

計畫編號：DOH102-DC-2502

衛生福利部疾病管制署 102 年委託科技研究計畫

計畫名稱：侵襲性 A 群鏈球菌之抗藥性及分子流行病學研究

年度/全程研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署

計畫主持人：江春雪

研究人員：陳英彥、鄭麗容、王昱嵐、姚淑滿、高培修

執行期間：102 年 01 月 01 日至 102 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

	頁次
目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	5
前言	7
材料與方法	11
結果	17
討論	21
結論與建議	24
參考文獻	25
表一、各地區不同醫院評鑑層級通報個案分析	27
表二、各地區感染個案年發生率分析/十萬人口	27
表三、感染個案主要發病症狀及臨床疾病分析	27
圖一：各月分通報 A 群鏈球菌侵襲性感染個案分布	28
圖二：各年齡層 A 群鏈球菌侵襲性感染個案性別分布	28
圖三：各年齡層 101 年 A 群鏈球菌侵襲性感染個案性別發生率分布	29
圖四：各年齡層 102 年 A 群鏈球菌侵襲性感染個案性別發生率分	29
圖五：各年感染侵襲性 A 群鏈球菌菌株 emm 基因型別分布	30
圖六：各年齡層感染侵襲性 A 群鏈球菌菌株 emm 基因型別分布	30
表四、101 年分離 A 群鏈球菌抗生素感受性分析	31
表五、102 年分離 A 群鏈球菌抗生素感受性分析	31
表六、A 群鏈球菌菌株 Erythromycin 抗藥基因及外毒素基因分析	32
表七、A 群鏈球菌菌株分子型別比較分析	32

中文摘要

自 101 到 102 年，全國 54 家醫療院所通報 354 例 A 群鏈球菌侵襲性感染或毒性休克症候群個案，分離出 324 株菌株。35 歲以上為主要感染族群，佔全部個案 87.6% (310/354)；男性為女性的 1.85 倍；以 7 到 10 月較多個案發生。個案數以台北區 32.2% 最高，高屏區、南區及東區分別占 19.2%、18.9% 及 18.6%。各年發生率以東區最高，101 及 102 年每十萬人口分別為 7.9 人及 4.5 人，南區分別為 1.1 人及 1.0 人，台北區分別為 0.94 及 0.66 人。除 6 月份外，102 年每個月的個案數都較 101 年為低，102 年 1 到 10 月個案數為 101 年的 73.6%，以東區下降最大(55.3%)，其次為台北區(67.7%)。

兩年間 A 群鏈球菌的抗生素感受性變化不大，依感受性將抗生素分為三類，第一類含 amoxicillin、cefepime、cefotaxime、linezolid、meropenem、menicillin G 及 vancomycin，所有菌株均具有感受性 (susceptible)；第二類含 chloramphenicol、clindamycin、erythromycin 及 levofloxacin，約有 86.9% ~ 97.6% 菌株具有感受性，其中對 erythromycin 占有較高抗藥性(resistant) (12.5%)；最後為 tetracycline，只有 30.2% 菌株具有感受性，且高抗藥性菌株占 68.0%；治療 A 群鏈球菌侵襲性感染症，仍以抗生素為優先考量，因此這些抗生素感受性資料將有助於臨床醫師用藥的參考。針對 A 群鏈球菌對紅黴素抗藥機制的 *ermB*、*ermTR* 及 *mefA* 基因偵測，19 株菌有 *ermB* 基因 (10.2%)、2 株有 *mefA* 基因 (1.1%)，未偵測到 *ermTR* 基因。在 A 群鏈球菌的化膿性外毒素 (streptococcal pyrogenic exotoxins) 基因偵測上，*speA* 佔 6.2% (20/324)，*speB* 佔 94.8% (307/324)，*speC* 佔 42.3% (137/324)。

