

計畫編號：MOHW103-CDC-C-114-133203

衛生福利部疾病管制署 103 年委託科技研究計畫

計畫名稱：高風險類鼻疽疫情區之地理、氣候、感染源與傳播途徑之相關性

## 年度/全程研究報告

執行機構：國立高雄師範大學

計畫主持人：陳亞雷

研究人員：陳堯生、陳培詩

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布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	( 8 )
結果	( 17 )
討論	( 24 )
結論與建議	( 29 )
計畫重要研究成果及具體建議	( 34 )
參考文獻	( 37 )
圖	( 43 )
表	( 58 )

## 中文摘要

鑒於台灣地區空氣傳播類鼻疽方式，尚有爭議。本計畫使用類鼻疽個案(2005-2011)進行空間與時間序分析，界定類鼻疽高風險區域(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作為污染點(位於高風險區域北方)，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，特別易於颱風季節從表層土中分離。*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颱風季節分布的聚集效應，經過空氣微粒的粒徑分析(<2.5-10  $\mu\text{m}$ )，*B. pseudomallei* 主要是附著 PM10 的空氣微粒。氣候因子如雨量、風速或風向(西北風)等，是驅動污染空氣微粒發生的相關因子。多變數分析，顯示雨量是主要的驅動因子。從污染土壤、空氣微粒以及臨床分離株，經過分子分型後，顯示主要分離菌是台灣地區的流行株-*B. pseudomallei* ST58。藉由 Gaussian air dispersed model 推估污染微粒可以擴散至 3.4 km 的範圍，這與 Replay K function 證實類鼻疽的死亡個案聚集於 3.5  $\text{km}^2$  相符。本研究結果支持類鼻疽空氣傳播的假設，即極端氣候的條件下，*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颱風季節的西北強風、豪雨，使得污染微粒覆蓋 3.4  $\text{km}^2$  範圍，進而觸發該地的類鼻疽疫情發展。

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

As an unidentified issue, the air transmission mode of melioidosis was studied in this project. By geographical and temporal analysis, the Zouying and Nanzih regions, Kaohsiung, were defined as a high risk area. Also, by the measurements of isolation rates, a cropped field located at the north of the high risk area was defined as contaminated sources. This area was performed the association between melioidosis incidence and appearance of contaminated aerosols. Our results indicated that the numbers of *B. pseudomallei* in vertical distribution of the cropped field were altered following the seasonal changes. Particularly *B. pseudomallei* was steadily isolated from land surface in typhoon season. The distribution of aerosols contaminated with *B. pseudomallei* was clustered in core region of high risk area, geographically, and in typhoon season, temporally. The sizes of contaminated aerosols were mainly distributed in PM10. Climate factors such as rainfall, wind speed and wind direction (north-west wind) were trigger factors contributing in presence of contaminated aerosols. *B. pseudomallei* ST58 was an epidemic strain in Taiwan. This strain can be isolated from soil, water and air particles in high risk area. By evaluation of Gaussian air dispersed model, the spreads of contaminated aerosols can reach to 3.4 km. Taken together, we suggested that the transmission modes of melioidosis in high risk area include airborne. Particularly in extreme climate condition, the flooding let *B. pseudomallei* shifts to land surface and grow. By strong rainfall and heavy north-west wind, the aerosol generated from contaminated land surface and covered over the high risk areas. Consequently, melioidosis cases occur.

**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)。全球的發生率不易統計，因為許多的熱帶地區國家的醫療與公衛技術，並沒有完整的類鼻疽資訊(Cheng and Currie, 2005)。目前以澳洲(發生率約 5.4-41.7 人/10 萬人口)與泰國(發生率約 12.7-21.3 人/10 萬人口)，是全球發生率最高的地區(Currie *et al.*, 2004; Limmathurotsahul *et al.*, 2010)。

類鼻疽屬於人畜共通疾病，可藉由呼吸道感染，感染力強與致死率可達 40%，所以美國將 *B. pseudomallei* 定義為 Category B 之 selected agent (Cheng and Currie, 2005)。台灣亦將類鼻疽歸屬於第四類法定傳染病，並將 *B. pseudomallei* 歸屬於 Risk Group (RG) 3，進行管控。類鼻疽的臨床症狀複雜，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。最嚴重病徵是急性敗血性休克，若無正確的治療，病人於 24-48 h 內死亡，死亡率達 20-40% (Leelarasame, 2004; Phuong *et al.*, 2008)。類鼻疽腦膜炎，較少發生。若不當的治療，菌體可以寄生於 CD11b leukocytes，並隨著 leukocyte transmigration 而誘發致命性的類鼻疽(Liu *et al.*, 2013)。

自 1984 年起，台灣發現首件類鼻疽病例後，類鼻疽的病患在台灣就逐年增加(Lee *et al.*, 1985; Hsueh *et al.*, 2001)。並於 2005 年後，類鼻疽病患集中於南台灣地區，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)。將類鼻疽病患(2004-2011)進行地理空間以及通報時間序分析，發現類鼻疽疫情自 2008 年以後，就有在高雄楠梓與左營地區的聚集現象(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，都可能不一致。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，人類活動可接觸的土壤(如：農事活動的翻土)，若有 *B. pseudomallei* 的高分離率，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)。可能是因為洪水使土壤的含水量飽和，並且匯集營養。同時亦促使居於深層土壤的 *B. pseudomallei*，有機會漂移至地表與孳生，進而增加了民眾接觸的機會。同時漂移至地表的 *B. pseudomallei*，亦可能隨著強風或洪水為載體，散布於周遭環境，並且爆發更大的疫情 (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) 類鼻疽個案通常聚集於 5 km<sup>2</sup> 範圍內的熱點(如: 高雄左營) (Dai *et al.*, 2012); 在 5 km<sup>2</sup> 範圍外，類鼻疽通報個案即銳減 (Mu *et al.*, 2013)。(2) >70% 類鼻疽個案屬於肺性類鼻疽，僅有 3% 個案有明顯的皮膚潰爛。(3) 接受疫情調查的類鼻疽病患，>90% 沒有明顯的傷口、赤足習慣或有接觸污染源(土壤或水源)的經驗。(4) 類鼻疽病患間，沒有飲食習慣的交集。(5) 疾病聚集感染與颱風事件有關(Mu *et al.*, 2013)。(6) 特定地區可以檢測出污染有 *B. pseudomallei* 的土壤與水源，並且距離聚集感染類鼻疽病患的居住址，只有 2.5-7.5 km (Dai *et al.*, 2012)。(7) 熱點地區的空氣微粒可以測量到 *B. pseudomallei* 的 DNA 片段等(Chen *et al.*, 2014)。暗示著類鼻疽熱點地區的疫情，可能藉由特定的污染源，並經由特定的載體，在局部地區傳播所致。

綜觀近年類鼻疽發生熱點地區之高雄左營、楠梓地區。該地區屬於一個口袋的地形地貌，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* 污染的土壤或水源，可能藉這股氣流而形成氣膠。污染的空氣微粒也因此覆蓋於該地，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，本計劃旨為證明高風險疫情區所爆發的類鼻疽疫情，其傳播途徑屬於空氣傳播，包括吸入污染的空氣微粒所致。

## 材料方法

**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 km<sup>2</sup> 範圍)，並且向四周延展至 7 km (依據 Reply's model 計算, 7 km 是類鼻疽聚集感染的最大半徑範圍)，形成 48 km<sup>2</sup> 的研究範圍。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。自設氣象站地點為彌陀圖書館(22.7761, 120.2466)、援中國小(22.7281, 120.2781)、國光高中(22.7091, 120.3058)與民泰街 (22.6621, 120.2963)。氣候數據依 DAVIS 提供之軟體，進行自動儲存與校準 QA/QC。



**空氣採樣** 研究標地(48 km<sup>2</sup>)之空氣微粒採樣站，約以 3.3 km<sup>2</sup> 設置一個採樣點與監測站，共計 12 處(S1-S12)。因為本研究假設類鼻疽疫情，與颱風過境有關。因此考慮颱風的逆時針旋轉氣流，在該地產生強勁的西北風。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滯留或擴散範圍的監測。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設置 S10-S12 的採樣點，作為污染微粒可能無法飄達的位置。陰性對照組的設置地點，係以 GIS (geographical information system) 的 focusing test 檢驗所得，所選取台灣地區最不可能發生類鼻疽病例聚集的地點-古坑，作為控制組

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。共計 540 樣品(n=45/site)。特定採樣則依據中央氣象局所發布颱風警報後，在 S6 採樣點，在颱風警報期間之前三日至颱風警報的後三日，實施每日定時的樣品收集。共計收集 14 次颱風警報，得 126 件樣品(n=9/次)。

採樣方法有三種方式。(1)使用 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  $\mu$ m), 每次採集約 10-12 h, 總計約 14,000 L。並萃取其空氣微粒之總 DNA。(2)以 air impinger (15 L/min)衝擊收集瓶內的選擇性培養液(Ashdown's broth), 以培養空氣微粒之 *B. pseudomallei*。以及(3)使用衝擊器(20L/min; MERCK MAS-100)直接衝擊細菌培養基(TSA; trypticasesoy agar), 以計算總細菌數; 或衝擊真菌培養基(Sabouraud Dextrose Agar), 以計算總真菌數。

**土壤採樣** 土壤採樣分為隨機採樣(random sampling)與固距採樣(fixed interval sampling)。

土壤之隨機採樣目的是為找尋 48 km<sup>2</sup> 研究範圍內, 可能出現的污染源。土壤採樣以 0.5-1 km 為區域範圍, 在範圍區域內, 沿可到達田間的小徑, 使用儘量均勻分配的隨機採樣方式進行。若研究標地內屬住宅區, 則取住戶願意提供的庭院土壤或空地土壤。每個採樣點, 以鑿土器取 60 cm 深處的土壤, 約 100 g。採樣時間每月實施, 為期一年, 取得 576 件樣品。

土壤固距採樣是以藍田農地為範圍，以 GIS 劃分 25 小格 (25 m<sup>2</sup>)，取 1 m<sup>2</sup> 為一樣點。旨在調查 *B. pseudomallei* 在污染地的垂直分布。每個採樣點以鑿土器取得表層(< 5cm)、淺層(6-30cm)與深層(31-60 cm)各 100g 土壤，共計 900 個檢體。

**水源採樣** 水體隨機採樣是以典寶溪、後徑溪與蓮池潭，按 0.5-1 km 距離。取底泥(100g, n=48)或砂石(n=12)；以及水體(2 L, n=60)。

水體的固距採樣，是以蓮池潭為標的。利用 GIS 平均劃分 8 (S1-S8) 個樣點區，每個樣點取底泥(100g, n=96)，深層水(>60 cm, n=96)與表層水(0-10 cm, n=96)。

**檢體處理** 空氣採樣濾紙所含之 total DNA，係使用 3 mL PBS (phosphate buffered saline)浸潤，並以超音波震盪之。所得之震盪液，以 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 萃取 DNA。

水體(2 L)收集後，經 cellulose nitrate 粗濾後，再以 0.45 μm 濾膜過濾之。過濾完成後，取得 0.45 μm 濾紙，並以 3 mL PBS 覆蓋，繼

之以超音波震盪之。所得之震盪液，以 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 萃取 DNA。

土壤、底泥或溪石，則以 1 g 樣品置入 3 ml PBS (phosphate buffered saline) 覆蓋，並以超音波震盪之。震盪後的液體，以 soil DNA purification kit (GeneMark, Taiwan) 抽取 DNA。

**菌體培養** 空氣微粒檢體取 impinger sampling 之收集液，培養之。土壤檢體以 15g 土壤與 PBS 強烈震盪後的液體，培養之。水體培養則取 0.45 $\mu$ m 之濾膜。所有培養物，均分別置入 Ashdown's broth、於 42°C 培養之，隔日進行三區劃線後(至少三片)，連續觀察 7 d。菌株鑑定依 ID32 GN profile (API system; bioMerieux, France) 與 *fliC* specific amplicon 確認之。

**PCR 定性與定量分析** *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(Baker *et al.*, 2011)。 *fliC* primer 為 forward: CTCACGCAAAGCATGTCGGCG; reversed: TTAGTAC GCGCCCG ; *orf2* primer 為 forward: CGTCTCTATACTGTTCGAG; reversed: CGTGCACACCGGTCA。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。當檢體出現 200 bp 之 specific amplicons，視為有效檢體，進行後續的實驗。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。為排除可能的抑制物，土壤檢體使用 purification kit 移除土壤的 humic acid (TAKARA, Japan); 若為空氣微粒檢體，則以稀釋法降低抑制物的影響。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%)。最低檢測濃度為 6.94 copies/m<sup>3</sup>。

### 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 (1083µl of 6N HCl and 917µl 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 50µl 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 1µl 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 µm 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。

**分子分型** 分子分型以 MLST (multilocus sequencing typing) 與 PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) 分析之。MLST 的執行是將菌體 DNA 以 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co., Madison, WI, USA) 純化之。Housekeeping genes (ace, gltB, lepA, lipA, nark, ndh, gmhD) 分型使用的 primer 以及 PCR 條件, 依據標準方法實施之 (Vesaratchavest *et al.*, 2006)。每一個位置的核酸序列比對, 係使用 *B. pseudomallei* MLST website database (<http://bpseudomallei.mlst.net/>) 的

