

計畫編號：DOH97-DC-2014

行政院衛生署疾病管制局 97 年度科技研究發展計畫

台灣困難梭狀桿菌流行狀況之研究

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：魏孝倫

研究人員：高俊偉

執行期間：97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

* 本研究報告僅供參考，不代表本局意見，如對外研究成果應事先徵求本局同意*

一、摘要	2-3
二、本文	
(一)、前言	4
(二)、材料與方法	5-7
(三)、結果	8-10
(四)、討論	11-12
(五)、結論	12
(六)、參考文獻	13-15
(七)、圖表	16-25

摘要

關鍵詞：困難梭狀桿菌、監測、分子分型、偽膜性結腸炎、抗生素

困難梭狀桿菌(*Clostridium difficile*)引發人類之自限性腹瀉，嚴重感染會引起偽膜性結腸炎甚至死亡。危險因子包括免疫力低下者，高齡者及長期使用抗生素者，因此易造成院內群聚感染。後續的影響則是病人的死亡率增加、延長醫療照護的時間及成本。

在加拿大、美國與歐洲皆曾引發人口密集安養中心之群聚感染，自 2002 年開始，在美加與歐洲的大規模的群聚感染被發現和一株高產毒變異株 (B1/NAP1/027) 有關，至 2006 年，亞洲的日本及澳洲也發現此毒力菌株的蹤跡，各國的公衛實驗室因此警惕並進行疾病的監測，以防止高毒力菌株造成大規模感染。

本計畫第一年目標是達成(一)建立 *C. difficile* 菌株資料庫，得知台灣 *C. difficile* 於腹瀉病人的發生率，以作為判別流行狀況之基礎，(二)發展 MLVA 的高效力之分型技術，做為疾病監測與追蹤群聚感染之用。

今年執行成果，菌株分離率為 12.6%，而產毒株分離率為 4.2%。在發展 MLVA 方面，除了已發表的 10 個 VNTR 位址外，我們發現了 52 個高變異性的 VNTR 位址，可用於追蹤院內感染。初步選擇了兩個組合(MLVA1 已發表組合, MLVA2 自行研發組合)來分型本土分離株，發現兩者均能有效的偵測出群聚，MLVA2 有更強的分群效果。

Abstract

Keywords: *Clostridium difficile*, surveillance, molecular typing, pseudomembranous colitis, antibiotic

Clostridium difficile can cause *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) of human, clinical manifestations range from asymptomatic colonization, to severe diarrhea, pseudomembranous colitis (PMC), toxic megacolon and death(6). The risk factors for CDAD include antibiotics use, old age, immunocompromised. Therefore, CDAD become highly associated with nosocomial outbreak, and this will increase mortality of patients, course for taking care, and cost.

Recently, several hospitals in Quebec have experienced dramatic increase in the incidence, severity and relapses associated with CDAD. From 2002, the CDAD outbreaks of Canada and U.S was found associated with the B1/NAP1/027 virulence strain. In 2006, the 027 virulence strain was also isolated in Japan and Australia. This finding prompted the nosocomial infection surveillance program to conduct by every country to prevent the spread of disease.

The first year goal of this project include: (1) Establish the database of *C. difficile* and find the isolation rate of *C. difficile* in diarrhea patient, as doing that, we can figure out the baseline of *C. difficile* in Taiwan. (2) Develop the MLVA molecular typing method for disease surveillance and tracing of the nosocomial outbreak.

Result of this year is as follow, the isolation rate of is 12.6% in all *C. difficile* and is 4.2 % in toxin- producing strains. For MLVA development, we find 52 VNTR loci, 10 have been reported and 42 were found in this project, all of these VNTR loci were candidate for tracing outbreak. Finally, two MLVA groups MLVA1 and MLVA2 were used for isolates clustering, both MLVA groups detect the epidemiologic related isolates successfully. The MLVA2 have higher clustering efficiency than MLVA1.

前言

C. difficile 原為人類腸道正常菌叢，在長期使用抗生素後會造成 *C. difficile*- associated disease (CDAD)，其症狀可為自限性的腹瀉、結腸炎，嚴重則造成偽膜性結腸炎(1)。2002 年起，一株強毒株造成加拿大 *C. difficile* 之大流行，相較於之前 (1991~1992) 的菌株，此強毒株造成了短期死亡率上升 4 倍，屬於 B1/NAP1/027 型別(毒素分型 toxotype III，REA 型別 B1 型，PFGE 分型 NAP1 (North American pulsed field gel electrophoresis type 1)，PCR ribotype 027)，此強毒株也在美國、英國、歐洲大陸等地陸續引發院內感染 (2, 3)。日本和澳洲也分別在 2005 及 2006 年發現此強毒菌株(4, 5)。

CDAD 主要危險因子為長期使用抗生素(1, 6)，高齡、免疫力低下、制酸劑使用及透過醫護人員傳播等，綜合上述因子，醫院或長期照護中心等機構成為最容易造成群聚感染的地方。

目前困難梭狀桿菌並非法定傳染病，相關流行病學資料僅有台大醫院在 2003 年 9 月至 12 月的調查，發現 CDAD 在使用抗生素引起腹瀉的患者(AAD)中之發生率為 1.2/1000 人-日。本研究的事前評估，經回收 17 家醫院的問卷調查，有 15 家有 *C. difficile* 檢驗項目，但均是依醫囑才進行，所有醫院均未將之列為常規檢驗；而檢驗方法有 11 家以糞便作細菌培養再進行生化試驗確認菌株，3 家以糞便作細菌培養配合毒素 A 測試，由於生化試驗的準確度不足；而毒素 A 測試無法鑑定出新出現的毒素 A-B+ 感染株(7, 8)，因此由現有醫院資料必定會低估此菌分離率，也很難得知整體流行狀況。因此更提高此篩檢計畫的必要性。

