

計畫編號：DOH97-DC-2014, DOH98-DC-2014

行政院衛生署疾病管制局97~98年度連續型科技研究發展計畫

台灣困難梭狀桿菌流行狀況之研究計畫

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

協同主持人：邱乾順、魏嵩璽、徐錦池、黃伊文、施志宏、
黃建文、盧敏吉

研究人員：高俊偉

執行期間：97年 1月1日至 98 年 12月 31 日

5 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*

目 錄

一、摘要	2-5
二、本文	
(一)、前言	6-8
(二)、材料與方法	9-15
(三)、結果	16-23
(四)、討論	23-30
(五)、結論	31-31
(六)、參考文獻	32-34
(七)、圖表	35-54
三、附錄	55-57

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。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。

有鑒於台灣已逐步進入高齡化社會，人口密集之老人安養院與長期照護機構，皆可能引發*C. difficile*之流行感染。本實驗室自2008年起建立困難梭狀桿菌之檢驗參考實驗室，可作為分子分型疾病監測系統之基礎。本計畫目標是達成(一)調查台灣*C. difficile*於腹瀉病人的分離率，以作為判別流行狀況之基礎，(二)調查長期照護病人中*C. difficile* 的分離率(三)發展MLVA的高效力之分型技術，以利

追踪群聚感染之用。(四)建立 *C. difficile* 分子分型, 流行病學資料, 及菌株抗藥性, 毒素特性等資料庫, 做為疾病監測用。

本研究達成:

(一) 產毒株於腹瀉病人之分離率為4.2 %。

(二) 台灣 *C. difficile* 於長期照護中心住民的盛行率因醫院不同分離率可由3%至28.57%, 而產毒株的無症狀帶原率為8.1%。

(三) 建立 *C. difficile* 菌株資料庫, 此資料庫包括 MLVA 及 PCR-ribotype 兩種分型方法, 及毒素型別, 抗生素敏感性型別等菌株特性及流行病學資料, 菌株種類包括目前國內主要流行株及國外 027 型標準強毒株等型別, 可提供臨床菌株比對之用。在兩年收集的分離株中, 並無發現 027 型強毒株存在, 但人畜共通型別的 017 型佔第四位。

(三) 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, 可用於追踪院內感染。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。第二年計畫並利用 MLVA 分型法偵測出院內群聚感染。

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 CDI. From 2002, the CDI outbreaks of Canada and U.S were 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.

Due to the aging of population in Taiwan, the CDI outbreaks may occur in the health care facilities, we set up a reference laboratory of *Clostridium difficile* since 2008, and further epidemiology study could base on this reference laboratory.

The result of our study this year:

1. the isolation rate of *C. difficile* in toxin- producing strains in diarrhea patient is 4.2 % .
2. The prevalence of *C. difficile* in health care facilities range from 3% to 28.57%, and the isolaton rate of toxin producing strain in asymptomatic carriers is 8.1%.
3. The *C. difficile* database was set up including MLVA and PCR-Ribotyping methods, toxin genotype, antimicrobial susceptibility, epidemiology data. Four different ribotype reference strains including the 027 virulent strains were also included in this database for the comparison of suspect clinical isolates. There is no 027 virulence strain found in the strains collected in the past two years, however, the zoonotic type 017 is the fourth most popular in all the collected isolates.
4. 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. In our second year surveillance, 6 nosocomical outbreaks were detected by MLVA.

一. 前言

流行狀況*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]。此菌在正常新生兒會有50 % 的分離率，在無症狀成人也有2~3 %的帶原[2]。2002年起，一株強毒株造成加拿大*C. diffidile*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，此菌為B1/NAP1/027 流行株(毒素分型toxitype 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[3-4]。

國內方面，台大醫院曾對1994年至1996年的該院檢驗結果作回溯研究以評估診斷方法[5]，發現感染*C. difficile*後CDAD的發病率約為59% (126/213)。而該醫院最近一次(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[6]。

致病機轉及危險因子*C. difficile*的分子致病機轉包括移生及毒

素產生，移生作用藉由各種吸附因子，如P36, P47, Cwp84等[7]，使得細菌得以生長在腸細胞表面；而致病因子主要是透過分泌TcdA與TcdB毒素，此兩種毒素為glucosyltransferase，會間接破壞腸壁上皮細胞細胞骨架 [8]。

而環境的危險因子為長期使用抗生素，高齡、免疫力低下、質子幫浦抑制劑使用及人員的接觸傳播等[9]，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。

問題需求及解決目前困難梭狀桿菌並非法定傳染病，在本研究的事前評估，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[10-11]，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。更進一步，國內醫院是否有群聚感染發生，也有待了解。

因此本計畫是要建立鑑定及監測系統，包括困難梭狀桿菌的培養及鑑定流程，及一個包括菌株的MLVA型別、ribotype、毒性基因型、抗藥型式、病人基本資料等的資料庫。

第一年計畫，我們主動收集實驗室來源的腹瀉檢體並進行菌種分

離，而今年的計畫則針對高風險的長期照護中心做篩檢，以了解困難梭狀桿菌在長照人口的盛行率。

C. difficile的傳統的分型方式有ribotyping 和毒素基因分型。PFGE， MLST (multilocus sequence typing)， 及MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis)則持續發展中，其中以MLVA的分型效力最強。本計畫去年已發展出一組以17個VNTR位址組合的MLVA分子分型法，並應用於今年的長照中心來源分離株，以追蹤群聚感染，並且在55株分離株中偵測到了5個群聚。ribotype是國際上通用菌株命名法，今年我們建立並改善了ribotype的分型方法，以利於國際間的比對。

由於CDAD的產生與抗生素有關，今年的計畫也建立了抗生素敏感性試驗，今年所有的分離株均對vancomycin、metronidazole這兩個CDI建議用藥[12] 保持敏感性，但對於fluoroquinolone類的norfloxacin則全部產生抗藥性。

今年我們並舉辦研討會，將本計畫所建立的困難梭狀桿菌鑑定流程及相關經驗，提供臨床檢驗室參考，以加強臨床人員對此菌的警覺。

二. 材料與方法

1 . 檢體及流病資料之收集：

菌株收集：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。

檢體收集：與6家醫院合作收集長期照護中心所有住民之糞便檢體，5家在中部地區(4家地區型醫院, 1家教學醫院), 1家為南部地區醫院，在本研究中5家醫院以代號CC、CI、CJ、CK、CL、SO表示，病房型態包括5個RCC，6個RCW，及1個護理之家，收集糞便送至中區實驗室進行分離鑑定困難梭狀桿菌。

流病資料收集：提供問卷，請醫院護理人員提供病人之性別、出生年月日、居住縣市、發病日期、採檢日期、是否住院、是否服用抗生素等(附錄一)。

2. 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，會增幅出一290

bp片斷作確認[13]。

3. 產毒型別鑑定：偵測TcdA基因的3'端的重覆序列 nt處，若TcdA增幅出395 bp表示可正常產生毒素A，若產物為150 bp，表示有缺失，無法產生毒素，TcdB針對nt 的位置增幅，若產生 bp表示產生B毒素 [13]。

