計畫編號：DOH95-DC-2040

行政院衛生署疾管制局九十五年度研究計畫

計畫名稱：類鼻疽快速檢驗方法的建立

Establishment of Rapid Diagnostic test for Melioidosis

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

研究主持人：馮天霖

協同主持人：周振英

研究人員：林佳慧、曾士展、張瑞炘

執行期間：九十五年一月一日至九十五年十二月三十一日

＊本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見＊

目錄

頁數

摘要

中文摘要---------- 3

英文摘要---------- 4-5

前言---------- 6-7

材料與方法---------- 8-17

結果與討論---------- 18-22

結論與建議---------- 23-26

參考文獻---------- 27-29

圖表---------- 30-37

中文摘要：

類鼻疽桿菌(*Burkholderia pseudomallei*)是造成類鼻疽 Meliodosis 的致病菌，台灣類鼻疽是新浮現的疾病，臨床診斷依賴細菌培養和正確的鑑定，本研究範圍以蒐集近年來疾病管制局通報病例菌株，目的在研究台灣本土病原株型態特徵、生化反應、抗藥特性、基因圖譜、分子檢測、脂肪酸檢測、抗原檢測、抗體檢驗技術以建立參考實驗室資料及技術並回饋成果提供防疫單位、臨床實驗室快速正確診斷的依據。純化的抗原經動物免疫產生多價抗體，提供臨床快速檢測需要。API20NE 生化鑑定本土菌株 98.8% 正確鑑定。Vitek I 自動微生物生化鑑定儀只有 52% 正確。GC 細菌細胞脂肪酸系統對乾燥型菌株能正確判定，粘狀型菌株會有錯誤鑑定。抗生素敏感實驗，Trimethoprim-Sulfamothoxazole 有 25.3% 的抗藥性外，Amoxicillin-Clavulanic acid、Ceftazidine、Doxycycline、Imipenum 均有很好的感受性。血清抗體 ELISA 實驗感染期病患抗體 IgG 感染期的血清陽性佔 89.5% ，半年後陽性佔 95.5% ，但是高 titer 抗體仍維持半年以上，這對流行區當作診斷工具是不利的，對非流行區則是很好的檢測工具。進行的基因比對的結果確認 95 年七月間的暴發流行和環境的感染源有直接關連性。利用 MLST 資料比對可確認編號 0523 為境外移入病例。

英文摘要

Melioidosis, an infectious emerging disease in Taiwan, is caused by *Burkholderia pseudomallei*. Its clinical diagnosis has traditionally depended upon bacterial culture and identification. The purpose of this study is to establish a methodology of analysis of Taiwan's indigenous isolates, including: phenotypic characteristics, biochemical profiles, antibiotic susceptibility profiles; as well as, PFGE profiles, nucleic acid detection, fatty acid analysis, antigen detection, and serological detection methods. We hope that the established methodology could benefit clinical laboratories and local preventive authority. The polyclonal antibody produced by infected animals was used in rapid clinical diagnosis detection. Analysis of 83 isolates by API 20NE and Vitek I showed 98.8 % and 52% accuracy, respectively. However, Gas chromatograph fatty acid system could not detect any mucous-form isolates. In the respect of antibiotic susceptibility profiles: twenty (25.3%) isolates were resistant to trimethoprim-sulfamothoxazole; all isolates were sensitive to amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidne, doxycycline, and imipenum. In the serological aspect: 89.5% of confirmed cases showed IgG positive in the beginning of infection; the IgG positive rate increased to 95.5% in half year later. The results demonstrated that IgG was not a good candidate for detection of melioidosis in endemic areas. Using PFGE analysis, it was demonstrated that an outbreak occurred in July, 2006 was originated from the environmental isolates. Besides, one confirmed case (No. 0523) was classified as an imported one from comparison of MLST information.

關鍵字：類鼻疽、台灣、PFGE

Keywords: Melioidosis **,** *Burkholderia pseudomallei*, Taiwan, PFGE

前言：

類鼻疽桿菌(*Burkholderia pseudomallei*)是造成類鼻疽 Meliodosis 的致病菌，其分布在東南亞、澳洲北部及其他熱帶和亞熱帶地區。類鼻疽桿菌是土壤中的腐生菌，偶而會因皮膚傷口或吸入、食入受污染塵土而受感染。類鼻疽可以認為是新浮現的疾病，臨床診斷完全依賴細菌培養和正確的鑑定，許多臨床實驗室對類鼻疽檢驗没有經驗往往容易誤判（1,2,3,4）。

類鼻疽病例在台灣 1985 年李等（5）首次報導一起境外移入病例後，陸續在 1996、1998、19999、2001、2003 年有關的病例文獻報告（6,7,8），類鼻疽非屬法定傳染病，但疾病管制局 2000 年起列為通報病例，每年病例數平均在十例左右的散發本土個案。但是在 2005 年七月間台南市及其高雄縣交界地區發生爆發流行，此事件後提醒防疫單位以及臨床醫師的注意，由國外的經驗每到雨季過後的高温潮濕的氣候就有病例發生（9）。台灣在全球氣候的暖化現象下帶有致病菌的土壤易受風災水力的沖刷而顯露病源，加上診斷技術的提升，病例會有增加的趨勢發展。受類鼻疽感染的病患，在細菌培養鑑定結果前的治療幾乎都是症狀治療及投與經驗性的抗生素。由於這種感染症並不常見，臨床上極少會在第一時機使用管制性抗生素，但因類鼻疽症病情發展不能預期，如何快速鑑定，了解本土類鼻疽菌株的地域特性，

提供正確抗生素使用資料，為發展類鼻疽參考實驗室應具備要件，我們研究範圍以蒐集近年來疾病管制局通報病例菌株並培養於各種增菌培養基、選擇性培養基以觀察菌落個別差異、電子顯微鏡下差異間比較，基質利用之生化反應(API20NE)、自動細菌鑑定儀器(VITEK)，脂肪酸氣相分析(MIDI)、E-test 抗生素感受實驗，抗體凝集法檢測抗原試劑的開發、ELISA 抗體檢測、PCR 及 Real-time PCR 分子檢測、分離病原株與環境菌株 PFGE 圖譜探討病原株台灣分佈，本土菌株及境外移入區別，環境株和病原株的關連性，以 MSLT 選擇本土株和境外株做 MSLT 資料庫查核與其他國家的比較。本計劃的目的在建立台灣本土病原株型態特徵、生化反應、抗藥特性、基因圖譜、分子檢測、脂肪酸檢測、抗原檢測、抗體檢驗技術並回饋成果提供防疫單位、臨床實驗室快速正確診斷的依據。

材料與方法：

一、菌株

蒐集 2003-2005 年間菌株，2003-2004 年 9 株(0001-0009)，2005 年 83 株（0505-0579），環境菌株 33 株 (KN01-33)為二仁溪台南市和高雄縣沿岸地區分離之菌株(本局 95 年委外計畫，高雄師範大學，陳亞雷教授提供)。*B. mallei*、 *B. thailandensis* (日本岐阜大學提供) *B.cepacia*、*Pseudomonas aeruginosa ATCC27853*、 *E. coli ATCC25922* 、*Staphylococcus aureus ATCC29213*、 *Streptococcus group A*、 *B Leginella pneumophila*。