在菌株分子型特性分析上，除了抗藥基因及毒素基因，M 蛋白質型別

也是與國際接軌比對的資料之一，也是疫苗發展的標的之一，利用美國疾病管制局資料庫比對 emm 序列來分型，共區分 43 種不同型別，emm12 佔 17.3% 最多、其次為 emm113 佔 26.4%、emm22 佔 10.8%、emm11 佔 6.5%、emm102 佔 4.6% 及 emm1 佔 4.3%；我們將這些基因型別交叉比對，發現 emm12 中的 55 株 (55/56) 帶有 *speC* 基因，emm1 有 12 株 (12/14) 具有 *speA* 基因。

本研究針對 A 群鏈球菌造成侵襲性感染或毒性休克症候群之菌株為對象，所蒐集來自全國各地的菌株，與過去法定傳染病猩紅熱所蒐集到的菌株有所不同，希望藉此來了解國內 A 群鏈球菌侵襲性感染的流行概況，為未來防治 A 群鏈球菌感染之重要參考依據。

關鍵字：A 群鏈球菌侵襲性感染、毒性休克症候群、化膿性鏈球菌、抗生素感受性、紅黴素抗藥性基因、化膿性外毒素、emm 分型

英文摘要

A total of 354 cases of invasive group A *Streptococcus* infection or Streptococcal toxic shock syndrome, providing 324 *Streptococcus pyogenes* isolates, were reported in 2012-2013. Cases occurred in every single month, with July to October more prevalent. Three hundred and ten cases (87.6%) were adults age ≥ 35 years. The male to female ratio was 1.85. By geographic areas, 32.2% cases were in Taipei area, followed by 19.2%, 18.9% and 18.6% in Kaoping, South and East areas, respectively. The highest incidence was 7.9 and 4.5 cases per 100,000 population in the East area in 2012 and 2013, respectively. It was 1.1 and 1.0 in the South area and 0.94 and 0.66 in the Taipei area, respectively. Comparing to 2012, case number declined in every month in 2013, except June. From January to October, case number in 2013 was 73.6% of that in 2012, especially obvious in the East area (55.3%) and in Taipei area (67.7%).

There was no difference in antimicrobial susceptibility in 2012-2013. All isolates were susceptible to amoxicillin, cefepime, cefotaxime, linezolid, meropenem, penicillin G and vancomycin. The susceptibility rate ranged between 86.9%-97.6% to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin and levofloxacin. The resistant rate was higher (12.5%) to erythromycin. The susceptibility rate was only 30.2% to tetracycline and the resistant rate was 68.0%. Antibiotics are still the major treatment choice for invasive group A *Streptococcus* infections, our data will assist in therapeutic decision for clinicians. In analysis of the genes related to erythromycin resistance, the

prevalence of *ermB*, *mefA*, and *ermTR* gene was 10.2%, 1.1% and 0%, respectively. In analysis of genes encoding streptococcal pyrogenic exotoxins, the prevalence of *speA*, *speB* and *speC* genes was 6.2%, 94.8% and 42.3%, respectively.

Using the emm sequence database of US CDC, 43 emm types were detected in our collection, including emm12 (17.3%), emm113 (26.4%), emm22 (10.8%), emm11 (6.5%), emm102 (4.6%) and emm1 (4.3%). Further analysis revealed that 55 of 56 emm12 isolates carried *speC* gene, and 12 of 14 emm1 isolate carried *speA* gene.

Different from our previous collection of group A *Streptococcus* isolates that caused Scarlet fever, this study analyzed group A *Streptococcus* isolates that caused invasive infection or toxic shock syndrome from all over Taiwan. The aim was to reveal the epidemiology of this type of infections and the characteristics of these isolates, and to provide information for future prevention of group A *Streptococcus* infections.