4. 產毒性試驗：採用Remel(目前由Oxoid代理)之同時測定TcdA，TcdB毒素之ELISA試驗，依說明書操作[14]。

5. 抗生素敏感性試驗：利用BD Biodisk公司生產之梯度濃度條(E test)，依該公司之操作說明書進行試驗，本研究測試的抗生素有 Ciprofloxacin, Ceftriaxone, metronadalzone, vancomycin, moxifloxacin, tetracycline, erythromycin, clindamycin等8種藥物。

6. 發展MLVA方法：

(1)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。

(2)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 μ M 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 $^{\circ}$ C處理5分鐘後,再進行30次循環反應(94 $^{\circ}$ C 30秒、48~52 $^{\circ}$ C 45秒與72 $^{\circ}$ C 45秒),再經72 $^{\circ}$ 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 mM primers, 0.2 μ M 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a。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。

(3)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[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。

7. 分離株之MLVA分子分型：

利用第一年發展出之以17個VNTR為主之MLVA組合, 對所有分離株進行MLVA之分子分型, 17對引子分別用與ABI系統相容之染料(6-FAM, NED, VIC或 PET) (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA)標記, 並分成5個群組(表二 b), 進行多重PCR反應(multiplex PCR), 所增幅之片斷大小再於定序儀上的毛細管電泳分析。詳細方法如下, PCR反應混合液總體積10 μ l, 含1 x PCR buffer , 1% DMSO , 0.2 μ 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95 C處理15分鐘後, 再進行30次循環反應(94C 30秒、51C 90秒與72C 90秒), 再經72 C

反應10分鐘, 具螢光之PCR 產物, 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, 預測出VNTR 位址增幅之產物片斷大小。

8. 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。

9. PCR ribotype 分型: 利用Bidet針對16S和23S中間的變異序列設計之引子組作部份實驗方法的修改, 以FAM螢光標記引子, 增幅菌株之變異序列, PCR混合液為在總體積10 μ l中, 含1 x PCR buffer, 0.5 μ M primers, 0.2 mM each deoxyribonucleotide, 1.0 unit的

recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan)與2 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23次循環反應(94 C 1分鐘、57 C 1分鐘、72 C 分鐘)，再經72 C反應5分鐘, PCR產物，稀釋200倍，再以ABI Prism 3130 Genetic Analyzer分析片斷大小, 將ABI之原始檔匯入BioNumerics軟體進行分析。

10. 菌株永久保存：中區實驗在計畫進行期間將長期保存菌株於15%甘油中及陶珠保存管中。

11. 分析CDI歷年的個案數：申請健保資料庫連結，取得包括病人年齡, 性別, 所接受之診療及其它潛在疾病代碼, 是否死亡, 醫事機構類別, 住院日數以判斷歷年CDI的個案數是否有升高的趨勢。

三. 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。

長照中心之盛行率

總計收集了342件糞便檢體進行鑑定分離，對象來源的6家醫院有1家(CC)為醫學中心，5家(CI, CJ, CK, CL, SO)為區域級醫院，收集的病房來源有RCC (CI, CJ, CK)或RCW(CI, CK, CJ, CL, CC, SO)或護理之家(SO)(表四)。依美國CDC及歐盟CDC對CDI監測的定義，入院48小時以內者無法判斷為社區型或院內型，因此入院48小時以上之個案才予以分析，符合此標準的個案數有337件，其中分離出之陽性產毒株有38件，總分離率為11.2%。每家醫院的產毒株分離率自3%至28.57%不等(表四)，比較不同醫院所有種類病房總計分離率發現，SO醫院與其它5家醫院之卡方檢定有顯著低下；再以病房種分類比較，發現三家醫院的RCC病房之間分離率未有顯著差異，五家醫院之RCW病房中，

S0醫院與其它醫院有顯著差異;比較不同種類病房間之分離率, NH與另外兩種病房, 分離率有顯著差異;分析各醫院內之不同病房的情形, 發現並無顯著差異。綜合來說, RCW病房在各醫院均有較高分離率的趨勢。

利用羅輯迴歸分析所有檢體與8種因子, 包括是否腹瀉, 是否使用抗生素, 是否使用H2 blocker, 是否使用質子抑制劑, 是否插NG tube, 是否有CDAD病史, 是否有急性病房住院, 是否有排糞失禁, 發現病人之急性住院, H2 blocker使用及排便失禁, 三個因素均偏低, 取S0醫院之RCW病房與其它醫院之RCW病房共同分析, 發現上述三種因子均有顯著差異, 推測是S0醫院分離率低的原因。

產毒型別分佈

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a)。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。

長照中心之產毒型以A+B+ (30/38)占多數，在各別的醫院也是A+B+型別居多(表三b)。

抗藥型式分佈

計畫初期使用5種抗生素包括，在所有分離株中只出現兩種型別，綜合來說，所有分離株對Vancomycin及Metronidazole均有感受性，而對ceftriaxone, norfloxacin均產生抗藥性，只有在tetracyclin有敏感或抗藥的產異；之後增加的3種藥物是Moxifloxacin, Clindamycin, erythromycin, 在已執行的11分離株之中分為7種抗生素敏感性型式，其中有一分離株為多重抗藥性，除Vancomycin及Norfloxacin外，對所有藥物均產生抗藥性(表五)

發展MLVA分型法

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個俱有變異性，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a。之後實際測試了24株分離株，結果如表六, 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。表六順序是依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)。

以MLVA偵測院內群聚感染

我們利用第一年計畫研發出之17個VNTR位址的MLVA組合，針對分離株進行分子分型，將這些MLVA型別輸入Bionumerics軟體，再以maximum spanning tree(MST)來看分離株的聚集情形，聚集的判定條

件為分離株的MLVA型別差異在一個位址以內的判定為一個聚集，在5家醫院的5個病房偵測到了7個聚集(圖三)，將7個聚的資料整理如表七，群集1, 2, 4, 5, 6, 7分別是發生在醫院SO, CL, CJ, CI, CI, CK各自的相同病房中，各個群集內的分離株，ribotype的型式都相同，但少部份俱有不同的毒素基因型別及抗生素敏感型式(表七)。而聚集3是來自同一病人的兩株菌株，因此不列為群聚感染，總計我們在今年醫院來源的分離株中偵測到了5個群聚。

PCR-Ribotype型別

我們建立困難梭狀桿菌的PCR-Ribotype分型法，由於傳統的跑膠方法有影像模糊缺點，因此我們改用標記螢光的引子進行增幅16S及23S間之變異區，之後利用定序儀上的毛細管電泳分析，並且利用購得的全長定序*C.difficile* 630株作為標準來調整實驗條件(圖四a)，所得到peak file直接輸入Bionumerics軟體較傳統跑膠電泳圖解析度較佳，如框選部份由跑膠電泳圖不易區分，由毛細管電泳則可清楚區別(圖四b)。

為建立資料庫，我們購得的ribotype標準株4株，分別為國際通用的001, 017, 027, 106型，加入資料庫比對，未比對到的型別則以(TW+序號)來命名。目前在困難梭狀桿菌資料庫總計有258株菌株，有58種ribotype型別，最多的前15名分別是TW4, TW10, TW14, 017, TW25,