公用程式，遵循標準步驟而比對出 sequence type (ST)，並定義 MLST 的型別。

PFGE 則是將待測菌株於 37°C 培養 16 h 後，取細菌沉澱物均質混合於 10 mM Tris-HCl buffer，並取 1:1 比例之 2.0% (w/v) pulsed-field certified agarose (Bio-rad) 混合之，其混合液添加 40 µl lysozyme (25mg/ml)。取其混合液 100 µl 加入固定器中，並於 4°C 下、固化之。所得之固化方塊置於 lysozyme buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.2 % (w/v) sodium deoxycholate; 0.5 % (w/v) sodium lauryl sarcosine)，並添加 40 µl lysozyme (25 mg/ml)，於 37°C 下作用 1 h。作用畢，以 wash buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) 洗滌之。洗滌後之固化方塊，加入 1 mg proteinase K 於 1 ml proteinase buffer (100mM EDTA; 0.2% (w/v) sodium deoxycholate; 1.0% (w/v) sodium lauryl sarcosine; pH 8.0)，並以含有 100mM PMSF 之 wash buffer 洗滌 30 min. 洗滌畢，以 XbaI 於 37°C 作用 18 h。反應後之 DNA 片段以 PFGE 電泳之 (CHEF DRII system, Bio-rad)，電泳條件：initial plus 5 sec., final plus 35 sec., 14°C, 20 h, 1% pulsed-field certified agarose。電泳圖譜以商用軟體分析其相似度 (GeneProfiler® 或 Treecon® 軟體)，並且定義型別。

**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(Crichton 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)、negative binomial model (zero-inflated) 與 Spearman correlation 分析。屬單變項分析 (univariant 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。ST type 演化關係，係使用 e-Burst 3.0 軟體分析之(<http://www.mlst.net/>)

**空飄模組計算** 空飄模組係使用 Caucasian air dispersed model，並假設污染微粒射出高度(h)=0、垂直散布(z)=0、左右擴散(y)=0，以颱風狀態，使用下列公式計算之。

$$\chi \equiv \frac{Q}{2\pi u \sigma_y \sigma_z}$$

最大的擴散範圍以 PM10 平均起始濃度約  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$  以及  $6000 \text{ copies}/\text{m}^3$  計算之。風速以  $17.2 \text{ sec}/\text{m}^3$  (颱風定義) 計算，氣候條件設定 D。(Q, emission rate (g/sec);  $\pi=3.14159$ 、 $\mu$ ,



average wind speed (m/sec);  $x$ , downwind distance (m);  $\sigma$ , Caussian constant) ([http:// www.csun.edu/~vchsc006/469/gauss.htm](http://www.csun.edu/~vchsc006/469/gauss.htm))

## 結果

**定義類鼻疽高風險疫情區** 本研究以 local moran's I 與 SatSacn 空間聚集分析類鼻疽病患(2000-2011, n=322) GPS 的地理分布，顯示二仁溪流域下游(包括高雄茄萣、台南南區、中西區與仁德等；n=80)與左楠地區(包括高雄梓官、楠梓與左營等；n=83)有明顯的聚集 ( $p<0.01$ ) (圖 1)。若以 Reply's model (poisson distribution)分析類鼻疽病例的空間聚集，顯示於二仁溪流域與左楠地區的分布，分別在 7.5 與 5 km 距離範圍內，有明顯的聚集 (圖 2)。若依據時間序列分析，類鼻疽地理分布的中心點迄 2005 年起持續向南移動(圖 3a)，疾病的發生率二仁溪流域已由 2006 年起逐漸減緩(圖 3b)，但左楠地區則於 2008 年起不斷向上攀升(圖 3c)。雖然 2012-2014 年間，類鼻疽發生率銳減，但類鼻疽個案仍 72.4% (21/29; 2012)、78.9% (15/19; 2013)、76.7% (23/30; 2014)聚集於高雄地區。故本研究以高雄市楠梓左營地區為高風險疫情區的研究場址，並以 Reply's model 分析 5 km<sup>2</sup> 的病患聚集區域定義為核心範圍，並擴展至 48 km<sup>2</sup> 範圍，定義為周邊具有潛在污染源分佈的區域 (圖 4a)。

**污染源的調查** 在總研究區域之 48 km<sup>2</sup> 範圍，以 1 km<sup>2</sup> 為單位，進行土壤與水源一年期(2012)的定期隨機採樣。結果顯示，B.

*pseudomallei* 並不會廣泛地從環境土壤或水源中分離，僅集中於 S18(12.5%)與 S19 (29.1%)，以及少量分布於 S10 (4%)與 S23(4%)等地 (圖 4b)。研究區域內的典寶溪，沒有分離出 *B. pseudomallei*，但在後勁溪的 S23 地，有 20.8%的分離，以及在蓮池潭之 S30、S31 等地，亦分別有 29.1%與 20.8%之分離率。因此，我們選擇具有高分離率之 S19(藍田農地)與 S30(蓮池潭)兩地，進行定點的環境垂直分布調查。

於 2013-2014 期間，S19 地以 25 m<sup>2</sup> 範圍，選取 1 m 等距 (n=25 sites)，進行表層(< 5 cm)、淺層(30 cm)與深層(60 cm)土，以及 S37 地之沿岸 12 個水源採樣點(3 m 等距)，取表層水(<10 cm)、深層水(>60 cm)、底泥等檢體，定期分析 *B. pseudomallei*-specific DNA 陽性檢出率。結果顯示，S20 地之深層土壤的陽性檢出率於 12-36% (圖 5a)；淺層土壤於 8-36%間波動(圖 5b)；深、淺層土壤的陽性檢出率相關性為  $r^2=0.3905$ 。但是，淺層土壤於 6-11 月間，才有明顯的陽性檢出率，可>30%(圖 5c)，並且分別與深( $r^2=0.5667$ )、淺層( $r^2=0.5382$ )土壤的陽性檢出率相關。S37 地之池水或底泥的陽性檢出率為 4-24% (圖 6a-c)，但池水與底泥間的陽性檢出率，均< $r^2=0.1$ (表層池水 vs 深層池水、 $r^2=0.058$ ；表層池水 vs 深層底泥、 $r^2=0.048$ ；深層池水 vs 深層底泥、 $r^2=0.02$ )，顯示池水出現 *B. pseudomallei* 與深層池水或底泥，皆無相關。但因蓮池潭用於調節都市排洪，所以人工不定時的排放潭水，可能導致本項調查的偏差。

空氣微粒的調查 茲為證明 48 km<sup>2</sup> 研究範圍，污染 *B. pseudomallei* 的空氣微粒主要出現在 5 km<sup>2</sup> 的核心範圍。因此，於 48 km<sup>2</sup> 範圍設置 12 樣點區進行空氣微粒的採集與分析(圖 7a)。茲為確認空氣微粒有被正確收集，且微粒上的核酸亦被有效的萃取。故本研究的有效樣品在符合(1) GC-MS 監測濾膜之 C<sub>14:0</sub> 3-OH FA (LPS indicator)濃度，介於 5-50 μg/mm<sup>3</sup> (證明濾膜收集有 G(-)細菌)；(2)濾膜萃取之 DNA 可以測得 universal 16S RNA 的基因片段(證明濾膜 DNA 已被成功萃取，且 PCR 反應可以執行)。結果顯示，在 2012-2014 期間，於 5 km<sup>2</sup> 核心地區(S4-S7)有 29-36%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(4-9%)，明顯偏高(圖 7a)。S8 與 S9(受到半屏山屏障)之樣點區，分別為 9%及 4%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* 的陽性率與從未發生類鼻疽的控制組地區(古坑)的陽性率(4%)相同。

因此，我們選取 S7 與 S9 區，進行 *B. pseudomallei*-specific DNA 濃度的時間序之縱向追蹤。結果顯示，specific DNA 濃度於測量期間的濃度變化很大，約<1- >600 copies/m<sup>3</sup>。不過，熱點地區(S7)，颱風季節收集的空氣微粒，出現>60 copies/m<sup>3</sup>的 *B. pseudomallei*-specific DNA，計有 28 次(總樣品數, n=122)(圖 8a)。但在非熱點地區(S9)，空氣微粒則不曾發生>60 copies/m<sup>3</sup>(平均值+1SD)的 specific DNA (總樣

品數, n=122) (圖 8b)。同時，熱點地區的時間序分析，*B. pseudomallei*-specific DNA 的變化圖形，有季節性的變化分布，2013-2014 期間，都集中在 6-9 月。6-9 月亦屬於雨季與類鼻疽盛行的時間(Mu *et al.*, 2013)。

既然 *B. pseudomallei* 可以附著於空氣微粒中，我們進一步分析空氣微粒的粒徑。因為 PM<sub>10</sub> 可視為粉塵，會被阻隔於外鼻道；PM<sub>10</sub> 通常屬於生物性微粒，雖有部分會被呼吸道攔阻，但部分仍會直接進入肺部，屬於危險性微粒；而 PM<sub>2.5</sub> 屬於金屬性微粒，可以不受阻隔的進入肺部深層，屬於高危險之微粒(Kendall, 2007)。在 60 次空氣總微粒出現 PCR 陽性檢出的時間點，同時收集 PM<sub>10</sub>、PM<sub>4-10</sub> 與 PM<sub>2.5</sub> 的粒徑分析，結果 PM<sub>10</sub>、PM<sub>4-10</sub>、PM<sub>2.5</sub> 分別有 35%、20%、1.7% 的陽性檢出(表一)，顯示相較於 PM<sub>4-10</sub>、PM<sub>2.5</sub>，大部分 *B. pseudomallei* 可以附著於 ≥10 μm 的空氣微粒。

**環境與臨床菌株的分子連結** 茲為確認自土壤、水源或空氣微粒之 *B. pseudomallei* 分離株，是否與臨床病人之分離株有分子連結的證據。因此，取研究期間環境分離菌(土壤、n=16，水源、n=6；空氣微粒、n=4)與左營、楠梓地區類鼻疽個別病患的分離株(n=20)，進行 MLST 的分子分型。結果顯示，土壤分離菌有 ST58、ST703、ST834、ST1001 與 2 個新的 ST type (無法與國際現有的 ST 資料庫配對，定義為 new

type); 水源分離菌包括 ST58、ST1001 與 ST1115; 空氣微粒分離菌則只出現 ST58 型別(表二)。同時我們分析左營、楠梓地區之類鼻疽病人的臨床分離菌, 包括 2010(n=9)、2011(n=5)、2012 (n=3)與 2013 (n=2)等。結果顯示, 都屬於 ST58(表三)。

若以 90%相似度為基準, 分析環境與臨床菌株的 PFGE 型別。結果顯示 ST1001 與 ST58, 分別形成 Type I, II 之 2 大族群。ST1115 與 ST1001 同屬 Type I, ST834 與 ST58 同屬 Type II, 有>90%的 PFGE 圖譜的相似度。ST704 雖與 ST58 同屬 Type II, 但可以區別為 Ia 與 Ic subtype。MLST 定義的 2 個 new type, 一株之 PFGE 圖譜與 ST58 完全一致, 一株可區隔為 Ib subtype。MLST 或 PFGE 分型的結果, 都顯示環境(包括土壤、水源、空氣微粒等)與臨床分離株間, 共同盛行 *B. pseudomallei* ST58 (PFGE type I)。

茲因泰國與澳洲是完全不同的地域, 長年菌株演化的結果, 可能會出現不同基因背景的群落。因此, 我們使用 e-Burst 分析全球 MLST 之 ST 資料庫, 發現 *B. pseudomallei* ST 型別, 確實出現地域隔離演化所造成的 Thai 與 Australia clones (圖 10)。本研究發現的 ST58、ST703、ST834、ST1001、ST1115, 以及 new type, 都屬於 Thai clone。ST58 與 ST1001 亦明顯出現在不同的群落, 佐證了 PFGE 分型出現 type I 與 type II 的群落結果。

**類鼻疽案例分析** 本研究使用 322 例類鼻疽案例，進行人口計量學分析。結果顯示，類鼻疽病患之男女比約 3.2:1，年齡分布於 35 至 85 歲間，總計死亡率約 20%。約有 50% 案例無固定工作，僅有 6% 病例或 10.5% 病例的職業是從事農事或戶外相關工作，但類鼻疽病患大多是非雇員或不願透漏工作概況。若將 local moran I 分析之二仁溪流域或左楠地區分開，分別取 2 個類鼻疽熱點地區的病患進行個別案例分析，各種人口計量學的變因與類鼻疽發生間的相關性都相同（表四）。

**氣候條件分析** 依據類鼻疽資料庫的發病時間(出現發燒或局部發炎症狀的時間點)與氣候因子資料庫進行分析。結果顯示，當時間參數設定延遲 3-5 日，日降雨量與左楠地區之類鼻疽疾病發生呈現顯著相關( $p < 0.05$ )(圖 11a)。但台灣地區的豪大雨量，主要出現在颱風季節，因此風速可能成為重要的因子。我們繼之以出現單日瞬間最大風速為參數分析，亦發現時間延遲設定 3-5 日，會出現單瞬間最大風速( $> 12$  m/sec)與類鼻疽的發生率呈現正相關的結果( $p < 0.05$ )(圖 11b)。依據左營、楠梓地區十年期間(2005-2014)的風向統計，顯示西北風是該地區最常出現的風向。颱風季節(6-10 月)，當日出現西北風，在時間延遲設定 3-5 日的條件下，西北風向與類鼻疽個案發生呈現正相關( $p < 0.05$ )。當考慮降雨、風速與風向的多變數分析下，雨量變化在 2009-2011 年