二、安全操作

所有會造成氣霧可能均在負壓實驗室生物安全等級 class II 安全操作箱操作。

三、菌株型態生化鑑定

觀察檢體、血液培養瓶、血液培養基培養菌落抹片 Gram's stain 染色情形。 Ashdown plate、MacConkey plate、Blood agar plate 菌落型態，TSI slant 反應，Oxidase 反應，基質利用實驗 API 20NE(biomerieux, France) 依據廠商操作說明 APILAB PLUS 軟體 3.3.3 版。Vitek 自動微生物鑑定依據廠商操作說明。

四、電子顯微鏡觀察

以磷鎢酸負染色法觀察類鼻疽菌的外觀及其鞭毛，利用菌體固定包埋切片染色觀察乾燥型菌落及粘液型菌落的菌體內構造區別，其方法簡要如下：血液培養基培養 24 小時菌落調成 1×10^7/ml，經離心去上清液以 2.5% Glutaraldehyde 固定 90 分鐘，0.1M Cacodylate/8% sucrose 洗三次，1% OsO_4/Potassium ferricynide 固定 1 小時，0.1M Cacodylate/8% sucrose 洗三次，0.2% uranyl acetate 染色 1 小時，水洗後梯度酒精脫水， 1% PTA in 100% 酒精染 30 分鐘，再經 P.O.、Eponate 置換包埋、固化、超薄切片，日立穿透型電子顯微鏡觀察。

五、細胞脂肪酸分析

自動微生物脂肪酸鑑定系統(MIDI Systems,Inc) 依據廠商操作說明 ，操作簡要如下：菌株以 5% 血液培養基培養 24 小時，再經收菌、皂化、甲基、萃取、洗滌以製備甲基脂肪酸，上自動氣相分析儀自動資料庫比對，相似值(Similarity Index; SI) SI 0.5 以上越準確，數值低於 0.5 將指示出最接近相關的菌種。另 *B. pseudomallei* 有一 2-hydroxymyristic acid (2HMA)脂肪酸為此菌特殊指標。

六、抗生素實驗

依據 CLSI/NCCLS 抗生素敏感實驗標準操作 Volume 25 Number 1 建議選擇 Amoxicillin-Clavulanic acid、Ceftazidine、Doxycycline、Imipenum、Trimethoprim-Sufamethoxazole 等五種抗生素，以 E-test (AB BIODISK) 紙條定量 MIC 抑菌濃度，依據廠商操作說明。另選擇 10 株類鼻疽環境株做為與病原株比對。以前述五種抗生素紙錠測量抑菌環大小以評估抑菌或有抗性。另以類鼻疽菌對 Getamicin、Colistin 的敏感性做為鑑定的參考。

七、基因圖譜

依 USA CDC PuleNet PFGE 快速脈衝式電泳標準操作程序作小部分修改。

（一）以 TSA 瓊脂培養基置於 37℃隔夜培養，首先開啟水浴槽，設定溫度在 56℃，並配製菌體包埋用瓊脂[1% SeaKem Gold (SKG) agarose in TE buffer] 置於 56℃水浴槽備用。

（二）體包埋及菌體溶解

1. 將每個純化培養好的菌株及 USA CDC PulseNet PFGE 分析用標準 marker 菌株 H9812 以無菌棉棒刮取菌落至裝有 2ml Cell Suspension Buffer (CSB)之 13×100mm KIMBLE® culture tube 中，混合均勻後以濁度計調整濁度值至 0.45-0.50。
2. 標示好 1.5ml 無菌微量離心管，先加入 20µl 之 20 mg/ml Proteinase K 溶液至每一微量離心管中，再取出測好濁度之菌液 400µl 放入微量離心管中緩慢混合均勻後準備包埋。
3. 將上述裝有 400µl 菌液之 1.5ml 微量離心管，再加入 400µl 包

埋用瓊脂(1% SKG Agarose)混合均勻後，快速注滿鑄膠模具(plug mold)，待其冷卻固化形成膠塊(Plug)。

4. 在等待膠塊形成的同時，於 50ml 離心試管中配製 **Proteinase K/Cell Lysis Buffer** (每支試管含 20mg/ml Proteinase K 25µl＋Cell Lysis Buffer 5ml)。

將固化之膠塊，推入分裝有 Cell Lysis Buffer 之 50ml 離心試管中，鎖緊管蓋後置於 56℃恆溫震盪水浴槽中 shaking wash 1.5 ~ 2 小時。

（三）膠塊清洗

在菌體溶解處理同時間內，先將清洗用之滅菌好的二次水(D.D.W.)及 TE buffer，預先放置在 56℃水浴槽加熱保溫。

1. 將離心試管蓋取下，換上有孔篩子(Screened Plug Caps)或是用扁平微量藥匙擋住膠塊，以方便倒掉 Cell Lysis Buffer，小心留下膠塊。
2. 加入 15 ml 預熱 56℃之滅菌二次水(D.D.W.)至離心試管中，將試管放回 56℃恆溫震盪水浴槽中 shaking10~15 分鐘之後倒掉，再加入新的二次水重覆清洗二次 。
3. 二次水(D.D.W.) 清洗結束倒乾後，加入 15ml TE Buffer， 56℃水浴槽中 shaking wash 15 分鐘之後倒掉，再加入新的 TE Buffer 重覆清洗四次以上。
4. TE Buffer 清洗結束倒乾後，取出膠塊放入裝有 3ml TE Buffer 之長型血清瓶中，置於 4℃冰箱保存直到使用為止。

（四）限制酵素消化切割(Restriction Digestion)

1. 以 70%酒精消毒單側刃之刀片及膠體切割台後，取出清洗好的膠塊(包括 PFGE 分析用標準 marker 菌株 H9812 的 Plug 在

內)切出一寬 2mm×長 10mm 之細長狀膠條(slices)，放入裝有 200µl 限制酵素專用緩衝溶液的 1.5ml 微量離心管中，置在室溫下 5~10 分鐘。

2. 移除上述緩衝溶液，再加入 200µl 已含有酵素 SpeI (10Units) 的限制酵素專用緩衝溶液，放置 37℃乾浴器或水浴槽 1.5 ~ 2 小時。
3. 作用時間結束後，取出酵素專用緩衝溶液，置換成 200µl 的 0.5 x TBE 緩衝液。

（五）電泳操作流程

1. 配製 2400ml 的 0.5X Tris-Borate EDTA(TBE) 緩衝液[10X TBE 溶液 120ml＋2280ml 二次水(D.D.W.)]；取其中 150ml 與 1.5g **SKG** agarose 加熱溶製成 1%電泳用膠，置於 56℃水浴槽備用。
2. 將剩餘 2250ml 的 0.5X TBE 緩衝液倒入電泳槽中，開啟脈衝式電泳裝置(Bio-Rad CHEF Mapper XA system)電源、幫浦(流速 70)及冷卻裝置，使緩衝液溫 度降至 14℃
3. 組裝好電泳膠鑄膠台(gel casting stand)並以水平桌調整水平；齒梳(Comb) 緊密接觸鑄膠台底部的撐膠板(gel platform)。
4. 將已被酵素消化之細長狀膠條(slices)取出，用吸水紙盡量吸乾附著於其上之緩衝液，再將細長狀膠條依序平貼於齒梳(Comb)：將 PFGE 分析用標準 marker 菌株放置在第 1、5、10、15 孔，其餘孔位放置樣品菌株。
5. 之後將齒梳直立放置在鑄膠台(gel casting stand)上，倒入融化回溫至 56℃的 1% SeaKem Gold agarose 電泳用膠，放置室溫 20~30 分鐘或 4℃ 15 分鐘待冷卻凝固後即可進行電泳。

