

計畫編號：DOH98-DC-2021

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

亞太地區 PulseNet 組織合作研究計畫：食因性細菌病原分子流行病學
監測

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：邱乾順

研究人員：王佑文、童聖凱、梁綉雲

執行期間：2009 年 1 月 1 日至 2009 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

一、摘要	2-4
二、本文	
(一)、前言	5-7
(二)、材料與方法	8-9
(三)、結果	10-11
(四)、討論	12-13
(五)、結論與建議	14
(六)、計畫主要研究成果及具體建議	15
(七)、參考文獻	16
(八)、圖表	
圖一、 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi 菌株之親緣關係圖	17
圖二：PFGE 與藥敏關係圖一	18-19
圖三：PFGE 與藥敏關係圖二	20-21
表一、本研究分析之菌株來源	22
表二、本研究用於分析 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi 之 16 個 VNTRs	22

摘要

2009 年台灣傷寒病例數急速增加，大多數傷寒病例為印尼勞工。本計畫利用亞太地區食因性疾病分子分型監測網(PulseNet Asia Pacific)組織之便，邀請越南與孟加拉成員提供 2007-2009 年之 *Salmonella enterica* serovar Typhi 菌株，進行脈衝電泳、多位址重覆序列分析的基因分型，與藥物敏感性試驗，以探討不同國家來源之菌株之遺傳親緣關聯性與抗藥性面貌。在所分析的 176 株菌株中，以印尼、越南、孟加拉與台灣來源菌株為主，另有 6 株菌株來自中國、緬甸、印度、柬埔寨與日本等國。利用 MLVA 圖譜資料所做的群組分析結果顯示，印尼、越南與孟加拉之菌株各自形成獨立之群組，台灣菌株則相當分散；孟加拉與大部份的越南與其它境外移入菌株有較高的親緣關係，有 2 株台灣菌株和印尼來源菌株有相同 MLVA 圖譜。利用 PFGE 圖譜所做的群組分析並結合藥敏試驗資料，顯示大部份印尼菌株有相近親緣關係，該群組菌株對測試的 15 種藥物具有感受性或只對 streptomycin 具有抗藥性，但當中也有 1 株多重抗藥菌株存在。越南與孟加拉之菌株，多數為多重抗藥。雖然越南與孟加拉不是台灣傷寒菌的主要來源，但菌株多重抗藥的普遍性，仍有必要持續性的監測。菌株之基因分型資料與藥敏資料，皆存入 BioNumerics 管理之資料庫中，供往後比對研究之用。

關鍵字：*Salmonella enterica* serovar Typhi、亞太地區食因性疾病分子分型監測網、脈衝電泳、多位址重覆序列分析、抗藥性

Abstract

The number of typhoid cases increased dramatically in 2009; most of the cases were imported Indonesian labor^S. As a member of PulseNet Asia Pacific, a foodborne disease surveillance network in Asia Pacific region, we were able to collaborate with the public health laboratories in Vietnam and Indonesia to compare genotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates originating from different countries. The isolates were analyzed their genotypes with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) and tested their antimicrobial susceptibility, which was conducted in a laboratory of the National Health Research Institute. In total, 176 *S. Typhi* isolates were characterized. Most of the isolates originated from Indonesia, Vietnam, Bangladesh and Taiwan; another 6 isolates were originated from China, Myanmar, India, Cambodia and Japan. The clustering analysis of MLVA profiles revealed that isolates from Indonesia, Vietnam and Bangladesh distributed in distinct clusters; isolates from Taiwan scattered distributed. Most of Bangladesh isolates were genetically close to Vietnamese isolates and other imported isolate^S. Clustering analysis using PFGE patterns revealed that most Indonesia isolates shared an indistinguishable PFGE pattern or closely related patterns and they were susceptible to 15 antimicrobials tested or resistant to streptomycin only. But, a multidrug resistant (MDR) strain had emerged. Most of Vietnamese and Bangladesh isolates were MDR that would be a notable medical issue. All the genotype and antimicrobial susceptibility data were saved in a BioNumerics database for future study.

