

計畫編號：DOH92-DC-2014

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

侵襲性肺炎鏈球菌在臺灣地區血清型及分子生物學研究

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：周振英

研究人員：陳英彥、沈佩紋、姚淑滿

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

	頁次
目錄	0
摘要	1
前言	3
材料與方法	5
結果	10
討論	16
結論與建議	21
參考文獻	22
圖一：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症個案數	25
圖二：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症的年齡分佈	26
圖三：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染主要年齡層每十萬人發生率	26
圖四：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症各月份發生情形	27
圖五：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染所引起病症之各年齡層分佈	27
圖六：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症之各年齡層血清型分佈	28
圖七：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症 2 歲以下幼童血清型分佈	28
圖八：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染 65 歲以上老人血清型分佈	29
圖九：血清型 14 之 PFGE 分子生物型別	29
圖十：血清型 14 之 PFGE 分子生物型別	30
圖十一：血清型 14 之 PFGE 分子生物型別	30
圖十二：血清型 14 之 PFGE 分子生物型別	31
圖十三：血清型 14 之 PFGE 分子生物型別	31
圖十四：血清型 3、6B 及 23F 之 PFGE 分子生物型別	32
表一：23 價及 7 價疫苗含蓋肺炎鏈球菌在各年齡層血清型比例	32
表二：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症之粗略致死率分析	33

摘要

由於台灣地處溫帶及亞熱帶地區，再加上人口多密集居住在都會區內，極適合許多藉由呼吸道傳播之病原菌生長及散佈，肺炎鏈球菌便是其中之一；肺炎鏈球菌不僅是在呼吸道感染，特別是當該菌侵入到人體內更會導致嚴重的侵襲性感染症，例如：敗血症、菌血症、腦膜炎、肺炎及腹膜炎等，這些感染都可能直接影響到病患生命安全。本研究自民國 91 年 1 月 1 日起至 92 年 12 月 31 日，由 28 家地區級以上醫院通報受侵襲性肺炎鏈球菌感染病患之相關資料及菌株共 623 例，監測侵襲性肺炎鏈球菌在臺灣地區流行狀況，符合侵襲性定義者(從血液、腦脊髓液及其他無菌部位分離出菌者)共 546 例，發生人口主要在 5 歲以下(24.18%)的幼兒及大於 65 歲以上(36.26%)的老人，男女發生比例為 2.15:1，流行於冬春氣溫較低氣候變換的季節，粗略致死率為 13.75%。最好發的血清型依次為 14 (19.05%)、23F (14.47%)、3 (13.92%)、19F (12.82%)、6B (8.06%)、9V (4.21%) 及 4 (2.38%) 等，成人與兒童最常見血清型稍有差異，在 15 歲以上成人血清型依次為 3 (17.93%)、14 (15.76%)、19F (13.59%)、23F (12.23%)、6B (6.25%)、9V (3.86%) 及 4 (3.26%) 等。在 14 歲以下兒童則依次為 14 (29.03%)、23F (16.77%)、6B (13.55%)、19F (11.61%)、3 (5.81%) 及 9V (4.52%) 等。目前市售 23 價多醣體疫苗所能含蓋血清型的比例為

86.81%，在六十五歲以上老人含蓋血清型的比例為 88.38%。另一種針對 2 歲以下幼兒的 7 價蛋白質結合型疫苗也在美國上市使用，針對國內 2 歲以下幼兒所能涵蓋血清型比例為 81.13%。我們使用 Sma I 限制酵素處理血清型 14 及 3 菌株，再用脈衝電泳方法將其作用後之 DNA 加以分析，發現到在血清型 3 的 DNA 脈衝圖譜均相同，而在血清型 14 菌株則可分析出有三大主要分子型別，以及另外尚可分出 11 種以上不同分子型別。由以上流行病學的調查、微生物學之鑑定及進一步由分子層面深入探討，讓我們初步了解到臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌的流行趨勢、血清及分子生物型別，這些對於該菌在防疫政策上以及對國內疫苗施打的有效性等問題，均提供了寶貴的參考資料，為使調查結果更能代表台灣地區流行情形，繼續監測該菌在臺灣地區之流行概況仍有其必要性存在。

前言

肺炎鏈球菌為小孩及年長者呼吸道感染之重要病原菌之一，在成年人的感染及社區型肺炎的傳播也時有所見，長久以來在世界各地有許多受肺炎鏈球菌感染後所造成的重大疾病；肺炎鏈球菌會藉由空氣傳播經呼吸道侵入人體造成感染，在溫帶及亞熱帶地區的國家，適合肺炎鏈球菌的生長及擴散，其侵入人體後會造成許多侵襲性疾病，尤其較易侵入免疫系統較弱之兒童及 65 歲以上老人如：菌血症、敗血症、腦膜炎及呼吸道疾病如：肺炎、中耳炎、鼻竇炎等之侵襲性疾病。在美國每年肺炎鏈球菌造成約有 50,000 例菌血症、500,000 例肺炎及 3,000 例腦膜炎病例，其中約有 40,000 人因肺炎鏈球菌感染而死亡 (1,2)。台灣位處溫帶及亞熱帶地區，人口又多集中於都市區域活動，人與人的接觸頻繁，非常適合肺炎鏈球菌的生長，國內有關該菌引起侵襲性感染的發生率及所造成死亡率等的流行病學調查，曾有部分醫院或一些地區性之報告發表，並沒有較具全國性的調查資料，以及菌株好發的血清型、抗藥性問題等，都沒有完整詳細的調查資料。從 1976 至 1979 年發現真正高度抗藥性的肺炎鏈球菌之後，該菌的抗藥性問題就在全世界許多國家陸續被發現 (3-5)。近幾年來抗藥性菌株有逐漸增加的趨勢；在國內由以往的報告也顯示有類似的情形 (5-9)，且抗藥性之比例在世界上也屬於非常嚴重的程度，這也增加許多臨床治療上的困難。在

1983 年已有能針對 23 種血清型有效的肺炎鏈球菌 23 價疫苗上市 (2,10)，在國外建議施打的對象為 65 歲以上老人及免疫系統不全者 (1)，但此種疫苗卻無法使 2 歲以下之幼童誘發產生足夠的免疫反應，只能使用在 2 歲以上的孩童，2 歲以下之幼童則必須仰賴發展另一種與蛋白質接合的肺炎鏈球菌結合型疫苗，由於其製造成本較貴，目前在美國及歐洲地區也已經有 7 價蛋白質結合型疫苗上市 (11,12)，因此 23 價疫苗及 7 價蛋白質結合型疫苗在國內能含蓋的肺炎鏈球菌、其使用效果如何及台灣地區是否需要自行發展結合型疫苗仍有待評估。

在國內外許多研究亦發現到，受相同血清型別之肺炎鏈球菌感染個案，實際上這些感染菌株是由不同來源在傳播，以及該菌抗藥性問題上，亦可使用細菌本身的基因來加以區別 (26,27,28)，因此為了更深入了解台灣地區受肺炎鏈球菌感染狀況，除了用血清分型技術外，並使用分子生物學分型方法來加以研究，以探討其傳播的種種因素來源。

我們持續由國內地區級以上醫院開始，收集這些醫院所分離出之侵襲性肺炎鏈球菌菌株及受感染病患的相關資料，分析菌株的血清型別，及進一步用分子分型技術確定其分子型別，以了解目前台灣地區肺炎鏈球菌的流行情形；並且從中去了解肺炎鏈球菌的傳播與環境人類間的關係，這些將是台灣本土的重要參考資料，以及未來防疫政策上的重要參考依據。

材料及方法

各醫院通報內容及流程：

一、疾病通報定義：由肺炎鏈球菌引起之侵襲性疾病（肺炎、腦膜炎、菌血症、關節炎、骨髓炎、心內膜炎、心包膜炎、腹膜炎等）總稱為侵襲性肺炎鏈球菌疾病；各年齡層，凡具有符合以上疾病臨床症狀之病例，且經由正常狀況下為無菌之檢體的細菌培養或抗原陽性反應者，即請通報。

二、通報醫院之範圍：

- 1.醫學中心及準醫學中心。
- 2.區域醫院及準區域醫院。
- 3.地區教學醫院及特殊功能教學醫院。
- 4.地區醫院。

三、通報內容及流程：

- 1.臨床醫師之通報：由通報醫院之醫師填寫病患之疾病資料後，通報至衛生署疾病管制局細菌性疾病組。
- 2.實驗室之通報：由各醫院細菌室之負責人，且參加衛生署舉辦之肺炎鏈球菌之訓練及講習者，依據所採個案檢驗之培養為肺炎鏈球菌陽性，則填寫有關資料後送衛生署疾病管制局細菌性疾病組，並通

