Ripley's K function 計算聚集的最可能範圍，界定出類鼻疽的熱點是位於高雄左楠地區的 5 km² 範圍。雖然研究期間(2012-2013) 年類鼻疽疫情減緩，但 40-50% 病例仍聚集於該區。這種小區域的疾病聚集模式，顯示 污染源可能固定與傳播介質受地域限制的現象，值得注意。

2. 污染 B. pseudomallei DNA 空氣微粒的時空分布，符合地理因素限制熱點範圍的假設。

本研究熱點核心區(5 km²) 空氣微粒之 *B. pseudomallei* 陽性檢出率(14-29%) 明顯較核心外圍地區之陽性檢出率(2-9%) 高，並且在核心區南邊受半屏山與壽山阻隔後，空氣微粒之 *B. pseudomallei* 陽性檢出率明顯降低，類鼻疽的病例數也相對地降低。污染 *B. pseudomallei* 空氣微粒出現的時間序分析，亦與該區類鼻疽好發季節相關。實驗結果符合 地理因素影響類鼻疽熱點的分布範圍的假設，同時也佐證高雄 左楠地區是高風險疫情區的界定。

3. 季節性氣候因子影響 PM10 空氣微粒濃度，也影響類鼻疽疫情發展。

繼本研究第一年之分析發現類鼻疽熱點地區之類鼻疽疫情受氣候因子(包括雨量、風速與風向) 影響後，本年度發現空氣微粒亦受季節性的變化影響。特別是類鼻疽熱點地區是台灣 PM10 空氣微粒濃度最高的地區，並且 PM10 空氣微粒在該區呈現季節性的明顯變化，這個變化與類鼻疽好發季節相符。既然我們證明 *B. pseudomallei* 主要附著於 PM10 的空氣微粒，又可在 PM10 微粒上存活 3 日。因此，熱點地區攜帶有 B. pseudomallei 的 PM10 濃度變化，可能可以配合環境污染指標、氣候因素等，發展類鼻疽疫情預測模式的參考指標。

4. 土壤深層之 B. pseudomallei 於夏季時會浮出地表成為污染源

繼本研究第一年究利用盡量均勻隨機採樣方式，選出藍田農地為可能的污染源後，本年度界定此污染源之 *B. pseudomallei* 垂直分布有季節性的變化，特

別是夏季可以從田地的表層土分離。顯示農地是 *B. pseudomallei* 的棲息所，並且可以藉由季節性的變化而浮出地表，成為類鼻疽的污染源。

本研究的假設：類鼻疽高風險區域因為有特殊地形限制，使得固定的污染源所產生攜帶 *B. pseudomallei* 的空氣微粒在小範圍發生擴散，使得類鼻疽聚集發生。依目前的研究結論，可以推論高風險區域的農地，*B. pseudomallei* 可隨季節變化而由深層土壤浮出於地表，可能再藉由強風或豪雨形成污染之 *B. pseudomallei* 的 PM10 空氣微粒，地形限制使得該區 PM10 微粒不易散開，並且 *B. pseudomallei* 可以在 PM10 微粒上存活 3 日以上，一旦污染的微粒形成，類鼻疽疫情就可能在該區發生類鼻疽的聚集感染。但此結論仍須要進一步將土壤深層、淺層、空氣微粒與類鼻疽病人檢體之分離菌間，建立相同基因圖譜的分子證據聯結，以獲得更具體的結論以發展可資利用於預警或防疫的資訊。

102 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：高風險類鼻疽疫情區域之地理、氣候、感染源與傳播途徑之相關性

主持人：陳亞雷 計畫編號：DOH102-DC-1202

1. 計畫之新發現或新發明

本研究利用 GIS 分析類鼻疽於鄉鎮層次的顯著聚集現象，並且利用土壤、水源與空氣微粒的調查，不但清楚界定台灣類鼻疽熱點的位置與範圍，並且利用污染空氣微粒的分布，解釋熱點地區類鼻疽疫情是藉由污染空氣微粒而散布。本研究部分研究成果，包括藉由 random sampling 的方式調查 *B. pseudomallei* 的地理分布，並藉由時空分布界定類鼻疽高風險區域。以及利用熱點地區類鼻疽資料與分析期間的氣象數據，證明氣候因子(包括雨量、風速與風向)與類鼻疽發生的關聯等；都已分別發表於國際期刊，提供國際間對類鼻疽疫情防治的參考。(如：*Epidemiol Infect.* 2013; 29:1-9、*Trop Med Int Health.* 2012; 17:1005-13.

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

本研究對熱點地區的界定結果，可有效界定可能感染類鼻疽的居民對象，而實施必要的宣導(如避免傷口接觸污染源，或者穿著雨鞋清理淹水區)。但對醫護人員則有必要提出警訊，特別是當颱風(>19 m/sec)夾帶豪雨(>1000 mm)的氣象預警發布時，或者是 PM10 空氣微粒濃度顯著升高時，更應提醒類鼻疽熱點地區的醫療人員，警戒類鼻疽可能出現的聚集感染疫情。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

既然類鼻疽疫情與特定氣候條件改變有關，洪水又是類鼻疽疫情的主要觸發因子，有效的整治疏洪措施，避免類鼻疽高風險區出現淹水狀況，是類鼻疽防治關鍵。因此，疏洪防淹水及藉由氣象報告數據與環境品質監測數據，可以搭配成為本病疫情發生的警戒指標。