Keywords: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, PulseNet Asia Pacific, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus variable-tandem repeat analysis (MLVA), Antimicrobial drug resistance

前言

美國疾病管制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)為了監控*Escherichia coli* O157:H7 的感染流行問題，於 1996 年開始建立一個全國性的食因性疾病實驗室分子分型監測網(a National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance)，簡稱PulseNet，該監測網利用標準化的脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分子分型技術，由各州公衛實驗室進行菌株的PFGE指紋圖譜分析，再經由網路將圖譜傳送到CDC資料庫，集中進行圖譜比對，可達到早期偵測散發性食因性疾病流行性感染事件(diffused foodborne disease outbreak)¹。自 1998 年完成全國監測網建置之後，對*E. coli* O157 等食因性細菌病原引發的流行，監測成效非常良好。基於防疫無國界之理念，該計畫主持人Dr Balar Swaminathan開始將PulseNet技術平台推廣至國際，首先在鄰國加拿大成立PulseNet Canada，2002 年在亞太地區成立PulseNet Asia Pacific (有 13 成員國)的區域性監測組織，之後歐洲也成立了PulseNet Europe (31 成員國)，南美洲成立了PulseNet Latin America (13 成員國)，最後在中東地區成立了PulseNet Middle East (8 成員國)；這些地區加上PulseNet Canada與PulseNet USA，合組成立了國際的PulseNet International，是一個擁有 67 個成員國的龐大國際防疫組織 (<http://www.cdc.gov/pulsenet/participantS.htm>)。

PulseNet Asia Pacific (PNAP)於 2002 年在美國夏威夷成立後，日本國家傳染病研究所(National Institute of Infectious Diseases, NIID)副所長 Dr. Haruo Watanabe 為了能維持 PNAP 的運作，爭取日本政府經費，以研究計畫名義，每年提撥 200 萬日元支持每一個會員國，以建立實驗室 PulseNet 之設備、技術與分析能力，和參加 PNAP 年會或利用該筆經費到它國研習 PulseNet 相關技術。第一期 3 年(2006-2008 年)計畫，顯現相當成效；雖然該計畫只支付每一成員國每年 200 萬日元，金費不多，屬補助性質，但對一些經濟狀況不佳的國家，如菲律賓、越南、孟加拉、印度等國，仍有相當大助益，因為各國可利用小額的國外補助款爭取該國政府之重視，爭取政府提撥更多經費，建立該國之 PulseNet 實驗室能力。2008 年 2 月在印度召開之第五屆 PulseNet Asia Pacific 年會，Dr. Haruo Watanabe 宣佈已再度爭取到日本政府的第二期經費(2009-2011 年)，支持 PNAP 成員國進行跨國間的 PulseNet 相關的新型分子分型技術開發、新型分型技術的確效、與各種食因性細菌病原之流行病學研究與監測工作。

在 PNAP 成員內，本實驗室在 PFGE 分析能力與能量上，已居領先地位，同時在新型分子分型技術的研發上，本實驗室成功發展出包括 *Salmonella enterica* serovar Typhi 等數種食因性病原的 MLVA 技術，得以這些技術平台為基礎，主導研究計畫的進行。台灣在 2000-2008 年間，每年 *S. Typhi* 感染確定病例介於 33 至 60 例之間，大部份病例有出國旅遊史或為外籍勞工，屬境外

移入案例，但仍有半數是沒有出國旅遊史，很可能台灣仍有本土型的 *S. Typhi* 流行，然而 2009 年傷寒案例激增，上半年病例數已超過 2008 年全年病例數，激增之病例絕大部分是印尼外籍勞工。由於 *S. Typhi* 多數源於境外，而所謂的本土型菌株，也是很有可能是較早由鄰近的東南亞國家或中國所引入，因此對鄰近國家菌株情報之收集，特別是抗藥性資料與菌株 DNA 圖譜資料，有其重要性。

本研究與越南和孟加拉合作，收集該國 2007 年至 2009 年之 *S. Typhi* 菌株，進行 PFGE 與 MLVA 基因分型，並和國家衛生研究院合作，進行藥物敏感性試驗，比較台灣分離之菌株與越南、孟加拉與印尼來源之菌株，探討其親緣關係與抗藥性高低，並將資料有系統性地貯存於 BioNumerics 資料庫，供傷寒防疫追蹤調查之用。