TW1, TW3, TW6, TW18, TW23, TW16, TW5, TW8, TW4(表八), 此15個型別包括了164個分離株, 佔所有分離株的一半以上。與4個國際型別比對, 僅017存在本土株, 其餘3種型別, 包括027這株強毒株也尚未在本土株中發現。

健保資料庫分析結果

在2000年到2007年的健保資料中, 總共有2393個病例之診斷碼含8.45者, 在2000、2001、2002、2003、2004、2005、2006、2007年間分別有9、75、17、92478、535、615、572個病例。其發生率在2000、2001、2002、2003、2004、2005、2006、2007年間則分別為每十萬人年有0.006、0.3、0.1、0.4、2.1、2.3、2.7、2.5個病例。發生率和個案數隨著年度而增加。在2006年達到高峰。各年齡層在各年的分佈如圖五所示。由圖而見在>65歲的族群是病例主要年齡層。可見在<15, 15-44, 45-64, 及>65歲以上的年齡層病例數各為: 80(3.34%), 241 (10.07%), 451 (18.85%), 1621 (61.74%)。而各年齡層的兩性比例以Fisher's exact test比較, 男女性別在各年齡層的分佈並無顯著的差異($p=0.124$)。以申報健保費用的醫院層級分析, 可見醫學中心是主要的診斷醫院, 佔所有病例的54%(如圖六所示)。其次為區域醫院(25%)。兩者合計佔四分之三, 是主要的診斷醫療機構。

四. 討論

腹瀉病人之分離率

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[17]，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。

長照中心之盛行率

本計畫第二年是直接與臨床醫師合作，全面篩檢糞便檢體，在6家

長照中心所得到的產毒株分離率為3 %~28.57 %，分佈範圍相當大，除了S0醫院的3 %有顯著降低外，其它醫院的差異可能導因於檢體數量的差異。綜合來說，國內長照中心，較之前國外報告的30.3%為低[18]。

進一步分析陽性分離株與臨床症狀的關係，所有個案中有5例有被報告CDI病史，目前均已無臨床症狀，5例中有1例分離出困難梭狀桿菌，但為不產毒株，推測為一般帶原菌。

而有臨床腹瀉症狀的占產毒分離株的26.3 % (10/38)，總計無症狀帶原占所有篩檢數的8.1% (28/342)，這個比率較愛爾蘭的10 %為低[19]，但高於美國的5% [20]顯示仍有大部份的產毒株為無症狀帶原，但這些帶原者是否會因外在因素(如抗生素使用)而進一步引發疾病需要進一步探討，另外無症狀帶原者也被認為是一個引發病房內群聚感染的風險因子[21]。本研究提供了國內首次的長照中心細菌分離率，萬一未來發生流行，可以此背景值作為判斷。

毒素型別及抗藥型式

腹瀉病人之毒素型別分佈，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。由於A-B+產毒型已陸續被報導也會致病[22-23]，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, 因此第二年以人口密集機構為合作對象以提高A+B+的收菌量。在所有產毒株中以A+B+ (30/38) 的毒素型別佔多數, 而有臨床腹瀉症狀者的毒素型別也以A+B+ (8/10) 佔多數。以卡方檢定分析不同毒素型別與腹瀉症狀關係, 並無顯著差異。

而norfloxacin和moxifloxacin是屬fluoroquinolone類藥物, 抗生素敏感性結果只在tetracyclin, erythromycin, clindamycin及moxifloxacin有變異, 在8種抗生素中, 全部分離株都有感受性的是vancomycin和metronidazole, 這兩種是目前建議使用於CDI的用藥[12], 而norfloxacin和moxifloxacin分別是第二類及第三類的fluoroquinolone類藥物, 本土分離株對norfloxacin全部具抗藥性, 而對moxiflocacin在8株中有2株具抗藥性, 而clindamycin則在8株中有5株是有抗藥性的, 在國外的群聚流行株027被報告對fluoroquinolone產生抗藥性[24], 而對clindamycin感受性也逐漸降低[25], 另外我們的結果偵測到一株僅對vancomycin及metronidazole有感染受性之多重抗藥性的產毒株。綜合結果, 顯示國內菌株的抗藥性與群聚流行株027有相同的趨勢。

MLVA之建立

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a), 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。

群聚之偵測

在長期照護中心的分離株中發現的7個聚集(表七), 在CI,CJ,CK,

CL,SO分別有2, 1, 2, 1, 1個聚集, 由分佈位置來看, 聚集3是來自同一病人, 因此排除群聚感染; 聚集1, 2, 4, 6, 7內的分離株都各自存在同一病房且1, 4, 6, 7聚集的ribotype型別也有一致性; 聚集5的分離株是來自同一醫院不同病房, 兩者未查到關聯性, 而分離時間也無一致性, 必需加入其它分子型別才能再做判斷, 但由時間地點的差異來看, 也可能表示此MLVA的偵測系統的敏感度仍不足; 另外由抗生素敏感型式來看, 聚集1, 4中分離株的型別不完全相同, 顯示抗生素敏感型式與基因型別的不一致性, 這些相異處主要發生在clindamycin及erythromycin, 抗藥基因, 先前有報告這兩種基因由transposon攜帶[26-27], 或許可以解釋在同抗生素敏感型別與基因型別不一致的原因。再由毒素基因型別來看各個群聚, 除了群聚6之外, 所有的都具一致性, 群聚6的一株為A-B-, 其餘為A+B+, 因基因型別是以PCR鑑定的, 有可能是在引子位置發生突變而造成的偽陰性; 另一原因可能是MLVA敏感性不足, 將親緣關係較遠的菌株也群集在一起, 但群聚6的其它菌株仍判斷為同一群聚感染。綜合來說, 本研究在55株本土株發現了5個群聚感染, MLVA分型在敏感性仍有改善的空間。

PCR-ribotype型別

在ribotype型別資料庫中, 包含了第一年的實驗室來源菌株及第二年計畫的長照中心來源菌株, 第一年的菌株因大部份收集自門診,

來源相當分散,在258株中分成58個ribotype型別,雖然型別相當多,但由資料庫仍可看出國內有幾株主要的流行株。另外值得注意的是,017型在加拿大的調查發現同時來自人及動物來源,被認為是人畜共通的菌株[28],017型在本研究中占第四位,是否是有食物來源或環境的感染,值得進一步研究。

健保資料庫分析

這個健保資料庫的分析發現台灣的困難梭狀桿菌感染發生率遠低於西方國家。加拿大曾作過全州以人口為基礎的困難梭狀桿菌感染調查,發現在2005到2006年的一年間,該州各區域的發生率在每十萬人年間為10.9-43.4[29]。此外,另有報告發現在德國及美國該菌感染的發生率分別為14.5及6.9/100,000人年[30-31]。這些發生率都高於本次研究的結果(0.006-2.7/100,000人年)。我們推測這樣低感染率的現象部分來自於醫療人員在照護過程中未考慮到本菌的感染及醫院設備沒有辦法檢驗此菌。在研究過程中我們和合作的醫院接觸的結果,發現許多的醫院一直以來檢驗部很少收到醫師要求檢驗困難梭狀桿菌的要求,也有許多醫院無法作此菌的培養或是沒有快速診斷試劑的準備。此外,由我們在長期照護中心及呼吸道照護病房所作的調查發現,住民有產毒性困難梭狀桿菌感染的比率為3%至28.57%,這些比率遠遠高於由健保資料庫所呈現的感染率,也因此暗示了健保資料