知醫院之院內感染管制小組或指定之醫師通報病患之疾病資料。分離出之菌株亦以快遞運送至衛生署疾病管制局細菌性疾病組，做再鑑定、血清分型及保存菌種等工作。

菌種鑑定、分型及保存：

一、菌株來源：凡符合侵襲性肺炎鏈球菌疾病之通報定義，由各通報醫院之細菌室分離出之菌株，將平板培養基菌株盡快以快遞方式送至疾病管制局細菌性疾病組，做菌株之再鑑定及分型。

二、使用培養基：

分離及增菌用培養基可使用含3%-5%綿羊血的血液培養基（BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md., U.S.A.）。

三、菌株鑑定：

1. 菌株分離：

以解剖顯微鏡觀察可疑菌落，菌落上有微細顆粒，呈 α 溶血性，若再繼續培養，菌體會自行溶解，使菌落由中央凹陷而呈火山口狀。自培養基上取可疑菌落做革蘭氏染色(Gram's stain)，並於顯微鏡下觀察。肺炎鏈球菌為革蘭氏陽性球菌，直徑為0.5~1.25 μm ，通常成對排列，周圍繞以明顯莢膜，典型成對的肺炎鏈球菌互相在較扁平的一面連接，相對的二端則凸起，但人工培養者則可能有單

個、短鏈或長鏈狀的情形出現。

2. Optochin 生長抑制試驗 (optochin growth inhibition test) :

挑取疑似菌落，塗劃於血液培養基上，貼上含 5 μg optochin

(Optochin: Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 之濾紙錠，於

35-37°C，5 % CO_2 過夜培養。一般 *Streptococcus pneumoniae* 將有

大於 14 mm 之抑制環產生 (若用 6 mm 紙錠)，或大於 16 mm 之

抑制環產生 (若用 10 mm 紙錠)。近年來，已發現 optochin 抗性菌

種，因此若有抑制環小於標準，可再操作 bile solubility 試驗。

3. Bile solubility test (膽鹽溶解試驗) :

將幾滴 10% sodium deoxycholate (為 bile salt 的一種) 直接加到

blood agar plate 上的菌落，觀察 30 分鐘，如溶解 (非漂浮掉)，則

為 *Streptococcus pneumoniae*。

四、肺炎鏈球菌的血清分型 (*Pneumococcus* serologic typing) :

莢膜腫脹試驗 (Quellung reaction) :

利用抗莢膜多醣類 (anti-capsular polysaccharide) 抗體，可將肺

炎鏈球菌分為 90 型 (Antisera: Statens Serum Institut, Copenhagen,

Denmark)，是將一滿圈環之肉汁培養菌或血液瓊脂上菌落的生理

食鹽水懸浮液，加上一滿圈環之不同型抗血清，在載玻片上相混

合後，以油鏡觀察，若為同型，則菌體莢膜的輪廓將非常清晰並呈膨脹，否則不然，如此則可判斷其血清型。

五、菌種保存

經鑑定及分型之菌株，則做次培養。取新鮮之菌體，放於有冷凍保存溶液之保存試管中 (Protect, Technical Service Consultants Limited)，搖晃均勻後，靜置30秒，將冷凍保存液吸出，旋緊試管蓋子，放入-70°C保存，並做菌種保存記錄。

六、脈衝電泳分析法：

細菌培養在含3%-5%綿羊血的血液培養基 (TSA with 3-5% sheep blood)，於35-37°C，5 % CO₂過夜培養。將細菌溶於0.5mL (10mM Tris-HCl、1mM NaCl、5mM EDTA) 溶液中，將此溶液與0.5mL 2% 低熔點洋菜膠混合，注入模型內待凝結，取出置於50mM Tris-HCl、50mM EDTA、1% sarcosine、20µg RNase、100µg lysozyme溶液內，於37°C培養約5小時，倒掉此溶液並加入0.25M EDTA、20mM EGTA、1% sarcosine、50µg/mL proteinase K溶液，置於50°C培養16-18小時，然後使用10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA溶液清洗三次，每次30分鐘，切割一片段處理後包含菌之洋菜膠，用10U Sma I來進行限制酶切割反應。

再經脈衝電泳分析：在0.5倍TBE緩衝液中以2-30秒的轉換時間，旋轉角度120度，進行22小時。並使用數位照相系統拍照儲存後，以影像分析系統比對。

結果

一、收集侵襲性肺炎鏈球菌菌株及個案相關資料分析：

1. 計劃執行時間：民國九十一年一月一日至九十二年十二月三十一日。
2. 計劃收集地區：由國內北、中、南、東部各區 28 所地區級以上之醫療院所（北部 13 所、中部 10 所、南部 3 所及東部 2 所）。
3. 計劃收集個案：共計通報 623 例個案（北部 211 例、中部 203 例、南部 181 例、東部 22 例及未知 6 例）。
4. 符合定義個案：本監測計畫係針對侵襲性肺炎鏈球菌，故分離菌株之檢體來源需在正常狀況下為無菌之檢體，例如血液，腦脊髓液，肋膜液，關節液，腹水等。經過審核確定符合監測定義者共計有 546 例（北部 177 例、中部 178 例、南部 166 例、東部 20 例及未知 5 例）（圖一），其中通報的 49 例為由非侵襲性檢體分離到菌株以及 28 例未能培養出菌株，因在檢體來源定義上仍有疑義，因此將不列入統計資料中。
5. 收集檢體來源：大部分為來自血液分離者有 513 例（82.34%）尚有自腦脊髓液有 21 例（3.37%）、肋膜液有 14 例（2.24%）、腹水有 4 例（0.64%）以及痰液有 43 例（6.90%）分離出肺炎鏈球菌。

二、侵襲性肺炎鏈球菌感染因子分析

1. 各地區發生率比較：根據民國九十一年年底人口總數來計算該菌感染

的年發生率，在這年所發生的總平均粗略年發生率為每十萬人口有 1.22 人，北、中、南及東部地區年發生率分別為每十萬人口有 0.90、1.37、1.51 及 1.67 人受到侵襲性肺炎鏈球菌感染致病（圖一）。

2. 受感染年齡比較：依照各年齡層來區分感染侵襲性肺炎鏈球菌致病的比例，在這兩年收集到符合通報定義的 546 例個案中，兩歲以下感染者有 53 例（9.71%），三歲到五歲間有 79 例（14.47%），六歲到十四歲有 23 例（4.21%），十五歲到四十四歲有 71 例（13.00%），四十五到六十四歲有 99 例（18.13%），六十五歲以上有 198 例（36.26%），未知年齡有 23 例（4.21%）。根據民國九十一年年底人口總數來計算該菌感染的發生率，二歲以下幼童年發生率為每十萬人口 3.31 人、三歲到五歲間年發生率為每十萬人口 4.52 人、六歲到六十四歲間年發生率為每十萬人口 1.02 人、六十五歲以上老人年發生率為每十萬人口 4.87 人，可以發現到主要發生之年齡層為五歲以下幼童，以及六十五歲以上老年人（圖二、三），就兩年總合計算與兩年分開個別計算看來均有此相同之分布情形（圖二）。
3. 不同性別比較：依受侵襲性肺炎鏈球菌感染之病患性別比較，男性比女性人數為 360：167（2.16：1），對各年及整體來看，大約每年男性感染率都將近為女性的兩倍左右；若區分不同年齡層來計算，在十四

歲以下兒童男女人數比為 93：56 (1.66：1)，十五歲到六十四歲成人男女人數比為 118：51(3.31：1)，六十五歲以上老人男女人數比為 141：57 (2.47：1)。再以各地區男女每十萬人的年發生率比較，由圖一顯示台灣北中南東的男女發生率比較 (圖一、三)。

4. 氣候與通報個案數比較：每個月份均有病例通報，每月平均通報病例數為 22 例，與 91 年台灣地區每月平均氣溫比較，在氣溫較低的月份 (一、二、三、四、十一及十二月份)，通報病例共 411 例佔全年通報病例 75.27% ，為通報之主要季節，通報病例數最高的月份在一及二月份 (71、72 例)，在溫度較高的月份 (六、七、八、九月)，通報病例均不超過 30 例，而九月份通報病例數最少為 16 例(佔全年 2.93%)(圖四)。
5. 在受感染後所造成之疾病也有所不同 (圖五)：以肺炎 (40.84%)、菌血症 (20.87%)、敗血症 (15.93%) 及腦膜炎 (3.66%) 為主要。
6. 在通報的死亡人數來看：符合通報定義個案中，死亡案例有 75 例，粗略致死率為 13.74% (75/546)，十四歲以下兒童，死亡案例有 7 例，粗略致死率為 4.52% (7/155)，十四歲到六十五歲成人共有 24 例死亡，粗略致死率為 14.12% (24/170)。死亡案例大部分集中在六十五歲以上老人共有 44 例死亡，粗略致死率為最高 22.11% (44/199)。(表二)