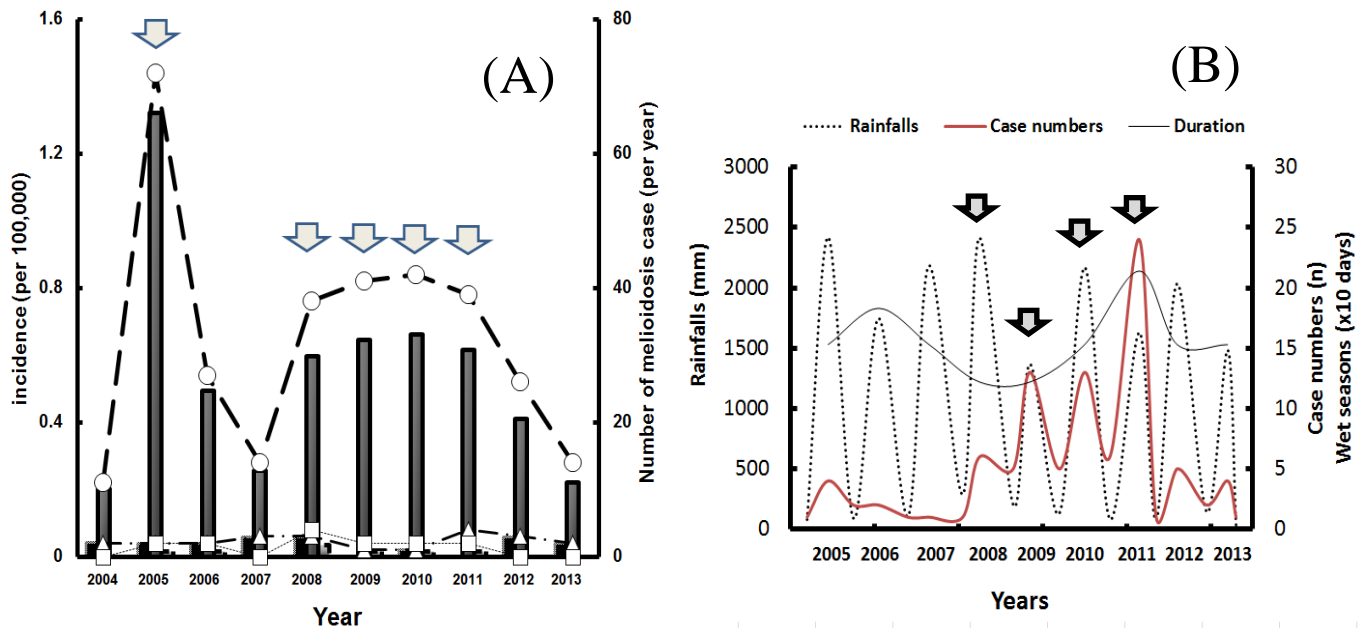
參考文獻

- Baker A, Tahani D, Gardiner C, Bristow KL, Greenhill AR, Warner J.** (2011) Groundwater Seeps Facilitate Exposure to *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol.* 77:7243-7246.
- Chen YS, Chen SC, Kao CM, Chen YL.** (2003). Effects of soil pH, temperature and water contents on the growth of *Burkholderia pseudomallei*. *Folia Microbiol.* 48: 253-256.
- Chen YS, Lin HH, Mu JJ, Chiang CS, Chen CH, Buu LM, Lin Y, Chen YL.** (2010) Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: Evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 48: 1432-1434.
- Cheng AC, Currie B.** (2005) Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev.* 18:383-416.
- Corkeron ML, Norton R, Nelson PN.** (2010) Spatial analysis of melioidosis distribution in a suburban area. *Epidemiol Infect.* 138:1346-52.
- Crichton EJ, Elliott SJ, Moineddin R, Kanaroglou P, Upshur RE.** (2007) An exploratory spatial analysis of pneumonia and influenza hospitalizations in Ontario by age and gender. *Epidemiol Infect.* 135:253-61.
- Currie BJ.** (2008) Advances and remaining uncertainties in the epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102:225-227.
- Dabisch P, Bower K, Dorsey B, et al.** (2012) Recovery efficiencies for *Burkholderia thailandensis* from various aerosol sampling media. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:78.
- Dai D, Chen YS, Chen PS, Chen YL.** (2012) Case cluster shifting and contaminant source as determinants of melioidosis in Taiwan. *Trop Med Int Health.* 17:1005-13
- Dance DA.** (2000) Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia spp.* and human-animal hosts. *Acta Trop* 74, 159-168.
- Ditsuwan T, Liabsuetrakul T, Chongsuvivatwong V, Thammapalo S, McNeil E.** (2011) Assessing the spreading patterns of dengue infection and chikungunya fever outbreaks in lower southern Thailand using a geographic information system. *Ann Epidemiol* 21:253-261.
- Hassan MR, Pani SP, Peng NP, Voralu K, Vijayalakshmi N, Mehanderkar R, Aziz NA, Michael E.** (2010) Incidence, risk factors and clinical epidemiology of melioidosis: a complex socio-ecological emerging infectious disease in the Alor Setar region of Kedah, Malaysia. *BMC Infect Dis.* 21;10:302.
- Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Ho SW, Luh KT.** (2001) Melioidosis: an emerging infection in Taiwan? *Emerg. Infect. Dis.* 7, 428-433.