庫所顯示的發生率有被低估的可能。

由健保資料庫的結果發現台灣八年的困難梭狀桿菌感染病例有持續上升的現象。這個現象與西方國家一致，但本研究並未如西方國家發現高毒性的菌株是造成近年病例上升的原因[32]。我們推測造成台灣困難梭狀桿菌近年病例數增加的原因，可能是來自於1. 台灣老年人口的增加。本研究發現65歲以上人口佔所有病例的67.74%，而台灣65歲以上人口比例由2000年的9.02%到2008年的10.12%，老年人口的增加可能是造成病例數增加的因素之一[33]，但若要進一步證明其直接相關性，應另外作分層抽樣調查來確認。2. 醫療人員的警覺性及醫院檢驗部門的能力增加。如同上段所述，我們的研究過程中除發現醫療人員的警覺性及醫院的檢驗能力仍然不足外，也發現在研究的八年期間，許多醫院已發展出檢驗此菌感染的能力，檢驗的數量也有上升。

五. 結論與建議

今年的研究提供了國內長期照護中心的產毒型困難梭狀桿菌基礎分離率平均為11.1%，無症狀帶原的分離率為8.1%；由ribotype型別來看，尚無發現國外流行的027強毒株；抗藥性結果顯示這些分離株雖無臨床症狀，但對fluoroquinolone及cephalosporin等已產生抗藥性；健保資料庫分析發現CDI的個案逐年增加；綜合上述結果，國內目前尚未遭受高致病困難梭狀桿菌威脅，但潛在的風險增高。

我們認為,此研究所建立的資料庫及方法,在困難梭狀桿菌的判定上可提供臨床實驗室一些必要的協助。

六. 計畫重要研究成果及具體建議

本研究建立了困難梭狀桿菌的基礎檢驗方式、MLVA及ribotype分型方法、流行病學資料庫,提供國內臨床實驗室或突發疫情時菌株之比對。

我們建議應提升醫療人員困難梭狀桿菌感染的警覺性及檢驗部門檢驗的能力。我們認為健保資料所呈現的困難梭狀桿菌感染數被低估了,這樣的低估可能來自於醫療人員困難梭狀桿菌感染的警覺性及檢驗部門檢驗的能力不足所致。因此,持續提升此菌感染的警覺性和實驗診斷的能力,可以改善本國病人對此菌感染造成的致病及致命情況。

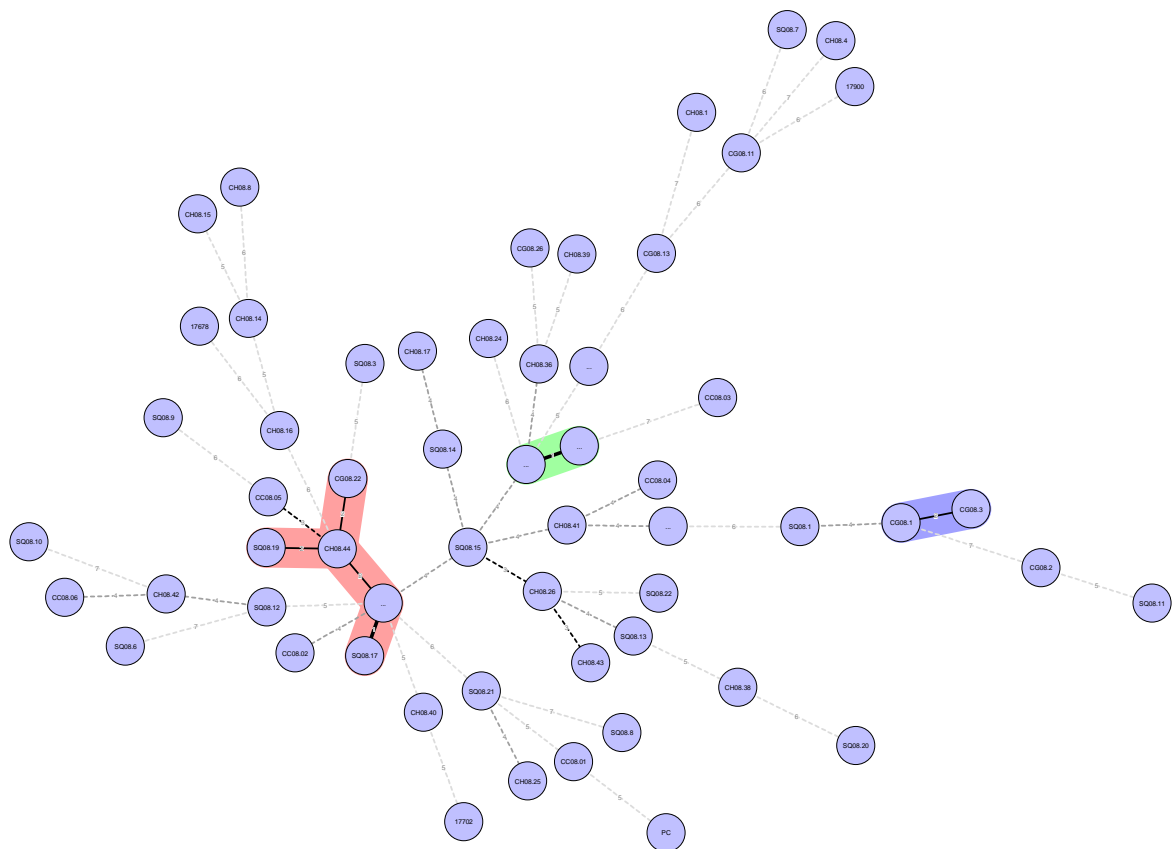
七. 參考文獻：

1. Fordtran, J.S., *Colitis due to Clostridium difficile toxins: underdiagnosed, highly virulent, and nosocomial*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2006. **19**(1): p. 3-12.
2. Belanger, S.D., et al., *Rapid detection of Clostridium difficile in feces by real-time PCR*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(2): p. 730-4.
3. Pepin, J., L. Valiquette, and B. Cossette, *Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec*. CMAJ, 2005. **173**(9): p. 1037-42.
4. McDonald, L.C., M. Owings, and D.B. Jernigan, *Clostridium difficile infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(3): p. 409-15.
5. Wei, S.C., et al., *Diagnostic role of endoscopy, stool culture, and toxin A in Clostridium difficile-associated disease*. J Formos Med Assoc, 1997. **96**(11): p. 879-83.
6. Hsu, M.S., et al., *Prevalence and clinical features of Clostridium difficile-associated diarrhea in a tertiary hospital in northern Taiwan*. J Microbiol Immunol Infect, 2006. **39**(3): p. 242-8.
7. Deneve, C., et al., *New trends in Clostridium difficile virulence and pathogenesis*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **33 Suppl 1**: p. S24-8.
8. Voth, D.E. and J.D. Ballard, *Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 247-63.
9. Schroeder, M.S., *Clostridium difficile--associated diarrhea*. Am Fam Physician, 2005. **71**(5): p. 921-8.
10. Limaye, A.P., et al., *Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-) B(+) strain of Clostridium difficile*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(4): p. 1696-7.
11. Sambol, S.P., et al., *Toxin gene analysis of a variant strain of Clostridium difficile that causes human clinical disease*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5480-7.
12. Surowiec, D., et al., *Past, present, and future therapies for Clostridium difficile-associated disease*. Ann Pharmacother, 2006. **40**(12): p. 2155-63.
13. Lemee, L., et al., *Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of Clostridium*