明顯成為影響左營、楠梓地區疾病發生的重要氣候因子(表五)。但 2012-2014 年之病例數過少，則無法建立相關性。

雖然 2012-2014 年間沒有明顯颱風的災害，但 2012 年 6-9 月，仍計有 7 次颱風侵襲台灣，10 月過後則無颱風過境。因此，我們將 6-9 月定義為颱風季節、10-12 月定義為參考季節。結果發現，颱風季節於 S5 地的 *B. pseudomallei*-specific DNA 陽性檢出率為 35.9%，平均濃度為  $500 \pm 3965$  copies/m<sup>3</sup>。然而，參考季節的 PCR 陽性檢出率為 0% (表四)。2013 年 7-10 月計有 6 次颱風侵襲，11-12 月則無颱風過境。颱風季節的陽性檢出率為 39.8%，平均濃度為  $190 \pm 284$  copies/m<sup>3</sup>；參考季節檢出率為 3.2%，平均濃度為  $15 \pm 4.6$  copies/m<sup>3</sup>。颱風季節的氣候因子，包括雨量、風速、UV 指數，颱風季節都明顯較參考季節偏高；空氣品質因子，包括空氣中真菌量、O<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>、CO、NO<sub>x</sub> 則在參考季節高於颱風季節(表六)。在颱風季節設定時間延遲 0-3 日，都出現雨量與 *B. pseudomallei*-specific DNA 呈現正相關 ( $p < 0.05$ )；設定時間延遲 3 日，則出現風速與 *B. pseudomallei*-specific DNA 呈現正相關 ( $p = 0.059$ )。若考慮風向，則颱風季節該日出現西北風(270°-330°)，則 *B. pseudomallei*-specific DNA 明顯增加( $p < 0.05$ )。在多變數分析，雨量仍是最顯著的影響因子。綜合所述，顯示氣候因子(尤以雨量最為顯著)驅動 *B. pseudomallei*-specific DNA 增加，亦可能因此而驅動類鼻疽個案發生。

**污染空氣微粒的擴散範圍** 在假設(1)熱點地區農地是主要的污染址，(2) PM10 空氣微粒(年平均濃度  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )是主要的載體，(3) 颱風氣候條件(平均風速  $17.2 \text{ m}/\text{sec}$ )是主要的驅動因子。我們依 Gaussian 空飄模型的最高濃度中心(即假設微粒高度  $h=0$ 、垂直散布  $z=0$ 、左右擴散  $y=0$ )的狀況下，計算可能的空飄擴散範圍。結果顯示，在距離污染中心 (downwind distance,  $x$ )為  $17 \text{ m}$  時，有最高的污染微粒濃度(約  $1017 \text{ cfu}$ )，若假設吸入  $1 \text{ cfu}$  的 *B. pseudomallei* 即可能罹患類鼻疽的條件下，最大的擴散距離為  $3400 \text{ m}$  (圖 13a)。若使用 Reply K function 計算類鼻疽在熱點地區死亡病例的聚集，無論是二仁溪流域或左營楠梓地區都呈現在  $3.5 \text{ Km}$  的範圍(圖 13b)。結果暗示，空氣微粒可能擴散的  $3.4 \text{ km}$  範圍，具有最高的危險性。

## 討論

本計畫是全球首次以 *B. pseudomallei* 附著之空氣微粒的地理分布與污染空氣微粒發生的時間序，解釋台灣類鼻疽聚集感染是藉由污染的空氣微粒所傳播。本研究證實污染 *B. pseudomallei* 空氣微粒之地理分布，主要座落於 S4-S7(陽性率=28.9-35.6%)的採樣區。S4-S7 涵蓋範圍約  $5 \text{ km}^2$ ，這與 Reply K function 分析類鼻疽個案聚集於  $5 \text{ km}^2$  範圍相符(Dai *et al.*, 2012)。相對的，核心區域外圍之區域 ( $48 \text{ km}^2$ )，



包括 S1-S3 與 S8-S12 的採樣區，陽性率<11.1%。特別是 S8 與 S9 採樣區位於 S4-S7 採樣區的南邊(相距<2.5 km)，可能受限於空氣微粒最大的擴散範圍或是半屏山的天然屏障，因此陽性率只有 4-9%。S7 與 S9 採樣區收集的 PCR 陽性空氣微粒，經過 qPCR 定量後，S7 地區微粒的 *B. pseudomallei*-specific DNA 明顯高於 S9 地區，亦說明半屏山是該地區，*B. pseudomallei* 藉由空氣微粒擴散的界線。

因為 *B. pseudomallei* 對乾旱敏感，所以最適當的生長環境，是含有 15% 水分的土壤 (Chen *et al.*, 2003)。雖然空氣微粒的含水量都<3%，但 *B. pseudomallei* 可以吸附在 1-10  $\mu\text{m}$  粒徑的微粒，並且存活 (Dabisch *et al.*, 2012)。10  $\mu\text{m}$  粒徑的微粒，已被證實在適當的溫度、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)，這亦與台灣類鼻疽熱點地區的病患聚集分布於 5  $\text{km}^2$  範圍相符。本研究證實 *B. pseudomallei* 主要是附著於 $\geq 10 \mu\text{m}$  粒徑的微粒，並且使用 Gaussian air dispersed model 推估 10  $\mu\text{m}$  污染微粒，可以擴散至 3.4 km 直線距離的範圍，這與 Replay K function 證實類鼻疽的死亡個案聚集於 3.5  $\text{km}^2$  相符(Dai *et al.*, 2012)。這個結果，可能說明了類鼻疽在此局部地方，發生數次聚集感染的原因。我們使用氣候因子分析，發現雨量出現的第 0, 1, 2 日，會與出現 *B. pseudomallei*-specific DNA 呈現相關，第 3 日之後的相關性即消失。暗示颱風風雨後的 2 日內，*B. pseudomallei*-specific DNA 會是明顯的傳播

媒介，2日之後藉由污染空氣微粒為傳播媒介的風險則降低，但不能排除直接接觸土壤的污染源致病的可能性。

本研究亦從空氣微粒活培養 *B. pseudomallei*，並且經 MLST 或 PFGE 分型，都證實空氣微粒的分離株與左營與楠梓地區(2010-2013 年間)之類鼻疽病人的臨床分離株，有相同的基因型別，建立了環境污染物至病人間的分子證據。特別是 *B. pseudomallei* ST58，曾被證實是 2005-2011 年間，台灣類鼻疽病人間的流行株(Chen *et al.*, 2013)，顯示迄今為止，*B. pseudomallei* 的流行株，都沒有改變。

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)，進而推論空氣微粒傳播類鼻疽的相關性。但上述研究欠缺空氣微粒攜帶 *B. pseudomallei* 的證據，以及缺乏微粒可以漂浮至 500 km 的證據。本研究首次證明(1) *B. pseudomallei* 會附著於 $\geq 10 \mu\text{m}$  的空氣微粒，(2) 4% 空氣微粒有 cultivated *B. pseudomallei*，都屬於 ST58 的流行株，(3) Gaussian air dispersed model 推算微粒可擴散至 3.4 km，並與 replay K function 推算類鼻疽致死個案聚集 3.5 km 範圍相符。

上述結果，支持了污染空氣微粒的擴散範圍，是發生類鼻疽的高風險範圍。

類鼻疽的傳播方式，亦可能藉由接觸污染的土壤或水源(Dance, 2000)。然而，類鼻疽的聚集感染多是發生在雨季過後，並且主要表現肺性類鼻疽(Inglis *et al.*, 2006)。藉由流行病學調查亦顯示，季節性的雨季來臨，可能導致肺性類鼻疽病患的增加(Limmathurotskul *et al.*, 2013)。本研究亦證實類鼻疽熱點地區的病患好發於颱風季節，病患出現與雨量或風速有關。在對於空氣微粒的陽性檢出方面，經 2012/04-2014/03 的縱向追蹤，亦發現污染的空氣微粒，主要出現在 6-9 月。統計分析顯示，雨量或強勁風速可能會驅動污染空氣微粒的發生。然而，2012-2014 年間，雖然有 14 個颱風過境台灣，但都沒有明顯的風雨災情，年度總雨量<1200 mm (左營地區 5 年平均年雨量達 2100 mm)。既然我們證明雨量是驅動類鼻疽疫情的最重要環境因子，2012-2014 乾旱的結果，可能造成高雄左營、楠梓缺乏環境觸發因子，而導致類鼻疽個案累計<20。因此，無法在病患與污染空氣微粒間，直接建立統計的相關性。但本研究都分別在類鼻疽病患的發生，以及出現污染的空氣微粒的時機，與雨量或風速等氣候因子，建立統計的相關性。因此，仍間接推論，氣候因子可驅動 *B. pseudomallei* 附著於空氣微粒與散布，進而造成類鼻熱點地區的聚集感染。本研究亦發現許多空氣指標因子(O<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>、CO、NO<sub>x</sub>)都出現季節性的變化，在颱

風季節過後，都會明顯偏高。但是這些因子都是穩定的隨季節而變化，所以排除直接與類鼻疽群聚感染有關聯。

颱風會產生逆時針氣流，使得類鼻疽熱點地區在颱風季節的風向呈現西北風(270°-330°)，經由類鼻疽核心區域與周圍區域之 48 km<sup>2</sup> 的隨機採樣調查，*B. pseudomallei* 僅集中熱點地區北方的 S18 與 S19 的藍田農地，距離類鼻疽病患聚集處，約 2-3.5 km。本研究亦發現深層土壤可以在四季中分離 *B. pseudomallei*，但僅在 6-10 月(颱風季節)，*B. pseudomallei* 才能在表層土壤中分離，顯示 *B. pseudomallei* 在土壤的垂直分布會隨著季節而改變。經過分子分型的結果，證實土壤分離菌、空氣微粒分離菌與臨床分離菌都屬於 *B. pseudomallei* ST58。因為颱風季節空氣微粒出現 *B. pseudomallei* 與出現西北風(270°-330°)有統計的相關聯，雖然我們無法完全排除病患可能直接接觸污染的土壤或水體，但熱點地區類鼻疽的傳染途徑，仍傾向是因為季節變化，使得 *B. pseudomallei* 浮出地表，在經由豪雨與強風而形成污染的微粒，進而散布在 3.5 km 範圍，使得類鼻疽熱點地區的易感宿主，因為吸入污染的微粒而致病。儘管如此，我們仍需警戒熱點地區土壤有高分離率的 *B. pseudomallei*，該地主要種植水稻、大豆、鳳梨或牧草，應特別在 6-10 月間的農耕犁土，需宣導穿著雨鞋、手套，避免農事工作者直接接觸污染的土壤。

## 結論與建議

### 1. 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 SatScan 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 km<sup>2</sup> 範圍，致死病患則有 3.5 km<sup>2</sup> 的聚集。雖然 2012 年起，類鼻疽的發生率減緩，但仍有 72.4% (21/29; 2012)、78.9% (15/19; 2013)、76.7% (23/30; 2014) 聚集於高雄地區。類鼻疽出現熱點的趨勢，並沒有改變。這種小區域的疾病聚集模式，顯示污染源與傳播模式固定。並且有地域性的區隔，值得注意。

### 2. 污染的空氣微粒利於熱點地區發生類鼻疽聚集感染。

本研究的類鼻疽熱點核心區(約 5 km<sup>2</sup>)之空氣微粒，其 *B. pseudomallei*-specific DNA 陽性檢出率，明顯較核心外圍地區之陽性檢出率高，並且出現半屏山與壽山一線為污染空氣微粒擴散的界線。若經 Gaussian 空飄模組與 Replay K function 驗證，都能得到此類鼻疽擴散的地理界線。既然本研究證實氣候因子(如雨量、風速、風向)與類鼻疽的發生或污染空氣微粒的出現，有統計的相關聯。因此，在特定氣候條件出現，可適當對此局部地區提供警訊與衛教。

### 3. 類鼻疽的流行株是 ST58

本研究從空氣微粒分離 viable *B. pseudomallei*，說明了污染空氣微粒的危險性。同時證實空氣微粒、土壤或臨床病人的分離株，主要都是 ST58，說明台灣地區的盛行菌株是 *B. pseudomallei* ST58。因此，當臨床病人感染株之 ST type 發生改變，可能說明流行趨勢的改變，可作為疾病發生的警訊。此外，*B. pseudomallei* ST1001 廣存於土壤與水體，可持續觀察 ST1001 是否會成為下一波的流行株。

#### 4. 季節性之 PM10 空氣微粒濃度變化，可作為類鼻疽指標

本研究證實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，污染的空气微粒亦有季節性的變化影響。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。因此，熱點地區攜帶有 PM10 濃度變化，可以配合氣候因素，成為預測類鼻疽疫情發展的參考指標。

#### 5. 土壤深層潛藏的 *B. pseudomallei* 會成為新的污染源

本年度證明 *B. pseudomallei* 的垂直分布有季節性的變化，特別是夏季(颱風季節)可以從田地的表層土分離，暗示颱風季節民眾可能有較高的暴露。因此，宜對如何清潔暴露污染的土壤，有清楚的衛教。