材料與方法

一、菌株

本研究分析之176株*S. Typhi*菌株，來自The International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh (ICDDR,B) 的Dr. Munirul Alam (39株)與National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam的Dr. Hung Dac Cam (51株)，在國內分離確定源於印尼(53株)，本國分離但患者無國外旅遊史或無法確定感染來源者，歸類於台灣本土株(27株)，與其它國家(柬埔寨、中國、印度、日本與緬甸，6株)(表一)。菌株分離時間為2007-2009年。

二、PFGE 分析

所有菌株皆使用標準化的PulseNet PFGE protocol 進行PFGE圖譜分析²，但每一分析使用之*Xba*I酵素量只用5單位(5 U)而非標準protocol所使用之40 U。PFGE圖譜以Kodak EDAS290 System (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA)拍照貯存為Tiff格式之數位資料，供後續BioNumerics軟體進行分析。

三、MLVA 分析

用於分析 *S. Typhi* 菌株之 16 個 VNTRs (Table 2)，係由本實驗室與其它學者合作所發展但未公開發表。此一批 VNTRs 可同時用於分析 *S. Typhi* 與 *S. Paratyphi A*。

四、藥物敏感性試驗

菌株藥物敏感性試驗(antimicrobial susceptibility testing)係由國家衛生研究

院楊采菱實驗室所執行，使用 microdilution 方法測試菌株對 15 種藥物之 MIC (minimal inhibition concentration)。試測之藥物包括 ampicillin (AMPC), aztreonam (ATM), ceftazidime (CTAZ), chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIPX), ceftriaxone (CTRX), cefotaxime (CTAX), gentamicin (GEN), kanamycin (KAN), nalidixic Acid (NAL), streptomycin (STR), sulfamethoxazole (SUL), trimethoprim/sulfamethoxazole (STX), tetracycline (TE), trimethoprim (TMP)。

四、資料處理

PFGE 圖譜影像以 BioNumerics version 4.5 (Applied Maths; Kortrijk, Belgium) 進行處理，每一菌株之 PFGE 圖譜與資料庫之菌株之來源資料連結貯存於利用 BioNumerics 管理的疾病管制局 *Salmonella* DNA Fingerprint Database 資料庫中。MLVA 資料，係將各 VNTR loci 之 DNA 長度轉換成重覆單元數，以 BioNumerics 之“Character Type”型態貯存。菌株遺傳關聯度分析，PFGE 圖譜係以 UPGMA 演算法分析，MLVA 資料，係以 UPGMA 或 Minimum Spanning Tree 演算法進行分析。

結果

一、菌株親緣關聯性

利用MLVA (16個VNTRs)圖譜資料所建構菌株親緣關係圖(圖一)，顯示2007-2009年分離之176菌株，來自印尼與孟加拉之菌株形成明顯之群組，越南菌株形成一個大的群組，也存在多個分散的基因型，台灣和其它國家的菌株之基因型相當分散。孟加拉與大部份的越南和其它國家境外移入之菌株有較接近的親緣關係，有2株台灣菌株與印尼菌株有相同MLVA基因型。

二、菌株抗藥性分析

將印尼、台灣與來自其它國家(孟加拉與越南除外)菌株，依據其PFGE圖譜建構親緣關係樹，對照15個藥物抗藥資料，可見大多數的印尼菌株分配於一主要的群組(群組A)(圖二)，分佈於群組A之大多數菌株擁有相同PFGE圖譜，分離時間為2008-2009年。群組A之菌株(1株除外)，對所有測試的藥物具敏感性，或(8株)只對streptomycin具有抗藥性。1株屬於群組A的印尼菌株，具多重抗藥性，對4種藥物(chloramphenicol, streptomycin, tetracycline, sulfamethoxazole)具有抗藥性，在群組A內有2株台灣菌株，對所有測試的藥物皆具敏感性。