6. 電泳條件設定如下：

   Initial switch time 2seconds，Final switch time 40 seconds，Run time 20 hours，Angle 120 degrees，voltage Gradient 6.0 volts/cm。

（六）染色與照相

1. 電泳結束，關閉電泳裝置取出膠片，置於 1μg/ml 溴化乙苯非啶溶液(ethidium bromide)染色 10~20 分鐘，並以二次水(D.D.W.)褪染 20~30 分鐘。
2. 膠片最後放置在 UV 平台上觀察，並以數位影像處理系統擷取 DNA 圖譜影像儲存成數位檔案(*.tif 檔)，以供後續 Bionumerics 電腦軟體進行圖譜分析比對。

八、Real-time PCR

參考 Thibault FM 等(21) 文獻以 Type III Secretion System genes 重新設計 Primer 與 Probe 製作快速診斷工具。細菌液調成 McFarland 1 ，100℃水浴滅菌以此當模板。以細菌 type III 分泌系統利用 BIO-RAD 廠牌之軟體設計三組 Primer 及 Probe:

SCU2F：TTCATCAGCACCGTCCACAG，SCU2R：GCGTGGCATGGAAGATGATG，

SCU2pro：FAM-CTCGCTGTTTCCGCTCGTCGTCGC-TAMRA

Orf11F：GTTACCCCGAACATCACGATGG，

Orf11R：GCCGGATGACAACGCATTTATG，

Orf11pro：FAM-TGCCTTGCCTTATCCGCACGGCTC-TAMRA

Orf13F：GAAGCCCGAATCGCCCAAAC，Orf13R:

GGAAGCTGACGGCAAAGGAG，

Orf13pro：FAM-TCAGGCCGGAGCATCTTCGCGC-TAMRA

Supermix (2X) 25ul，primer (10um) F 2ul，R 2ul, probe (2um) 5ul， H_2O 10ul，template 5ul。

Protocol:

Cycle 1: (1X)		
Step 1:	95.0 °C	for 03:00.
Cycle 2: (40X)		
Step 1:	95.0 °C	for 00:15.
Step 2:	60.0 °C	for 00:45.

九、CCF 抗原的製作

選用 BPS0302 本土病原菌株(本菌株可有乾燥型及粘狀，以乾燥型為種源菌)。菌株培養在無蛋白質培養基（PESB；1% glycine, 0.25% disodium phosphate, 0.5% Sodium chloride, 0.2% dextrose），3ml PFSB 加一菌落 37℃隔夜培養，倒入 500ml PFSB 37℃ 靜置培養一週，每天輕搖一下，7000rpm 一小時離心，上清液以 0.22 過濾，過濾後的

上清液經 ultrafiltration (PM10 Diaflow)膜加壓過濾，收集分子量在 10ka 以上菌液，再以 PBS 透析三次。蛋白質以 nano drop (ND-10000 spectrophotometer 定量，跑 Polyacryamide gel 以標準分子量測該蛋白質分子量。

十、製備檢測抗體用 indirect ELISA

以棋盤法 10、1、0.1ug CCF 抗原/100ul coating 在 96 孔 ELISA 盤，檢測最適抗原、抗體反應濃度。抽樣正常人血清 60 支，以平均值加 3 個 SD 定為 cut point 值，此二次抗體使用 goat anti-Human IgG、IgM，病人血清為 94 年 7 月間台南暴發類鼻疱病患血清 19 例，六個月後再次採集到 22 例當時患者血清。製備方法：0.1 μCCF Ag/ 100 μl coating 在 96 孔 ELISA plate，4℃ overnight(但不超過 16h)。200 μl/ well Blocking Buffer, 4℃ overnight。倒掉 blocking buffer, 加 100 μl/ well 待測檢體，放 37℃，30mins。PBS-T wash 5 次。用 HRP Stabilizer 稀釋 HRP conjugate 成 1：5000，加 100 μl/ well，放 37℃，30mins。PBS-T wash 5 次。加 100 μl/ well TMB substrate，放室溫 15mins，避光。加 100 μl/ well TMB stop solution，混和均勻並小心去除氣泡。放 ELISA reader（MRC TC II, DYNEX），用 450nm 讀取 OD 值。

十一、多價抗體的製備

CCF 抗原經透析除去 Sodium azide 定蛋白量，準備 12 支 BALB/c 6 週齡老鼠，抗原 3ml(1mg/5ml)調以等體積 Freund Adjuvant 3ml，以三歧接頭二支 5ml 針筒完全混合成稠狀（滴在水面上不散開），每隻接種 0.2ml，另二隻為陰性對照，每週接種一次共四次(除第一次須與 Complete Freund Adjuvant 混合，其後接種抗原與等體積之 Incomplete Freund Adjuvant 混合即可)，最後一次接種之 10-14 天抽取血清-20℃備用（12）。所得之抗體以 ELISA 檢測抗體 OD 值並以菌株 *B. pseudomallei*、*Legionella pneumophila*、*Streptococcus group A*、*B*、*Satphylococcus aureus*、*Burkholeria mallei*、*B. thailendensis* 、*B. cepacia*、 *E. coli* 等菌做抗原抗體的凝集實驗。續以紐西蘭白兔放大此抗體的製備做為快速診斷工具。

十二、Multilocus sequence typing(MLST) 分型及其資料庫比對

方法參照 Daniel Godoy 等 2003 文獻（20）。利用 *B. pseudomallei* 七個不同的 Housekeeping genes 各設計一對引子: ace、gmh、lepA、lipA、narK、ndh，經 PCR 夾出基因片段，用 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 及 ABI 3700 DNA sequencer 定序，應用 Macintosh program Sequence Output (可利用網站 www.mlst.net) 此七個對偶基因進行 sequence types (ST)，和類鼻疽資料庫中比對。(本實

驗由美國 CDC Dr. Gee 協助）

結果與討論：

一、分離

B. pseudomallei 為 G(－)、Oxidase(＋)，經血液培養瓶、痰液、濃液檢體直接抹片 Gram’s stain 為桿狀細長二端有時可見較濃染色。血液培養基典型菌落 Gram’s stain 均是 Bipolar stain 二端濃染中間淡染（安全針型）的短胖桿狀菌。從檢體塗在血液培養基 37℃的分離菌株 24 至 48 小時為平滑或菌落中間有如肚臍眼的凸出，48 小時後逐漸形成乳白色乾燥皺縮菌落，時間放置越久菌落有些會轉變成灰白、灰、暗灰，部分菌株會在乾燥皺縮菌落間長出淡色粘狀菌落，Ashdown plate 分離菌株成深紫色皺縮菌落，有時也可見紫色、淡紫、紫紅等顏色菌落。TSI (Triple Sugar Iron) slant 乾燥菌落 37℃48 小時成 A/K 乳白色斜面菌落，粘狀菌落成 K/K 反應，乾燥菌落之 TSI slant 可放室溫一年以上不死，粘狀菌落易死亡，粘狀菌落的命運有二：一轉變回乾燥型菌落，二維持粘狀。粘狀菌落種在 Ashdown plate 可延長存活時間。乾燥型菌落 MacConkey agar plate 菌落成淡粉色菌株，培養 48 小時以上漸成乾燥皺縮平坦菌落。電子顯微鏡負染菌體可見一至四條的鞭毛，菌體切片電顯下乾燥型菌落可見許多空泡狀而粘狀型少有空泡狀（圖一）。