綜合上述，對於類鼻疽的防治，可分為三個層面著手，以及一個可能發展的方向。

### (1) 疫情判斷

雖然 *B. pseudomallei* 僅在特定的地區被分離，但仍然屬於土壤的腐生菌，既使清楚知道 *B. pseudomallei* 高分離的區域，也不易從土壤中移除 *B. pseudomallei*。因此，民眾或有接觸，即可能發生類鼻疽。每年會在高風險區發生類鼻疽病例，甚至發生疫情，幾不可避免。因此，對疫情判斷，需要適當的作為。表七列六種狀況，包括(1) 群聚感染、(2) 多個死亡病例(敗血性休克)發生、(3) 小兒科病例出現、(4) 類鼻疽獸疫發生、(5) 新地區發生疫情與(6) 乾季發生敗血性病例等，需要採取的作為，以及判斷的理由(Inglis *et al.*, 2009)，可供當局參考。

### (2) 疫情調查

一旦類鼻疽發生聚集感染，需要有必要的流行病學的調查與處理，才可適當的管控疫情。圖 14 列三種調查模式，包括(1) 臨床病例的訪調、(2) 環境調查與 (3)血清學調查的流程與步驟(Inglis *et al.*, 2009)，資以釐清疫情的始末與感染源，以控管疫情。然而，截至目前止，對於血清學的背景資訊，乏有建立，可為後續研究的重點。

### (3) 適當衛教

既然類鼻疽通常在熱點地區發生，因此，在該地區發揮適當的衛教，可以減緩當地類鼻疽的威脅。表八列有 10 項重點衛教宣導措施，包括(1)避免直接接觸土壤、(2) 若需接觸需穿戴手套或雨鞋、(3) 傷口須立即清潔、(4) 傷口需有覆蓋、(5) 避免赤足、(6) 飲用煮沸的水、(7) 清潔食用容器(避免容器污染土壤)、(8) 避免直接淋雨、(9) 禁菸與(10) 有類鼻疽危險因子(如糖尿病、腎疾)，需特別避免類鼻疽的可能接觸等(Limmathurotsakul *et al.*, 2013)，可供當局衛教製作之參考。但鑒於本研究顯示污染空氣微粒是類鼻疽高風險區域的主要傳播途徑，因此須將類鼻疽列為呼吸道傳播疾病的衛教措施，特別是易感宿主(如糖尿病、腎疾或慢性病患者)家庭在強風、豪雨季節，應盡可能關閉門窗，避免不必要的外出，或戴上口罩等。特別是配合環保署空氣微粒的空氣品質警報系統，當颱風季節，空氣微粒明顯偏高時，宜宣導該地民眾，儘量不要外出，必要外出也須戴上口罩。這些衛教除在醫療院所外，可特別在高風險區域的國、高中實施，以深化當地的防治觀念。

### (4) 生物拮抗

若需積極的清除土壤中 *B. pseudomallei* 或防止 *B. pseudomallei* 從深層土壤飄移至表層土壤，或可嘗試 *Burkholderia* I379 的生物拮抗。



*Burkholderia* I379 具有固氮作用，被認為是可以促進植物農耕的菌種，廣存於台灣南部的耕地土壤中。當土壤檢體出現 *Burkholderia* I379，則無法分離 *B. pseudomallei* (Lin *et al.*, 2011)。實驗證明 *Burkholderia* I379 可以分泌抑制物質抑制 *B. pseudomallei* 生長(圖 15a)，並且在模擬的環境下，共同培養 *B. pseudomallei* 與 *Burkholderia* I379，則 *B. pseudomallei* 會在 72 h 內死亡(圖 16b)。因此，現今使用的生物農藥配搭 *Burkholderia* I379 製劑而施於藍田農地，可望抑制 *B. pseudomallei* 在表層土滋生，進而達到防治類鼻疽擴散的作為。

## 103 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：WOHW103-CDC-C-114-133203

### 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 Replay K function 與 Gaussian 空飄模型，定義出台灣類鼻疽的高風險區是位於高雄左營楠梓地區 3.5 km<sup>2</sup> 的區域。並且利用土壤、水源與空氣微粒的調查，解釋高風險地區類鼻疽疫情是藉由污染空氣微粒而散布，並且與氣候條件有關，特別是颱風季節西北風出現，高風險地區會出現高濃度的 *B. pseudomallei*-specific DNA，造成發生類鼻疽的風險。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。以及利用高風險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，以及證明高風險區域出現污染的空氣微粒與颱風季節有關等；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、*PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8:e2877)

## 2.計畫對民眾具教育宣導之成果

本研究對高風險地區的界定結果，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。對於衛教的實施，除醫護人員外，可加強對高風險地區之國、高中學生的衛教，以求類鼻疽防疫觀念的深耕。

## 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。

此外，藉由本研究的成果。可以推演出現 (1) 群聚感染、(2) 多個死亡病例(敗血性休克)發生、(3) 小兒科病例出現、(4) 類鼻疽獸疫發生、(5) 新地區發生疫情與 (6) 乾季發生敗血性病等情況出現，應有的防疫作為(表七)；以及一旦出現疫情，所需進行環境調查、病例分析與血清學調查等流行性學調查的步驟 (圖 14)。以及衛教宣導措

施，需包括(1)避免直接接觸土壤、(2) 若需接觸需穿戴手套或雨鞋、(3) 傷口須立即清潔、(4) 傷口需有覆蓋、(5) 避免赤足、(6) 飲用煮沸的水、(7) 清潔食用容器(避免容器污染土壤)、(8) 避免直接淋雨、(9)禁菸與(10) 有類鼻疽危險因子(如糖尿病、腎疾)，需特別避免類鼻疽的可能接觸等(表八)。特別是易感宿主(如糖尿病、腎疾或慢性病者)家庭在強風、豪雨季節，應盡可能關閉門窗，避免不必要的外出，或戴上口罩等。

## 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 YL, Lin YC, Chen YS, Chen SC, Liu YM, Tseng IL, Chiang CS,**

**Lin HH, Mu JJ.** (2013) Characterisation of predominant molecular patterns of *Burkholderia pseudomallei* in Taiwan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 107:165-9.

**Chen YL, Yen YC, Yang CY, Lee MS, Ho CK, Mena KD, Wang PY,**

**Chen PS.** (2014) The concentrations of ambient *Burkholderia pseudomallei* during typhoon season in endemic area of melioidosis in Taiwan. *PLoS Negl Trop Dis.*8:e2877.

**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.
- Crighton 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.
- Currie BJ, Jacups SP, Cheng AC, Fisher DA, Anstey NM, Huffam SE, Krause VL.** (2004) Melioidosis epidemiology and risk factors from a prospective whole-population study in northern Australia. *Trop Med Int Health.* 9:1167-1174.
- 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.

**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, 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<sub>2.5</sub>) sequester lung surfactant and amino acids from human lung lavage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:L1053-8.

**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.

**Limmathurotsakul D, Dance DA, Wuthiekanun V, Kaestli M, Mayo M, Warner J, Wagner DM, Tuanyok A, Wertheim H, Yoke Cheng T, Mukhopadhyay C, Puthucheary S, Day NP, Steinmetz I, Currie BJ, Peacock SJ.** (2013) Systematic review and consensus guidelines for environmental sampling of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2105.

**Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, Chaowagul W, Day NP, Peacock SJ.** (2010) Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 82:1113-1117.



**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.

**Liu PJ, Chen YS, Lin HH, Ni WF, Hsieh TH, Chen HT, Chen YL.**

(2013) Induction of mouse melioidosis with meningitis by CD11b+ phagocytic cells harboring intracellular *B. pseudomallei* as a Trojan horse. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2363.

**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.

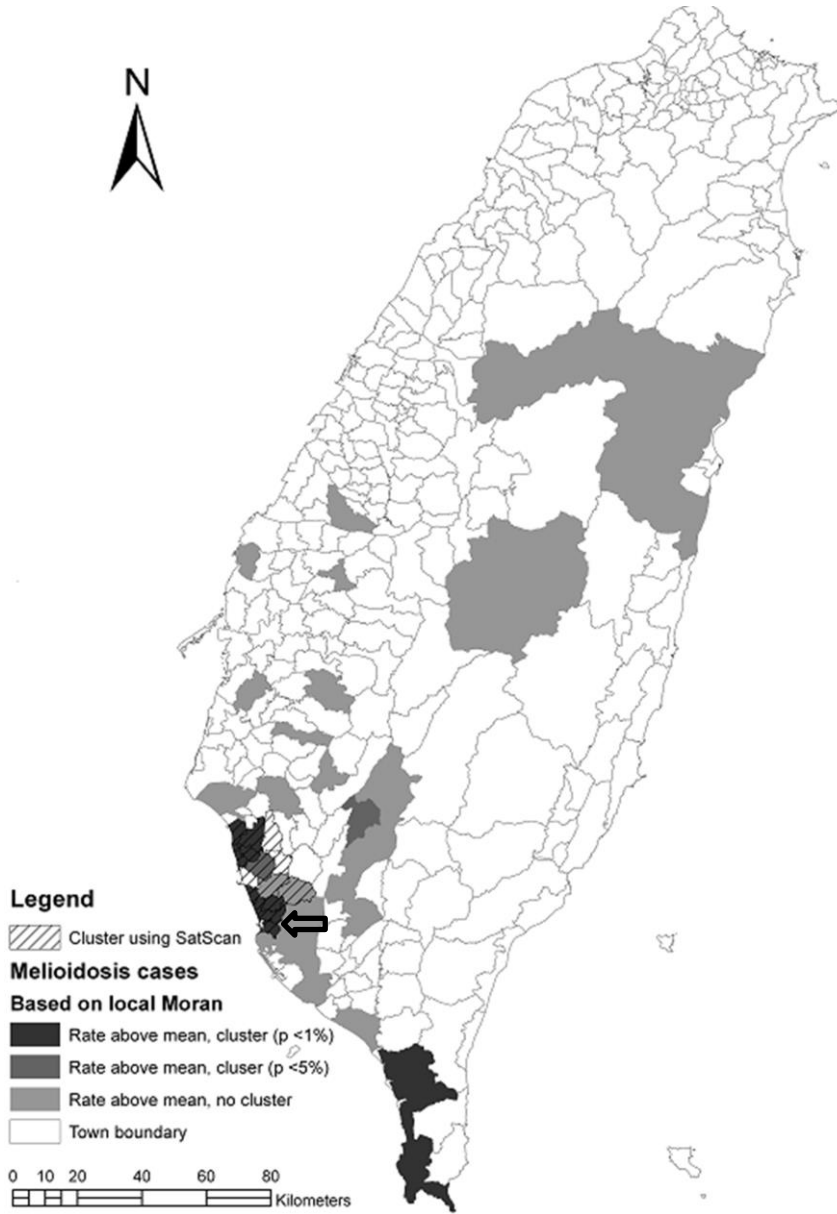
**Shi W, Wong MS, Wang J, et al.** (2011) Analysis of airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) over Hong Kong using remote sensing and GIS. *Sensors (Basel)*. 12:6825-36

**Su HP, Chan TC, Chang CC.** (2011) Typhoon-related leptospirosis and melioidosis, Taiwan, 2009. *Emerg Infect Dis*. 17:1322-1324

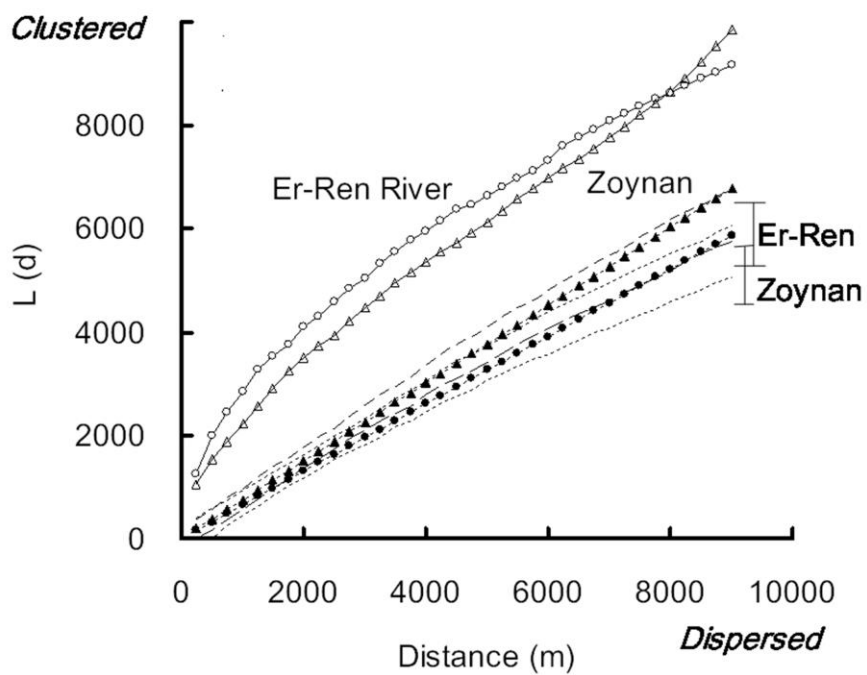
**Vesaratchavest M, Tumapa S, Day NP, Wuthiekanun V, Chierakul W, Holden MT, White NJ, Currie BJ, Spratt BG, Feil EJ, Peacock SJ.** (2006) Nonrandom distribution of *Burkholderia pseudomallei* clones in relation to geographical location and virulence. *J Clin Microbiol*. 44:2553-7.

**Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-Ngam 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.

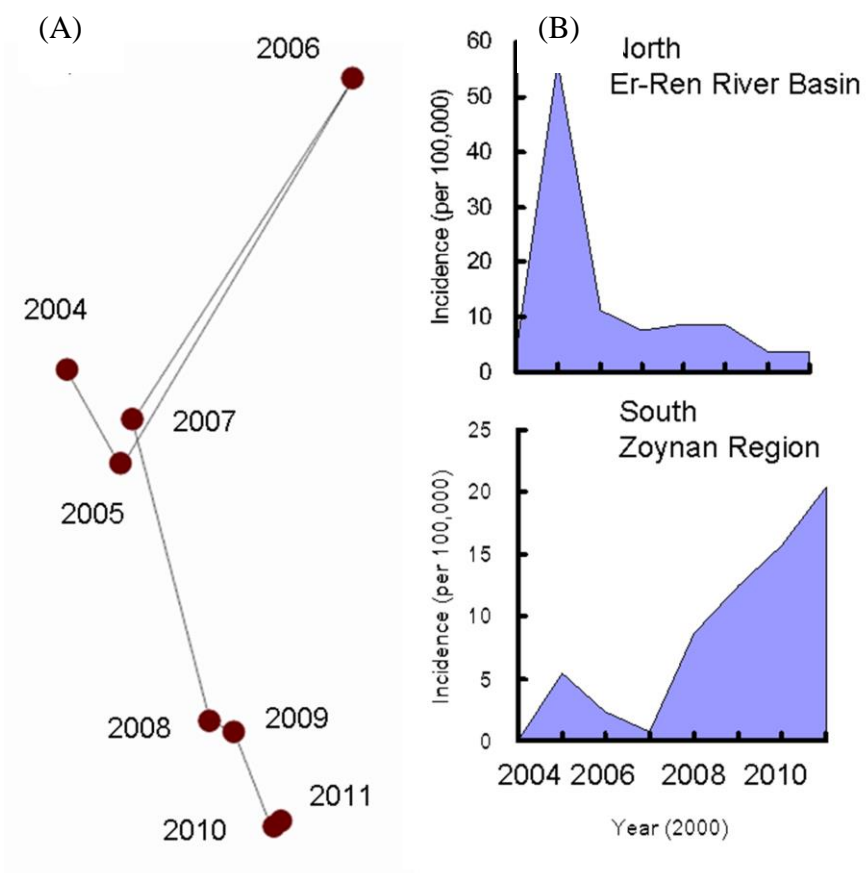
# 圖



圖一、類鼻疽群聚分析圖。類鼻疽群聚是以 local moran I 與 SatScan 分析城鎮層次的病例所得。顏色深淺如圖示，表示平均發生率的高低。斜線區域表示 SatScan 縮分析的聚集位置。箭頭所指，為本研究的場址。

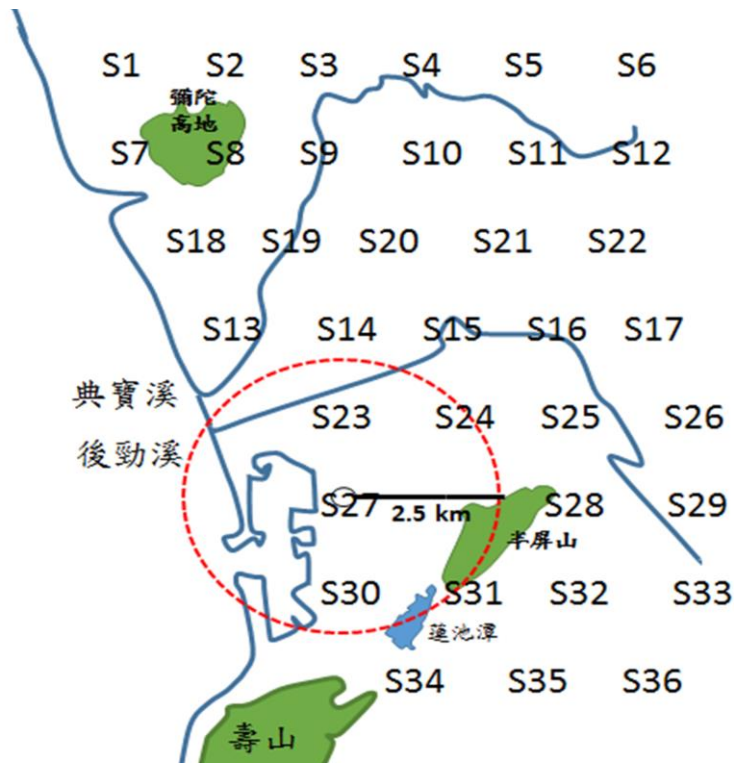


圖二、 **Replay K Function** 聚集分析。取 2005-2011 類鼻疽病例 (n=342) 進行分析，實心符號表期望值(圓形為左營；三角為二仁溪流域)，空心符號表觀察值(三角為左營、圓形為二仁溪流域)，虛線表示 95%可信區間的界線值。

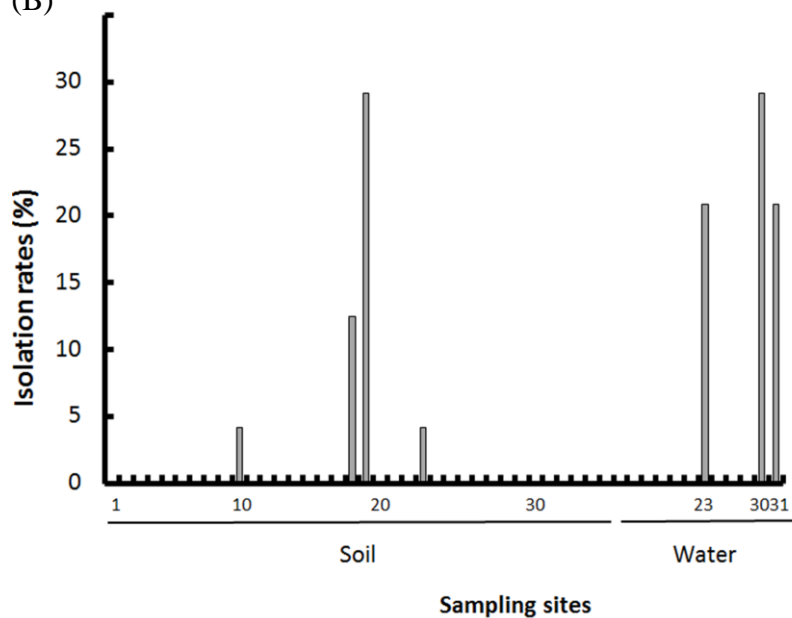


圖三、類鼻疽個案的平均中心與類鼻疽的年度發生率。類鼻疽個案分布之平均地理位置中心是依據年度個案之 GPS 資料計算 (A)，年度發生率以當年度類鼻疽個案與當年度人口為基準 (B)。

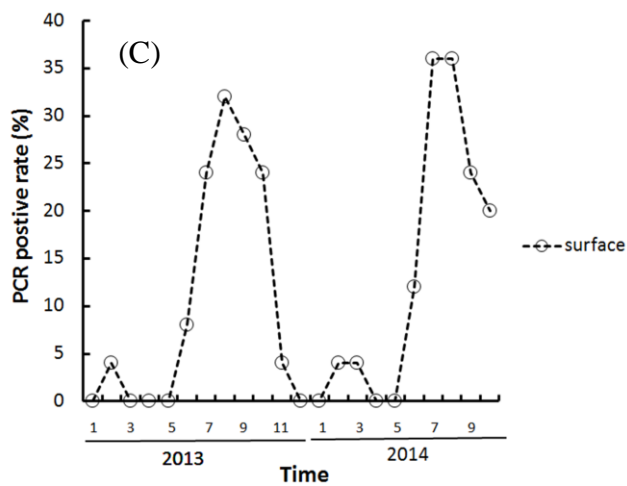
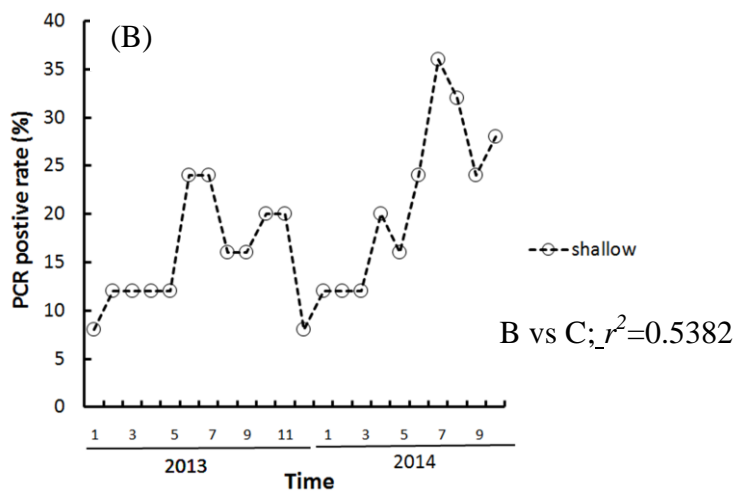
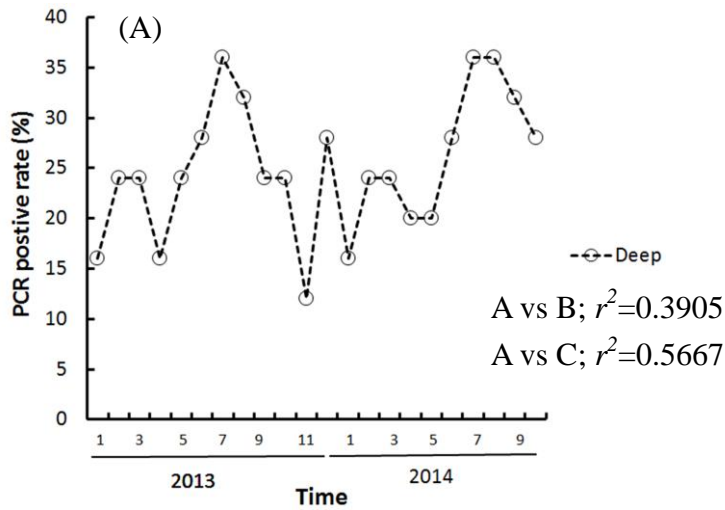
(A)



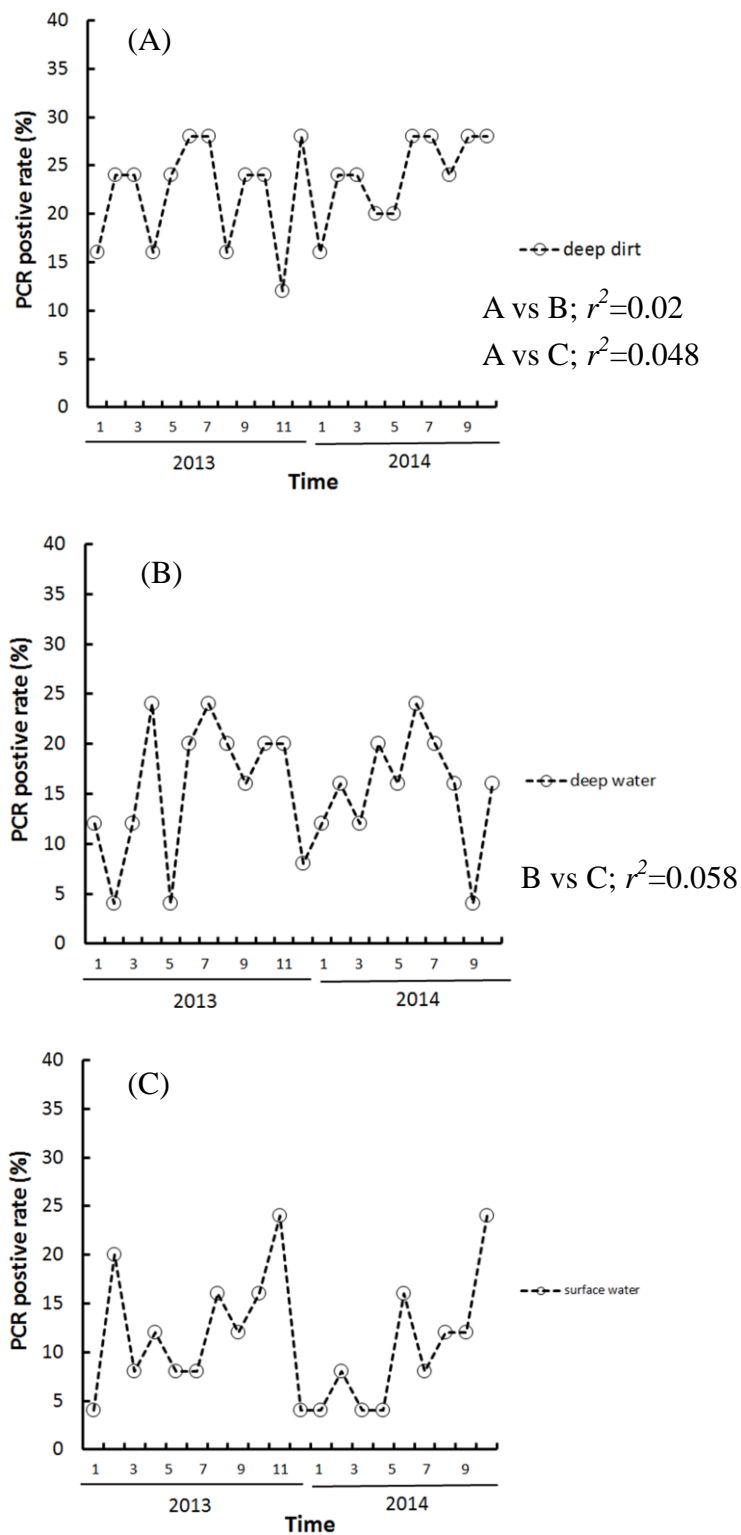
(B)