為預防 *C. difficile* 成為嚴重的新興傳染病原，因此本年度計畫要建立以 MLVA 分型為基礎的 *C. difficile* 資料庫，將包含 MLVA 型別、ribotype 型別、毒性基因型，病人基本資料等，以得到(1) *C. difficile* 在腹瀉病人中之分離率，用以判斷是否爆發群聚感染，(2)建立 *C. difficile* 的 MLVA 分子分型方法，以判斷是否有強毒株出現，(3) 以 MLVA 分型法判斷院內群聚感染。

材料與方法

(一) 檢體、菌株及菌株資料之收集：

菌株收集及保存：與台中榮民總醫院、彰化基督教醫院、彰化秀傳醫院、基督教聖馬爾定醫院合作，培養腹瀉患者之肛門拭子，收集 *C. difficile* 疑似菌株；另外，與中山醫學院附設醫院及成大醫學院合作，收集已確認菌株。目前共確認 138 株菌株，長期保存以陶珠保存管及 15 % 甘油冷凍保存於 -80°C。

菌株資料收集：請醫院提供該菌株分離來源之性別、出生年月日、居住縣市、發病日期、採檢日期、是否住院、是否服用抗生素。

菌株分離及鑑定：檢體培養於 CCFA 選擇性培養基，選擇毛邊狀，於 UV 燈下觀察有淡黃螢光菌落，挑取一顆菌落放入 1 ml 無菌水中，煮沸 20 分後，離心取上清液，最後以 PCR 測定 *tpi* 基因，會增幅出一 230bp 片斷作確認 (9, 10)。

產毒型別鑑定：偵測 TcdA 基因的 3 端的重覆序列 7820-8189 nt 處，若 TcdA 增幅出 369 bp 表示可正常產生毒素 A，若產物 110 bp，表示有缺失，無法產生毒素，TcdB 針對 4468-4642 nt 的位置增幅，若產生 160 bp 表示產生 B 毒素 (9, 10)。

(二) **產毒性試驗：**採用 Remel (目前由 Oxoid 代理) 之 TcdA, TcdB 毒素快速檢測紙碟，依說明書操作 (11)。

(三) **PCR ribotype 分型：**擬照 Bidet 針對 16S 和 23S 中間的變異序列設計之引子組，測定 ribotype (12, 13)。

(四) 發展 MLVA 方法：

利用軟體找 VNTR loci:利用台大資料所研發之 VNTRDB 軟體，尋找兩條已完成定序之 *C. difficile* (strains QCD-32g58 與 630) 基因體序列中可能的重覆序列，人工比對去除重覆、互補或只有 1 個 bp 變異的序列，再進行後續的測試。

測試俱變異性的 VNTR 位置:針對篩選出的重覆序列位址的前後設計引子，引子是使用位於 Primer3 website(<http://frodo.wi.mit.edu> [accessed 1 September 2007])免費軟體所設計，變異性位址所用的引子及反應溫度如表一。選取 6 株菌株:包括 2 株 BCRC 標準株(BCRC17702, BCRC17678)及 4 株自行分離出之菌株，以 PCR 反應確認軟體選出的位址是否為高變異性位址，PCR 反應混合液總體積 10 μ l, 含 1 x PCR buffer, 0.5 M primers, 0.2 mM each deoxyribonucleotide, 1.0 unit 的 recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan)與 1 μ l 的 DNA template。PCR 反應的溫度控制為 94 °C 處理 5 分鐘後，再進行 30 次循環反應(94 °C 30 秒、48~52 °C 45 秒與 72 °C 45 秒)，再經 72 °C 反應 5 分鐘，產物經稀釋 20 倍，之後於 E-gene(Qiagen)分析 DNA 片斷，在 6 株測試株中若有片斷大小有不同者，則確認為 VNTR 位址。

比較各個位址之變異性:分析 24 株實際分離菌株之 50 個位址的變異性，每對引子之一，由台灣之美商應用生命股份有限公司合成與 ABI 系統相容之染料(6-FAM, NED, VIC 或 PET) (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA)。PCR 增幅反應中，每一反應的混合液體積為 10 μ l PCR, 含有 1 x PCR buffer, 1% DMSO, 0.05 至 0.4 M primers, 0.2 mM each deoxyribonucleotide, 1.0 unit 的 recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan)與 1 μ l 的 DNA template。將 50 個 VNTR loci 分成 12 組的 multiplex PCR(M1 至 M12)來分析，剩餘的 2 個單獨進行 PCR 反應。各組反應引子及濃度如表二。PCR 反應液置於溫度循環器 GeneAmp PCR System 9600 (Applied BioSystems)，反應的溫度控制在 M1~M8 以 94 °C 處理 5 分鐘後，再進行 30 次循環反應(94 °C 45 秒、48~52 °C 50 秒與 72 °C 60 秒)，再經 72 °C 反應 10 分鐘;而 M9~M12 為以 94 °C 處理 15 分鐘後，再進行 30 次循環反應(94 °C 30 秒、51 °C 90 秒與 72 °C 90 秒)，再經 72 °C 反應 10 分鐘。具螢光之 PCR amplicons，用水稀釋 200 倍，再以 ABI Prism 3130 Genetic

Analyzer 分析其片段大小(以 GeneScan 500 LIZ Size Standard [cat # 4322682; Applied BioSystems] 為參考標誌)。各樣本資料與 amplicons 長度資料，以 GeneScan Data Analysis Software ver 3.7 (Applied BioSystems) 貯存分析，所有不同長度之 amplicons，皆經定序決定其重覆單元數目，DNA 定序以 ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction kit 反應，使用 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer 分析。以 *C. difficile* 630 作為標準參考，由 Primer3 軟體預測出 VNTR 位址增幅之產物片斷大小，如表一。

資料分析：各 VNTR loci 之對偶基因變數值，以 Nei' s diversity index (D) 為衡量標準，其計算方程為： $1 - \sum(\text{allele frequency})^2$ 。MLVA 和 PFGE 之分型效力指數(discriminatory index)之歧異度指數(Simpson' s index)的多樣性指標(diversity, D)和 95%的信賴區間(confidence interval, CI) ，以 Hunter 等人之公式計算(14, 15)。