- Inglis TJ, Levy A, Merritt AJ, et al.** (2009) Melioidosis risk in a tropical industrial environment. *Am J Trop Med Hyg.* 80:78-84.
- Inglis TJ, Sagripanti JL.** (2006) Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol.* 72:6865-6875.
- Kaestli M, Mayo M, Harrington G, Watt F, Hill J, Gal D, Currie BJ.** (2007) Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia. *Appl Environ Microbiol.* 73:6891-7.
- Kaestli M, Mayo M, Harrington G, Ward L, Watt F, Hill JV, Cheng AC, Currie BJ.** (2009) Landscape changes influence the occurrence of the melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei* in soil in northern Australia. *PLoS Negl Trop Dis.* 3:e364.
- Kendall M.** (2007) Fine airborne urban particles (PM_{2.5}) sequester lung surfactant and amino acids from human lung lavage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:L1053-8.
- Kitron U, Kazmierczak JJ.** (1997) Spatial analysis of the distribution of Lyme disease in Wisconsin. *Am J Epidemiol* 145:558-566
- Lee N, Wu JL, Lee CH, Tsai WC.** (1985) *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 22:352-4.
- Leelarasamee A.** (2004) Recent development in melioidosis. *Curr Opin Infect Dis.* 17:131-136.
- Lin HH, Chen YS, Li YC, Tseng IL, Hsieh TH, Buu LM, Chen YL.** (2011) *Burkholderia multivorans* acts as an antagonist against the growth of *Burkholderia pseudomallei* in soil. *Microbiol Immunol.* 55:616-24.
- Lin HH, Huang SP, Hsieh HC, Chen CS, Chen YL.** (2006) Performance characteristics of the limulus amebocyte lysate assay and gas chromatography-mass spectrum analysis of lipopolysaccharides relative to nitric oxide production by peritoneal exudates of cells. *J Hazard Mater.* 145:431-436.
- Mu HH, Yung PO, Chen YS, Chen PS, Chen YL.** (2012) The occurrence of melioidosis is related to different climatic conditions in distinct topographic areas of Taiwan. *Epidemiol Epi.* 29:1-9.
- Phuong DM, Trung TT, Breitbach K, Tuan NQ, Nübel U, Flunker G, Khang DD, Quang NX, Steinmetz I.** (2008) Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102 Suppl 1:S30-6.
- Palasatien S, Lertsirivorakul R, Royros P, Wongratanacheewin S, Sermswan RW.** (2008) Soil physicochemical properties related to the presence of *Burkholderia pseudomallei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102 Suppl 1:S5-9.

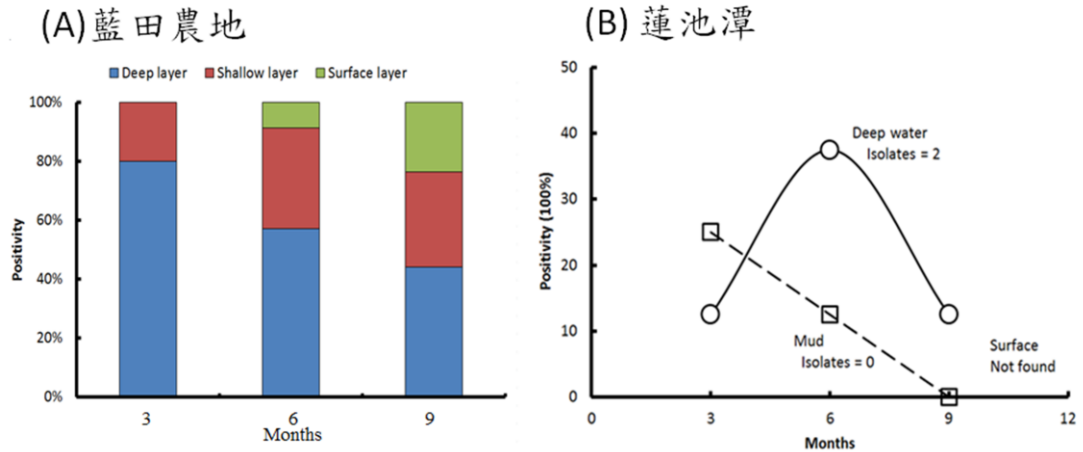
- Shi W, Wong MS, Wang J, et al.** (2011) Analysis of airborne particulate matter (PM_{2.5}) over Hong Kong using remote sensing and GIS. *Sensors (Basel)*. 12:6825-36
- Su HP, Chan TC, Chang CC.** (2011) Typhoon-related leptospirosis and melioidosis, Taiwan, 2009. *Emerg Infect Dis*. 17:1322-1324
- Su HP, Yang HW, Chen YL, Ferng TL, Chou YL, Chung TC, Chen CH, Chiang CS, Kuan MM, Lin HH, Chen YS.** (2007) Prevalence of melioidosis in the Er-Ren River Basin, Taiwan: implications for transmission. *J Clin Microbiol*. 45:2599-2603
- Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-Engam N, Jitsurong S, Kunthawa B, Noimay P, Noimay P, Binla A, Thamlikitkul V.** (1999) Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 60(3):458-61.
- Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Chantratita N, Feil EJ, Day NP, Peacock SJ.** (2009) *Burkholderia Pseudomallei* is genetically diverse in agricultural land in Northeast Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 3:e496.
- Wuthiekanun V, Mayxay M, Chierakul W, Phetsouvanh R, Cheng AC, White NJ, Day NP, Peacock SJ.** (2005) Detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil within the Lao People's Democratic Republic. : *J Clin Microbiol*. 43(2):923-4.