圖四、隨機採樣的樣點分布與分離率。依 48 km<sup>2</sup> 的實驗場址，劃分 S1-36 採樣區。Replay K function 計算之 5 km<sup>2</sup> 聚集，如紅色虛線範圍 (A)。採檢區之土壤或水體樣本，檢體經 Ashdown's method 分離出 *B. pseudomallei*，視為陽性而計算分離率。

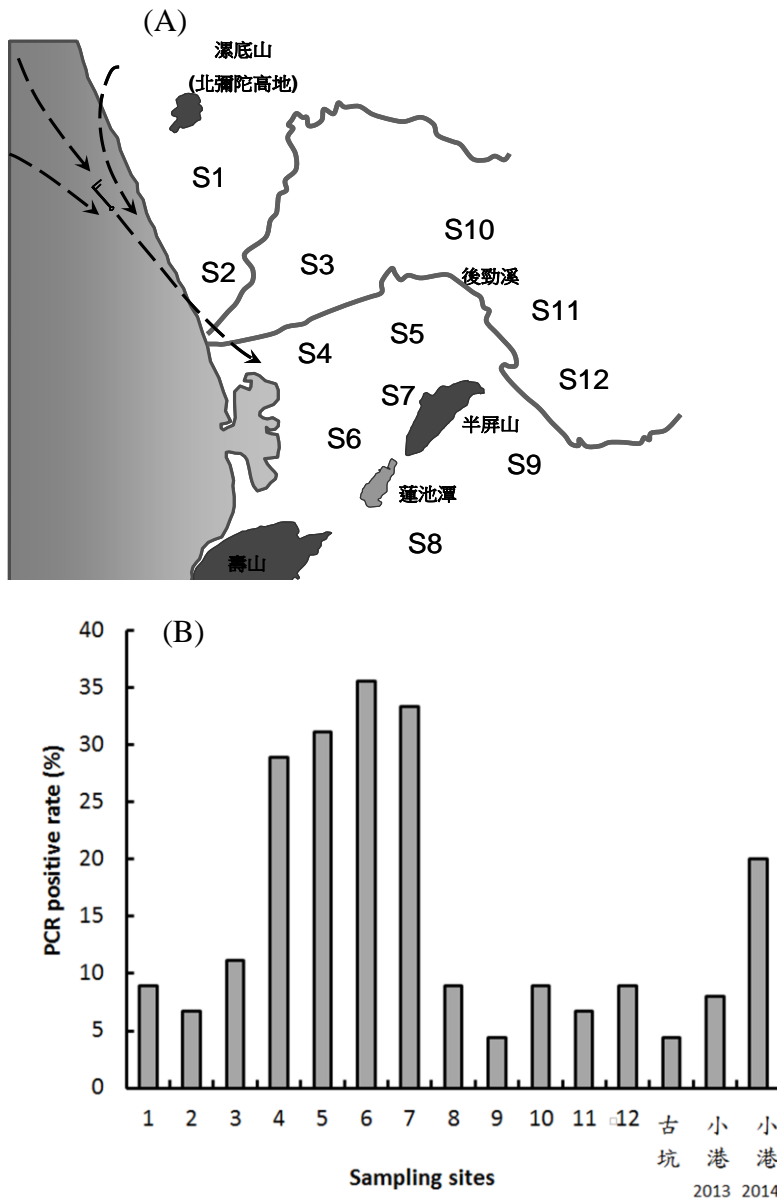


圖五、土壤之 *B. pseudomallei* 垂直分布。 2013-2014 年間逐月採集深層(A, 60 cm)、淺層(B, 30 cm)與表層(C, <10 cm)土壤，檢測 *B. pseudomallei*-specific *fliC* amplicons 之陽性率。各層土壤間陽性率的相關性，列於圖右。

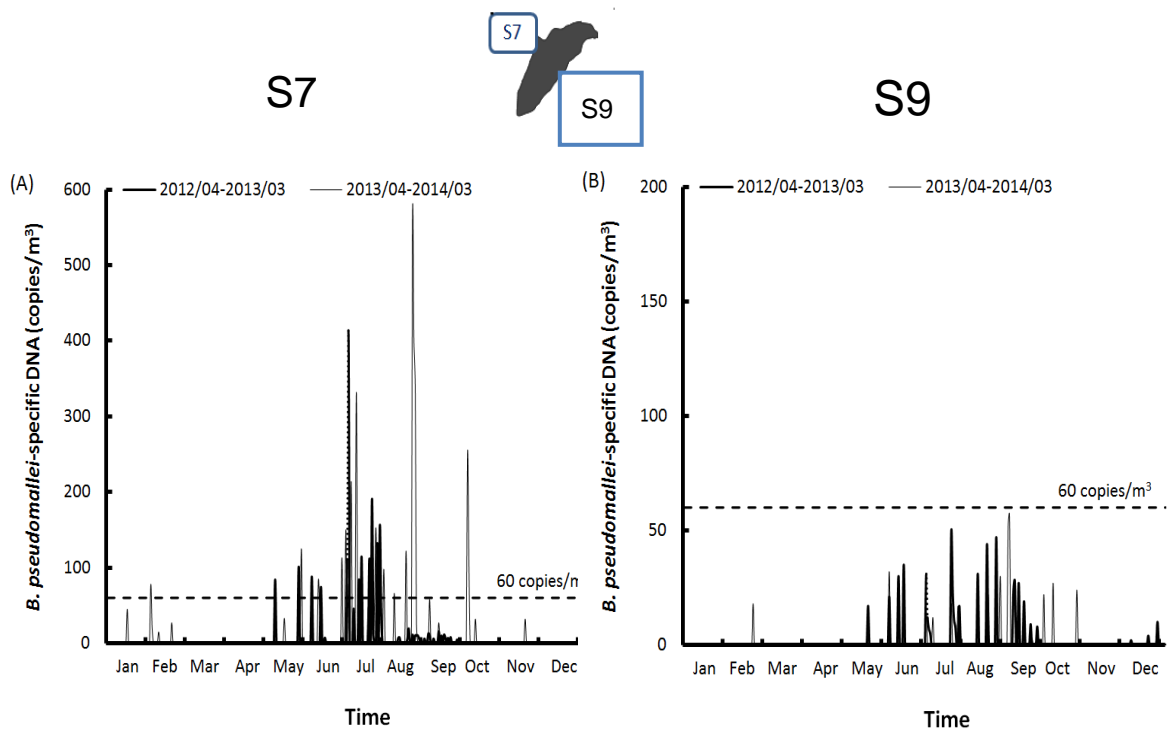


圖六、水體 *B. pseudomallei* 之垂直分布。 2013-2014 年間逐月採集底泥(A)、深層水(B, >60 cm)與表層水(C, <10 cm)的樣品，檢測 *B. pseudomallei*-specific *fliC* amplicons 之陽性率。各層土壤間陽性率的相關性，列於圖右。

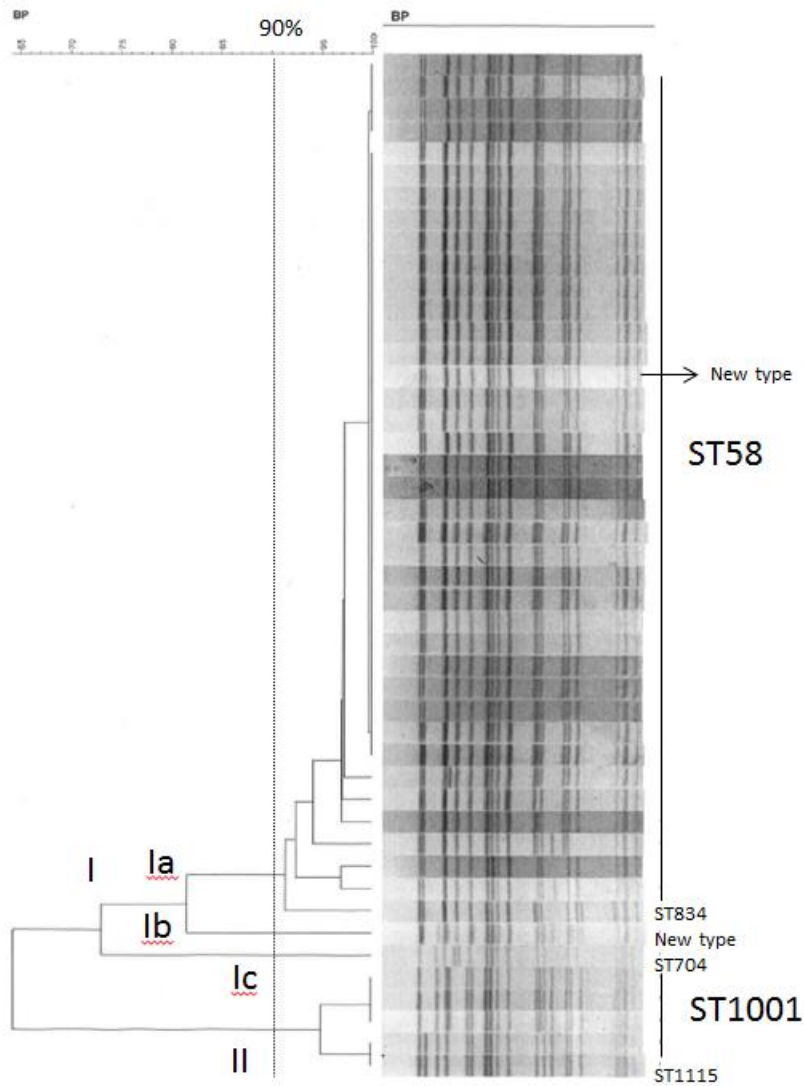




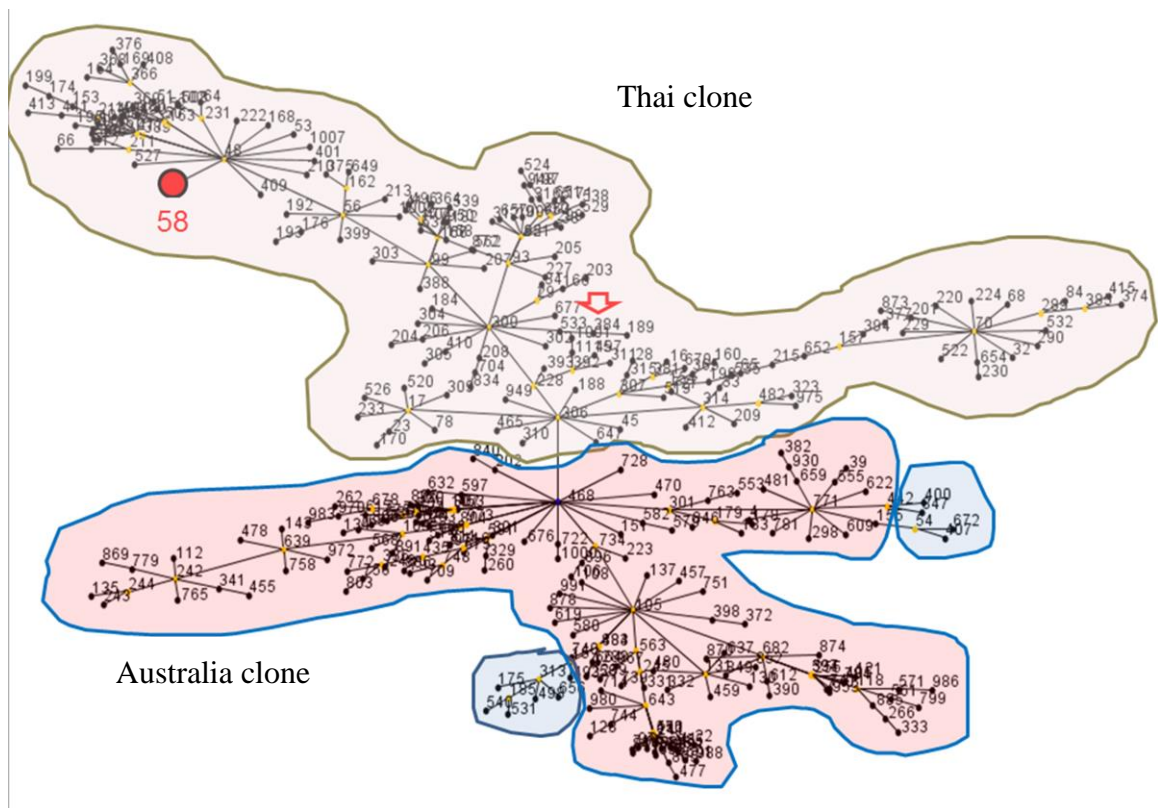
圖七、空氣微粒採集位置與陽性率。 48 km<sup>2</sup>之實驗區域，設置 S1-S12 採樣點的位置圖，箭頭所指為颱風季節，最主要的風向(A)。2013-2014 年間，於採樣區收集空氣微粒，分析 *B. pseudomallei*-specific *fliC* amplicons 之陽性率。古坑與小港為控制組地區，因小港地區 2013 與 2014 的陽性率差異很大，所以分別作圖。