三、肺炎鏈球菌之血清型別分析：

1. 血清型別分析統計：

其中符合通報定義的 546 例，分離出之 *Streptococcus pneumoniae* 菌株，總共分離出有 26 種以上不同血清型別，在所有菌株中最好發的血清型依次為 14 (19.05%)、23F (14.47%)、3 (13.92%)、19F (12.82%)、6B (8.06%)、9V (4.21%)、4 (2.38%) 及 11 (2.01%) 等，這在這兩年的血清型分布上大致相同，只有在其順序上稍有不同：91 年度為 14 (18.67%)、19F (14.33%)、23F (14.00%)、3 (12.00%)、6B (8.33%)；以及 92 年度為 14 (19.51%)、23F (16.26%)、3 (15.04%)、19F (10.98%)、6B (7.72%)。另外就不同年齡層來看，十五歲以上成人與十四歲以下兒童最常見血清型就有較大分布差異，在成人血清型依次為 3 (17.93%)、14 (15.76%)、19F (13.59%)、23F (12.23%)、6B (6.25%)、9V (3.86%) 及 4 (3.26%) 等。在兒童則依次為 14 (29.03%)、23F (16.77%)、6B (13.55%)、19F (11.61%)、3 (5.81%) 及 9V (4.52%) 等，(圖六)。由於六十五歲以上老人為主要感染族群，以及有較高之致死率，因此在其常見血清型分布依序為 3 (17.68%)、14 (17.17%)、19F (15.66%)、23F (12.63%)、6B (6.06%) 及 10 (3.54%)，(圖八)。以及兩歲以下幼兒亦為主要感染人口，常

見血清型依序為 14 (28.30%)、23F (16.98%)、6B (15.09%)、19F (11.32%)、9V (7.55%)。(圖七)

2. 市售 23 價多醣體疫苗及 7 價蛋白質結合型疫苗分析：

就符合通報定義的 546 例分離出之肺炎鏈球菌血清型，與市售 23 價多醣體疫苗所能含蓋血清型的菌株比例為 86.81% (474/546)，若以 7 價蛋白質結合型疫苗來比較，其所能涵蓋菌株比例為 62.64% (342/546)。就各年齡層來分析：在十四歲以下兒童，23 價疫苗所能含蓋血清型為 87.74% (136/155)，7 價疫苗所能含蓋血清型為 77.42% (120/155)，在十五歲以上成人 23 價疫苗所能含蓋血清型為 87.50% (322/368) 7 價疫苗所能含蓋血清型為 56.79% (209/368)。另外針對好發年齡層的六十五歲以上老人，23 價疫苗能含蓋血清型的比例則為 88.38% (175/198)，以及好發的兩歲以下幼兒，23 價疫苗能含蓋血清型的比例則高達 90.57% (48/53)，但對此年齡層其疫苗防護力不足，必須使用 7 價結合型疫苗，因此其能含蓋血清型的比例則為 81.13% (43/53)。(表一)

三、脈衝電泳分析

將分離出肺炎鏈球菌血清型 Type 14 型及 Type 3 型菌株，使用限制酶 SmaI 切割其染色體 DNA，再經脈衝電泳分離其切割後 DNA 片段大

小，其片段大小分布在 398.4kb 到 20.5kb 之間（圖九），由其片段大小及分布情形，大致可將血清型 14 之肺炎鏈球菌菌株，區分出 14 種以上不同分子生物型別，其中有 4 種主要分子生物型別佔了較大族群。（圖九、十、十一、十二、十三），且這些不同分子型別，均分部在不同的區域上及年齡層；另外在血清型 Type 3 菌株的脈衝電泳分析上，同樣使用限制酶 SmaI 作用在染色體 DNA 切割，其所產生之片段圖譜來看，似乎只能分辨出一種主要型別（圖十四）。

討論

肺炎鏈球菌為一人類鼻咽部正常細菌叢，常會因上呼吸道受損或病患受其他疾病感染後身體機能較差時侵入人體，其感染方式及途徑仍有待進一步研究；在所有年齡層，肺炎鏈球菌均可能造成肺炎、菌血症、腦膜炎等嚴重之侵襲性感染疾病；由於人體本身具有的免疫系統能防禦肺炎鏈球菌的感染，但在 2 歲以下幼兒及 65 歲以上的老人因免疫機能較差，以及在免疫系統受損或不全之患者均易受到感染而造成嚴重的侵襲性疾病(5,13)。

由我們在臺灣地區 28 所地區級以上醫院這一年來的調查結果顯示，臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染的年發生率大約在每十萬人有 1.22 人，5 歲以下的兒童及 65 歲以上之老年人的年發生率大約在每十萬人有 4.52~4.87 人，遠較 6 歲以上 64 歲以下範圍的成年人(年發生率在每十萬人有 0.30~1.57 人)高很多(圖一、二、三)，這與國外易受感染的年齡層相仿，但因我們所監測的範圍僅侷限在這 28 所醫療院所，也只能代表部分受侵襲性肺炎鏈球菌感染的人口，因此在年發生率上卻較國外其他國家來的低；在臺灣地區男女發生的比率上，以及在主要的發生季節，都與國外相類似，不論以發生個案數或以年發生率來看，大約是男性為女性的兩倍(1,2)，主要發生期在 1~5 月及 11、12 月(圖四)，這與氣象溫度資料比較，也可看出高發生率的月份，有較低的月平均溫度顯示，也就是大約在冬春兩季氣溫低且

氣候變化大；雖然肺炎鏈球菌之侵入方式尚未完全了解，但我們可由我們所蒐集到的這些流行病學資料，間接推測出肺炎鏈球菌的特性及侵入人體的方式；當人類抵抗力較弱時，亦即是在 2 歲以下的兒童及 65 歲以上之老年人其免疫系統稍弱年齡層，以及在外界條件的影響下：氣候變換季節（冬春兩季），溫度低氣候變化大，為許多呼吸道感染性疾病盛行季節，因而增加了侵襲性肺炎鏈球菌感染的機會。

在臺灣地區北、中、南、東四區發生率都約為每十萬人有 1 人受感染，（每十萬人北部有 0.90 人、中部 1.37 人、南部 1.51 人、東部 1.67 人），在這些地區粗略致死率，則分別為 13.56%、15.17%、14.46% 及 15.00%，顯示發生率及粗略致死率並無較大區域性差異存在；此乃因臺灣地處溫帶及亞熱帶地區，也是侵襲性肺炎鏈球菌較易感染的地區，臺灣各地均有侵襲性肺炎鏈球菌感染的發生；臺灣各地區域之溫度差異並不大，也因此各地區發生率並無顯著差異存在。但就主要發生的五種血清型中（14、23F、3、19F、6B），血清型 6B 及 3 粗略致死率為 23.81% 及 19.74%，較血清型 14、23F 及 19F 粗略致死率（分別為 8.65%、10.26% 及 11.11%）高出兩倍左右，這顯示是否受血清型 3 及 6B 感染之病患所造成的傷害較大，甚或是 6B 血清型之肺炎鏈球菌具有較強抗藥性或其他較強影響機制，這些仍有待對該菌株及受感染個案背景資料來加以探討。

由於國內外肺炎鏈球菌的抗藥性問題日益嚴重，為解決日後對該菌無抗生素可治療的窘境，事先施打疫苗將有助於預防及對付抗藥性菌株之產生；但肺炎鏈球菌之血清型別，到目前已知就多達 90 種 (10,17,18)，因此必須發展能含蓋多種血清型別的多價疫苗，所含蓋的應為主要發生的幾種血清型。在美國已有上市使用包含 23 種 (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F) 針對歐美國家引起侵襲性疾病的肺炎鏈球菌主要血清型為參考，所發展出之多醣疫苗 (2,10)，但在不同國家地區及年代好發的血清型也具有相異性。除此這 23 價疫苗的使用上亦不適用於 2 歲以下之幼兒，無法讓 2 歲以下幼兒的免疫系統產生足夠抗體；也因此相同於 b 型嗜血桿菌結合型疫苗發展成功的例子，也已有肺炎鏈球菌蛋白質結合型疫苗 (11,12) 在歐美上市使用，由於其製造過程較複雜成本也相對提高，因此僅有涵蓋 7 種血清型 (14、23F、19F、6B、9V、4 及 18) 的蛋白質結合型疫苗。因此考量國外使用之 23 價疫苗及 7 價蛋白質結合型疫苗是否適合臺灣地區使用，以及未來在開發結合型疫苗該使用那些血清型，這些就必須由臺灣地區分離出肺炎鏈球菌血清型來做參考比較。在國內這類有關菌株血清型的資料，仍舊缺乏具全國代表性的調查報告，因此本研究的另一個目的，也就是要建立臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌的血清型資料。