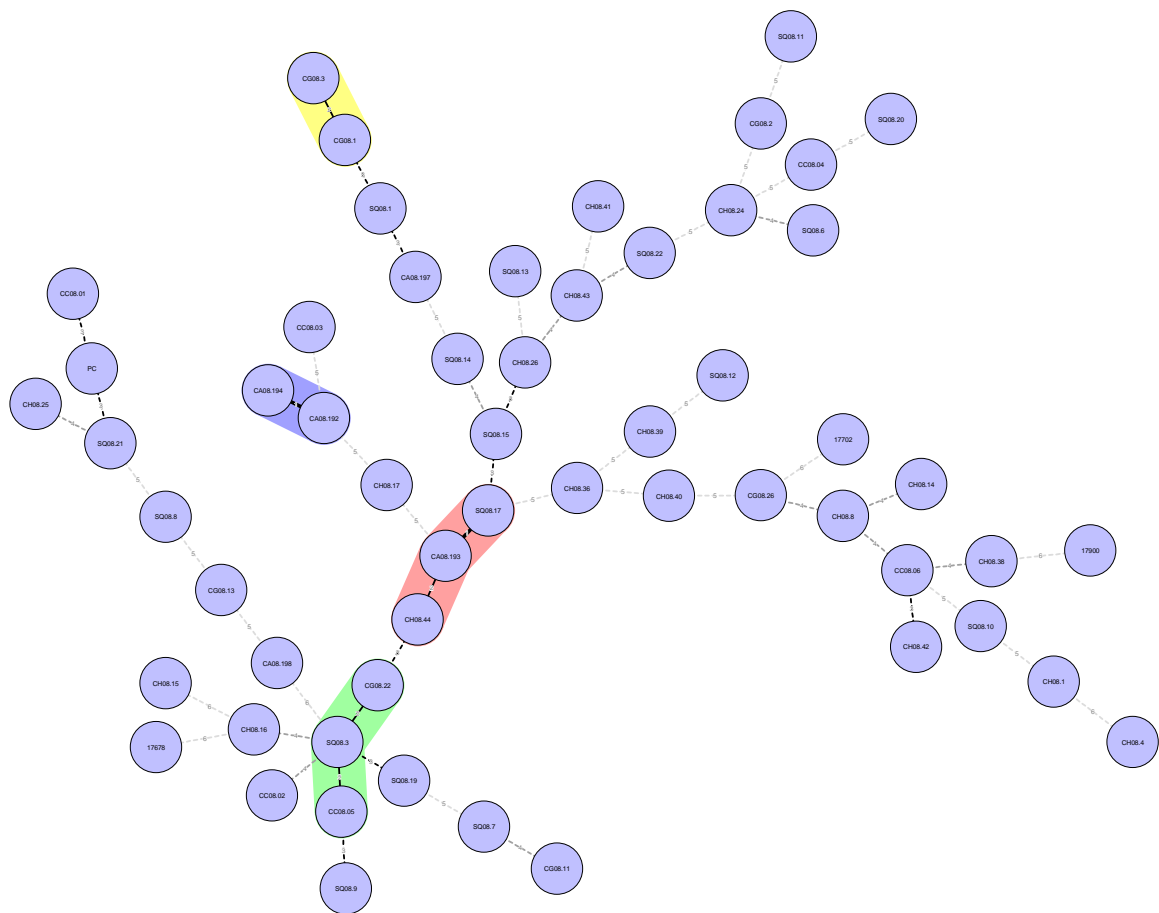
- difficile*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5710-4.
14. *X/pect Clostridium difficile Toxin A/B Protocol*.
 15. Gupta A, P.C., Bishop RD, Sobel J, Mintz ED., *Laboratory-confirmed shigellosis in the United States, 1989-2002: epidemiologic trends and patterns*. Clin Infect Dis., 2004. **15**(38(10)): p. 1372-7.
 16. Program, C.N.I.S., *Surveillance for Clostridium difficile associated diarrhea (CDAD) Preliminary results from January 1st to April 30th, 2007*. 2007.
 17. Viscidi, R., S. Willey, and J.G. Bartlett, *Isolation rates and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from various patient populations*. Gastroenterology, 1981. **81**(1): p. 5-9.
 18. Riley, T.V., et al., *Clostridium difficile in general practice and community health*. J Hyg (Lond), 1986. **96**(1): p. 13-7.
 19. Ryan, J., et al., *Asymptomatic carriage of Clostridium difficile in an Irish continuing care institution for the elderly: prevalence and characteristics*. Ir J Med Sci, 2009.
 20. Rivera, E.V. and S. Woods, *Prevalence of asymptomatic Clostridium difficile colonization in a nursing home population: a cross-sectional study*. J Genit Specif Med, 2003. **6**(2): p. 27-30.
 21. Riggs, M.M., et al., *Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic Clostridium difficile strains among long-term care facility residents*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(8): p. 992-8.
 22. Rupnik, M., *Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of Clostridium difficile toxinotypes*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(3): p. 541-55.
 23. Shin, B.M., et al., *Emerging toxin A-B+ variant strain of Clostridium difficile responsible for pseudomembranous colitis at a tertiary care hospital in Korea*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **60**(4): p. 333-7.
 24. McDonald, L.C., et al., *An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile*. N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2433-41.
 25. Noren, T., et al., *Clindamycin resistant strains of Clostridium difficile isolated from cases of C. difficile associated diarrhea (CDAD) in a hospital in Sweden*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002. **42**(2): p. 149-51.
 26. Tally, F.P. and M.H. Malamy, *Resistance factors in anaerobic bacteria*. Scand J Infect Dis Suppl, 1986. **49**: p. 56-63.
 27. Spigaglia, P., F. Barbanti, and P. Mastrantonio, *Detection of a genetic linkage between genes coding for resistance to tetracycline and erythromycin in Clostridium difficile*. Microb Drug Resist, 2007. **13**(2): p. 90-5.

28. Rupnik, M., *Is Clostridium difficile-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease?* Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(5): p. 457-9.
29. Lambert, P.J., et al., *Population-based surveillance of Clostridium difficile infection in Manitoba, Canada, by using interim surveillance definitions.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. **30**(10): p. 945-51.
30. *Surveillance for community-associated Clostridium difficile--Connecticut, 2006.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2008. **57**(13): p. 340-3.
31. Burckhardt, F., et al., *Clostridium difficile surveillance trends, Saxony, Germany.* Emerg Infect Dis, 2008. **14**(4): p. 691-2.
32. Della-Torre, E., L. Dagna, and N. Saporiti, *Clostridium difficile.* N Engl J Med, 2009. **360**(6): p. 637; author reply 637-8.
33. <http://www.dgbas.gov.tw/ct.asp?xItem=15408&CtNode=4594>.