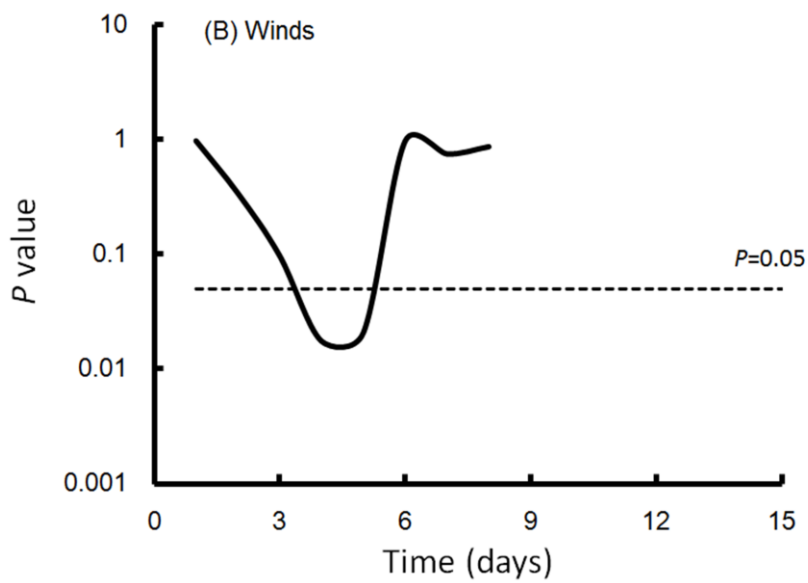
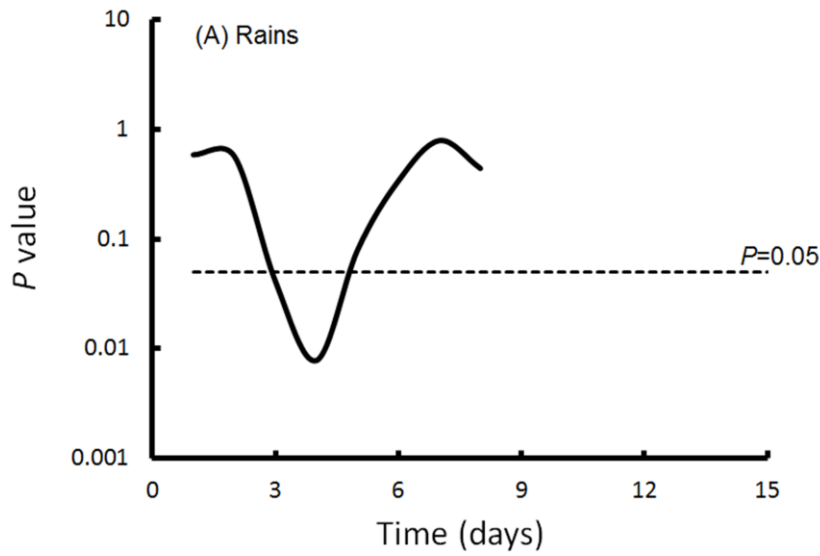
圖八、空氣微粒之 *B. pseudomallei*-specific DNA 定量。 2012-2014 年間，收集 S7 (A) 與 S9 (B) 採樣區之空氣微粒，進行 qPCR 反應，定量 *B. pseudomallei*-specific *fliC* amplicons 之濃度。S7 與 S9 區域的相對位置，列於圖形上方。黑色實心圖案表半屏山。



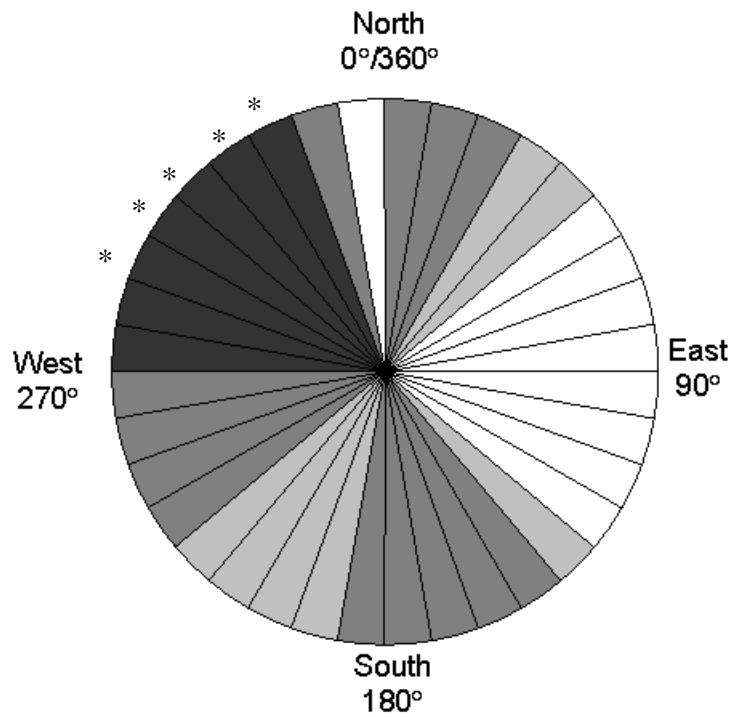
圖九、*B. pseudomallei* 分離株之 PFGE 分型。45 株 *B. pseudomallei* 的環境與臨床之個別分離株(土壤、n=16，水源、n=6；空氣微粒、n=4、病人、n=19)，經 90% 相似度定義 PFGE type 的親緣關係。個別菌株之 ST type 若相同，則不個別標示菌株名。



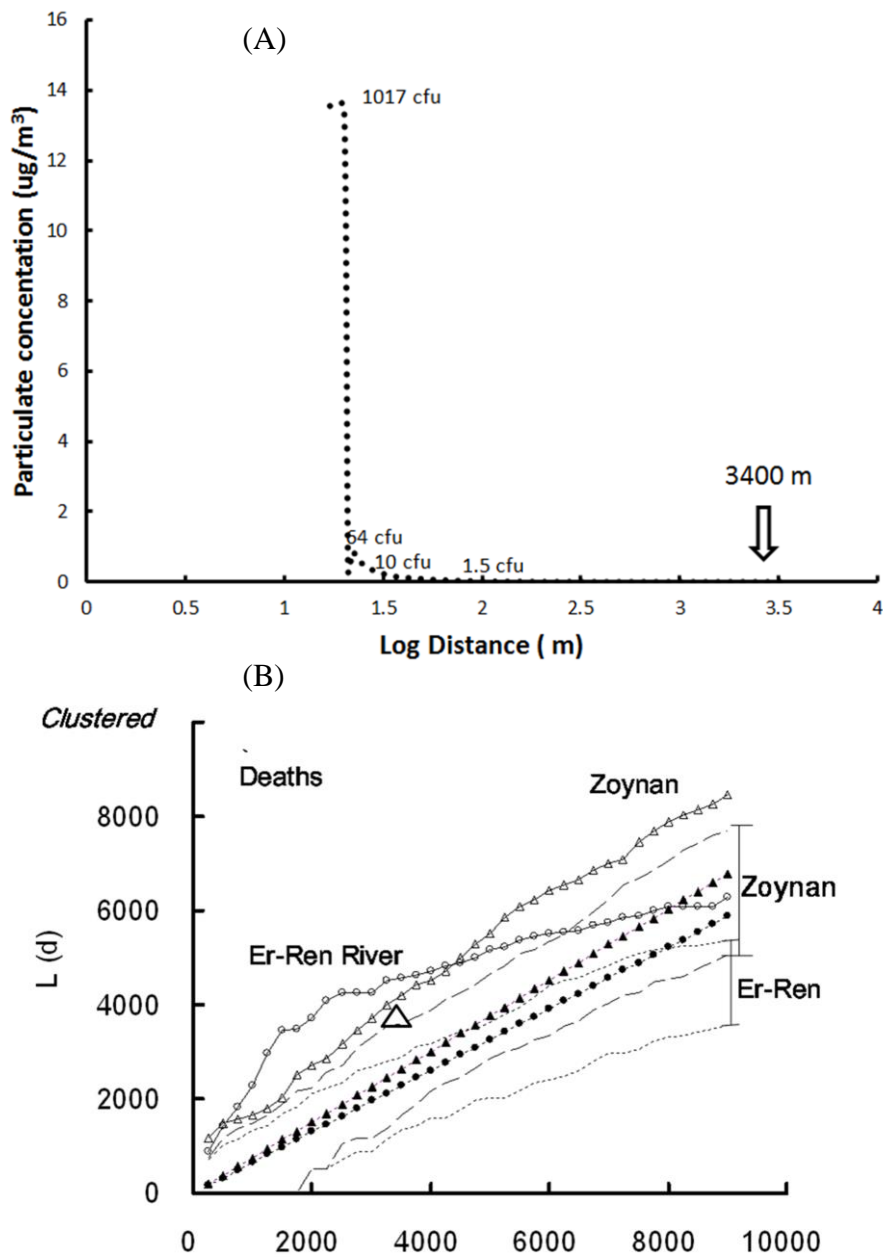
圖十、*B. pseudomallei* 之 ST type 聚落。取不同之 *B. pseudomallei* ST type (n=354)，依 e-Burst (version 3.0) 分析 Thai clone (上方) 與 Australia clone (下方) 的聚落。藍色小圈的區域範圍，表示 Australia clone，但分離自泰國。紅色圓形表 ST58，箭頭所指為 ST1001 的位置。



圖十一、氣候因子與類鼻疽個案之相關性。類鼻疽高風險區(高雄左營、楠梓)之類鼻疽個案分別與雨量(A)或風速(B)進行 negative binomial model 分析，在設定 time lag (days)後，p value 的變化圖。需線所指為  $p=0.05$ ， $p<0.05$  定義為顯著相關。

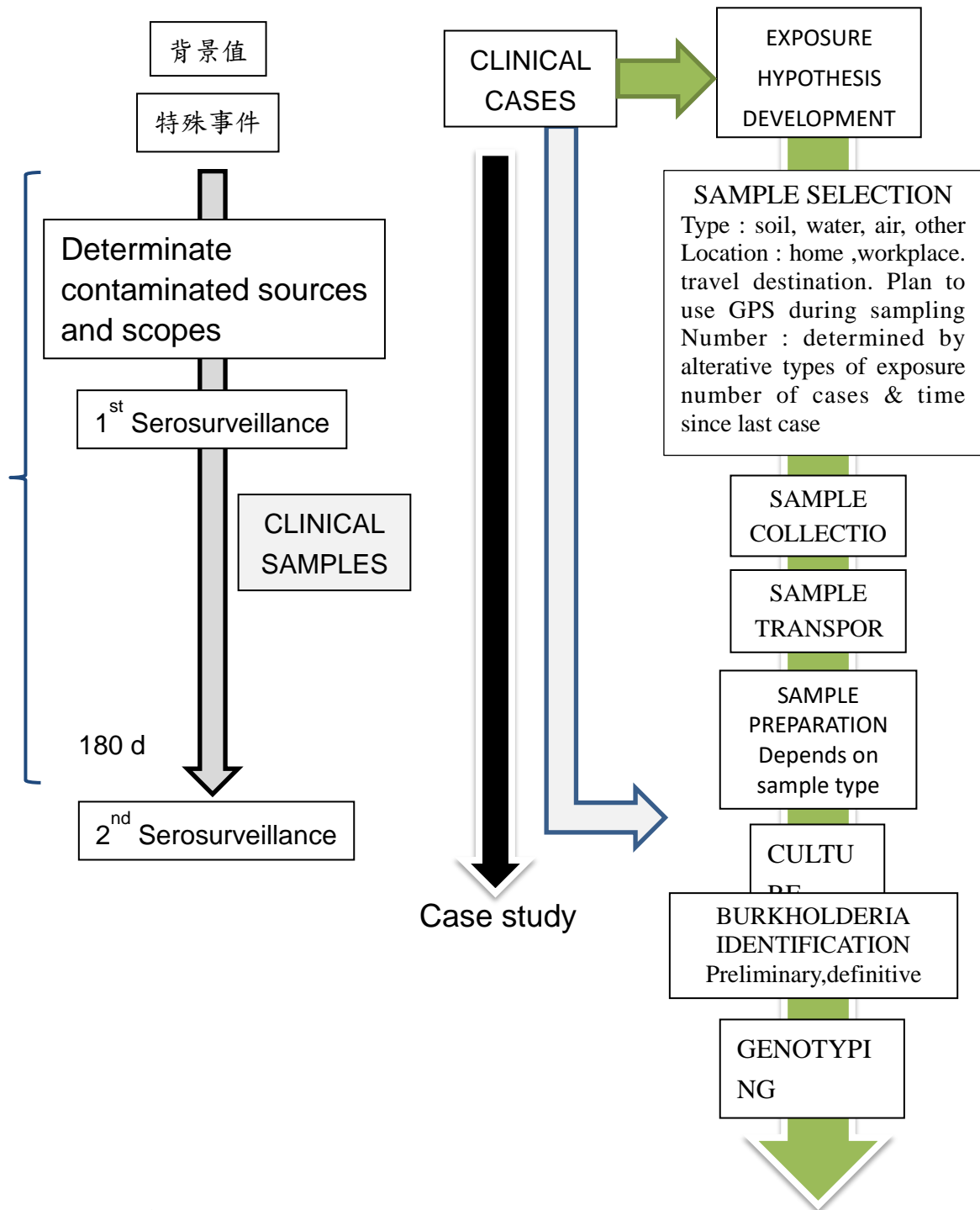


圖十二、風向分布與類鼻疽個案之相關性。類鼻疽高風險區(高雄左營、楠梓)之風向分布，依 0°-360°展開。顏色深淺為出現頻率之多寡。星號所指係颱風季節，該風向與類鼻疽個案呈現相關( $p < 0.05$ )。