在我們所做的血清型別研究調查結果，臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌已鑑定出之血清型共約 26 種以上不同型別，最主要流行的血清型依序為 14、23F、3、19F、6B、4、9V 等；在十五歲以上成人與十四歲以下兒童最常見血清型稍有差異。由於六十五歲以上老年人及兩歲以下幼兒為受感染的主要年齡層，就其分離之菌株鑑定出血清型別，在六十五歲以上老人最常見為 3、14、19F、23F、6B、10 及 9V，在兩歲以下幼兒最主要血清型依序為 14、23F、6B、19F、9V 及 3；這些血清型資料與市售 23 價疫苗及 7 價蛋白質結合型疫苗所能含蓋血清型的菌株比例分別為 87.73% (479/546) 及 62.64% (342/546)，若以主要發生年齡層來分析：在六十五歲以上了年人，23 價疫苗所能含蓋血清型為 88.38% (175/196)，在兩歲以下幼兒，7 價蛋白質結合型疫苗所能含蓋血清型為 81.13% (43/53)，7 價蛋白質結合型疫苗，在十五歲以上成人所能含蓋血清型卻只有 56.79% (209/368) (表一)。在我們所分析這些菌株的血清型中，與以往國內外調查流行之血清型別比較，主要盛行的幾種血清型大致相同，只是在佔有的順序上有所差異 (18-21)，這些調查資料便成為日後有效施打疫苗之重要參考依據。

由於分子生物學分型技術發展，將有助於探討肺炎鏈球菌的感染來源、傳播途徑或抗藥性菌株散佈情形；除利用傳統的血清型別或抗藥性分析，或許只能約略看出肺炎鏈球菌之主要分布情形，要進一步作更深入的

流行病學分析便要借助分子生物學分型方法來加以探討；我們初步將最主要的血清型 14 的菌株，使用脈衝電泳分析方式，可將所分離到血清型 14 的菌株再細分成 14 種以上分子型別（圖九、十、十一、十二、十三），而其中也發現到有兩個主要族群分屬於 4 種不同分子生物型別，分子生物型別為 SPH1401、SPH1402、SPH1411 在北中南都有發現，尚未發現到有類似同一種型別大量聚集情形；也未發現其感染的年齡層及疾病上有顯著差異存在現象，但這可能要更進一步去調查個案的相關資料，比如收集其接觸者的感染資料，或其他許多未通報之個案再收集，甚至要再延續幾年收集這些感染菌株及資料等，但目前我們可以證實到此脈衝電泳分析方法，在分析台灣地區肺炎鏈球菌之分子生物型別，將是一個可行的方法；另外在血清型 Type3 的菌株，雖然使用限制酶 SmaI 並無法再加以分辨出不同型別（圖十四），但相反的，血清型 Type3 的菌株其具有較厚之莢膜，在使用莢膜腫脹試驗鑑定時，較難判斷 Type3 的血清型，因此也可使用此脈衝電泳分析方法，來進一步確認其 Type3 的血清型別，至於要將之再進一步分型，則可使用不同之限制酶來處理其染色體 DNA，如 Apa I 等酵素，如此再來進一步分析（23,24,25,26,27）。

結論與建議

近來由於地球的氣候變化，國際間交流日益頻繁，不僅人類儼然已經形成一廣大地球村，就連許多病原菌也都在各國間互相交流，再加上許多人類未具有抗體的新興疾病及人畜共通傳染病的盛行等種種因素，使得這些感染人類的病原菌大大增加侵入人體的機率；在細菌的治療及預防上，雖然能使用抗生素有效抑制細菌的生長，但大量使用下將造成嚴重的抗藥性問題，在國內及國際上侵襲性肺炎鏈球的抗藥性問題一直持續增加；因此要解決抗藥性問題，並且降低感染及感染候造成死亡等影響，疫苗注射便成為一大解決方案；然而該選擇何種疫苗，包含了其涵蓋效能及成本都將是考慮的重點。因此我們在對侵襲性肺炎鏈球菌感染的預防上，除了應盡速了解國內發生情形，更可由血清型別的分佈，作為將來國人預防接種上的重要參考。

參考文獻

1. Center for disease control and prevention. Prevention of pneumococcal disease recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR. 1997; 46(no. RR-8): 1-24.
2. Pneumococcal polysaccharide vaccine. MMWR. 1981; 30: 410-2, 417-9.
3. CDC. Defining the public health impact of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: report of a working group. MMWR 1996; 45: 1-14.
4. Hansman D, Bullen MM: A resistant pneumococcus Lancet 1967;ii:264-5 .
5. 薛博仁, 陸坤泰. 青黴素抗藥性肺炎鏈球菌感染之治療和預防. 台灣醫誌. 1991; 1: 57-65 .
6. Chiou CCC, Liu YG, Huang TS, Hwang WK, Wang JH, Lin HH, Yen MY, Hsieh KS. Extremely high prevalence of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in Kaohsiung, Taiwan. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 1933 –37.
7. Hsueh PR, Chen HM, Lu YC, Wu JT. Antimicrobial resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains in southern Taiwan. J. Formos. Med. Assoc. 1996; 95: 29-36.
8. Hsueh PR, Wu JT, Hsiue TR. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection associated with rapidly fatal outcome. J. Formos. Med. Assoc. 1996; 95: 364-71.
9. Shi ZY, Enright MC, Wilkenson P, Griffiths D, Spratt BG. Identification of three major clones of multiply antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwanese hospitals by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 3514-19.
10. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, Rastogi SC, Schiffman G, Henrichsen J, Mädelä PH, Broome CV, Facklam RR, Tiesjema RH, and Parke JC. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross reactive types

- within groups. *J. Infect. Dis.* 1983; 148: 1136-59.
11. Baltimore RS. New challenges in the development of a conjugate pneumococcal vaccine. *JAMA* 1992; 268: 3366-7.
 12. Robbins JB, Schneerson R. Polysaccharide-protein conjugates; a new generation of vaccines. *J Infect. Dis.* 1990; 161: 821-32.
 13. Schreiber JR , Jacobs MR. Antibiotic-resistant pneumococci. *Pediatr. Clin. Nor. An.* 1995; 42: 519-37.
 14. Fenoll A, Martin BC, Munoz R, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13: 56-60.
 15. Marton A, Gulys M, Munoz R, et al. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J. Infect. Dis.* 1991; 163: 542-8.
 16. Margaret IP, Lyon DJ, Yung WH, Chan C, Cheng FB. Evidence of clinical dissemination of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 2834-39.
 17. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin. Microbiol* 1995; 33: 2759-62.
 18. Nielsen SV, Henrichsen J. Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982-1987. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15: 794-8.
 19. Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J, Facklam RR. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United State, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 885-9.
 20. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children-implication for vaccine strategies. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1995; 14: 503-510.

21. 鍾森田,李啟仁,謝維詮,何憲武,楊照雄.臺灣肺炎雙球菌之菌型分佈.中華微免雜誌. 1991; 24: 196-200.
22. Toikka P, Nikkari S, Ruuskanen O, Leinonen M, Mertsola J. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 633-7.
23. Lefevre JC, Faucon G, Sicard AM, Gasc AM. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin. Microbiol* 1993; 31: 2724-8.
24. Hall LM, Duke B. Conservation of restriction sites in isolate of *Streptococcus pneumoniae* fragment patterns. *J Clin. Microbiol* 1998; 36: 1805-7.
25. Bogaert D, Ha NT, Sluijter M, Lemmens N, De Groot R, Hermans PW. Molecular epidemiology of pneumococcal carriage among children with upper respiratory tract infections in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):3903-8.
26. Siu LK, Chu ML, Ho M, Lee YS, Wang CC. Epidemiology of invasive pneumococcal infection in Taiwan: antibiotic resistance, serogroup distribution, and ribotypes analyses. *Microb Drug Resist.* 2002 Fall;8(3):201-8.
27. Syrogiannopoulos GA, Bogaert D, Grivea IN, Beratis NG, De Groot R R, Hermans PW. Molecular epidemiology of penicillin-susceptible, multidrug-resistant serotype 6B pneumococci isolated from children in Greece. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):581-5.