二、API 20NE

83 株病原株 82 株(98.8%)可正確鑑定，一株鑑定為 *P. aeuruginosa*（電腦編號 1154554）。經 30℃24 小時判讀 ADH 往往是弱反應，同化作用在 48 小時判讀 ADI、MLT、CIT 會是弱反應或是可能陰性反應，其電腦編碼為 1156556（16 株）、1156557（3 株）、1156576（51 株）、1156577（12 株）。參考細菌株 *B.thailandensis*（1157577）、*B. mallei*(1140524)，*B. cepacia*(0077573) *可以和 B. pseudomallei* 區別。

三、Vitek I 自動微生物生化鑑定儀

可正確鑑定 *B. pseudomallei* 43 株（52% ），unidentified 30 株（36% ）鑑定力 *B. pseudomallei* 在 94%以下 7 株（8% ），鑑定為 *B. mallei1* 株（1.2% ），Pasteurella haemol 2 株（2.4% ）。

四、自動微生物脂肪酸鑑定系統

在 MIDI 系統資料庫乾燥型菌株均能正確判定為 *B. pseudomallei*，有 11 株續分離培養時型態上變成粘狀型菌株，鑑定有一株仍判定為 *B. pseudomallei*，7 株為 *B. cenocepacia*，3 株為 *B. mallei*。83 株中有 82 株（98.8% ）有 2-hydroymyristic acid （14：0　2OH）特有標記，有一株缺乏，此缺乏 2-hydroymyristic acid 為菌株編號 0523 是境外移入菌。參考菌株 *B. mallei*，*B. cepacia* 可正確鑑定，*B. thailandensis* 菌落

會誤判為 *B. pseudomallei*，但是其缺乏 2-hydroymyristic acid （14：0 2OH）。

五、抗生素敏感實驗

病原株經選用五種抗生素敏感實驗，Trimethoprim-Sulfamothoxazole 有 25.3% 的抗藥性外，其餘四種抗生素均有很好的感受性（見表一）。10 株環境株（NS-1 至 NS-10）的抗藥性圖譜和病原株類似並無特殊(資料未呈現)。

抗生素紙錠實驗，Amoxicillin-Clavulanic acid（AMC-30）抑制環直徑 30-32mm，Ceftazidime（CAZ-30）抑制環直徑 27-32mm，Doxycycline（DO-30）抑制環直徑 27-32mm，Imipenum（IPM）抑制環直徑 34-38mm，Trimethoprim-Sulfamothoxazole（SXT-25）抑制環直徑 0-30mm，Gentamycin（GM-10）抑制環直徑 0mm，Colistin（CL-10）抑制環直徑 0mm。Trimethoprim-Sulfamothoxazole 抗生素紙錠實驗抑制環直徑為 0mm 有 38 株占 45% ，對照於 MIC 在 0.75(ug/ml)以上(資料未呈現)。

六、菌株基因圖譜分析

以 Spe1 限制酶酵素切，約可區分成 5 個 Cluster(S1-S5)（見圖二）。 區

分依據，95% 相似性為一個 Cluster，圖譜完全相同為一 clone。 圖譜顯示此 Cluster 和地源分佈有關。南台灣的流行以二個 Cluster 為主要，台南市、高雄茄萣為一 Cluster 或 clone 屬 S1，高雄除茄萣外、屏東、台南縣境為另一 Cluster 屬 S3。其他 Cluster 佔少數，編號 0523 台北新莊株，歸入在 S2 是境外株。S4 編號 0568、0571 台中致病株，此菌是否為境外株或本土株仍須要蒐集更多菌株比對。S5 編號 0009 高雄鳳山致病株，是獨立區域的感染源需要進一步探討。編號 0505、0524 分別是高雄燕巢、高雄梓官病例株，分類在 S1 Cluster。編號 0004、0559、0572 分別是台南南區、台南中區、高雄茄萣病例株分類在 S3 Cluster。以上 5 個病例株在分類上和實際居住地緣的關連性有待釐清。環境株也區分成五個 Cluster，其二大 cluster 分屬於 S1 及 S3 ，其餘為獨立出來的 Cluster。編號 1、2 為編號 0003 乾燥型、粘狀型株，本實驗顯示菌落型態改變並沒有改變基因變動。

七、Multi-locus Sequence Typing (MLST)

ST 58 佔多數(n＝7)，有二株為 ST 99 及 ST 50、ST67、ST451 各一株。ST451 為新的序列型，其與 ST 58 僅在 LepA 一個 allele 不同（見表二）。其他序列 MLST 資料庫中在亞洲可見，Dr. Gee 表示美國菌株為境外移入（見表三）。

八、抗原純化

CCF 蛋白經電泳分析主要蛋白分子量在約在 60Ka。(見圖三)

九、多價抗體的製備

經免疫老鼠所得之抗體以 ELISA 檢測抗體均在 OD 值 1.5 以上，以菌株 *B. pseudomallei*、*Legionella pneumophila*、*Streptococcus group A*、*B*、*Satphylococcus aureus*、*Burkholeria mallei*、*B. thailendensis* 、*B. cepacia*、 *E. coli* 等菌做抗原抗體的凝集實驗，除 *Burkholeria mallei* 有交叉凝集外，其他均無凝集反應。

十、血清學實驗

經標準化正常血清 60 隻定臨界值(Mean＋3SD)，吸光值為 0.68。感染期的血清陽性佔 89.5% ，半年後陽性佔 95.5% （表四)。IgM 抗體感染期的血清陽性佔 89.5% （17/19)，半年後陽性佔 81.8% （18/22）（資料未顯示)。

十一、Real time PCR 方法檢測

B.pseudomallei 對 Orf11、Orf13、Scu2 均可抓到，*B. mallei* 對 Orf13、Scu2 可抓到，而 *B. thailandensis* 只抓到 Scu2，其他菌株無反應（見表五)(圖四)。

結論與建議

從血液培養瓶長出類鼻疽菌液直接摸片 Gram's 染色不易見到安全針型短胖菌體。痰液或咽喉拭子檢體培養以 blood plate（BP）、ashdowm plate 加 ashdowm broth 對菌量少的檢體可增加檢出率。類鼻疽菌落變異從典型粗糙皺摺到平滑粘狀和兩極性短胖菌體染色有關。粘狀型落菌落存活期短，這在電子顯微鏡菌體切片可得到證明，乾燥型菌體含有大量的β-hydroxy butyric acid （9）而粘狀型缺乏，據其他文獻研究顯示菌體含β-hydroxy butyric acid 是環境細菌抵抗外在狀況得以長期存活的原因。Ashdown 培養基培養的粘狀型較能長期存活的原因應該和其培養基內的成份 Crystal violet 壓迫性篩選有關，我們把粘狀型接種 Ashdown broth 再次增菌可得到乾燥型。至於乾燥型與粘狀型的轉變是受什麼調控機置仍待研究。