圖、表



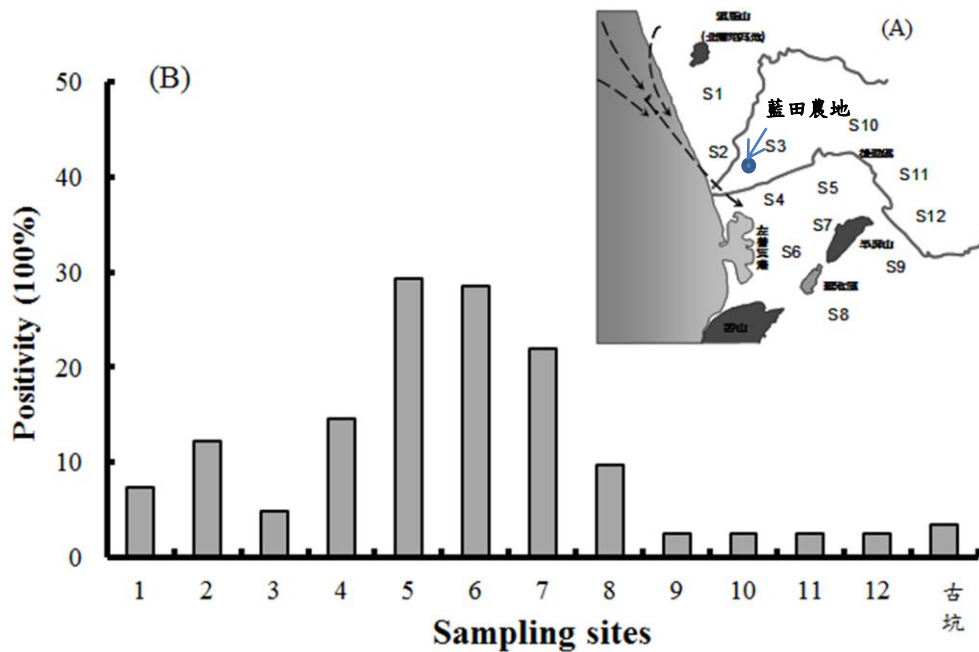
圖一、類鼻疽通報病例

(A)南台灣類鼻疽發生率與通報數之變化。黑色柱狀表示南台灣地區之類鼻疽年度發生率；圓圈表南台灣類鼻疽通報件數；三角形表中台灣類鼻疽通報件數；方格表台灣其他地區之類鼻疽通報件數。箭頭所指為南台灣出現颱風引起的洪水災情。(B)類鼻疽熱點地區(楠梓、左營)之雨量與類鼻疽通報件數關係圖。虛線線條表年度雨量分配；黑色細線條表雨季期間長短；紅色線條表類鼻疽通報件數。箭頭所指為南台灣出現颱風引起的洪水災情。



圖二、*B. pseudomallei* 於實驗場址的垂直分布變化

(A)藍田農地。藍田農地以固定間隔(1 m²)劃分 25 格，每隔取表、淺、深層土進行檢測與活培養，PCR 陽性率依據表層(0-10 cm; 細虛線)、淺層(10-30 cm; 粗虛線)與深層(30-60 cm; 黑實現)界定 *B. pseudomallei* 的垂直分布。*B. pseudomallei* 總分離株數目，用文字列於指示線旁。(B)蓮池潭。蓮池潭以固定範圍劃分 8 個採樣區，PCR 陽性率依據潭底之底泥(方塊所示)、深層水(>60 cm; 圓圈所示)與表層水(0-10 cm)界定 *B. pseudomallei* 的垂直分布。表層水為零檢出，所以沒有標示。*B. pseudomallei* 總分離株數目，用文字列於指示線旁。



圖三、污染 *B. pseudomallei* 空氣微粒之地理分布與陽性檢出率

(A) 採樣點位置圖。採樣點區域為類鼻疽熱點核心區域(S4-S7)與外圍地區(包括核心區域西北方、S1-S3; 受山丘屏障區域、S8-S9; 以及核心區不受風向影響的區域、S10-S12)。箭頭方向表示該區域於夏季, 出現強勁季風的主要風向。(B) 樣點區之 PCR 陽性檢出率。採樣點(S1-S12)與控制組(古坑; 從未出現類鼻疽通報個案的區域)出現 *B. pseudomallei*-specific DNA 的陽性率。

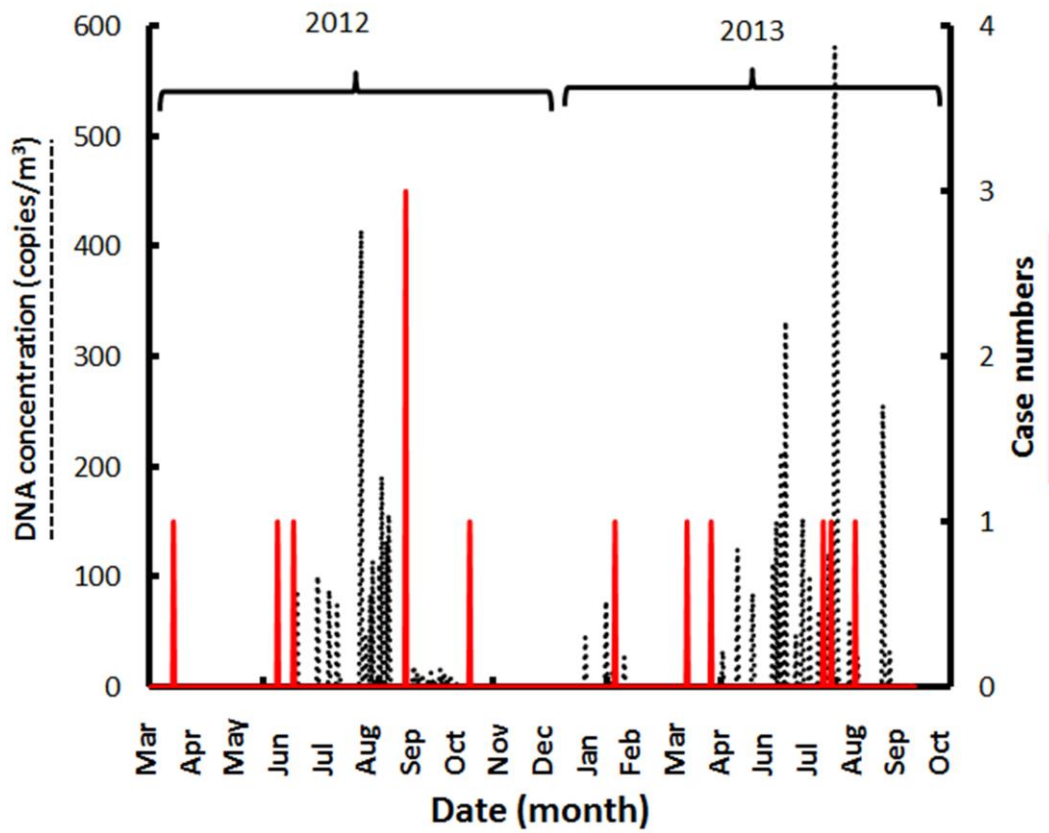


圖 四. 類鼻疽熱點區域之污染 *B. pseudomallei* 空氣微粒之時間效應變化

2012/03/01-2013/10/31 期間，類鼻疽熱點(S5 樣點區)之 *B. pseudomallei*-specific DNA 的濃度變化(虛線；採樣區間[4 d] DNA 濃度變化)。紅色實心線表示類鼻疽發病日期的通報數目(週為單位)。