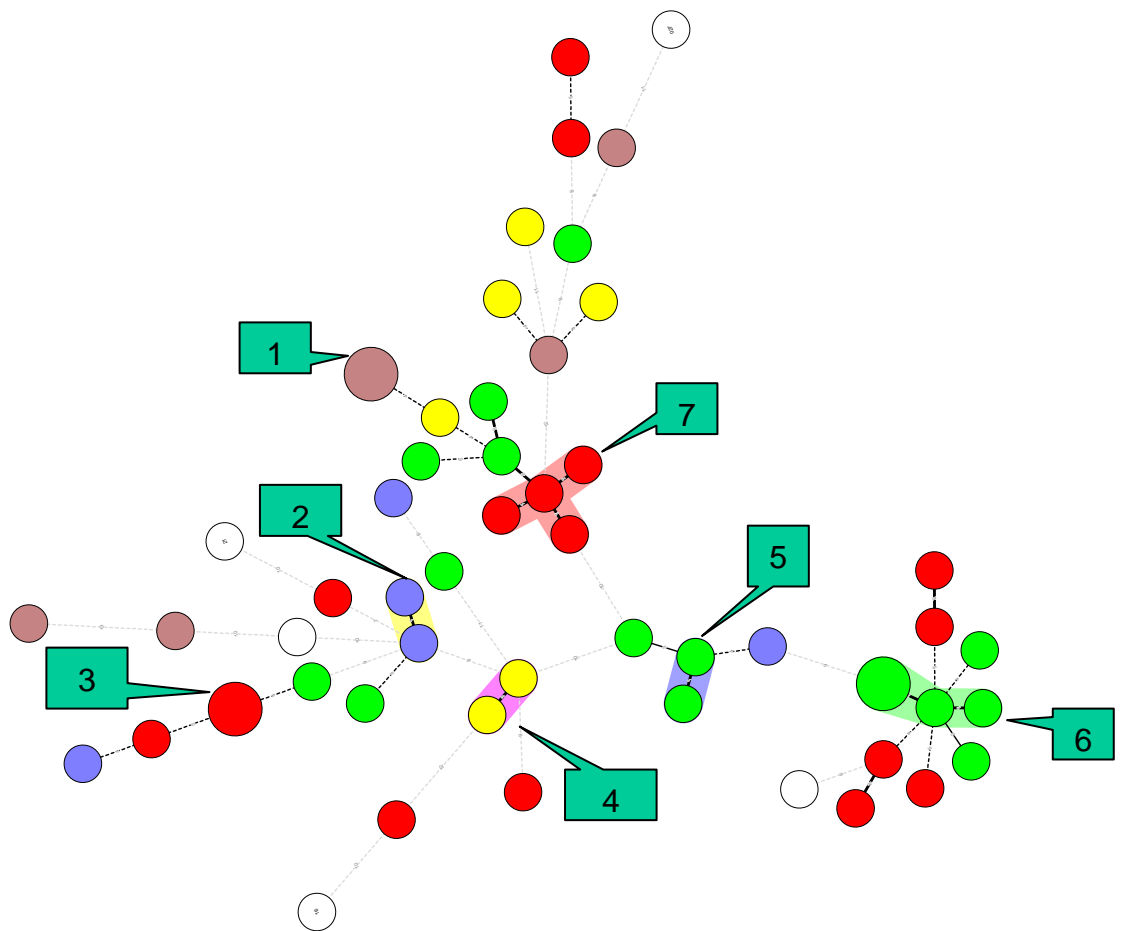
八.圖、表



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

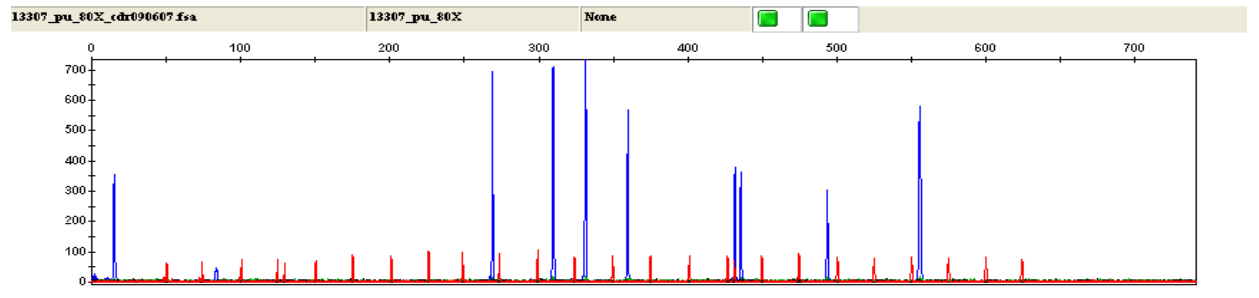


圖三. 55株長照中心來源株之MLVA分型的MST(Maximun spanning tree)

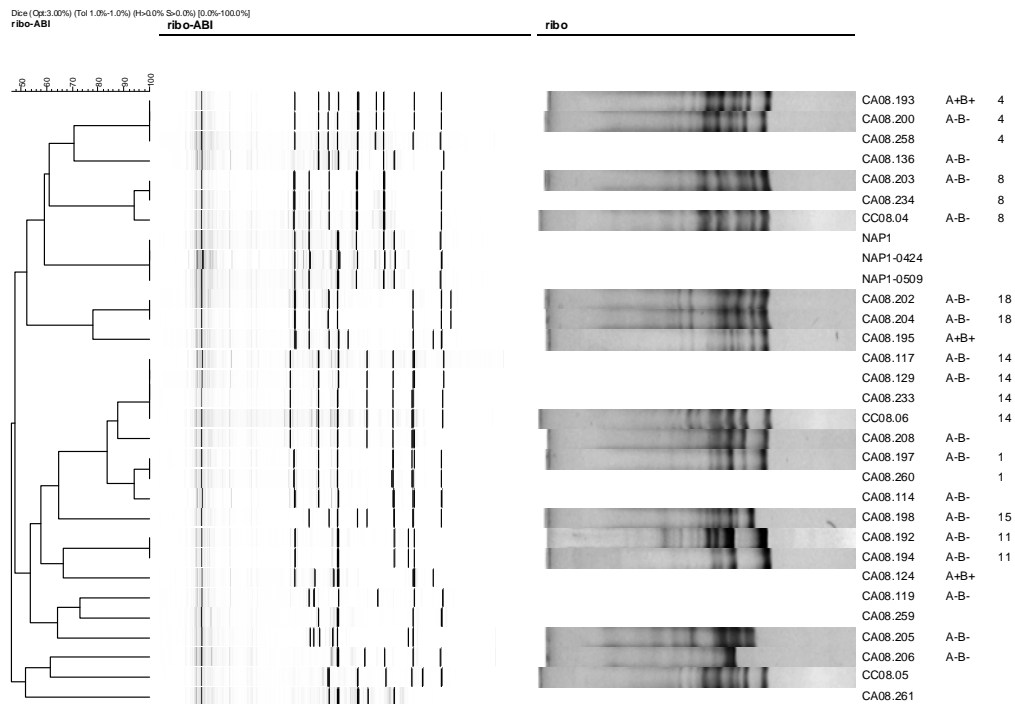
樹狀圖。不同顏色分別代表不同的醫院分離株, 群集的認定標準以

MLVA有一個以內copy number認定為一個群集, 以背景色表示出。

(a)