Key words: invasive group A *Streptococcus* infection, Streptococcal toxic shock syndrome, *Streptococcus pyogenes*, antimicrobial susceptibility, erythromycin resistance genes, streptococcal pyrogenic exotoxins, emm types

前言

A 群鏈球是許多人類傳染病中常見的致病菌，雖然目前能有效的使用抗生素加以治療，但是其快速的藉由呼吸道傳播速率，以及一些較嚴重的侵襲性感染，甚至在感染後造成的嚴重後遺症等，都顯示出 A 群鏈球仍是造成人類健康的威脅及醫療資源損耗的重要病原菌之一。

A 群鏈球菌為一 β 溶血性革蘭氏陽性球菌，目前僅發現是以人類為主要宿主，人類受其感染的部位以及引發的臨床症狀很廣，傳播方式多為藉由呼吸道經空氣傳染或是由親密接觸性傳染；常發現存在正常人與外界接觸的部位，如：喉頭及鼻咽部，屬於人體呼吸道之正常菌叢（normal flora），正常人的帶菌率約為 5%~15%，這會依年齡層不同而異；各個年齡層都會受到 A 群鏈球菌感染，但一般常見於 5-15 歲學齡兒童咽喉部感染造成猩紅熱（Scarlet fever）、鼻咽喉炎（Nasopharyngitis）、中耳炎（Otitis media）等臨床症狀，這可能與此階段年齡層之幼童本身的抵抗力、多聚集於一活動區域（幼稚園、托兒所及小學一二年級教室）、生活的衛生習慣較差、以及更重要的病原菌本身的特性有關^{1,2}。

在 1987 年，Cone 等人發現到 A 群鏈球也會引起毒性休克症候群（Streptococcal toxic shock syndrome, STSS）的侵襲性臨床症狀，之後於 1989 年，由 Steven 等人提出這症狀類似金黃色葡萄球菌引起之毒性休克症候群（Staphylococcal toxic shock syndrome），並會造成人體內許多器官的衰竭，造成很高的致死率。另外在許多國家也都發現到 A 群鏈球感染造成其他如壞死性肌膜炎（Necrotizing fasciitis）、腦膜炎及菌血症等侵襲性感染的臨床症狀^{1,3-5}。

人類除了受到 A 群鏈球菌侵襲性及非侵襲性感染造成的各種不同的病症外，特別的是有些患者於感染的 2-3 週，還會有較嚴重之後遺症（post-streptococcal infection sequelae）如風濕熱（acute rheumatic fever）、急性腎絲球腎炎（acute glomerulonephritis）以及有心臟病史的病患容易感染造成急性風濕性心臟病（acute rheumatic heart disease）等，這些後遺症都是與 A 群鏈球菌致病因子及患者本身的自體免疫有關^{1,2,6}。

由於 A 群鏈球菌會造成人類許多的疾病，以及許多嚴重的後遺症，人類也針對其特性做了許多的研究，包含了確知該菌的構造、抗藥性機制、遺傳物質及許多的致病因子等，但仍有許多相關致病機制未能得到很明確的答案，這都有待科學家們急欲努力解決的問題；A 群鏈球菌致病的原因關係到寄主與病原菌的交互作用，目前由研究結果可以推論的幾個主要可能有：1、病原菌的附著以及聚集在患者咽喉或皮膚上皮細胞（pharyngeal or dermal epithelial cells）的能力，甚至能夠侵入上皮細胞進入到病患血液中；2、A 群鏈球菌菌株外層細胞壁及莢膜（capsule）包覆，另外還有鑲嵌在其間的許多不同膜蛋白（membrane protein），這些物質的存在，使得病原菌能夠躲避白血球的吞噬作用而造成死亡；3、A 群鏈球菌會釋放出許多致病毒性因子（virulence Factors），這也是猩紅熱症狀中造成草莓舌及皮疹的主要原因；這些毒素種類很多且不斷有新的毒素被發現：如 streptolysin O、Streptococcal pyogenic exotoxins、Streptokinases 等⁷⁻⁹，除此仍有可能存在許多尚未被發現的致病機制^{1,2,10}。在這些可能的致病機制中，許多研究學者發現到，能幫助 A 群鏈球菌吸附到人體上皮細胞的膜蛋白 M protein，還參予抵抗白血球吞噬作用的進行，以及人體產

生免疫反應的重要 epitope；另外有許多發表的論文發現到，A 群鏈球菌造成的不同臨床病症與 M protein 型別有關；因此膜蛋白 M protein 不僅在致病或是造成人體免疫反應的機制上，均扮演了極重要的角色¹。