API 20NE 鑑定 *B. pseudomallei* 有 20% 到 40% 的錯誤（10,11,12），而 Lowe 等 2002 年（13）文獻則有 99% 的鑑定能力，本實驗則有 98.5% 準確度，相信是因地域菌株的特性有關。此生化鑑定判定需要有經驗能力，對於醫療院所實驗室或經驗不足的檢驗人員，因未從型態染色等做初步判別就直接以 API 20NE 檢驗結果為判定標準，會因

Arginine dehydrolase 慢反應以及同化實驗 assimilation 肉眼判讀的誤差而得到錯誤的答案。

Lowe 等 2002 年（13）發表 Vitek 自動微生物鑑定系統 99% 的鑑定能力，但和我們實驗結果有很大的差距，只有 52% 正確及 36% 無法判讀，這可能是其資料庫內容未包含本土菌株特性，故 Vitek l 在我國不是好的 *B. pseudomallei* 快速鑑定系統。而 Phoenix 自動微生物儀 (Becton Dickinson, Heidberg, Germany)缺乏類鼻疽資料庫無法評估。

GC 細菌細胞脂肪酸系統對葡萄糖非發酵菌的鑑定很準確，但對腸內葡萄糖發酵菌鑑別力差。據 Inglis 文獻（14）GC 細菌細胞脂肪酸有 98% 敏感性。MIDI 系統從菌落脂肪酸抽提到結果報告約只需 1.5 小時，本儀器較昂貴外試劑耗材便宜是一個良好的輔助鑑定系統。

Thibault F.M.等 2004 年（15）文獻顯示在蒐集 50 株世界各地之類鼻疽菌抗生素感受實驗 Amoxicillin-Clavulanic acid、Ceftazidine、Doxycycline 各有 2% 抗藥性、Imipenum 沒有抗藥性、Trimethoprim-Sufamethoxazole 有 68% 抗藥性。本研究顯示台灣本土菌株對前三種抗生素均有感受性，目前沒有發現例外，對 Trimethoprim-Sufamethoxazole 則有 1/4 有抗藥性，建議在 94 年八月五日研商「類鼻疽人體及環境調查相關事宜」專家會議台南市立醫院

對類鼻疽流行區未住院觀察個案處理原則建議使用 Trimethoprim-Sufamethoxazole 應以予以更正。類鼻疽菌抗生素紙錠實驗 CLSI/NCLS 並未有標準操作程序，對小型臨床檢驗室或經費缺乏的是可做為敏感實驗代替品。

Stitaya Sirisinha（16）等文獻在無蛋白質培養液抗原純化上得到 30Kda 蛋白，而我們實驗得到 60Kda 蛋白，或許是選用編號 0003 菌株有關。血清抗體檢測存在著對抗原交叉反應問題，我們以純化的抗原經動物免疫產生多價抗體，對文獻已知會造成凝集反應的菌株做檢測（22），檢測結果只有對 *B. mallei* 會有交叉反應，未來將進行放大抗體量產提供臨床快速檢測需要。血清抗體 ELISA 實驗感染期抗體 IgG 有很高的正確性，但是高 titer 抗體仍維持半年以上，這對流行區當作診斷工具是不利的，對非流行區則是很好的檢測工具，利用 IgM 當作急性期診斷工具或是二次採檢作為四倍上升判定陽性的依據均非是可靠方法。

類鼻疽菌是容易培養的細菌，但是鑑定時間太長因此許多實驗室發展分子檢測方法，但根據 Kunakorn 等 2000 年（17）文獻從血液檢體直接以 PCR primer16S、 Spacer、LPS 分子鑑定得到很差的敏感性，目前我們分子檢測使用時機是在血液培養瓶長出菌時及分離菌株的鑑

定上，下個研究工作是如果增加病原體 DNA/RNA 抽出，設計實用敏感專一性 Primer。

PFGE 基因圖譜分析，參考 Trakulsomboon 等 1994 年(18)及 Koonpaew 等（19）文獻使用 *Spe*I 限制酶酵素切，我們進行的基因比對的結果確認 95 年七月間的暴發流行和環境的感染源有直接關連性（見圖二）。編號 0001、0002、0003 為 93 年間保存的台南市病原株證明在暴發流行前台南市已有同一 clone 的病原株存在。

為可和世界其他實驗室比較及探討境外移入病例證明，我們利用 MLST 資料比對可確認編號 0523 為境外移入病例，編號 0569 是否為境外移入有待考證。佔多數的 ST 58 菌株來源橫跨 93 年台南市、94 年台南市、高雄茄萣暴發流行株以及散發流行的高雄橋頭株，此無法和 PFGE 方法區分成 S1、S3 及 S5 三個 Cluster。編號 0001 在 PFGE 是歸在 S1 Cluster 內，但在 MSLT 則是新的 ST 451。MSLT 資料庫 ST58、ST99 為泰國菌株，和此次實驗分析本土菌株無法區分，因此在追查類鼻疽病原時我們結論以為 PFGE 可得較細的分析能力，但是圖檔的國際比較對 PFGE 是不利的，因此需要發展另一套辨識鑑定方法。

參考文獻

1. Cheng AC., and BJ. Currie, Melioidosis：epidemiology, pathophysiology, and management. Journal of clinical microbiology. 2005, P.383-416.
2. White Nj, Melioidosis. Lancet 2003; 361:1715-22.
3. David AB Dance, Melioidosis as an emerging global problem. Acta Tropica 2000; 74:115-119.
4. Timothy J., J. Inglis, et al., Comparison of diagnostic laboratory method for identification of *Burkholderia pseudomallei*. Journal of clinical microbiology. 2005,p. 2201-2206.
5. Lee SS., et al. Melioidosis: two ingenous cases in Taiwan. J Formos Med Assoc. 1996; 95:562-6.
6. Hsueeh PR., Teng LJ., Lee LN., Yu CR., Yang PC., Ho SW., Luh KT. Melioidosis: An Emerging Infection in Taiwan? Emerging infectious disease 2001; 7:
7. Tsai WC., et al. Septicemic melioidosis in Southern Taiwan: a case report. J Microbiol Immunol Infect. 1998; 31:137-40.
8. Luo CY., et al. Relapsing melioidosis as cause of iliac mycotic aneurysm: an indigenous case in Taiwan. J Vasc Surg. 2003; 37:882-5.
9. Sprague L.D. and H. Neubauer, Melioidosis in animals: A Review on Epizootiology, Diagnosis and Clinical Presentation, J. Vet. Med. 2004, p.305-320.