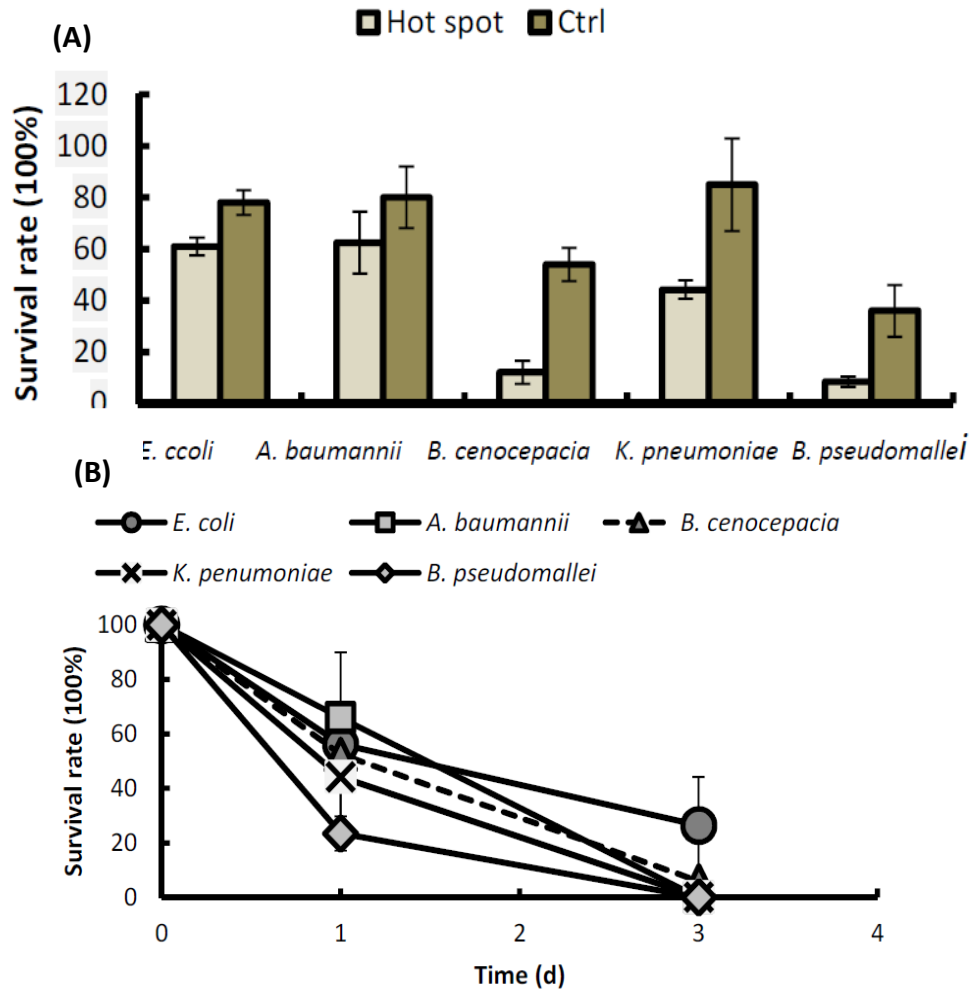


圖 五. *B. pseudomallei* 於空氣微粒的存活率比較

(A) 病原菌於空氣微粒之存活性比較。取類鼻疽熱點地區與控制組地區(古坑)收集之空氣微粒，經滅菌、烘乾後，將濾膜覆蓋 10^5 cfu 細菌，無菌下風乾後之濾膜總細菌數當作 100% 存活。將濾膜放置室溫 3 d 後，測量濾膜之殘存細菌數，並計算其存活率。(B) 病原菌於熱點地區空氣微粒存活之時間效應。取類鼻疽熱點地區之空氣微粒，經滅菌、烘乾後，將濾膜覆蓋 10^5 cfu 細菌，並依指定時間間隔計算其存活率。