M protein 是鑲嵌在細胞膜上，向細胞外延伸的一條 α -helical coiled-coil 纖維蛋白質構成，由於其在外側的 N 端具有變異區（Variable region）及高度變異區（Hypervariable region），因此便具有許多不同型別的 M protein Type，已確定的 M protein 就有將近 100 多種型別以上；更由於人體針對感染的 A 群鏈球菌產生免疫反應時，不同 M protein 型別會產生不同的免疫抗體，這在開發疫苗上面臨到極大的困擾，也因此許多研究者便以此來區分 A 群鏈球菌的型別，然而要取得辨識其型別的抗血清並不容易，再加上它的變異大仍有無法判斷血清型別的可能，因此有許多研究便趨向於利用該蛋白質的調控基因來加以判斷分型；雖然 M protein 的表現受到很多因子調控，例如受到多個調控因子通稱為 Mga（multigene regulator）binding protein 調控¹；但是他們也發現到表現 M protein 位在 vir regulon 內的一段 emm gene，能夠利用其序列的比對來顯示其不同的型別（emm typing），並且許多研究也顯示其 emm type 能夠與 M protein type 相對應，在美國 CDC 便建立一個 Streptococcus pyogenes emm sequence database，由 emm sequence 可與資料庫比對出型別¹¹⁻¹³。這些不同的分子分型方法將可利用來取代 M protein serotyping¹²。

本研究計劃是將這兩年，自全台收集 A 群鏈球菌侵襲性感染或毒性休克症候群個案之感染菌株，選用能代表其菌株特性的方法，建立菌株特性資料庫：1、細菌對各種抗生素的感受性；2、使用可替代 M-protein 分

型的 emm-typing 方式，與美國疾病管制局的 emm 基因資料庫做一比對，來找出其 emm-type¹²；並建立我們自己的序列資料庫；3、除此對於其他毒性因子（virulence factors），如釋放到外界的外毒素：streptolysin O、Streptococcal pyogenic exotoxins，利用聚合酶鏈鎖反應方法去探討具有這些毒素基因的資料庫⁷⁻⁹等；4、Erythromycin 抗藥性基因資料建立，有兩種主要機制，其中 *ermB*、*ermTR* 為產生甲基化酶造成細菌對 macrolides、lincosamind 和 streptogramin 產生抗藥性，另外一種是 *mefA* 基因會造成細菌將抗生素排出的機制。¹⁴⁻¹⁶

要建立這一龐大的資料庫，首要在於菌種及流行病學資料的蒐集與保存，以及接著建立能完整代表菌株各種特性的資料庫，這代表了建立一套微生物與人類交互關係的歷史背景資料，實為一項迫切且極其重要之工作，然而這些工作卻必須要持續的耗費時間及人力來進行，才能顯現其執行後的成果。

材料及方法

壹、菌種鑑定、分型及保存：

- 一、菌株來源：自民國 101 年至 102 年，由全國各醫療院所通報之 A 群鏈球菌侵襲性感染或毒性休克症候群個案，凡符合通報定義，依傳染病通報模式送至疾病管制局呼吸道細菌實驗室，進行菌株之分離鑑定及分型。期間共計收到 354 例符合通報定義個案，經實驗室鑑定分離之菌株共計 324 株，作為本計劃研究之材料。

二、使用培養基：

使用含 3%-5% 綿羊血的血液培養基 (BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA)，來進行菌株之分離、鑑定及增菌培養。

三、菌株鑑定：

1. 菌株分離：

- (1) 將檢體接種於含 5% 脫纖維綿羊血的血液平板 (BAP) 上，依四區劃線法將檢體劃開，並於接種處穿刺平板數次，令 β -溶血現象更為明顯，再將培養皿置於 35~37°C 中，於含有 5% 二氧化碳的空氣狀況下培養 18~24 小時。
- (2) 若發現有直徑約在 0.5~1.5mm、呈黏液狀 (mucoid)、光滑 (glossy)、灰白色、周圍有明顯溶血環 (clear hemolytic zone) 之菌落，即環內之紅血球完全被破壞，呈現 β -溶血現象，經革蘭氏染色為革蘭氏陽性球菌者 (液態培養者呈鏈球菌)，為可疑