圖十三、空氣微粒擴散範圍與類鼻疽死亡個案的聚集分析。空氣微粒濃度變化依 Caucasian air dispersed model，採 PM10 起始濃度  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、覆蓋  $6000 \text{ copies}/\text{m}^3$  之 *B. pseudomallei* 與風速  $17.2 \text{ sec}/\text{m}^3$  計算。箭頭所指，為濃度趨近於  $0 \text{ copies}/\text{m}^3$  (A)。Replay K Function 聚集分析係取 2005-2011 類鼻疽病例 ( $n=342$ ) 進行分析，實心符號表期望值(圓形為左營；三角為二仁溪流域)，空心符號表觀察值(三角為左營、圓形為二仁溪流域)，虛線表示 95% 可信區間的界線值。三角所指，係最大的期望值與觀察值的背離(最有效聚集的距離)。

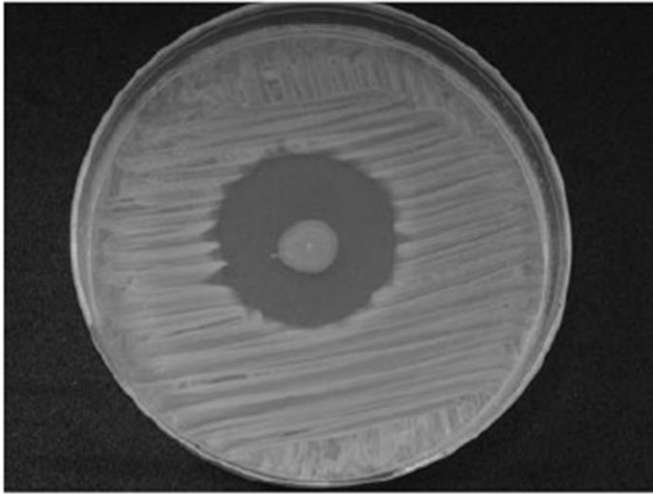
# 類鼻疽疫情調查



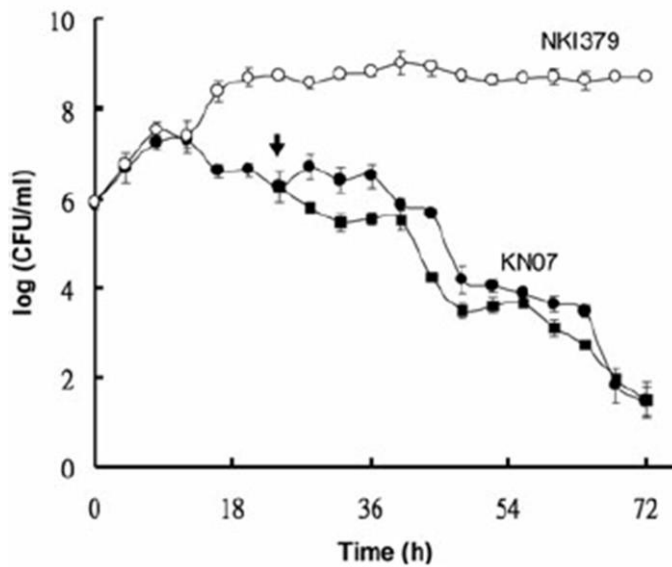
圖十四、類鼻疽疫情調查流程圖。本圖引用於 The public health implication of melioidosis (Inglis et al., 2009)。



(a)



(b)



圖十五、*Burkholderia pseudomallei* 與 *Burkholderia I379* 拮抗作用。 *Burkholderia I379* (中心點)對 *B. pseudomallei* KN07 產生抑制圈 (A)。 *Burkholderia I379* (white circle)與 *B. pseudomallei*(black circle)共同培養之。箭頭所指， *Burkholderia I379* 培養 24 h 後，再加入 *B. pseudomallei* KN07 (B)。本圖取自 *Burkholderia multivorans* acts as an antagonist against the growth of *Burkholderia pseudomallei* in soil. (Lin et al., 2011)。

Table 1: Positive rate of *B. pseudomallei*-specific DNA in particulate matters

	Particulate matters		
	PM10	PM4-10	PM2.5
Sample size (n)	60	60	60
Positive numbers (n)	21	12	1
Positivity (%)	35.0%	20.0%	1.7%

Table 2. ST types of environmental strains

Strain	Source	ST type	Housekeeping genes						
			ace	gltB	gmhD	lepA	lipA	narK	ndh
1	Air	58	3	1	5	1	1	4	1
2	Air	58	3	1	5	1	1	4	1
3	Air	58	3	1	5	1	1	4	1
4	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
5	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
6	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
7	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
8	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
9	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
10	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
11	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
12	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
13	Soil	New type	4	1	5	1	1	29	1
14	Soil	New type	3	1	6	1	1	4	1
15	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
16	Soil	834	3	1	6	1	1	29	1
17	Soil	58	3	1	5	1	1	4	1
18	Soil	704	1	1	6	1	1	29	1
19	Soil	1001	4	2	6	1	1	29	1
20	water	58	3	1	5	1	1	4	1
21	water	1115	1	2	6	1	1	29	1
22	water	1001	4	2	6	1	1	29	1
23	water	1001	4	2	6	1	1	29	1
24	water	No identify							
25	water	1001	4	2	6	1	1	29	1

Table 3. ST types of clinical strains

Strain	Year	ST type	Housekeeping genes						
			ace	gltB	gmhD	lepA	lipA	narK	ndh
1	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
2	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
3	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
4	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
5	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
6	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
7	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
8	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
9	2010	58	3	1	5	1	1	4	1
10	2011	58	3	1	5	1	1	4	1
11	2011	58	3	1	5	1	1	4	1
12	2011	58	3	1	5	1	1	4	1
13	2011	58	4	1	5	1	1	29	1
14	2011	58	3	1	6	1	1	4	1
15	2012	58	3	1	5	1	1	4	1
16	2012	58	3	1	6	1	1	29	1
17	2012	58	3	1	5	1	1	4	1
18	2012	58	1	1	6	1	1	29	1
19	2013	58	4	2	6	1	1	29	1
20	2013	58	3	1	5	1	1	4	1

Table 4 Demographic characteristics of melioidosis cases

	Study areas		
	Taiwan	Er-Ren River	Zoynan
2000-2004	20	4	
2005-2011	302	80	83
Gender			
M	230	54	65
F	72	26	18
Age			
>85	13	2	5
75-84	46	15	20
65-74	59	21	15
55-64	72	19	21
45-54	70	11	15
35-44	31	10	3
<35	11	2	4
Fatal cases			
	69	17	14
Occupation			
Unemployed	156	50	54
Agriculture	13	4	0
Indoor	19	5	2
Outdoor	32	7	5
No information	82	14	22

Table 5 Multivariable analysis for rainfall, wind speed and wind direction

Region	Lag time (d)	Dominate climate factors* for			
		Rain, WS (wind speed) and WD (wind direction, degree)			
		2005-2011	2005-2008	2009-2011	2012-2014
Zoynan					
Region	3	Rain, $p=0.016$		Rain, $p<0.001^B$	
	4			Rain, $p<0.001^B$	
	5		WS, $p=0.022$		

\*  $p \geq 0.1$  not shown

B, Significant after Bonferroni-correction ( $p=0.1$ )

**Table 6** Descriptive statistics for ambient *B. pseudomallei* and environmental factors during the typhoon season (June to September) and the reference season (October to December) near Lotus Pond in South Taiwan.

		Tryphoon season	Reference season	<i>p</i> -value
<i>B. pseudomallei</i> (%)	Positive rate	35.9% (38/106)	0% (0/82)	
	2012			
	Positive rate	39.3% (48/122)	3.2% (4/122)	
	2013			
<i>B. pseudomallei</i> (copies/m <sup>3</sup> )	Mean ± SE (Range)	500.6 ± 3965.4	N.D. ( N.D.)	<0.001*
	(2012)	(N.D. <sup>a</sup> -41376.0)		
	(2013)	190±284 copies/m <sup>3</sup>	15±4.6 copies/m <sup>3</sup>	
Rainfall (mm)	Mean ± SE (Range)	13.7 ± 31.9 (N.D.-155.0)	0.7 ± 4.5 (N.D.-39.5)	<0.001*
Wind (m/s)	Mean ± SE (Range)	2.1 ± 0.9 (1.1-7.2)	1.8 ± 0.5 (1.1-3.6)	0.029
UV index <sup>b</sup>	Mean ± SE (Range)	8.5 ± 2.9 (1.0-13.0)	5.5 ± 1.4 (1.0-8.0)	<0.001*
Ambient Fungi (CFU/m <sup>3</sup> )	Mean ± SE (Range)	400.3 ± 781.1 (51.3-2590.4)	869.0 ± 1399.3 (42.9-457.3)	<0.001*
Ambient Bacteria (CFU/m <sup>3</sup> )	Mean ± SE (Range)	241.1 ± 35.4 (68.9-6849.8)	157.9 ± 9.8 (122.5-7884.0)	0.357
O <sub>3</sub> (ppb)	Mean ± SE (Range)	26.6 ± 1.5 (9.8-72.2)	37.4 ± 1.8 (3.7-75.4)	<0.001*
SO <sub>2</sub> (ppb)	Mean ± SE (Range)	4.1 ± 0.2 (1.2-10.9)	4.9 ± 0.1 (2.5-9.4)	<0.001*
CO (ppm)	Mean ± SE (Range)	0.4 ± 0.0 (0.1-1.0)	0.6 ± 0.0 (0.3-1.4)	<0.001*
NO <sub>x</sub> (ppb)	Mean ± SE (Range)	16.6 ± 0.7 (5.1-41.3)	24.2 ± 0.9 (12.4-63.8)	<0.001*

<sup>a</sup> N.D.means not detected;

<sup>b</sup>1 unit equals 25mW/m<sup>2</sup>;

\*significant at *p*-value<0.05.

doi:10.1371/journal.pntd.0002877.t002

Table 7\*

<b>Reason for alert</b>	<b>Rationale</b>	<b>Action</b>
Case cluster	Unusual event, undisclosed cases, Potential secondary prevention	Case finding Environmental health investigation Enhanced laboratory surveillance Isolate genotyping As in case cluster
Multiple deaths, septicemic disease	Unusual severity, clustering, Potential single source	
Pediatric cases	Unusual severity	Case finding, serosurveillance enhanced laboratory surveillance
Epizootid	Potential herald event	Veterinary & serosurveillance
Previously unknown location	Extension of endemic area	Enhanced laboratory surveillance
Dry season septicemic cases	Unusual event, specific Environmental source	EH investigation, case finding, serosurveillance

\*本表取自 The public health implication of melioidosis (Inglis et al., 2009)。



Table 8\*

Recommendations for the prevention of melioidosis.
1. Avoid direct contact with soil or environmental water.
2. If contact with soil or environmental water is necessary, wear protective gear including rubber gloves, boots or waders, and wash with soap and clean water immediately after exposure.
3. In the event of an injury involving contamination with soil or environmental water, immediately clean the wound with soap and clean water.
4. Keep open wounds covered and avoid contact with soil or water until completely healed. Do not apply any herbal remedies or other substances to the wound. In the event that the wound comes into contact with soil or environmental water, clean the wound thoroughly with soap and clean water.
5. Always wear shoes. Do not walk bare foot.
6. Only drink bottled or boiled water. Do not drink any untreated water.
7. Do not eat food contaminated with soil or dust. If food is to be eaten without cooking, wash thoroughly using clean water. Use clean eating utensils, and wash these in clean water.
8. When outside, avoid heavy rain or dust clouds. If caught in a dust cloud, cover mouth and nose. Use an umbrella to protect yourself from the rain.
9. Do not smoke.
10. Be aware that you are at greater risk of melioidosis if you have certain conditions, including diabetes, chronic kidney disease, and diseases that require steroid therapy or medications that suppress the immune system.

doi:10.1371flournal.pntd.0002072.t002

\*本表取自 Activities of daily living associated with acquisition of melioidosis in northeast Thailand: a matched case-control study (Limmathurotsakul *et al.*, 2013)