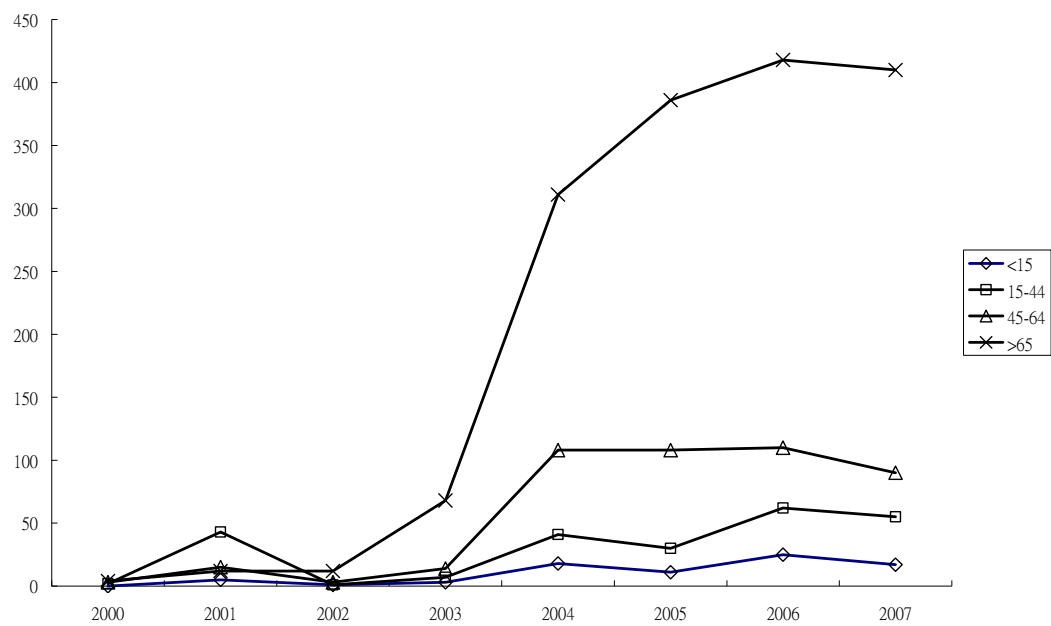
(b)



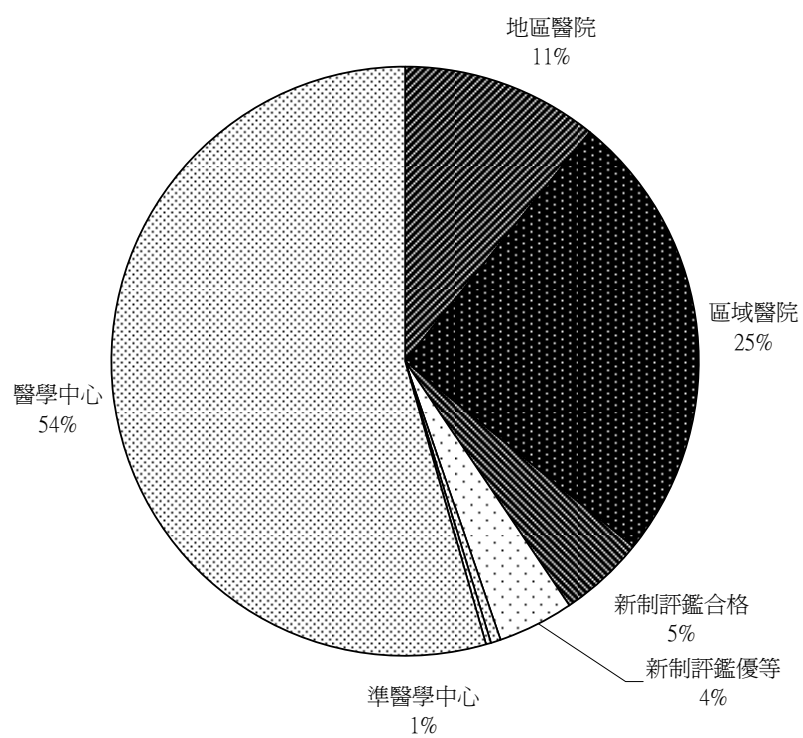
圖四.(a) 參考株 CCRC13307 (CD630)的毛細管電泳ribotype型式

(b) 毛細管電泳(左)及傳統電泳型式(右)圖譜比較。

圖五. 各年齡層在各年診斷為困難梭狀桿菌的病例數。



圖六. 各醫院層級診斷困難梭狀桿菌感染的比例圖。



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	AACGCATTAAATT TCAC-TCCTCATA
Loci name	Pattern	Index*	Product size#	Anneali ng temp	Primer
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 name	Pattern	Index*	Product size#	Annealing temp	Primer
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.

(a) 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

(b)MLVA 引子組

Group	Loci name	Primer sequence	Label dye
M1	CDR49	CTTAATACTAACTAACTCTAACCAGTAA	FAM
		TTATATTTTATGGGCATGTAAA	
	cd5	ATATTCAAATGGCTTCATGG	VIC
		TCCAGTAATGTTTGAAGTGGT	
	CDR59	CCTTCTGGCTTCCTTGTAAATA	PET
		GTAGAAGGGGCAAATAATGAG	
M2	cd27	CAAAGGTAAAGCTCATTCTGGA	FAM
		TTGAAGGTATTTATGGGCAATTC	
	C6cd	ATTGGAATTGAATGTAACAAAA	PET
		GTTTAGAATCTACAGCATTATTTGA	
	cd12	TTAGCTGATTGGGAGGTTGG	NED
		TGTAAGCATCTGCATCTCCG	
M3	cd7	TCTGGCAGTTGATTCAGCAT	FAM
		GGATTTAGTGGTGGAGGGGT	
	CDR5	AATTTTAAGTTAACGTTTTTCTACAT	VIC
		AGCCATTTTTATCAATCCTTTCTAT	
	CDR60	AACGCATTAATTTCACTCCTCATAC	PET
		GGTGCACATGCTGGTCCTG	
	CDR9	TGTATGAAGCAAGCTTTTTATT	NED
		ACCAAAAATTTCTAACCCAAC	
M4	cd6n	TGTGCAAGACAAATAGATATGTGTAAA	FAM
		CCCTAACTCGCTGTAAATCCA	
	H9cd	GTTTTGAGGAAACAAACCTATC	VIC
		GATGAGGAAATAGAAGAGTTCAA	
	cd25	TTTTGTCGTCTATCCCACCA	PET
		AGGGCTTGCAATTGTTTCAC	
	F3cd	TTTTTGAAACTGAACCAACATA	NED
		ACAAAAGACTGTGCAAATATACTAA	