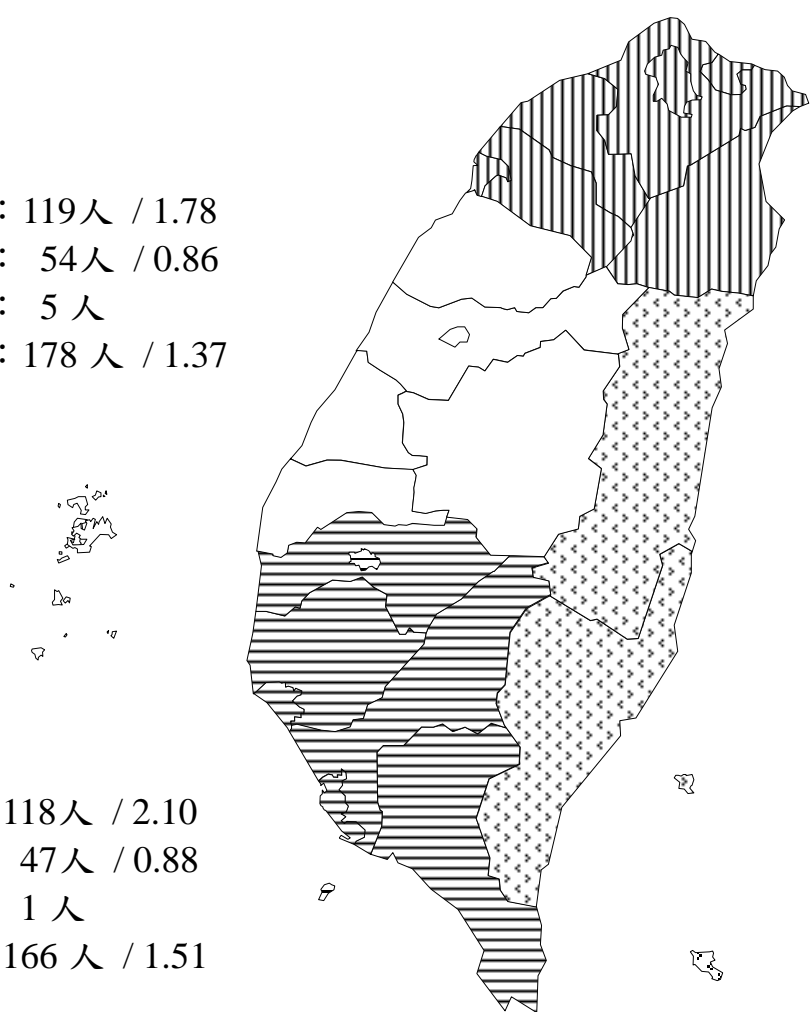
圖一：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症個案數/發生率(每十萬人)
(民國91年1月至民國92年12月)

臺灣區	男性：360人 / 1.57	北區	男性：108人 / 1.08
	女性：167人 / 0.76		女性：60人 / 0.61
	未知：19人		未知：9人
	合計：546人 / 1.22		合計：177人 / 0.90

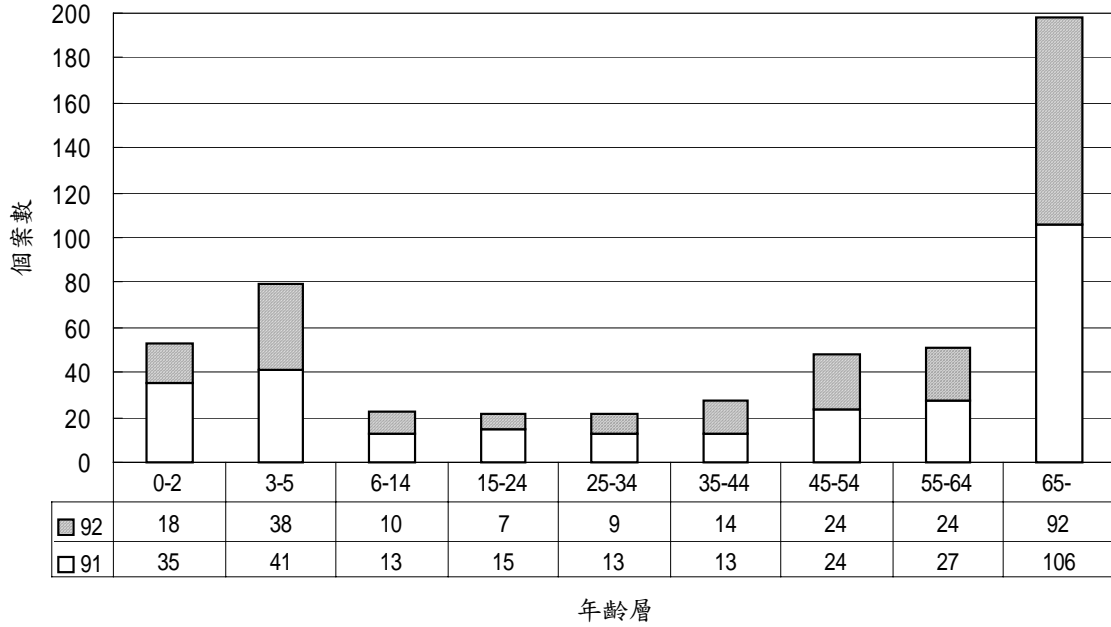
中區	男性：119人 / 1.78
	女性：54人 / 0.86
	未知：5人
	合計：178人 / 1.37

南區	男性：118人 / 2.10
	女性：47人 / 0.88
	未知：1人
	合計：166人 / 1.51

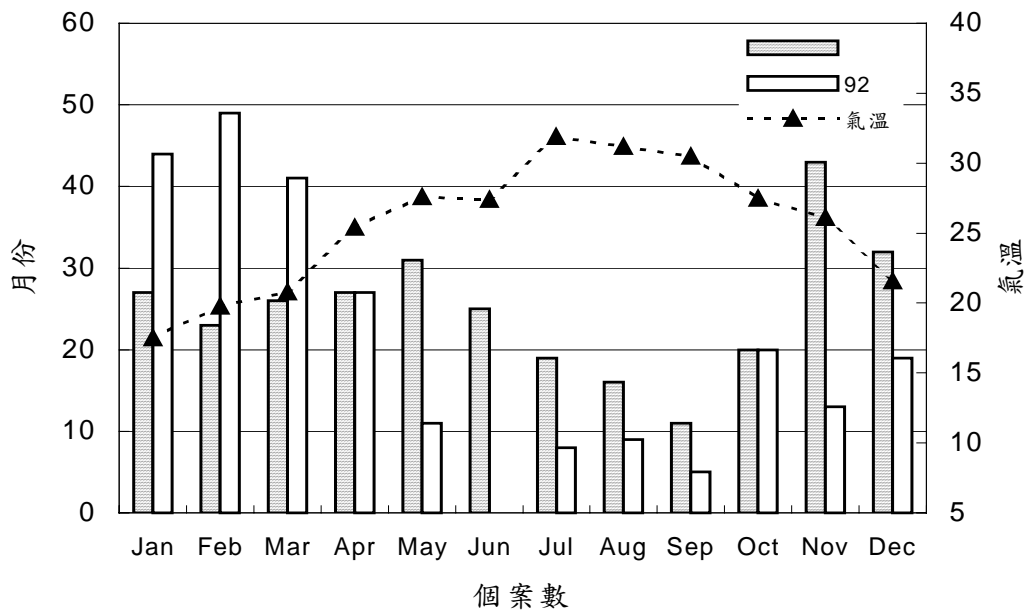
東區	男性：14人 / 2.21
	女性：6人 / 1.07
	未知：0人
	合計：20人 / 1.67