群組A之外的菌株，大多數對所有15種藥物皆具敏感性，或只對streptomycin具抗藥性，但有1株源於Cambodia的菌株，對8種測試藥物(ampicillin, chloramphenicol, nalidixic acid, streptomycin, sulfamethoxazole, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, trimethoprim)有抗藥性，在國內分離之2株菌株(2008年分離)，對5種藥物具有抗藥性。所有菌株對aztreonam, ceftazidime, ciprofloxacin, ceftriaxone, cefotaxime, gentamicin, kanamycin等二線藥物則未出現抗藥性。

越南與孟加拉菌株，也以PFGE圖譜進行群組分析，以對照菌株之抗藥性。親緣關係圖顯示菌株之抗藥性和基因型有關聯性(圖三)，群組B之菌株，皆源於孟加拉，除了1株是對7種測試藥物有抗藥性的多重抗藥菌株外，其它菌株對所有15種藥物具感受性或只對streptomycin或/和nalidixic acid具抗藥性。群組C菌株源於越南與孟加拉，此群組菌株大多屬多重抗藥性，大多數菌株對15種藥物中的7-8種藥物具有抗藥性。由於群組C之大部越南菌株尚未完成藥敏分析，但有6株已完成分析之越南菌株結果推測，越南之菌株也可能會有嚴重的多重抗藥問題。

討論

本年度(2009年)台灣傷寒病例數大量增加，上半年病例數已超過2008年整年的病例數，這些傷寒病例大多數是印尼新進的勞工或看護工。疾病管制局為解決傷寒激增的問題，除了加強印尼勞工的糞便檢驗外，亦派防疫醫師到印尼訪查。由菌株之 PFGE 與 MLVA 基因型分析，顯示源於印尼的大部份菌株，具有相同或相近的基因型，且自2008年開始即出現在台灣，由於印尼外勞大多來自同一個地區，推測印尼這個地區在2008年開始，應有傷寒流行情形，2009年流行幅度更加嚴重。由於來台印尼勞工都集中在幾個訓練學校，亦不排除傷寒的流行是發生訓練學校的可能性。

最近 Yanagi 等人³分析印尼泗水之 *S. Typhi* 菌株，發現在2008年分離之8株菌株，皆已對 nalidixic acid 與 ampicillin 有抗藥性，其中又有3株屬於多重抗藥，另外對 chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole 與 ciprofloxacin 具有抗藥性，對 ceftriaxone, cefixime 與 azithromycin 則尚有敏感性，因此 Yanagi 等人認為印尼 *S. Typhi* 多重抗藥，是很值得重視的問題。本研究之抗藥性資料顯示，入境台灣的印尼菌株，多重抗藥的問題仍然不很嚴重，大多數菌株對測試的15種藥物皆具敏感性或只對 streptomycin 具抗藥性，尚未出現對 quinolone 藥物(nalidixic acid 與 ciprofloxacin)或 cephalosporins 類有抗藥性的菌株。但印尼菌株中已有1株菌株具有多重抗藥性，未來印尼 *S. Typhi* 菌株抗藥性的問題，仍需持續監測。孟加拉與東南亞國家例如柬埔寨與越南 *S. Typhi* 菌株，具有嚴重的多重抗藥問題，雖然多屬第一線藥物，仍是個嚴重的警訊。Yanagi 等人發現印尼已存在抗 ciprofloxacin 的菌株，則未在所分析的176株菌株中發現。

本研究所使用與其它學者合作開發的 MLVA 基因分型方法，建構菌株

之親緣關係，效果相當好。*S. Typhi* 是屬於遺傳單純的病原菌⁴，目前所有 DNA-based 的方法，皆不足以有效地建立令人滿意的 *S. Typhi* 親緣關係。本研究所使用的 MLVA 方法，擁有 16 個 VNTRs，理論上，VNTRs 之數目愈多，就能愈清楚描繪菌株之間的親緣關係，而高變異的 VNTRs 可用於分析親緣關係近的菌株，較低變異的 VNTRs 則適合用於建立親緣關係較遠的菌株^{5,6}。在 16 個 VNTRs 中，6 個屬高變異的 VNTRs (表二)，故擁有區分高親緣關係菌株的能力。圖一的 MLVA 群組分析資料顯示，印尼、越南與孟加拉的菌株都形成一主要的群組，資料也顯示越南與孟加拉的菌株有較高親緣關係，台灣的菌株相當分散，推測來源相當多源，在 2007-2009 年間，沒有本土性的傷寒流行，但有 2 株菌株分佈在印尼主要群組中，且與其他印尼菌株有相同 MLVA 圖譜；此 2 名台灣病例中，有一例追查到照顧的印尼外傭是無症狀帶原者，指出印尼外勞高傷寒菌感染，對台灣的防疫會造成衝擊。