續表二. b MLVA 引子組

Group	Loci name	Primer sequence	Label dye
M5	CDR4	TTAATTGAGGGAGAATGTTAAA	FAM
		AAATACTTTTCCCACTTTCATAA	
	CDR48	TGGAGCTATGGAAATTGATAA	NED
		CAAATACATCTTGCATTAATTCTT	
	cd22	TGGTACCAAATACTGATTTTGAGC	NED
		GACGACCCGGATAGAGATGA	

表三. 分離株毒素基因型別

(a) 腹瀉病人來源菌株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

(b) 長照中心來源菌株毒素型別分佈

hospital	toxin genotype		Toxin producing strain
	A+B+	A-B+	
CC	3	1	4
CI	13	2	15
CJ	2	2	4
CK	7	1	8
CL	2	0	2
SO	3	2	5
total	30	8	38

表四. 各醫院收集檢體數、分離菌株數、產毒株數目

醫院代碼	病房	檢體數	C. difficile 分離數	產毒株數目	分離率	總分離率
CC	RCW	14	7	4	28.57 %	28.57%
CI	RCC	16	3	2	12.5 %	21.7 %
	RCW	53	23	13	24.5 %	
CJ	RCC	8	2	2	25 %	18.7 %
	RCW	8	3	2	25 %	
CK	RCW	37	16	8	21.6 %	21.6 %
CL	RCC	13	1	1	7.7 %	5.6 %
	RCW	23	6	1	4.3 %	
SO	RCW	82	4	3	3.7 %	3 % *
	NH	83	2	2	2.4 %	
total		337	67	38		11.2 %

表五. 分離株抗生素感性型式

antibiotic	MZ 16mg/L	NX 4mg/L	TX 16mg/ L	TC 4mg/L	VA 4mg/L	MX 4mg/L	EM 4mg/L	CM 4mg/ L	isolate numbe r
	S	R	R	R	S				10
	S	R	R	R	S	R	R	R	1
	S	R	R	R	S	R	S	S	1
	S	R	R	R	S	R	S	I	1
	S	R	R	S	S				15
	S	R	R	S	S	S	R	R	4
	S	R	R	S	S	S	S	R	2
	S	R	R	S	S	S	S	S	1
	S	R	R	S	S	R	S	S	1
range mg/L	0.023~0 .94	32~25 6	>32	0.047~ 6	0.38~ 2	0.75~3 6	0.5~25 6	2~256	36

表六.

Loc 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

表七. 醫院分離株群聚資料

cluster	Involve strain	Antimicrobial susceptible profile	Riboty pe	hospital	ward	Isolation date
1.	CJ09.007 (A+B+)	SRRSR	TW25	CJ	RCW	2009.5.22
	CJ09.025 (A+B+)	SRRRS	TW25		RCC	2009.5.26
2.	CL09.019 (A-B-)	ND	TW6	CL	RCW	2009.8.22
	CL09.022 (A-B-)	ND	ND			
3	CK09.5327-1 (A+B+)	SRRSS	TW10	CK	RCW	2009.6.9
	CK09.5327-2 (A+B+)	SRRSS	TW10		Same patient	
4	SO09.101 (A+B+)	SRRSSSSR	TW9	SO	Nursing	2009.8.15
	SO09.138 (A+B+)	SRRSSSSS	TW9		home	2009.8.15

5.	CI09.51	SRRRRS	TW6	CI	RCW1	2009.4.21
	(A+B+)	ND	ND		RCW2	2009.8.25
	CI09.79					
	(A+B+)					

續表七. 醫院分離株群聚資料

6	CI09.008	SRRSS	TW10	CI	RCW1	2009.4.23
	(A+B+)					
	CI09.012	SRRSS	TW10		RCW1	2009.4.23
	(A+B+)					
7	CI09.001	SRRSS	TW10		RCW1	2009.4.23
	(A+B+)					
	CI09.016	SRRSS	TW10		RCW1	2009.4.23
7	(A-B-)					
	CK09.5316	SRRSS	TW4	CK	RCW	2009.6.11
	(A+B+)					
	CK09.5313	SRRSS	TW4		RCW	2009.6.9
	(A+B+)					
7	CK09.5310	SRRSS	TW4		RCW	2009.6.9
	(A+B+)					
	CK09.3302	SRRSS	TW4		RCW	2006.6.9
7	(A+B+)					

ND, 無資料

Antimicrobial susceptible profile 順序: metronidazole, norfloxacin,

ceftriaxone, tetracyclin, vancomycin, moxifloxacin, erythromycin,
clindamycin

表八. 數量最多的15種Ribotype 型別

ribotype	合計
TW4	33
TW10	23
TW14	20
017	18
TW25	14
TW1	12
TW3	11
TW6	8
TW18	8
TW23	7
TW16	6
TW5	5
TW8	5
TW11	4
總計	164

三、附錄

Clostridium difficile 病例資料登錄

病例編號:

(姓名: _____ 病歷號: _____ 因隱私考量, 可以不需填寫, 但需要時院方需有人可連結病例編號與病人身分)

病房種類: 呼吸治療加護病房(RCC) 呼吸照護病房(RCW)

長期照護中心

醫院名稱: 中國附醫 中山附醫 台中醫院 豐原

醫院 彰化醫院 南投醫院 灣橋榮民醫院

其它_____

醫院屬性: 綜合醫院 單獨經營的長照中心或 RCW

性別:___ (1: 男, 0: 女) 生日:___年___月___日

居住地:___縣___市(入住病房前居住地, 非戶籍地)

入住病房日:___年___月___日 採檢日: ___年___月___日

- 近二個月內是否曾使用合計超過一週的 Cimetidine, ranitidine

等 H2 blocker(胃潰瘍藥物): 是 否

- 現在是否有腹瀉症狀(近二天內有三次以上未成形排便): 是

否

- 近二個月內是否曾使用合計超過一週的 losec(omeprazole)等

- 以前曾被診斷 Clostridium difficile 感染: 是 否或不知道
- 近二個月內是否曾使用合計超過二週的 NG tube 或病患目前已作 gastrostomy: 是 否
- 是否有 fecal incontinence 現象(偶而發生不算): 是 否
- 過去一年內曾住其它急性病房超過二週以上: 是 否
- 近三個月內是否曾使用超過一週的抗生素: 是 (填以下小題)
否(跳下一大題)
- 使用週數: _____週 (以 0.5 週為單位, 四捨五入; 三個月內的週數加總)
- 種類包含: (使用三天以上才算入) quinolone(含 moxifloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin 等)
vancomycin teicoplanin metronidazol(flagyl)
clindamycin tetracyclin 或 minocycline
penicillin 第一代 cephalosporin (cefaclor、cefazolin、cephalexin 等) 第三代 cephalosporin (rocephin、claforan 等) cefepime 其它 cephalosporin _____tazocin imipenem

- 病患目前的潛在疾病(可以複選): 糖尿病 中風 慢性
阻塞性肺病 末期腎病(洗腎病患) 腎功能不全(尚未到洗腎病
患) 癌症(癌症種類:_____ ;近三個月內曾作過化療是
否) 其它_____