資料庫建立及 clustering: 經由 VNTR 位址長度推估之重覆單元數目，以阿拉伯數字記錄，以 BioNumerics software (version 4.6; Applied Maths, Kortrijk, Belgium)之 “Character Type” 資料形式，建立新的 *Clostridium difficile* 資料庫。應用 Minimum Spanning Tree 演算法(由 BioNumerics 軟體所提供)建構菌株之 MLVA 種源關係樹。

結果

菌株分離率目前鑑定出 138 株菌株，其中經臨床醫師懷疑為 CDAD 有 7 株，菌株來源包括三家醫學中心及兩家地區醫院。腹瀉定義是患者有未成型便即列入計算，腹瀉病人之分離率為 12.6 %，小於 5 歲者分離率為 26.3 %，65 歲以上的分離率為 14 %。但因第一年年是以實驗室現有的腹瀉檢體進行篩檢，並非與臨床醫師合作，因此並非所有符合腹瀉定義者均被採檢，因此本研究的分母應低於實際值。所有分離株中，俱產毒性者佔 33.3 %，因此產毒株在腹瀉病人之分離率為 4.2 %。所有分離株中，住院病人佔 47.1 %，非住院病人佔 23.1 %，另有 29.7 % 無資料；年齡分佈以 5 歲以下佔大部份為 47%，65 歲以上次之佔 16.7%；性別分佈上，男性佔 31.2 %，女性佔 38.4 %，有 30.4 % 無資料，由於此研究是以實驗室為基礎，無法控制臨床醫師的採樣標準，因此上述的分佈僅能作為粗淺的參考。

菌株毒素型分佈產毒型以 A-B- 的 66.7 % 佔最多，其次為 A+B+ 的 16.7%，而 A-B+ 也佔了 12.9% (表三)。不同毒素型在各年齡層分佈，5 歲以下以 A-B- 佔多數 69.4%，A+B+ 之佔 12.9%；65 歲以上以 A-B- 佔 68.2% 為主，A-B+ 佔 22.7%，而 A+B+ 僅佔 9%，因此若醫院只做毒素 A 測定，將會造成偽陰性。比較基因型與已完成的 30 株表現型，基因型陽性(A+B+及 A-B+)中且測出毒素表現的有 96.6 % (29/30)，其中 A-B+ 佔 3 株，A+B+ 佔 26 株，另一株未測出毒素表現的基因型是 A-B+，顯示所偵測的毒素基因位置未能完全反應產毒性，或是快速測試套組的敏感度不足，因此這部份我們將再以其它檢驗套組進一步測試。

PCR-Ribotype 分型完成 44 株菌株之 Ribotype 分型，共發現 12 型，其中以 4 型佔多數(8/44)，其次為 5, 6 型，ribotype 的毒素型分佈，型 2, 6, 7, 12, 17 均只有 A-B- 其中又以 6 型佔多數(7/44)，A+B+ 以型 1 為主，A-B+ 以型 4 為主；在年齡分佈上，小於 5 歲者除 10, 12 型外均有出現，大於 65 歲者僅有 4, 5, 6, 10, 12 等型別出現；在是否有腹瀉症狀出現，所有型別除 12 型外均有腹瀉症狀出現，但因是否有潛在性疾病的資料不足，此結果應不俱意義。

找尋 VNTR 位址 MLVA 是利用細菌具有變異重覆序列的特性，作細菌分型，我們首先利用台大資料所研發之 VNTRDB 軟體，尋找兩條已完成定序之 *C. difficile* (strains QCD-32g58 與 630) 基因體序列中可能的重覆序列；找到 1532 個重覆序列，再利用人工比對刪除重覆或互補的序列，得到 99 個可能的重覆序列位址；之後利用 PCR 方式配合定序測試 6 株菌株，發現 99 個 VNTR 位址有 52 個具有變異性，其中 CDR4、CDR5、CDR9、CDR48、CDR49、CDR59、CDR60、C6cd、H9cd、F3cd 等 10 個為已發表位址(21, 22)，其餘 42 個是新發現位址，除了 2 個大於 700 bp 的位址序列外無法由 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer 分析外，其餘 50 個 VNTR 位址後續實際用於測試所收集之本土菌株。此 52 個 VNTR 位址的引子，位址所在及重覆序列如表一。

測試 VNTR 位址的特性 分離株為了方便大量操作，將 48 個 VNTR 組合於 12 組 multiplex PCR 反應中，剩餘 2 株單獨反應，其組合及測試出的反應濃度如表二。之後實際測試了 24 株分離株，結果如表四，包含了各個 VNTR 的分型能力 (Typeability)，代表再 24 株菌株中，一對 VNTR 的引子所能增幅的菌株數；另外 alleles diversity 代表該 VNTR 的變異性，以公式 $1 - \sum(\text{allele frequency})^2$ ；而 alleles 代表在 24 株菌株中，該位址被發現包含不同的 copy numnbe 數。表四順序是依 alleles diversity 由上而下排列，可以看出已發表位址(CDR4、CDR5、CDR9、CDR48、CDR49、CDR59、CDR60、C6cd、H9cd、F3cd)(21, 22) 均有高變異性，而本實驗所發現的 cd7 位址也俱有 0.81 的 alleles diversity，甚至高於 H9cd、F3cd、CDR59、CDR48 等已被發表之位址。

利用 MLVA 對分離株分群 針對 57 株分離株做分群，首先使用已發表的 10 個 VNTR 位址分群，在本實驗中稱為 MLVA1，實驗結果以 minimum spanning tree 程式分析，分群標準是在兩個位址差異以內的識為一群，可發現有 9 株菌分別集中於 3 群(A1, A2, A3)，其它有 4 株差異再 3 個位址以內，剩下的菌株差異大於 3 個位址以上，親緣關係小(圖一)。群 A1 的兩株菌株均由同一醫學中心(代號 CA)的住院病人分離出，採檢日期相同，均為 1 歲的小孩，毒素型別同為 A-B-；群 A2 的兩株菌株是同一家醫學中心(代號 CG)分離出，採檢日相差 4 天，病患均為 1 歲小孩且住同一鄉鎮，一為住院病人，一個並未住院，兩者毒素型別皆為 A+B+；A3 群有 5 個