台灣傷寒病例，其感染病原多源於境外，特別是印尼、東南亞各國與中國等地，收集這些鄰近國家之菌株，建立 DNA 指紋圖譜資料庫，監測其抗藥性趨勢，對防疫工作有相當助益。藥物敏感試驗結果指出，源於印尼的大部份菌株，對測試的藥物少有抗藥情形，但越南與孟加拉菌株，或 1 株柬埔寨菌株，對測試的大部份第一線藥物出現多重抗藥的情形，這是一個值得注意的警訊。

結論與建議

1. MLVA 能區分高度遺傳單一化(genetically monomorphic)的 *Salmonella enterica* serovar Typhi，MLVA 圖譜資料能將印尼、越南、孟拉加來源菌株清楚地分成不同的主要群組。MLVA 因此具高分型效力，不但可做為群突發事件(outbreaks)調查與疾病監測(disease surveillance)之工具，亦可做為建構 *S. Typhi* 菌株遺傳親緣關係(phylogeny)的工具。
2. 印尼有一主要流行菌株，自 2008 年開始即由引進之印尼外勞移入台灣，2009 年數量激增，幸好這些菌株對常用之第一線用藥尚無抗藥性。然而，越南、孟加拉等地之多數菌株皆為多重抗藥，對第一線藥物普遍具有抗藥性，但對第二線藥物仍有感受性。雖然越南與孟加拉來源之傷寒病例不多，但越南是台灣眾多外籍新娘的母國，且台灣和越南經貿往來逐年增加，多重抗藥菌株的引入將難以避免，持續監測有所必要。
3. 在執行本計畫的同時，也分析歷年來收集之 200 多株 *S. Typhi* 菌株，其 PFGE 與 MLVA 基因分型資料，與藥物敏感性資料皆貯存於 BioNumerics 所管理之資料庫，供往後比對分析之用。特別是本計畫邀請越南與孟加拉學者參與，因而可獲得大量的菌株，因此可收集到鄰近國家 *S. Typhi* 之重要資訊。

98 年度計畫重要研究成果及具體建議

計畫名稱：亞太地區PulseNet組織合作研究計畫：食因性細菌病原分子
流行病學監測

主持人：邱乾順 計畫編號：DOH98-DC-2021

1. 計畫之新發現或新發明

本計畫是第一次導入 *S. Typhi* MLVA 基因分型方法，大量分析不同國家來源之 *S. Typhi* 菌株的研究。MLVA 資料能有效區分印尼、孟加拉、越南菌株，亦顯現台灣菌株之分佈。藥物敏感性試驗資料顯示印尼菌株抗藥性仍不嚴重，但照對的孟加拉與越南菌株則有嚴重的多重抗藥情形。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