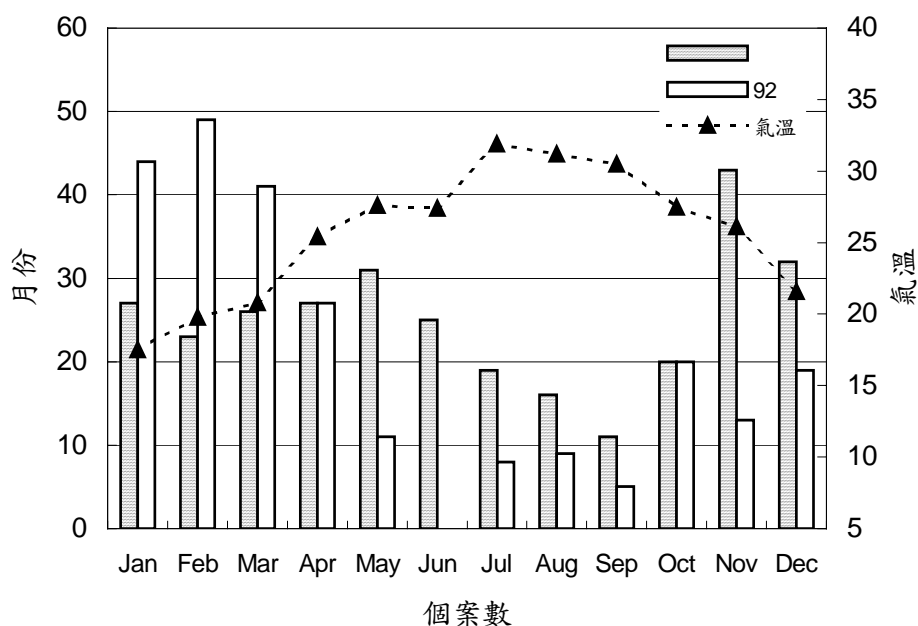
圖二：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症的年齡分佈
(民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月)



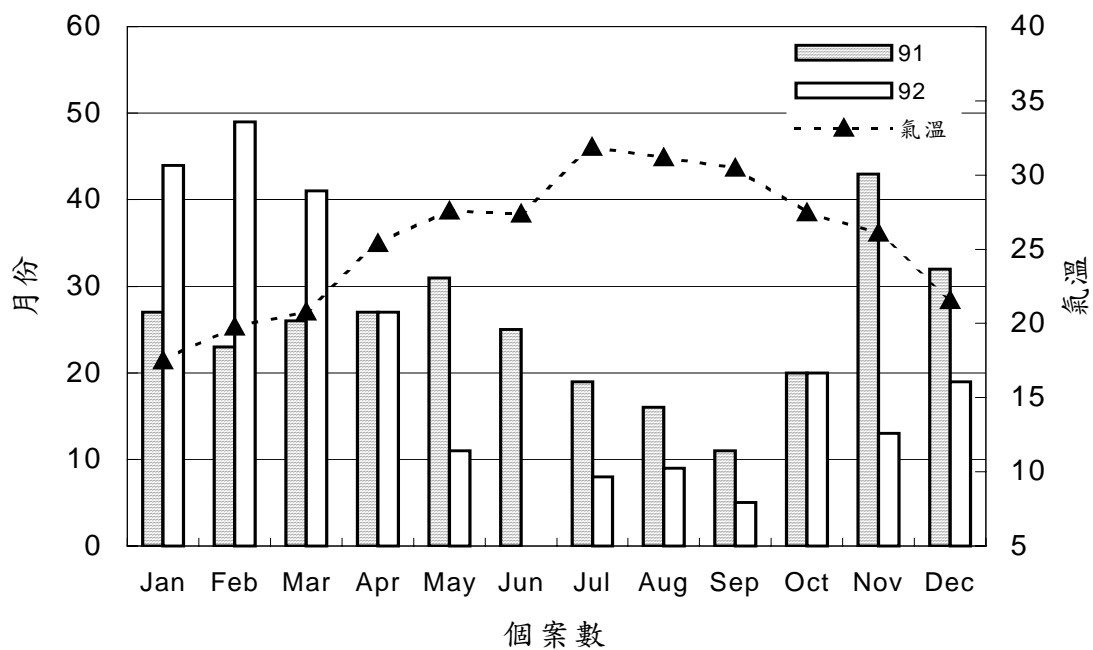
圖三：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染主要年齡層每十萬人發生率
(民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月)



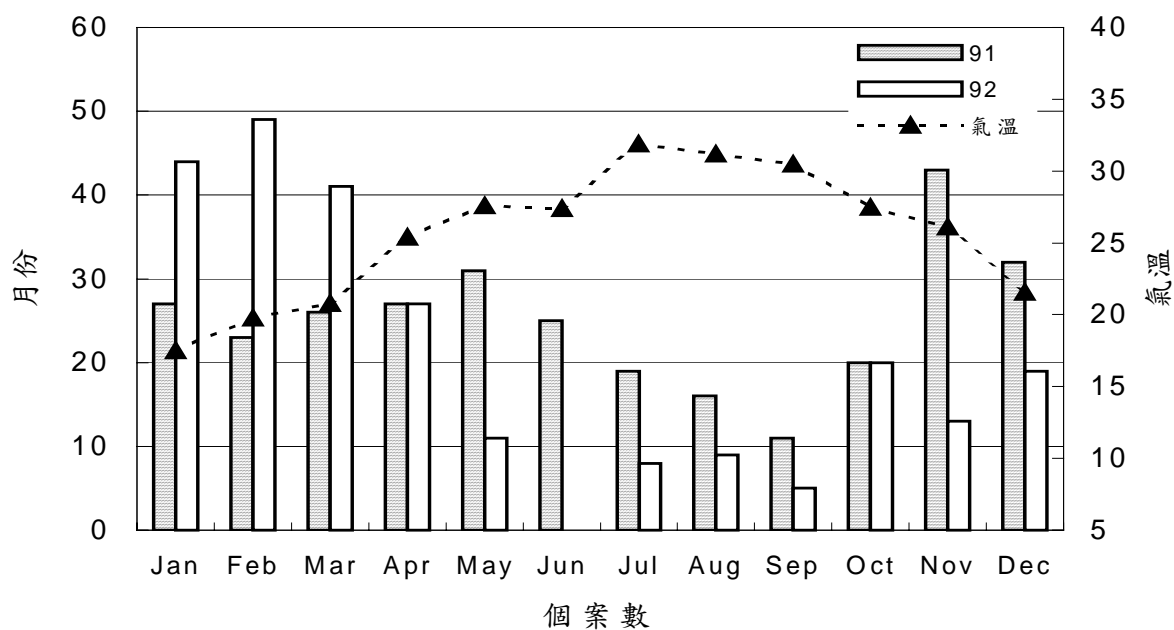
圖四：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症各月份發生與氣溫情形
(民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月)



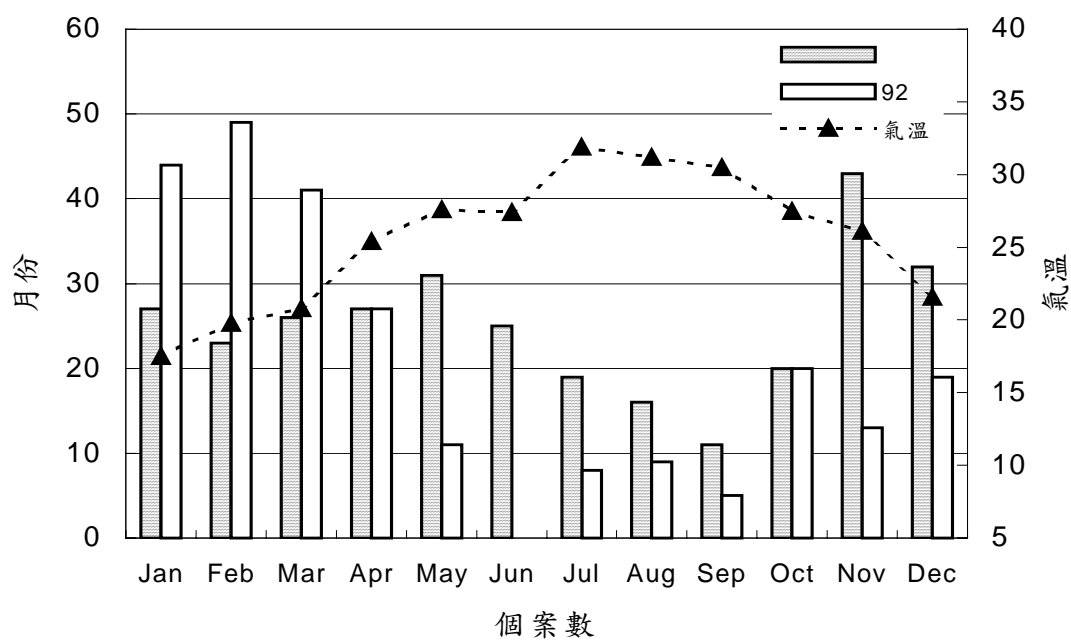
圖五：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染所引起病症之各年齡層分佈
(民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月)