分離自 4 家醫院的菌株, 毒素型別有 4 株為 A-B-, 1 株為 A-B+, 患者有 3 位為住院病人, 有 2 位未住院, 有一位已知有沙門氏菌感染。進一步, 我們測試自己找到的 VNTR 位址對這 57 株本土株的分群效果, 優先選擇 alleles diversity 較高的與已發表的 VNTR 位址搭配, 不同組合經 minimum spanning tree 程式分析, 發現 MLVA2 (C6cd, cd12, cd16, cd7, CDR4, CDR48, CDR49, CDR9, H9cd) 組合的分群效果較佳, 可將本土株分為 4 群, B1 群會對應到 A1 群; B2 群會對應到 A2 群; B3 群含有 SQ08.17, CA08.193, CH08.44, 毒素型均為 A-B-, 在 MLVA1 屬 A3 群; B4 群含有 CG08.22 (A-B+), SQ08.3 (A-B+), CC08.05 (A-B-), 其中 CG08.22, CC08.05 均為 A3 群(圖二)。

討論

本研究所收集的陽性產毒株分離率約為 4.2%，較加拿大 2007 的產毒株分離率 7.7% 低(16)，但由於每個國家收集腹瀉檢體之標準不同，加國腹瀉檢體的定義是要 24 小時內有 3 次以上未成型便，或 36 小時內水瀉 3 次以上或 48 小時內有 8 次以上未成型便，標準較為嚴格，若以相同標準台灣的分離率應在 4.2% 之上，針對菌株收集方式，由於今年是以實驗室為基礎的方式，無法控制收集標準，希望未來以臨床醫師為合作對象，克服需病人同意書的困難，訂定收集標準，以便得到更正確的數值。

本實驗將人口分佈分為三群：小孩(小於 5 歲)，老人(大於 65 歲)及其它(5~65 歲之間)來自，以全部分離株來說，小孩分離率為 26.3%，老人的分離率為 14%，較之前文獻所報告為低，之前報告 *C. difficile* 在正常胎兒有 50% 分離率，正常成人有 2-3% 分離率，住院病人有 20-30% 分離率(18)，因基礎值不相同，無法精確比較，但可以發現趨勢是相同的，也就是在小孩的分離率要高過成人。

由毒素型別分佈可發現無論是小孩或老人所帶細菌常為不產毒菌型 A-B-，分別佔該族群的 69.4%，68.2%，因此為正常帶原，但在產毒菌型的比例上，小孩以 A+B+ 為主(12.9%)，老人則以 A-B+ 為主(5.19)。由於 A-B+ 產毒型已陸續被報導也會致病(7,8)，因此，有必要對各醫院宣導同時測定 A 及 B 毒素，以免誤判，另外，由此收集方法雖可見整體菌型分佈，但有臨床意義的產毒株收集量較少，因此未來將以人口密集機構為合作對象以提高 A+B+ 的收菌量。

在 VNTR 位址的測試方面，typeability 表示該 loci 是否能被增幅出來，部份已發表之位址雖被報告有高度變異，但對本土的菌株卻無法被分型，未被增幅出來的情形可能包括該位址突變或整段缺失，這部份有待定序來解答。allele diversity 越高表示越可將相似的菌株區別開來，因此我們同時將 typeability 及 alleles diversity 列入評估，選取 alleles diversity 大於 0.5 以上才放入 MLVA 組合，而已發表但 typeability 較差者如 CDR59 優先刪除，用於分析所有分離株以比較結果。

在 MLVA 分群實驗中(圖一，圖二)，A1(B1)群獨立於其它菌株之外，同為一家

醫院住院病人且分離日相同，毒素型為 A-B-，雖不會是致病因子，但可能為院內傳播的菌型，但因無居住地資料，無法確認此推論。A2(B2)的菌株為雖為同一醫院分離出，進同一鄉鎮卻非同為住院病人，推測可能為院外的傳播。無論在 A1 或 B1 及 A2 或 B2 群的例子，可以看出本實驗所使用的 MLVA1 及 MLVA2 都有足夠的分型效力監測院內感染或群聚感染。A3 群所含的菌株型大部份為 A-B-(CG08.22 為 A-B+)，雖分在同一群却看不出流行病學資料相關性，且 SQ08.19 為其它致病因子(沙門氏菌)，因此推測 A3 群的 A-B-菌株應為正常帶原菌的一群。A3 群在 MLVA2 被分到 B3 及 B4 群，包括 B3 群的全部菌株，及 B4 群的 CG08.22，顯示 MLVA2 的分群效力較 MLVA1 佳。

ribotyping (19, 20)是針對 16S 和 23S rDNA 間的變異序列進行分析，建立此傳統方法可方便與舊有文獻及其它實驗室比較，由於 ribotype 的變異速度較慢，因此我們選擇作為比較 MLVA 組合的指標，希望在菌株數量不多時，仍可有效監測群聚的發生，在本實驗中發現同樣的 ribotype 在 MLVA2 分群較能分在同一區域(圖三)，但由於 ribotype 完成的菌株數較少，僅為粗略比較。

結論

本計畫與醫院合作，收集並分離 *C. difficile* 菌株，建立了菌種鑑定流程，初步得知在腹瀉病人的分離率為 12.6 %，而產毒株在腹瀉病人的分離率為 4.2 %。針對 *C. difficile* 的 MLVA 分型研發，我們找到了 52 個 VNTR 位址的後選，初步選擇了兩個組合(MLVA1 已發表組合，MLVA2 自行研發組合)來分型本土分離株，發現兩者均能有效的偵測出群聚，MLVA2 有更強的分群效果。

檢討與建議

困難梭狀桿菌為厭氧菌，為確保菌株存活率，第一年度以實驗室為基礎進行篩檢，結果雖回饋予臨床實驗室，但時效上無法達到防治成效。明年度計畫若通過，將會分為兩個方向，保留一個實驗室合作篩檢菌株，以便與今年的分離率在同一基礎上比較，可得知流行趨勢；另一方面會與臨床醫師合作，以得到完成的病歷資料，掌握病例間的關聯性，協助院內感染之判斷，同時可及時回饋結果予臨床醫師，即時採取防治手段。