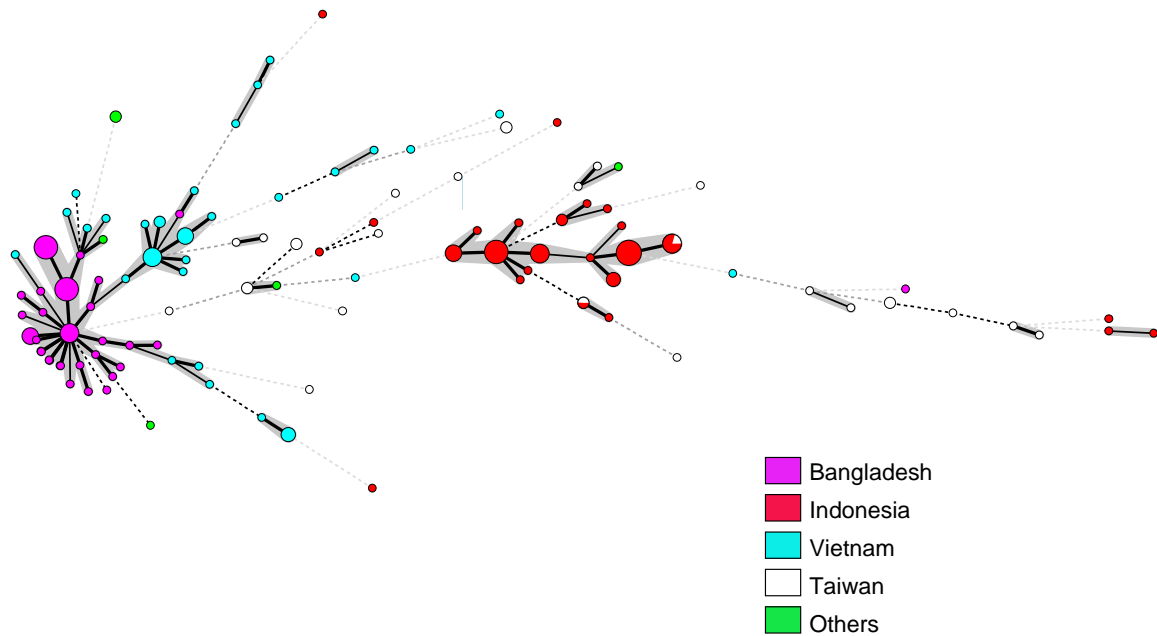
3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

印尼是台灣自 2008 年開始輸入傷寒病例數最多的國家，對該國菌株應持續進行抗藥性監測。其它鄰近國家，也有零星病例移入，研究顯示越南、柬埔寨、孟加拉菌株有嚴重多重抗藥菌株的出現，*S. Typhi* 多重抗藥菌株或可能成為未來台灣的問題。