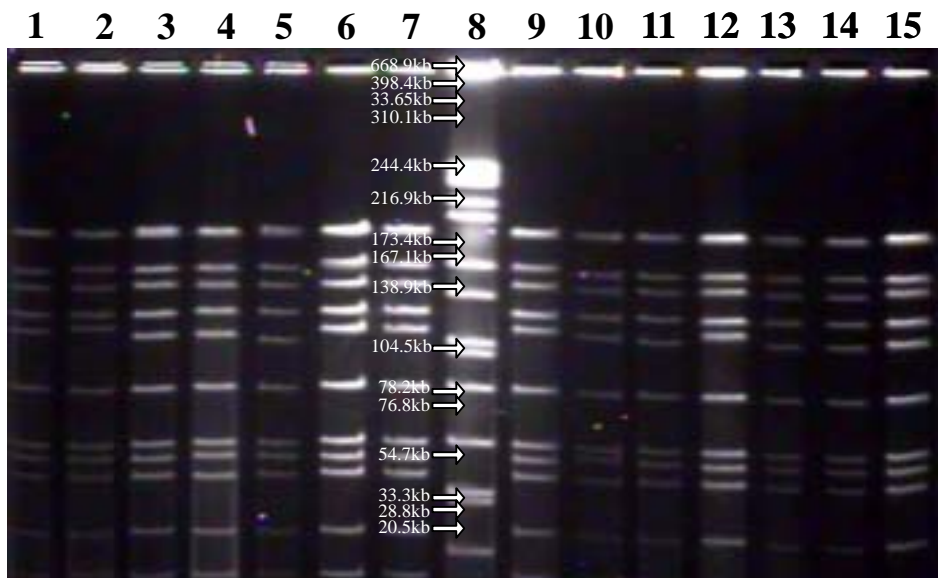
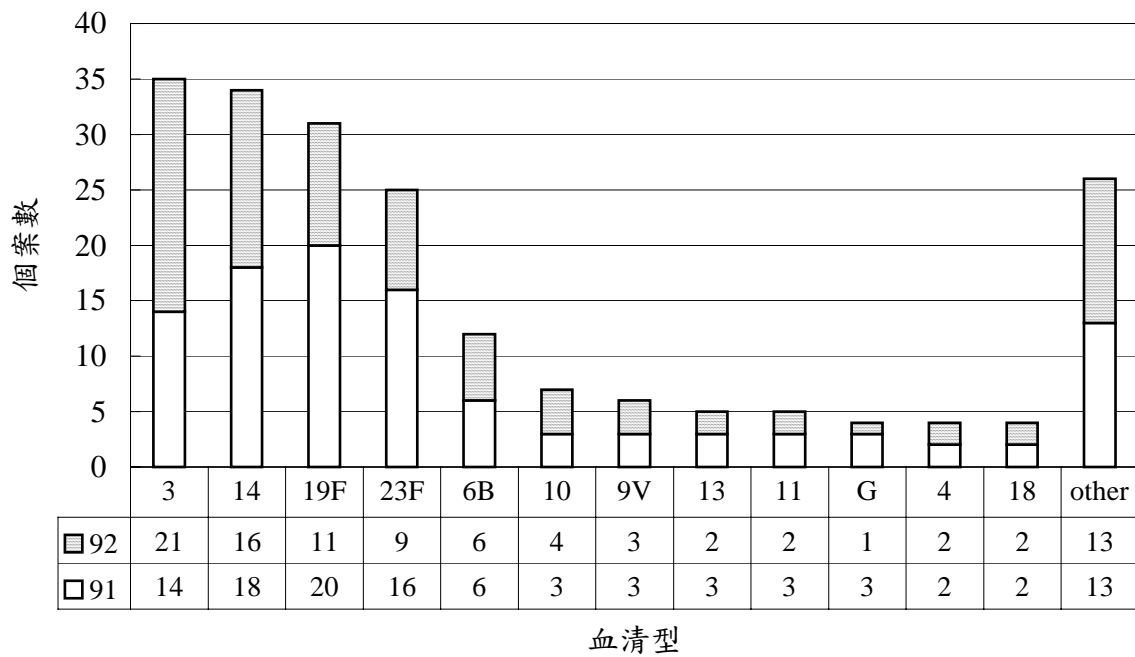
圖六：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症之各年齡層血清型分佈
(民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月)



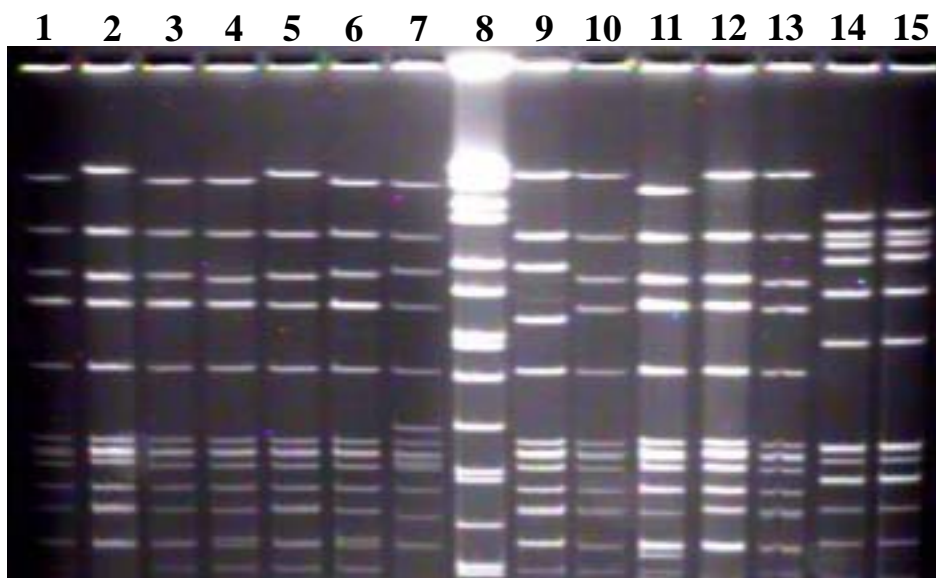
圖七：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症 2 歲以下幼童血清型分佈
(民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月)



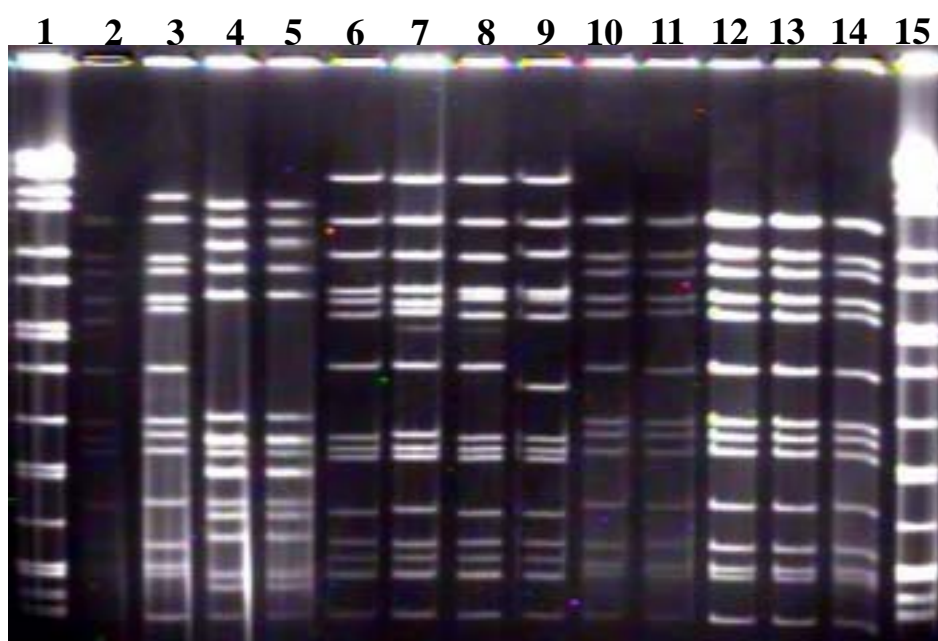
圖八：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症 65 歲以上老人血清型分佈
(民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月)