参考文献

1. Fordtran John S.. 2006. Colitis due to *Clostridium difficile* toxins: underdiagnosed , highly virulent , and nosocomial. *Bayl Univ Med Cent Proc*; 19: 3-12.
2. Jacques Pepin , Louis Valiquette , Benoit Cossette.2005. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec.*CMAJ*; 173(9): 1-6.
3. McDonald L. Clifford , Owings Maria , and Jernigan Daniel B.. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals , 1996-2003. 2006. *Emerging infectious diseases*. Vol 12 , no3 , march.
4. Kato H , Ito Y , van den Berg RJ , kuiiper E , Arakawa Y. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in japan. *Euro Surveill* 2007;12(1);E070111.3
5. Indra A , Huhulescu S , Hasenberger P , Schmid D , Alfery C , Wuerzner R , et al. First isolation of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027 in Austria.
6. Onderdonk AB , Lowe BR , and Bartlett JG. 1979. Effect of environmental stress on *Clostridium difficile* toxin levels during continuous cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.*; 38:637-641.
7. Limaye AP , Turgeon DK , Cookson BT , and Fritsche TR. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A- B+ strain of *Clostridium difficile*.2000. *J. Clin. Microbiol.* 38:1696-1697.
8. Sambol SP , Merrigan MM , Lyerly D , Gerding DN , and Johnson S. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. 2000. *Infect. Immun.* 68:5480-5487.
9. Lemee L , Dhalluin A , Testelin S , Mattrat MA , Maillard K , Lemeland JF , Pons JL. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase) , *tcdA* (Toxin A) , and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. 2004. *J Clin Microbiol.* Dec;42(12):5710-4.

10. Ludovic Lemeé , Anne dhalluin , Martine pestel caron , Jean francois lemeland , Jean louis pons. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types.2004. J. Clinc. Microbiol. Vol 42. 2609-2617.
11. X/pect *Clostridium difficile* Toxin A/B Protocol.
12. Bidet P , Lalande V , Salauze B , Burghoffer B , Avesani V , Delmee M , Rossier A , Barbut F , and Petit JC. 2000. Comparison of PCR- ribotyping , arbitrarily primed PCR , and pulsed- field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol.; 38:2484-2487.
13. Surveillance for community-associated *Clostridium difficile*-connecticut,2006. MMWR,2008,57(13);340-343.
14. Gupta, A., C. S. Polyak, R. D. Bishop, J. Sobel, and E. D. Mintz. 2004. Laboratory-confirmed shigellosis in the United States, 1989-2002: epidemiologic trends and patterns. Clin Infect Dis 38:1372-7.
15. Kimura, A. C., K. Johnson, M. S. Palumbo, J. Hopkins, J. C. Boase, R. Reporter, M. Goldoft, K. R. Stefonek, J. A. Farrar, T. J. Van Gilder, and D. J. Vugia. 2004. Multistate shigellosis outbreak and commercially prepared food, United States. Emerg Infect Dis 10:1147-9.
16. Surveillance for *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) preliminary results from January 1st to April 30 th,2007.
17. *Clostridium difficile*: Findings and recommendations from a review of the epidemiology and a survey of directors of infection prevention and control in England.
18. Belanger SD, M Boissinot, N Clairoux, FJ Picard and MG Bergeron, 2003. J. Clin.Mivrobiol.41:730-734. (18)
19. Van den Berg RJ , Ameen Hadi A. A. ,Furusawa Takahiro ,Claas Eric C. J. , van

- der Vorm Eric R. and Kuijper Ed J.. 2005. Coexistence of multiple PCR-ribotype strains of *Clostridium difficile* in faecal samples limits epidemiological studies. *J. Med. Micro.*; 54: 173-179.
20. Lemee Ludovic , Dhalluin Anne , Pestel-Caron Martine , Lemeland Jean-Francois , and Pons Jean-Louis. 2004. Multiocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic typed. *J. Clin. Microbiol.*; 42: 2609-2617.
21. Renate J. van den Berg, Inge Schaap,1 Kate E. Templeton, Corne' H. W. Klaassen, and Ed J. Kuijper. 2007. Typing and Subtyping of *Clostridium difficile* Isolates by Using Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. *J. Clin. Microbiol.*; 45: 1024–1028.
22. Jane W. Marsh, Mary M. O'Leary, Kathleen A. Shutt, A. William Pasculle, Stuart Johnson, Dale N. Gerding, Carlene A. Muto, and Lee H. Harrison. 2006. Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Investigation of *Clostridium difficile* Transmission in Hospitals *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 2558–2566.

表一. 52 個確認的 VNTR 位址之重覆序列型式,位置,反應溫度,及引子

Loci name	Pattern	Index*	Product size#	Annealing temp	Primer
cd14F	TTAGAAAGATTTTT ATTA	1785148	256	50	TGGTCCTACAACA GCAGCAG
cd8F	TGTGTGTT	1114631	335	50	TGCATATAAGTGC GAAATGAGG
cd1F	TA	377282	391	50	AGGAACTGCGGC TACTTTGA
cd20F	TTTTATAATTTCAA CAA	2734636	482	50	GCAGTTCCTTGAT GAACAACAC
cd21F	CTTCAT	2800757	315	50	CAAACCCTCCAG CAAATAA
cd13F	TAAATGAGTATGA GATTGTAAAA	1710510	389	50	TGCTCAGTTAGTG AGGTGAGTACA
cd12F	TTAGTTTTTATA	1451109	446	50	TTAGCTGATTGGG AGGTTGG
cd25F	AAGCTTTTTTCATT	3560984	489	50	TTTTGTCGTCTAT CCCACCA
cd18F	AAAT	2440373	318	50	CCGTTGTGGAGGC AGTTTAT
cd5F	TTAATTAAGTGGT AGATA	726882	458	50	ATATTCAAATGGC TTCATGG
cd9F	AAG	1164590	491	50	GGAGCAAGTGTA TGTACAGCAA
cd17R	ATTTAAAG	1931385	483	50	TTCATCAATTCCA TCGCTGT
cd15F	AAATT	1786239	416	50	CTGGAAATGCTAG TGTGCCA
cd24F	ATATTTAATA	3407362	397	50	CAAAGGTAGAC CTGAAAGGG
CDR48	ATAGATT	167124	210	51	TGGAGCTATGGA AATTGATAA
CDR60	TAAATAGGATGTA AAAG	677132	294	51	AACGCATTAATT TCAC-TCCTCATAC
Loci	Pattern	Index*	Product	Anneali	Primer