10. Inglis T.J.J. et al. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE. Pathology. 1998, p62-64
11. Dance D.A. et al., Identification of Pseudomonas pseudomallei in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE. J. Clin. Pathol. 1989, p 645-648.
12. Mindy B.Glass and Tanja Popovic. Preliminary Evaluation of the API 20NE and RapID NF Plus Systems for Rapid Identification of *Burkholderia Pseudomallei and Burkholderia Mallei*. Journal of clinical microbiology. 2005, p. 479-483
13. Lowe et al. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia Pseudomallei* . Journal of clinical microbiology. 2002, p. 4625-4627
14. Inglis T.J.J. et al. Comparison of Diagnostic Laboratory Methods for Identification of *Burkholderia Pseudomallei*. Journal of clinical microbiology. 2005, p. 2201-2206
15. Thibault F.M. et al. Antbiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia Pseudomallei and Burkholderia Mallei* to 35 antimicrobial agents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004, p1134-1138
16. Stitaya S.,Narisara A., Tararaj D., Pattama E., Surasakdi W., Pimjai N., Benja P., Visanu T., Yupin S. Recent development in laboratory dignosis of melioidosis. Acta Tropica 2000, p235-245.
17. Kunakorn M. et al. Comparison of three PCR Primer sets for diagnosis of septicemic melioidosis. Acta Tropica 2000, p237-251.
18. Trakulsomboon S. et al., Molecular typing of *Pseudomas Pseudomallei* from imported primate in Britain. Vet. Rev. 1994,

p65-66.

19. Koonpaew S., Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Burkholderia pseudomallei*from patients with melioidosis in Thailand. Acta Tropica 2000, p187-191.

20. Daniel Godoy et al., Multilocus Sequence Typing and Evolutionary Relationships among the Causative Agent of Melioidosis and Glanders, *Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei*. Journal of clinical microbiology. 2003, p. 2068-2079.

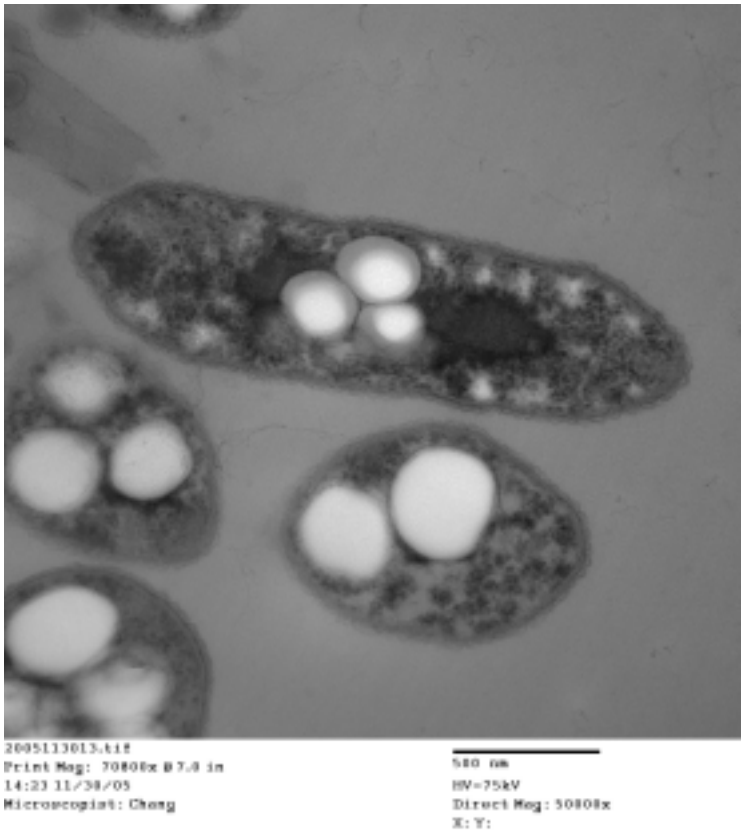
21. Thibault F.M., E. Valade, and D. R. Vidal, Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei, B. mallei,* and thailandensis by real-time PCR targeting type lll secretion system genes. Journal of clinical microbiology. 2004, p5871-5874.

22. George C.K. et al., Cross-Reaction to *Legionella Pneumophila* Antigen in Sera with Elevated Titers to Pseudomanas pseudomalei. Journal of clinical microbiology. 1980; 11:27-29.