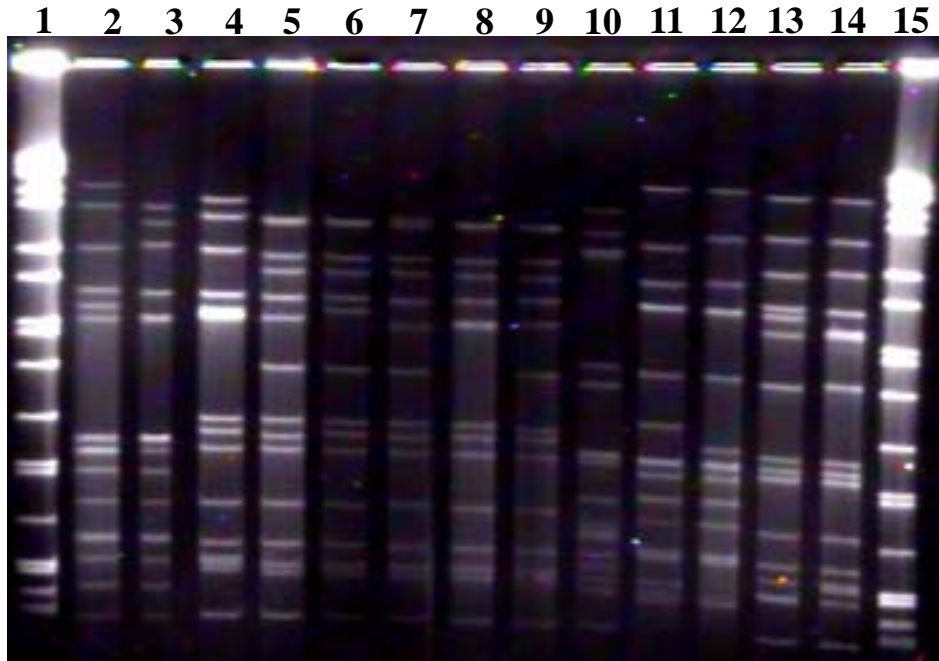
圖九、血清型 14 之 PFGE 分子生物型別：Lane 1、2、6、7、9、12 為 PFGE 型別之 SPH1401，Lane 3、4、5、10、11、13、14、15 為 PFGE 型別之 SPH1402，Lane 8 為 Salmonella ser. Braenderup H9812 使用 Xba I 限制酶切割之 DNA Marker。



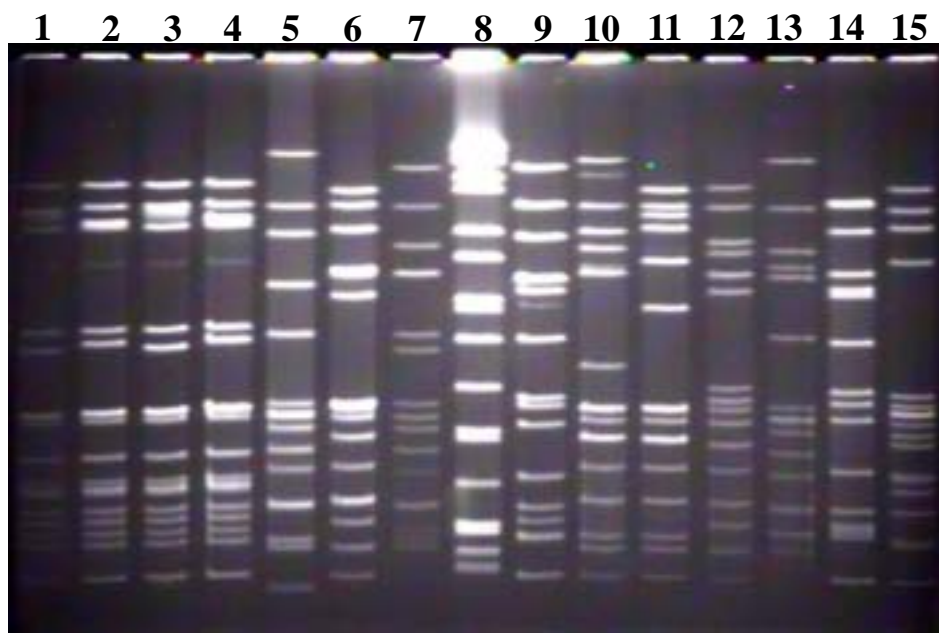
圖十、血清型 14 之 PFGE 分子生物型別：Lane 1、3、4、6、7、11 為 PFGE 型別之 SPH1411，Lane 2、5、9、10、12、13 為 PFGE 型別之 SPH1412，Lane 9 為 SPH1413，Lane 14、15 為 SPH1451，Lane 8 為 DNA Marker。



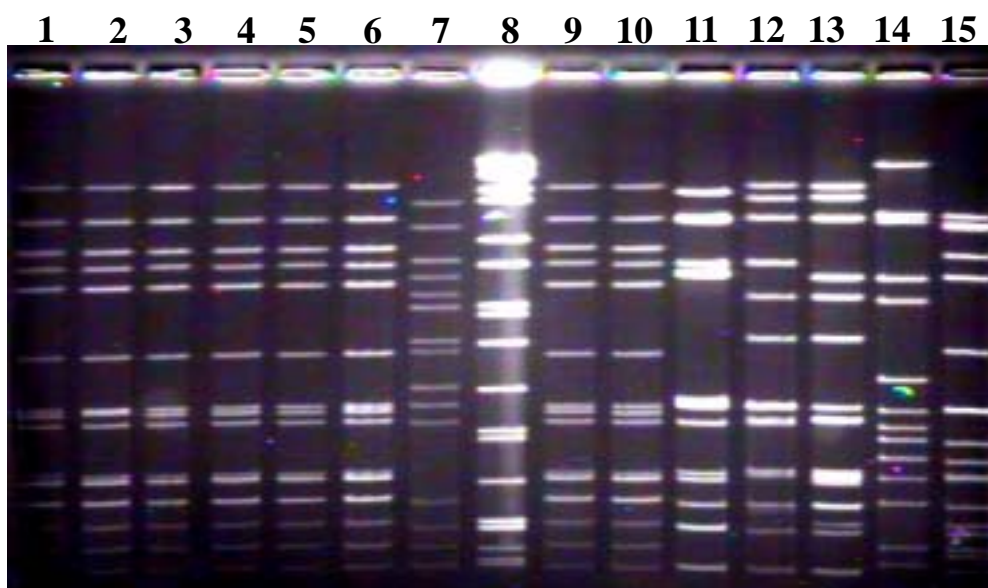
圖十一、血清型 14 之 PFGE 分子生物型別：Lane10、11、12、13、14、15 為 PFGE 型別之 SPH1401，Lane 2 為 PFGE 型別之 SPH1402，Lane 6、7、8、9 為 PFGE 型別之 SPH1441，Lane 4、5 為 SPH1421，Lane 3 為 PFGE 型別之 SPH1491，Lane 1、15 為 DNA Marker。



圖十二、血清型 14 之 PFGE 分子生物型別：Lane 5、7、8、9 為 PFGE 型別之 SPH1402，Lane 6 為 SPH1401，Lane 11、12 為 SPH1411，Lane 1、2、3、4、10、13、14 為單獨型別，Lane 1、15 為 DNA Marker。



圖十三、血清型 14 之 PFGE 分子生物型別：Lane 1、2、3、4 為 PFGE 型別之 SPH1431，Lane 5、6、7、9、10、11、12、13、14、15 為單獨之不同型別，Lane 8 為 DNA Marker。



圖十四、血清型 3、6B 及 23F 之 PFGE 分子生物型別：Lane 1、2、3、4、5、6、9、10 均為血清型 3 之 PFGE 圖譜，Lane 7、11 為血清型 23F 之 PFGE 圖譜，Lane 12、13、14、15 為血清型 6B 之 PFGE 圖譜，Lane 8 為 DNA Marker。

表一：23 價及 7 價疫苗含蓋臺灣地區分離侵襲性肺炎鏈球菌
在各年齡層血清型比例（民國 91 年 1 月至民國 92 年 12 月）

年齡	符合個案數	23 價疫苗含蓋個案數	含蓋率
0Y-14Y	155	136	87.74%
15Y-64Y	170	147	86.47%
>65Y	198	175	88.38%
Unknow	23	16	69.57%
Total	546	474	86.81%

年齡	符合個案數	7 價疫苗含蓋個案數	含蓋率
0Y-14Y	155	120	77.42%
15Y-64Y	170	93	54.71%
>65Y	198	116	58.59%
Unknow	23	13	56.52%
Total	546	342	62.64%

表二：臺灣地區侵襲性肺炎鏈球菌感染症之粗略致死率分析
 (民國 91 年 1 月 1 日至民國 92 年 12 月 31 日)

		死亡個案數	符合個案數	致死率
性別	男性	51	360	14.17%
	女性	24	167	14.37%
年齡層	0-2Y	4	53	7.55%
	3-5Y	3	79	3.80%
	6-14Y	0	23	0.00%
	15-64Y	24	170	14.12%
	>65Y	43	199	22.11%
	unknow	1	22	0.00%
Total		75	546	13.74%