name			size#	ng temp	
cd2F	TTAATGTTTTATAA	410868	475	52	TGGATGGCTGATG ACCAATA
cd4F	TATAAAGTATGATT A	563064	296	52	GAAATACTCCGCC CTCAACA
cd16F	AGTTTTCTTTA	1876716	436	52	TTGAATCCAATTA GTACAGTAACGTC
CDR4	AAGAGC	755721	281	51	TTAATTGAGGGAG AATGTAAA
CDR5	TATATTGG	692929	273	51	AATTTTAAGTTAA CGTTTTTCTACAT
F3cd	ATT	1954915	411	51	TTTTTGAAACTGA ACCAACATA
C6cd	TATTGC	3239736	300	51	ATTGGAATTGAAT GTAACAAAA
CDR49	TTCTATC	3688632	393	51	CTTAATACTAAAC TAACTCTAACCAG TAA
H9cd	CTT	4116072	296	51	GTTTTGAGGAAAC AAACCTATC
CDR9	TAAAAGAG	664660	242	51	TGTATGAAGCAA GCTTTTTATT
CDR59	TAAG/ATATA/GGAT /C	771338		51	CCTTCTGGCTTCC TTGTA-ATA
cd7R	ACATCAAATAAAG TAAATTATGTATCA GATGAACTTGATA CA	841311	482	48	TCTGGCAGTTGAT TCAGCAT
cd10R	ATTTTT	1240444	336	50	CAAATGGGAAAC TAATGCGA
cd27F	TAATTAAACAACCTT G	1537494	359	50	CAAAGGTTAAAG CTCATTCTGGA
cd31F	ATTTACTTACATTC ACT	4060518	221	50	TGGCAATTMCCA CTACTACCA
cd35F	TACAGA	3723489	297	50	TGTATCCATATTG AAATCTCTCCA
Loci	Pattern	Index*	Product	Anneali	Primer

name			size#	ng temp	
cd22F	ATTTTCATTATTAT T	2856992	307	50	TGGTACCAAATAC TGATTTTGAGC
cd29F	ATTGAATTACGAA GAG	1895202n	324	50	TGGATAAAAGGT AAAGCATGATAG AA
cd33F	ATGAAGATTTGAA TAAAGACATTA	1436247	416	50	TTTCGCAACCATA GCATTTG
cd38F	AAGAATG	706421	300	52	GCCAAAGGTCAA AATCATGG
cd23F	AGCAATTACACAA TATATAAT	2978000	292	50	TGTGCTCCTGTCA AAACCAT
cd30F	CACAATAGTTATTA T	2920034	417	50	TTGCCGACTATGC TATGTTCC/T
cd34F	ATTTTA	1902652	222	50	TCATATGCAAATT TGTACCCTTT
cd37F	TA	632574	273	52	TGCAAAAGCAGA AGGAGAGA
cd39R	TTATAGTA	920658	263	50	ATGATGATAACA AAACAGAGAAAG AC
cd11F	GATGAAGAA	1320614n	417	48	CCATGGAT/CAGG AATTGAC/TATTG
cd19F	ATTTTAATTTTAAA TATTA	2546216	306	50	AGGCTCACAACT TCACTCC
cd28R	AGTTTAAA	1698321	434	50	CCCTATCTCATTG G/TCTTGAAA
cd32F	TAAATT	301774	447	50	TTCAATGCAAAGA GGTTGGA
cd36F	ATTACTATT	4035695	201	50	TTCCTGATTCTCC AACTTCACTT

*各個位址在 *C. difficile* 630 序列上的位置

#size 大小以 *C. difficile* 630 之完整定序序列利用 Primer3 軟體預測

表二. 12 組 Multiplex 反應濃度及標示螢光

	name	Fin.c(μM)	color		name	Fin.c(μM)	color
M1	cd14	0.05	B	M9	cd41	0.2	B
	cd4	0.2	G		cd10	0.2	B
	cd34	0.25	R		cd5	0.2	G
	cd22	0.2	Y		cd12	0.2	Y
M2	cd21	0.1	B	M10	CDR49	0.2	B
	cd36	0.2	G		cd28	0.2	G
	cd37	0.2	R		CDR59	0.2	R
	CDR48	0.2	Y		cd1	0.2	Y
M3	cd18	0.1	B	M11	cd35	0.2	B
	H9cd	0.1	G		cd40	0.2	B
	cd39	0.25	R		cd25	0.2	R
	F3cd	0.1	Y		cd29	0.2	Y
M4	cd27	0.2	B	M12	cd34	0.2	B
	cd19	0.1	G		cd42	0.2	B
	C6cd	0.2	R		CDR5	0.2	G
	cd38	0.1	Y		CDR60	0.2	R
M5	CDR4	0.05	B				
	cd13	0.4	G				
	cd30	0.2	R				
	cd9	0.2	Y				
M6	cd15	0.08	B				
	cd24	0.2	G				
	cd20	0.2	R				
	cd16	0.4	Y				
M7	cd7	0.1	B				
	cd8	0.25	G				
	cd23	0.25	R				
	CDR9	0.25	Y				
M8	cd2	0.1	B				
	cd32	0.25	G				
	cd17	0.25	R				
	cd33	0.25	Y				

註: 已發表位址為

CDR4,CDR5,CDR9,CDR48,CDR49,CDR59,CDR60,C6cd,F3cd,H9cd

表三.各年齡群的毒素型別分佈

毒素型	小孩	其它	老人	無資料	總計
A+B-	3.0%	0.8%	0.0%	0.0%	3.8%
A+B+	6.1%	3.8%	1.5%	5.3%	16.7%
A-B-	32.6%	6.8%	11.4%	15.9%	66.7%
A-B+	5.3%	0.8%	3.8%	3.0%	12.9%
總計	47.0%	12.1%	16.7%	24.2%	100.0%

小孩: 年齡小於 5 歲以下

老人: 年齡大於 65 歲以上

表四.