菌落。

(3) 挑取 2~5 個可疑菌落次接種至血液平板 (BAP)，次培養於 35~37°C、5~10%CO₂、18~24 小時，以供進行鑑定。

2. 菌株鑑定：

(1) Bacitracin 感受性鑑定試驗：將血液培養基上可疑之單一菌落進行次培養，並於第一劃線區貼上含 0.04 單位枯草桿菌素 (Bacitracin) 的紙錠，於 35~37°C 中，於含有 5~10% 二氧化碳的空氣狀況下培養 18~24 小時。若發現抑制環存在即疑似為 A 群鏈球菌。

(2) PYR (pyrrolidonylaminopeptidase) 試驗

(a) 製備混濁度大於 McFarland No.2 標準之菌液於 0.25mL 生理食鹽水中，加入一顆含 L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide 基質的藥錠，於 35~37°C 培養 4 小時。

(b) 加入 3 滴呈色劑，若菌株具有 aminopeptidase，則可將基質水解，釋出 β-naphthylamide，可與呈色劑作用使溶液呈紅色，反之為黃色。

貳、抗生素最小抑菌濃度試驗：

1. 選用抗生素藥物包括：Amoxicillin、Cefepime、Cefotaxime、Chloramphenicol、Clindamycin、Erythromycin、Levofloxacin、Linezolid、Meropenem、Penicillin G、Tetracycline、及 Vancomycin 共 12 種抗生素組合。

2. 將新鮮菌株與 ID Broth 混合均勻調至 0.5 McFarland (約 1.5×10^8)

cfu/mL) 懸浮液菌量，加一滴指示劑到 AST Broth 內，再取 25 μ L 懸浮菌液加入 AST Broth 內，並在 20 分鐘內將調好之 ID Broth 及 AST Broth 各倒入 Phoenix SMIC/ID-2 之 panel 內，確實封蓋後將 panel 放入 Phoenix 100 機器內進行偵測。結果依據 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 提供抗藥判讀標準。

參、分子生物型別分析：

一、emm-typing：

(1)、genomic DNA 製備：

- a. 自隔夜培養之A群鏈球菌，取一滿圈環之菌量，完全溶入300 μ L 生理食鹽水 (0.85% NaCl)。
- b. 70°C加熱15分鐘，以最高速離心2分鐘，去掉上清液。
- c. 再以50 μ L TE (10mM Tris、1mM EDTA、pH8.0) 將沉澱物完全混合，再加入10 μ L mutanolysin (3000 unit/mL) 以及2 μ L hyaluronidase (30mg/mL)。
- d. 置放於37°C恆溫槽中30分鐘，再調整到100°C加熱10分鐘。
- e. 以最快轉速離心1分鐘，取上清液儘速進行PCR試驗，或存放於-20°C冰箱。

(2)、聚合酶鏈鎖反應PCR：

a. 調製PCR反應試劑 (master mix)：

- | | |
|---|--------------|
| * 10X buffer (含15mM MgCl ₂) | 10.0 μ L |
| * dNTP mixture (10mM) | 2.0 μ L |
| * Primer1 : TATT (C/G) GCTTAGAAAATTAA | 2.0 μ L |

* Primer2 : GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT	2.0 μ L
* Taq polymerase (3U/ μ L)	0.5 μ L
* ddH ₂ O	82 μ L

- b. 取不超過0.5 μ L溶解後的菌液上清液。
- c. 加入到19.5 μ L的PCR反應試劑 (master mix)。
- d. 置入PCR儀器中進行反應：反應時間溫度設定如下

94°C 1min → 94°C 15sec → 46.5°C 30sec → 72°C 1min15sec →

↑ 10cycle

94°C 15sec → 46.5°C 30sec → 72°C 1min15sec → 72°C 10min

↑ 20cycle (+10sec/cycle)