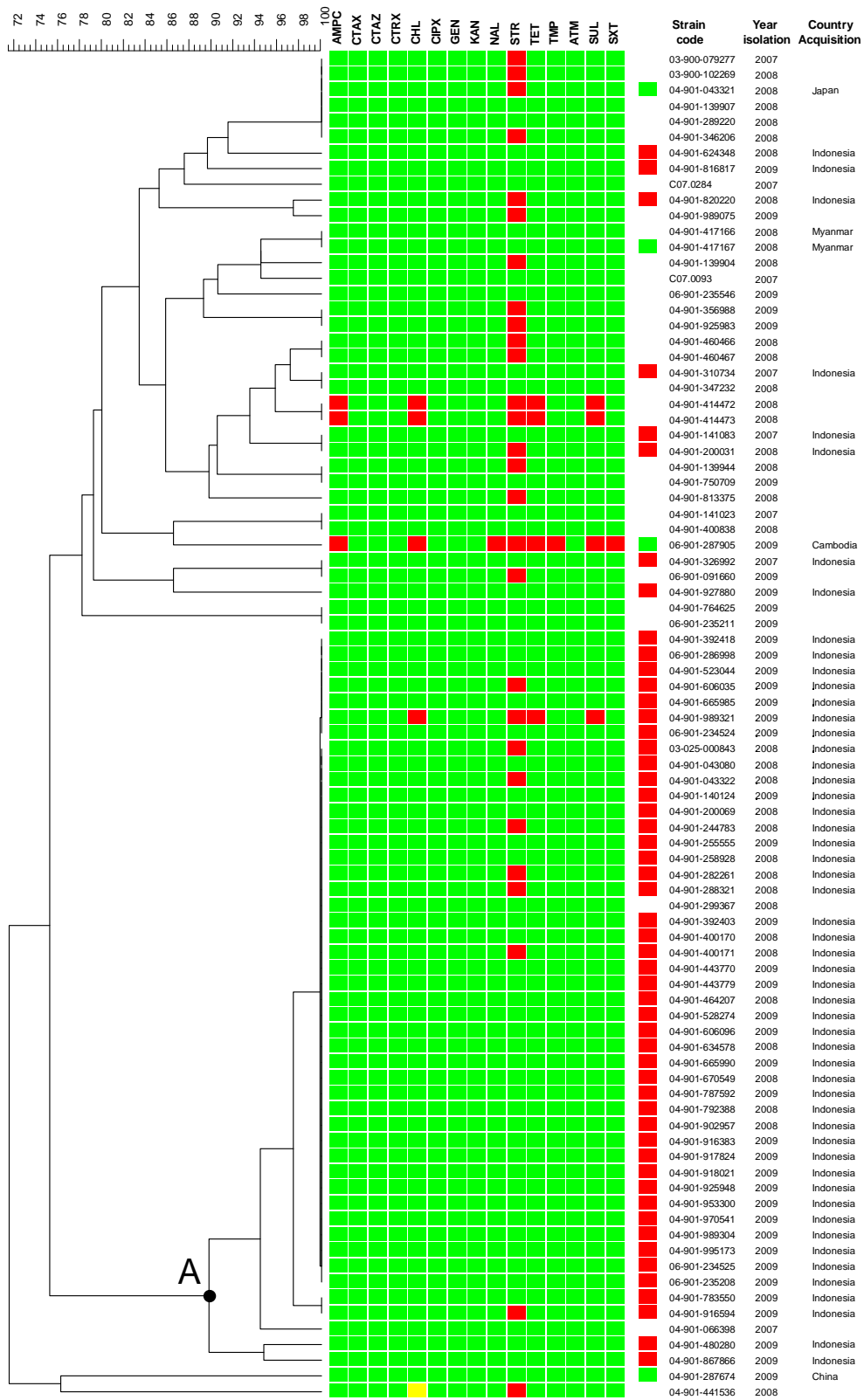
參考文獻

1. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* May-Jun 2001;7(3):382-389.
2. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* Spring 2006;3(1):59-67.
3. Yanagi D, de Vries GC, Rahardjo D, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant strains of *Salmonella enterica* in Surabaya, Indonesia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Aug 2009;64(4):422-426.
4. Roumagnac P, Weill FX, Dolecek C, et al. Evolutionary history of *Salmonella typhi*. *Science.* Nov 24 2006;314(5803):1301-1304.
5. Chiou CS, Watanabe H, Wang YW, et al. Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol.* Apr 2009;47(4):1149-1154.
6. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol.* Sep 2004;4(3):205-213.