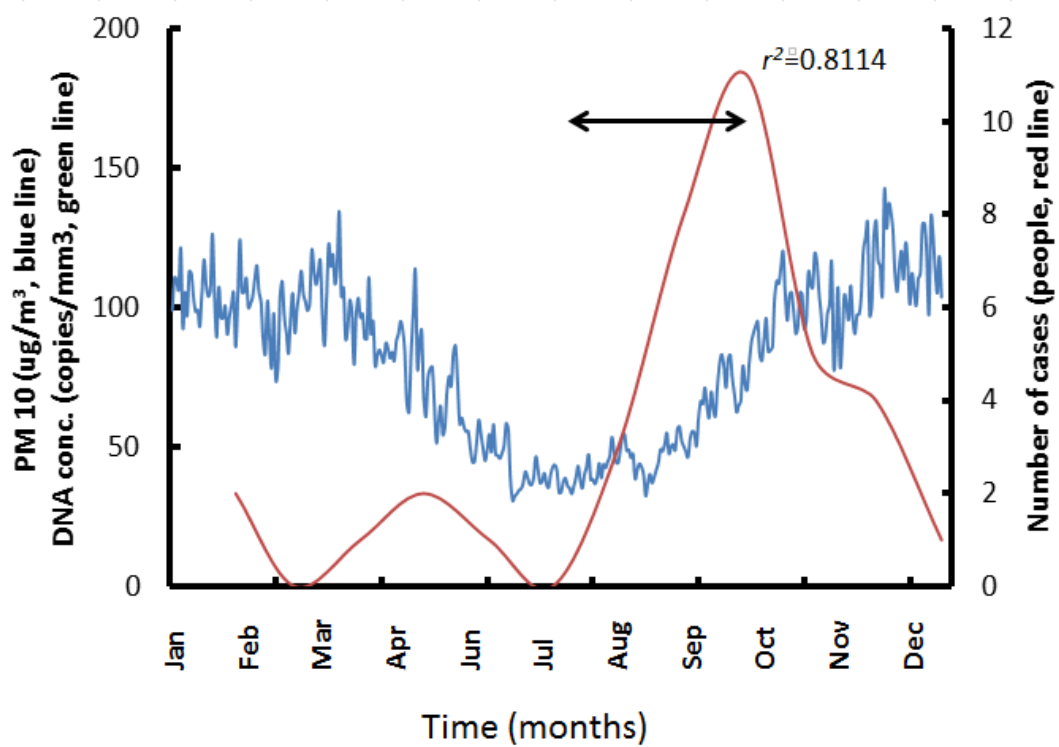


圖 六. 熱點地區 PM10 與類鼻疽通報個案之相關性

藍線所示為 2005-2012 年間之 PM10 空氣微粒的日平均濃度變化；紅線所示為 2005-2013 年熱點地區之類鼻疽通報總件數(以月為單位)。箭頭所指區間，是 2012-2013 年間空氣微粒可以測量出 *B. pseudomallei*-specific DNA 之期間。

Table 1, 2012-2013 蓮池潭陽性率調查比較表

Sampling	Years	Sizes (n)	Positivity, n (%)	
			PCR-based methods	Culture methods
Surface water	2012	39	12 (30.7%)	1 (2.6%)
	2013	24	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Deep water	2012		ND	ND
	2013	24	5 (20.8%)	2 (8.3%)
Muds	2012	21	6 (28.5%)	2 (9.5%)
	2013	24	3 (12.5%)	0 (0.0%)
River gravels	2012	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	2013		ND	ND

ND: No detection

Table 2, 空氣微粒之粒徑 *B. pseudomallei*-specific DNA 分析

	Total particles	PM10	PM2.5
Diameter (um)		10	2.5
Positivity; n (100%)	30 (100%)	11 (36.7%)	2 (6.7%)

審查意見執行情形

研究主題: 高風險類鼻疽疫情區域之地理、氣候、感染源與傳播途徑之相關性

計畫編號: DOH101-DC-1302

期中審查

審查意見	執行概況
1. 該計畫皆依計畫書擬定之目的、工作項目執行,亦符合本年度期中預定完成工作項目,尤其在空氣微粒監測與採樣技術。目前已進入颱風季節,颱風來襲前、中、後各階段之採樣時機請予把握。	已依委員意見,完成空氣採樣,並將結果列於期末報告
2. 有關半年(期中)經費使用狀況,請補充目前使用消耗狀況內容	已經補充說明
3. 類鼻疽為第三級病原體,活菌採檢、分離及鑑定等操作,請加強個人防護	已依安委會之規定,執行各項安全防護措施
4. 請考慮生活習慣之流病調查	已列入調查範圍
5. 在研究計畫當中為豪雨(>130mm)過後進行研究資料收集,但此雨量事件之選擇可能需要更多科學證據去佐證之。建議可輔以降雨強度或是淹水通報等事件日以規劃研究採樣	已將颱風警報與強降雨預報列為特定採樣範圍,當警報發生以每日採樣為原則
6. 研究原規劃當中提及欲標註地理環境、病原分布、氣象條件對類鼻疽疫情之關聯性,但就目前研究設計中,對地理環境部分之描述較少著墨。建議於後續研究中強調,何種特定地理環境對類鼻疽病原之生長或傳播有較高之風險	已利用高風險區域的地理環境設置 12 採樣區,因為類鼻疽疫情與颱風過境有關,考慮颱風(逆時針旋轉)多會產生強勁的西北風,因此位於類鼻疽熱點地區之西北方向設置 S1-S3 採樣點,作為污染空氣微粒可能出現的起始點。並在熱點的核心地區設置 S4-S7 採樣點,作為污染空氣微粒可能擴散的範圍。熱點地區之東南方有半屏山的屏障,因此在屏障之東南方之後設置 S8-S9 採樣點,作為污染空氣微粒可能無法跨越山岳限制的測量點。並且在熱點的外圍區域(>7.5 km)設置 S10-S12 的採樣點,作為污染微粒可能無法飄達的位置。
7. 本研究中對於土壤、水樣的檢測僅	已依據委員意見,第一年度進行土壤與

以 PCR 為之，對於空氣以 qPCR 分析，然類鼻疽的感染是否主要設定為接觸到不潔的土水而非空氣，若欲以空氣為主要定量分析的介質，是否應先建立空氣與土水中類鼻疽之相關性？否則這樣的研究設計與類鼻疽的實際感染途徑有落差。	水源的篩選調查，選出藍田農地與蓮池潭為可能污染址。第二年度完成藍田農地與蓮池潭之 <i>B. pseudomallei</i> 的垂直分布調查。預計第三年度將完成土壤、水源、空氣微粒與病人分離菌間的分子證據聯結的調查。
8. 本次所採集的 12 水體樣本以 PCR 分析均未測得類鼻疽，這樣結果可能會影響研究目的之達成，建議對於採檢點和採檢樣時間的選定再仔細考量	隨著季節變化，本計畫已測量到 PCR 陽性檢體與菌體的分離
9. 在 qPCR 分析的 QA/QC 部分應該要加上(1)qPCR 反應的 efficiency；(2)整套分析系統的(DNA 萃取+qPCR)的回收率和偵測下限	本研究是以 <i>B. pseudomallei</i> vgh19 (690±26 cfu/ml, n=3)為標準菌株進行萃取評估，結果以 $r^2=0.99$, slope=-3.6-3.1 之 qPCR 效率為 90~110%為實驗條件。整套分析系統的(DNA 萃取+qPCR)的回收率>90%，偵測下限為 1 copy/μl (約 5.52 cfu/μl)。
10. 實場和實驗室內測試的樣本數都要寫明	研究之樣品數均已詳列於期末報告書
11. 選擇其他縣市(或地區)與高風險地區做比較，以測試便因之相關性	已依委員的建議，本研究使用雲林古坑為相對比較的縣市
12. 分析高風險疫區病人潛在疾病，否則會影響類鼻疽的發生	已依委員的建議，從 CDC 資料庫擷取相關資料分析，並已列於上年度的期末報告書