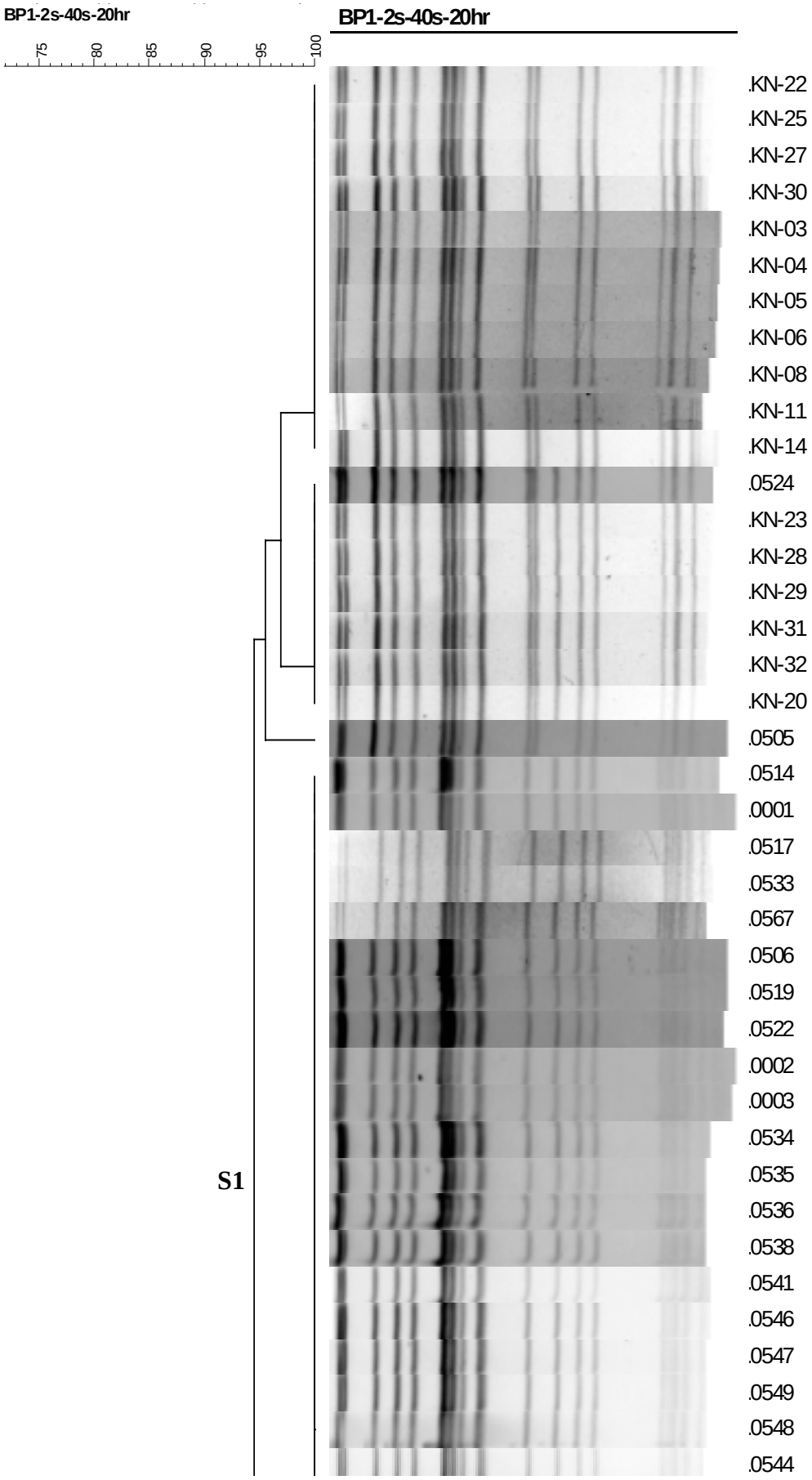
圖

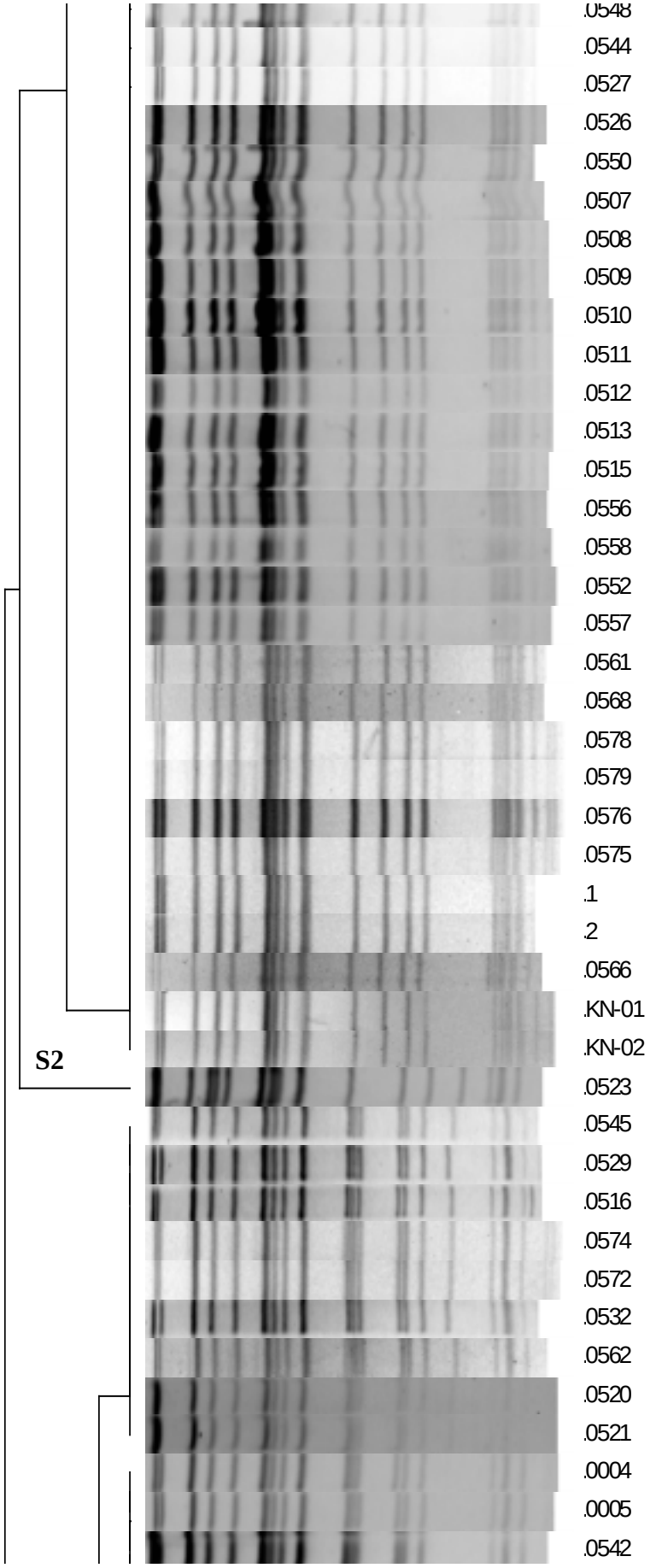
A

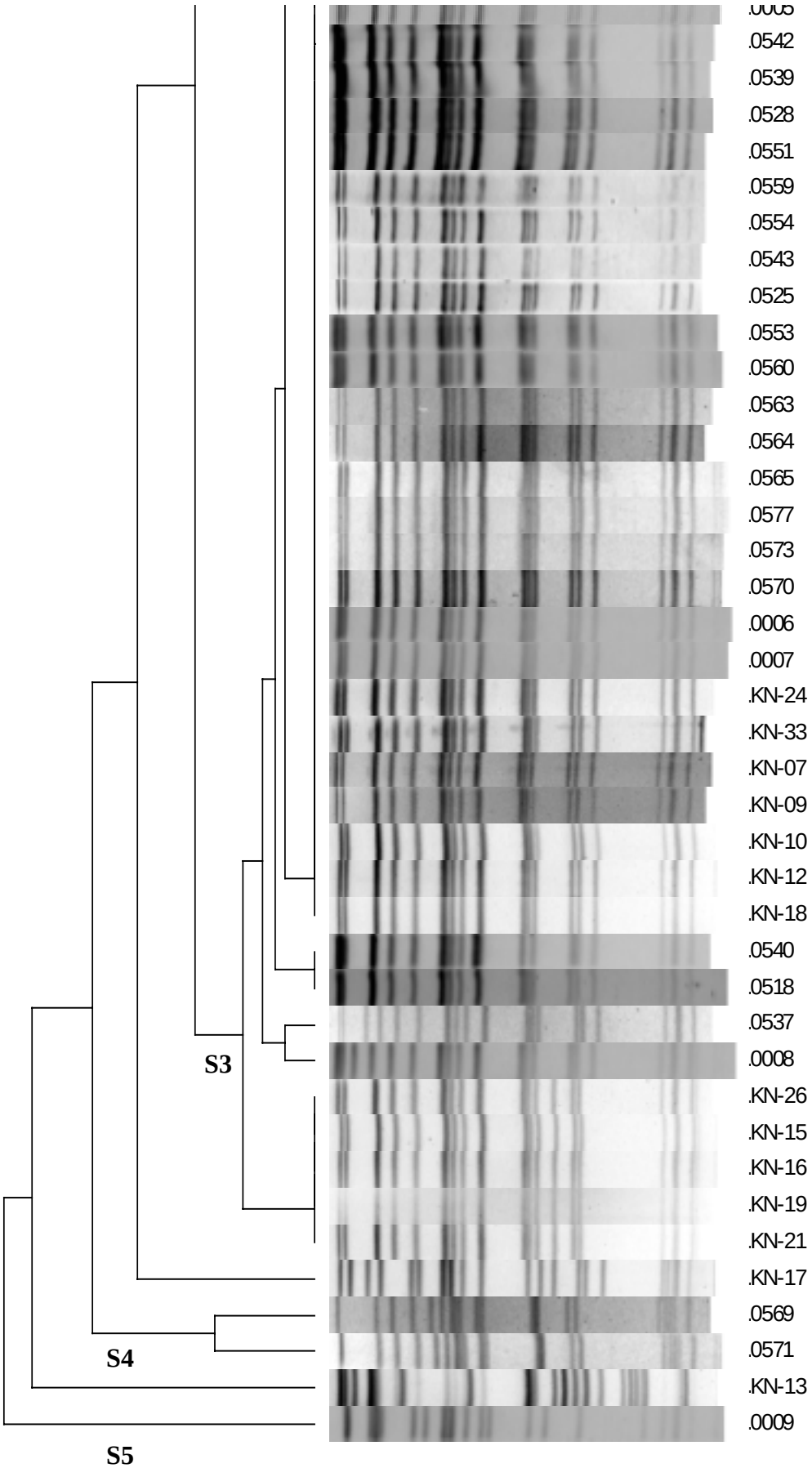
B



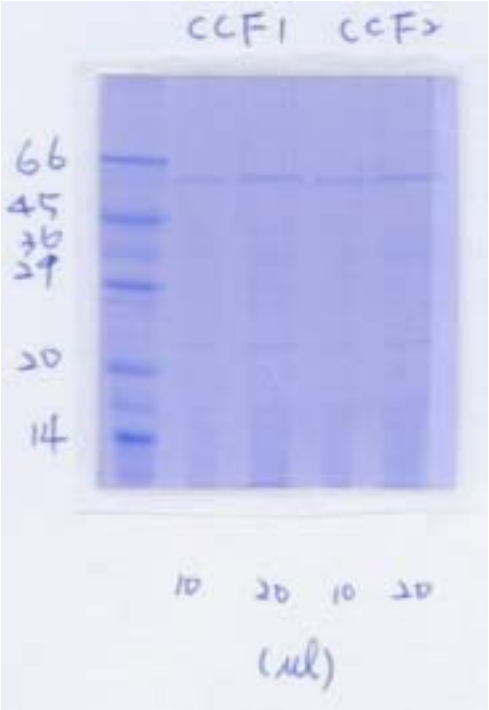
圖一、電子顯微鏡下菌體切片:A 粘狀型，B 乾燥型菌體


BP1-2s-40s-20hr
75
80
85
90
95
100
BP1-2s-40s-20hr
.KN-22
.KN-25
.KN-27
.KN-30
.KN-03
.KN-04
.KN-05
.KN-06
.KN-08
.KN-11
.KN-14
.0524
.KN-23
.KN-28
.KN-29
.KN-31
.KN-32
.KN-20
.0505
.0514
.0001
.0517
.0533
.0567
.0506
.0519
.0522
.0002
.0003
.0534
.0535
.0536
.0538
.0541
.0546
.0547
.0549
.0548
.0544
S1


.0548
.0544
.0527
.0526
.0550
.0507
.0508
.0509
.0510
.0511
.0512
.0513
.0515
.0556
.0558
.0552
.0557
.0561
.0568
.0578
.0579
.0576
.0575
.1
.2
.0566
.KN-01
.KN-02
S2
.0523
.0545
.0529
.0516
.0574
.0572
.0532
.0562
.0520
.0521
.0004
.0005
.0542

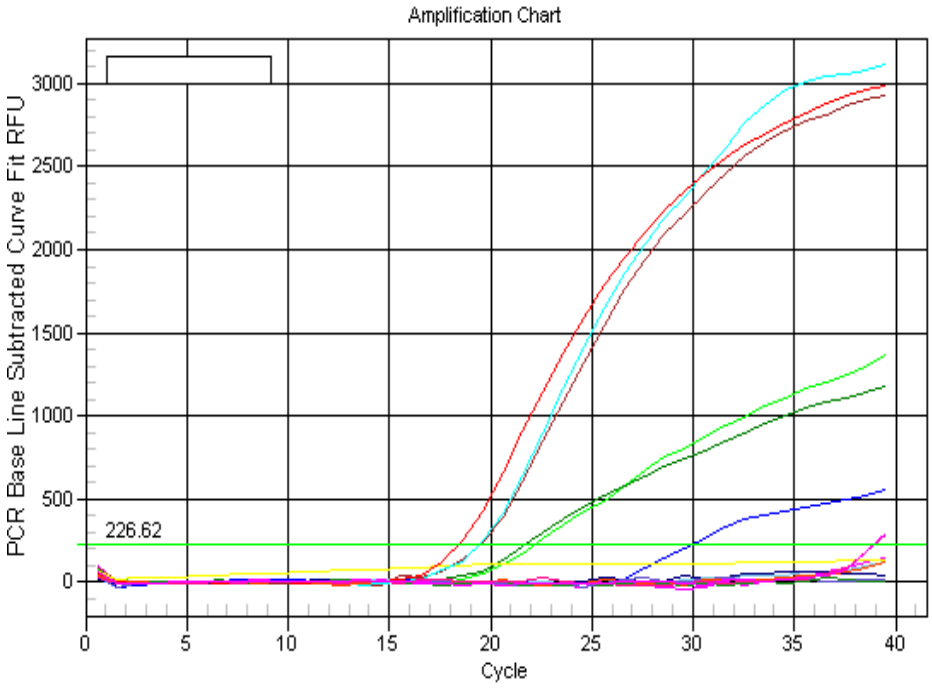


圖二、病原株環境株基因圖譜



60KDa

圖三、CCF 蛋白電泳分析圖



圖四、Real-time PCR 反應

表

表一、Susceptibility of B. pseudomallei (n=83)

Antibiotic	MIC (ug/ml) Sensitivity	Range	Percentage resistant
Amoxicillin-Clavulanic acid	≦8/4	1.5-2	0
Ceftazidime	≦8	1.5-2	0
Doxycycline	≦4	0.75-1.5	0
Imipenum	≦4	0.125-0.38	0