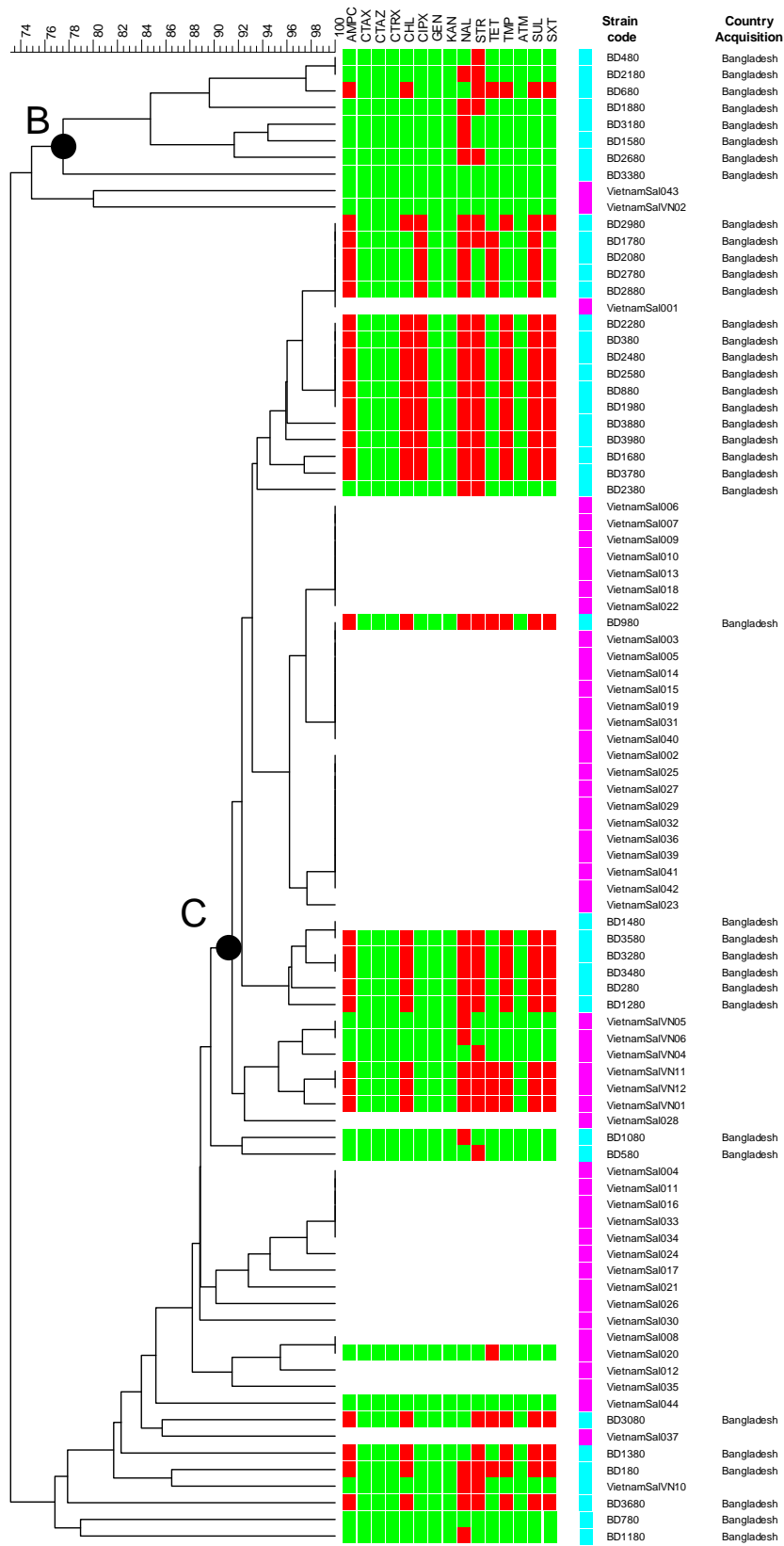
圖表



圖一、*Salmonella enterica* serovar Typhi 菌株之親緣關係圖。關係圖係以 16 個 VNTRs 之 MLVA 資料，使用 Minimum Spanning Tree 演算法所建構。176 株菌株來源包括孟加拉(粉紅色)、印尼(紅色)、越南(青藍色)、台灣(白色)與其它國家(綠色)。



圖二、PFGE 與藥敏關係圖一。菌株分離自台灣(白色)、印尼(紅色)與其它各國(綠色)。藥敏試驗，以紅色代表具抗藥性(resistance)，以綠色代表具感受性(susceptibility)。



圖三、PFGE 與藥敏關係圖二。菌株分離自孟拉加(青藍色)與越南(粉紅色)。

藥敏試驗，以紅色代表具抗藥性(resistance)，以綠色代表具感受性(susceptibility)。群組 C 之多數越南菌株尚未完成藥敏試驗。

表一、本研究分析之菌株來源

Country of acquisition	No. isolates	Year of isolation	
Taiwan	27	2007-2009	
Bangladesh	39	2009	
Cambodia	1	2009	
China	1	2009	
India	1	2008	
Indonesia	53	2007-2009	
Japan	1	2008	
Myanmar	2	2008	
Vietnam	51	2007-2009	
Total	176		

表二、本研究用於分析 *Salmonella enterica* serovar Typhi 之 16 個 VNTRs

VNTR Locus (alias) ^a	Length of repeat unit (bp)	Allelic diversity	
		Paratyphi A	Typhi
Sty2	6	0.00	0.02
Sty3	44	0.00	0.05
Sty14	10	0.65	0.00
Sty16	6	0.18	0.00
Sty19	9	0.51	0.00
Sty20	6	0.00	0.68
Sty25	6	0.00	0.92
Sty26	10	0.29	0.00
Sty37 (Sal02)	6	0.68	0.91
Sty39 (Sal06)	6	0.00	0.18
Sty40 (Sal20)	3	0.00	0.82
Sty41 (TR1 or Sal11)	7	0.00	0.90
Sty42 (TR5 or Sal22)	7	0.00	0.25
Sty43 (Sal10)	12	0.00	0.03
Sty44 (STTR5 or Sal16)	6	0.60	0.84
Sty45 (TR2)	8	0.00	0.95