研究主題: 高風險類鼻疽疫情區域之地理、氣候、感染源與傳播途徑之相關性

計畫編號: DOH101-DC-1302

期末審查

審查意見	執行概況
1. 明年請對吸入之傳播途徑多做著墨，期能較為明確地劃定高風險區域範圍、氣象狀況與維持時間，以協助在實務上做成能夠降低民眾感染風險又可行防治作為	已依委員意見，強化空氣微粒的採樣技術與採樣地點，並預期將分析結果與氣候因子共同進行風險評估分析，並將結果列於期末報告書。
2. 由於研究內容包刮採集底泥等較高菌量之檢體，建議除實驗室外，亦能注意採檢人員的防護措施	已依安委會之規定，執行各項安全防護措施

3. 除風速外，請分析溫度、溼度、光照等對微粒所攜帶病原體存活影響	空氣微粒對 <i>B. pseudomallei</i> 的存活性評估已列於期末報告
4. 依據個案分析，無固定職業(>50%)最高?戶外工作或農夫僅有 10%，請分析可能原因	因為類鼻疽患者多屬於有慢性病且需要照顧的族群，因此大多不是受雇人員。類鼻疽患者很少有戶外工作或接觸污染源的經驗，所以本研究的焦點放在空氣微粒傳播的機制，以解釋這個現象
5. 本計畫研究的設計佳，對於採樣點的選定謹慎且有好的根據，且同時考量水、土壤和空氣三種樣本，使結果能直接回答研究假設，惟 QA/QC 數據與資訊可再予補充	本研究的檢體先經過 GC-MS 測量 LPS 的指標，以確定採集檢體中有 G(-)菌的附著。並使用 16S RNA conserved region 的 PCR amplicon 作為 DNA 確實有效被萃取的依據。至於 PCR 的檢測效率、偵測值與檢測下限如前所述。
6. 本研究分析氣候因子對疾病之影響，並嘗試以環境檢測結果做為佐證，未來如能進一步將類鼻疽的檢出、氣候因子及疾病案例三者進行更深入的分析，甚至若能將氣候事件發生後，疾病產生的遲延(lag)天數，納入環境中類鼻疽濃度/檢出情形的分析考量，將更可釐清高雄地區類鼻疽的傳染途徑	本研究之第三年進度將會使用所有環境中類鼻疽濃度/檢出情形與氣候事件發生後(包括是否需設定疾病產生的遲延(lag)天數)進行統計分析
7. 研究中發現高雄地區的傳染途徑可能與泰國及澳洲等地極為不同，對於何種原因造成這樣不同的傳播途徑可予深入討論	本計畫是以地理因素解釋傳染途徑的差異。本年度空氣微粒檢測結果，已經逐漸凸顯這個現象，以列於期末報告中討論。
8. 推論降雨量可能造成土壤底部的類鼻疽跑到表層而造成傳播，但目前土壤樣本主要在 31-60cm 的土壤有最高的陽性檢出，或可進一步分析降雨/雨量是否真的改變了類鼻疽在土壤中的分布	已依委員意見，今年分析土壤中 <i>B. pseudomallei</i> 垂直分布的變化，並已列入期末報告的結果中。
9. 研究方法中提到上風處及下風處的採樣點，然結果中未明確提及這部分及比較上、下風處的類鼻疽檢出情形。另外，採樣期間的風向是否曾改變?若風造改變則上、下風處的位置也不同，在本研究上、下風處是如何定義	已將上風處與下風處更改為西北風的風向描述，讓讀者更容易了解風向的定義。此外風向是本研究持續於採樣位置實際測量的氣象數據，但因為採樣仍在持續進行中，所以風向是否改變了採樣檢出 DNA 濃度的結果，部分結果已列入期末報告，完整的結果將會在後續的

	報告中呈現。
10. 本研究提及「風向與風速會影響類鼻疽案例的發生」然因不同的風速和風向會導致類鼻疽集中(高濃度/高檢出)的地點不同，且受影響的時間亦不同，是否考慮針對可能的污染源進行上下風處不同距離點的類鼻疽分析，如此將更能看清楚呈現類鼻疽在空氣中的傳播情形	已經依據委員的意見，本研究考慮採樣區的地理環境與風向而設置有不同的採樣區。初步採樣區的 DNA 濃度變化與疾病發生的相關性，已列入期末報告。承上，待年度採樣檢體完全分析完畢，界定風向與空氣微粒濃度間關的結果，亦會在後續報告中呈現。
11. 有關高、低風險區之初步”特性描述”應予建議	第一年度類鼻疽高風險區的界定是依據 GIS 的空間分析結果所定義。第二年度利用空氣微粒攜帶 <i>B. pseudomallei</i> 之 DNA 濃度，證明高風險區與第一年定義之高風險區相符。低風險區則有數個選擇，包括半屏山以南(依地理環境推斷)、小港地區(依高雄地區之 focusing test 推斷)以及古坑地區(依據台灣類鼻疽病例的地理分布分析)。目前暫以古坑地區為低風險的參考點，但依空氣微粒的檢測逐步澄清，是當低風險區域參考點的特性，將會更清楚的說明。
12. 有關「filter」與「impinger」樣本所代表之不同意亦應予討論	Filter 結果表示 <i>B. pseudomallei</i> DNA 測量的結果；impinger 結果表示 cultivated <i>B. pseudomallei</i> 的結果，已經列於期末報告說明之。
13. 原計畫書 P.30 所提及之人文、地理等資料可以予討論。	已經依據委員意見進行分析，目前人文資料並無發現與類鼻疽疫情相關的具體結果，但地理因素(特別是半屏山的地理障礙)，顯與污染的空氣微粒分布有關，其結果已經列入期末報告。
14. 蓮池潭與藍田農地是可能之污染源，宜持續探討	已經依據委員意見，本研究已將蓮池潭與藍田農地之 <i>B. pseudomallei</i> 垂直分布與類鼻疽發生的相關性結果列入期末報告。
15. 對民眾之宣導應有具體做法，如消毒、如何防範感染(如易感染族群)等，只告知風速、風向及雨量等，可能無法	已依委員意見對民眾宣導宜以避免傷口接觸污染源或穿著雨鞋清理淹水庭院為主。出現風速、風向及雨量的警