Trimethoprim-Sulfamothoxazole	≦2/38	0.125-12	25.3

表二、 List of strains with ST designations and allele assignments

Strain	**ST**	ace	gltB	gmhD	lepA	lipA	narK	ndh
0523	**50**	3	1	2	1	1	4	3
0008	**58**	3	1	5	1	1	4	1
0009	**58**	3	1	5	1	1	4	1
0020	**58**	3	1	5	1	1	4	1
0525	**58**	3	1	5	1	1	4	1
0537	**58**	3	1	5	1	1	4	1
0539	**58**	3	1	5	1	1	4	1
0572	**58**	3	1	5	1	1	4	1
0569	**67**	3	4	3	4	1	4	6
0004	**99**	1	1	4	1	1	4	1
0026	**99**	1	1	4	1	1	4	1
0001	**451**	3	1	5	33	1	4	1

表三、 Origin of strains with the same STs as strains recovered from Taiwan. Source of data is the mlst.net database for *B. pseudomallei*.

Sequence type	Origin of previously characterized strains (number of strains)
50	China (1), Malaysia (4), Thailand (5)
58	Thailand (13)
67	Singapore (1)
99	Philippines (1), USA (1), Thailand (1), Malaysia (1), Unknown (1)

表四、暴發流行病患血清學值

	Collection of serum samples	
	At onset	After 6 month
Number	19	22
Positive rate	94.75 % (18/19)	95.5% (21/22)

表五、PCR amplification

	B.pseudomallei	*B. mallei*	*B. thailandensis*	Others species
Orf11	＋	－	－	－
Orf13	＋	＋	－	－
Scu2	＋	＋	＋	－