Loci name	Typeability #	Alleles Diversity*	Copy number
CDR4	0.96	0.93	0,1,4,5,7,8,9,11,12,15,16,18,25,-3,-4,-10,-17
CDR49	1.00	0.90	0,1,3,4,6,7,8,10,11,12,13,14,15,16,17
CDR9	0.83	0.90	2,5,6,7,8,9,10,11,13,21,25,26
C6cd	0.92	0.89	2,3,6,7,8,10,11,12,13,14,15,17,18,24
CDR60	0.92	0.88	2,10,15,16,17,18,20,21,22,23
CDR5	0.96	0.84	0,2,3,4,5,6,7,13,20,-2
cd7	0.92	0.81	2,3,5,6,7,8,9
CDR48	1.00	0.80	1,2,3,5,8,-1
cd5	0.96	0.77	2,3,4,6,7,8,16,17
CDR59	0.83	0.76	0,3,4,5,6,7
F3cd	1.00	0.64	4,5,8,9
cd25	0.96	0.63	3,5,6,7
H9cd	1.00	0.60	4,7,8,11
cd37	1.00	0.60	3,4,5
cd19	0.96	0.57	0,1,3,-3
cd20	0.83	0.55	0,1,2
cd16	0.92	0.53	0,1,2
cd12	0.96	0.51	2,3,4
cd27	1.00	0.50	1,2,3
cd22	1.00	0.49	2,3,4
cd14	1.00	0.47	1,2
cd34	1.00	0.47	0,-3
cd10	1.00	0.44	1,3
cd39	0.79	0.43	0,1
cd1	0.96	0.42	5,6,7
cd29	1.00	0.38	1,2
cd23	0.96	0.36	1,2,3
cd8	0.79	0.33	2,3
cd17	0.79	0.33	1,2
cd41	1.00	0.33	3,4
cd18	0.96	0.31	1,2,3,4
cd30	0.92	0.30	1,2
cd33	0.92	0.30	0,1
cd4	1.00	0.29	1,3,4

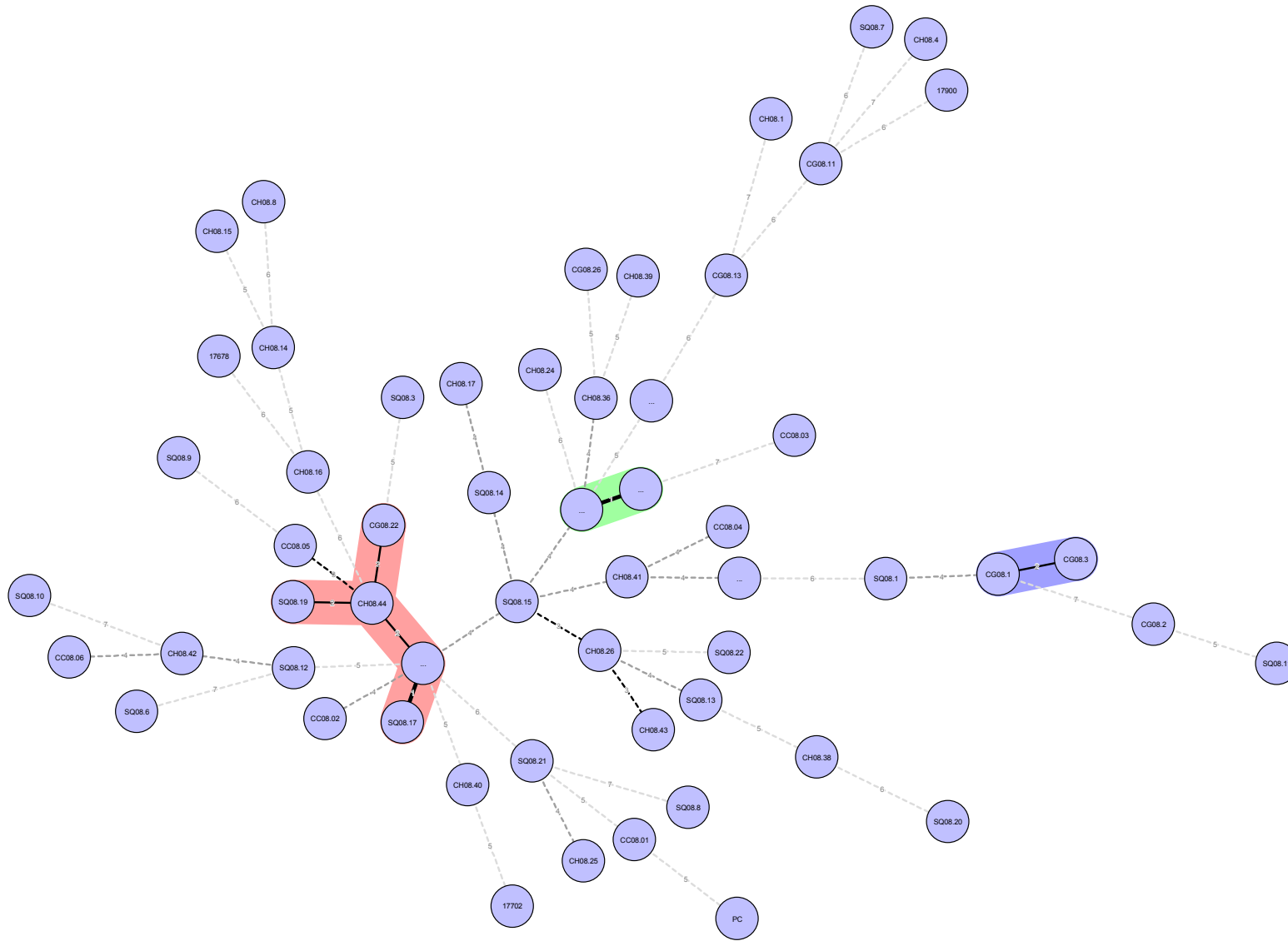
cd40	0.88	0.24	2,3
cd2	0.96	0.23	1,2
cd21	1.00	0.22	1,2
cd15	0.96	0.16	1,2
cd9	1.00	0.15	4,5
cd28	0.75	0.10	1,2
cd24	0.92	0.09	1,2
cd42	0.92	0.09	0,1
cd32	0.96	0.08	1,2
cd35	1.00	0.08	1,2
cd34	1.00	0.00	2
cd36	1.00	0.00	1
cd38	1.00	0.00	2
cd13	0.96	0.00	1