深入民心。	戒，主要以醫護人員為對象，關注類鼻疽可能出現的聚集感染。
-------	------------------------------

研究主題: 高風險類鼻疽疫情區域之地理、氣候、感染源與傳播途徑之相關性
計畫編號: DOH102-DC-1202
期中審查

審查意見	執行概況
1. 文中提到『2012年4月至2013年3月期間熱點地區關鍵性氣候因子(強風與豪雨)低於2009年至2010年的平均水準，相對的2012年的類鼻疽發生率亦低於2009至2011年期間』，此處是採用全年還是6至10越盛行季節的數據?且建議應把2012年及2009至2011年期間的強風與豪雨的平均水準明確寫出，如此較易比對數據。	已依據委員意見，期末報告已將2005-2013年降雨量、雨季長短與類鼻疽個案發生件數製圖說明之。
2. PM10與類鼻疽發生的相關性建議可以進一步進行統計分析。另外，由於研究假設類鼻疽菌是附著於空氣微粒而散佈，故建議亦應分析PM10(及各種空氣污染物)與類鼻疽DNA檢出濃度之相關性，如此才比較能反應PM10(及各種空氣污染物)對於類鼻疽在空氣存在的影響。	已依委員意見，期末報告已增列PM10以外之空氣污染指標進行分析，並將結果列於期末報告。
3. 空氣中微粒的組成是否受月份、季節的影響?若是，則用以測試的空氣微粒所收集的季節是否為類鼻疽盛行的季節?再者，比較左楠與古坑地區的空氣微粒對於類鼻疽存活率的影響主要目的為何?是要說明空氣微粒的組成不同會影響菌的存活?或只要看微粒可以增加菌存活率而已?若能明確說明目的，則對數據結果應用性將會更清楚。	比較空氣微粒的存活性主要是說明如果 <i>B. pseudomallei</i> 附著類鼻疽高風險區之PM10空氣微粒，可以存活3日。既然部分的PM10可以不被呼吸道阻攔而進入肺部，所以污染的PM10是具有風險的。本項說明已列入期末報告。
4. 由於本研究採集了空氣、土壤、水樣等不同版本，建議能在報告簡單描述一下整體採樣點的相對位置。另外，建議探討不同樣本、採樣地點所測得類鼻	已依委員意見於期末報告繪製採檢的相關位置圖。分離菌株間的親緣關係，將依原研究計畫進度於第三年做完整的呈現。

<p>痘菌間彼此的相關性(如濃度、親緣等)，此類數據應有助於了解類鼻痘菌於左楠地區的傳播。</p>	
<p>5. 前一年度相關意見宜儘速予以列表對照回應。</p>	<p>已依委員意見於期末報告完整列表說明之。</p>
<p>6. 若欲回答『地表水以下之分布與該菌在不同層次』之時序關係應予以說明，以釐清解釋數據之相關性。</p>	<p>已依委員意見將時間序分析結果列於期末報告中。</p>
<p>7. 以實驗目的而言，宜儘早引入大氣擴散模式，以協助數據解析。</p>	<p>將依委員意見引入大氣擴散模式，並在年度空氣微粒分析完成後，將結果呈現。</p>
<p>8. 該計畫皆依計畫書擬定之目的、工作項目執行，並持續進行類鼻痘桿菌於空氣微粒的濃度變化與在不同水層或土層的檢出率與特殊氣候條件(雨量、風向、風速與濕度等)變化的相關研究。</p>	<p>將依委員意見持續進行，相關結果已列入期末報告。</p>
<p>9. 除了空氣傳播之可能性外，是否有可能經由飲水或食物污染傳播，盼能完成基礎建設後，以建構之方法證明吸入為台灣類鼻痘病例之主要感染途徑，並進一步推測不同氣象條件下的警示範圍。</p>	<p>將依委員意見逐步進行，並將為何研究重點放於空氣微粒傳播於期末報告做更完整的說明。</p>
<p>10. 目前尚未能從空氣微粒中培養出活菌，可再嘗試不同採樣檢體及培養技術。</p>	<p>已依委員意見增進檢體處理與培養技術，目前已有 4% PCR 陽性檢體的採樣時間點，可以同時活培養 <i>B. pseudomallei</i>。所以暗示 >90% 檢體可能是 uncultivated bacteria 或死菌。</p>
<p>11. 熱點左楠地區空氣微粒中不利於類鼻菌生長，是否與該地區防疫人員及民眾的消毒工作等作為，亦是影響因子之一。</p>	<p>因為 <i>B. pseudomallei</i> 屬於常在的環境腐生菌，所以目前沒有防疫人員或民眾消毒工作的積極作為。影響 <i>B. pseudomallei</i> 在空氣微粒的生長因素，可能與乾旱或 pH 值有關，已將此項列入期末報告討論中。</p>
<p>12. 執行進度良好，研究成果具重要參考價值。</p>	<p>將依委員意見執行之。</p>