Typeability = 被增幅出之菌株數/24 株測試株

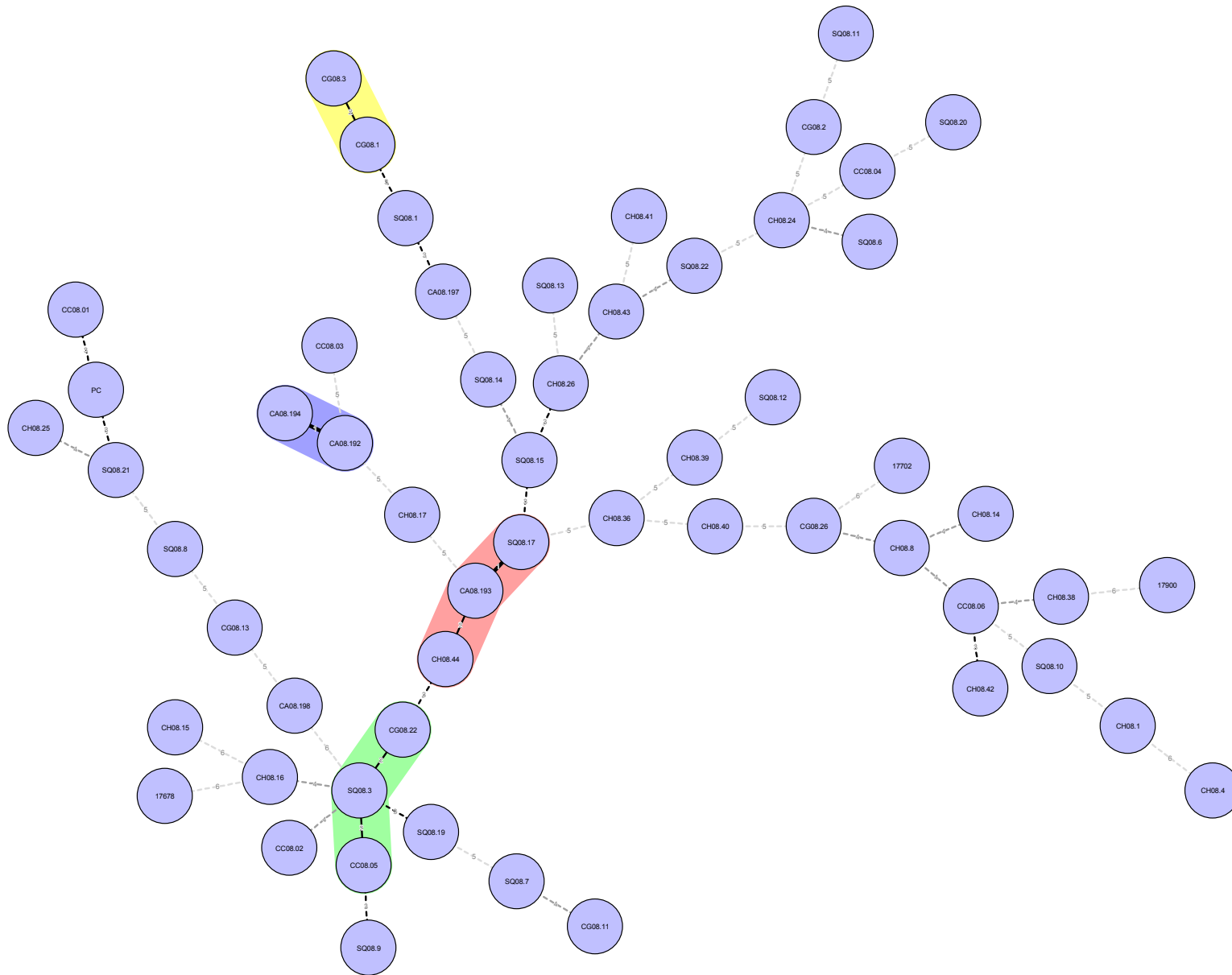
* Allele diversity = $1 - \sum (\text{allele frequency})^2$

已發表位址:CDR4,CDR5,CDR9,CDR48,CDR49,CDR59,CDR60,C6cd,F3cd,H9cd

圖一. MLVA1 (CDR4、CDR5、CDR9、CDR48、CDR49、CDR59、CDR60、C6cd、H9cd、F3cd)對 57 株菌株之分群結果
 將 57 株菌株分為 A1 群(綠色背景), A2 群(紫色背景)及 A3 群(粉紅背景), 圓圈內數字為菌株代碼



圖二. MLVA2 (C6cd, cd12, cd16, cd7, CDR4, CDR48, CDR49, CDR9, H9cd)對 57 株菌株之分群結果
將 57 株菌株分為 B1 群(紫色背景), B2 群(黃色背景), B3 群(粉紅色背景)及 B4 群(綠色背景), 圓圈內數字為菌株代碼



圖三. MLVA2 (C6cd, cd12, cd16, cd7, CDR4, CDR48, CDR49, CDR9, H9cd)對 57 株菌株之分群結果

將 57 株菌株分為 B1 群(紫色背景), B2 群(黃色背景), B3 群(粉紅色背景)及 B4 群(綠色背景), 圓圈內數字為 ribotype 型別, ribotype 1, 6, 10 分別以藍色, 紅色, 綠色線條標示, 而 ribotype 4 數量最多但分佈較為分散。