- e. 以 0.8% agarose gel 電泳確認後，使用 QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA) 純化PCR產物，將純化之產物置於-20°C保存。
- f. 送至民間廠商進行sequencing，再將結果與美國疾病管制局網站之 emm 基因序列資料庫 ([http : //www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.htm))，進行比對工作。

二、毒素基因與抗藥基因鑑定：

1、DNA分離：

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。使用Qiagen之QIAamp DNA Mini Kit，抽取隔夜培養之細菌DNA。

2、聚合酶鏈鎖反應PCR：

(1)、Primer :

spe A1 :	5' ACT TAA GAA CCA AGA GAT GG	3'
spe A2 :	5' CCT TAT TCT TAG GTA TGA AC	3'
spe B1 :	5' GGA TCC CAA CCA GTT GTT AAA TCT CT	3'
spe B2 :	5' AAC GTT CTA AGG TTT GAT GCC TAC AA	3'
spe C1 :	5' AAG TGA CTC TAA GAA AGA CA	3'
spe C2 :	5' TTG AGT ATC AAT GTT TAA TG	3'
slo1 :	5' AAT ATC AAC ACT ACA CCA GT	3'
slo2 :	5' CTG TTG AAA CAT TGG CAT AG	3'
erm B1	5' GAA AAGGTACTCAACCAAATA	3'
erm B2	5' AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	3'
mefA-1	5' AGTATCATTAATCACTAGTGC	3'
mefA-2	5' TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	3'

1. 在 30 μ L PCR 反應混合液中含 :

ddH ₂ O	22.4 μ L
10X Taq buffer	3.0 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ L
dNTP (10 mM)	0.3 μ L
Primer-1 (5 μ M)	0.3 μ L

Primer-2 (5 μ M)	0.3 μ L
Polymerase (5U/ μ L)	0.2 μ L
<u>Template</u>	<u>2.0 μL</u>
Total volum	30.0 μ L

2. PCR 反應流程：

94°C 1min → 94°C 1min → 55°C 2 min → 72°C 1min → 72°C
 10min → 4°C pause 30cycle

3. 取 5 μ L 的 PCR 產物. 使用 2 % agarose gel in 0.5X TBE buffer 進行電泳分析。

結果

一、A 群鏈球菌侵襲性感染或毒性休克症候群之個案流行病學分析：

1. 自民國 101 年 1 月 1 日至 102 年 10 月 31 日期間，由全國各醫療院所通報之 A 群鏈球菌侵襲性感染或毒性休克症候群個案，經確定 354 例感染個案，並由其中分離出 324 株 A 群鏈球菌；通報個案在台北區 114 例（101、102 年度分別為 72、42）、北區 14 例（9、5）、中區 25 例（15、10）、南區 67 例（38、29）、高屏區 68 例（41、27）及東區 66 例（45、21）為本計劃研究材料（表一）。
2. 來自全國各地區，共計 54 家醫療院所通報，範圍涵蓋全台灣各地區，以台北區 18 所最多，其次為南區、高屏區、中區、東區及北區分別為 14、10、5、4 及 3 所。在醫院評鑑層級上，計有 27 家區域醫院通報 150 例，醫學中心共計有 14 家通報 162 例，以及 13 家地區醫院通報 42 例（表一）。
3. 在這兩年間每個月份均有病例通報，全部月平均確定病例數為 16.1 例（18.3、13.4），個案數在 7 月～10 月為較多通報時期，共計 178 例（102、76），約佔全部 50.3%（46.4%、56.7%）（圖一）。
4. 根據民國 101 年及 102 年年中人口總數來計算 A 群鏈球菌侵襲性感染或毒性休克症候群的年發生率，每十萬人口 0.95 及 0.69 人；台北區每十萬人口 0.94 及 0.66 人，北區每十萬人口有 0.26 及 0.17 人，中區為每十萬人口 0.33 及 0.27 人，南區每十萬人口 1.12 及 1.02 人，高屏區每十萬人口 1.13 及 0.89 人及東區較高每十萬人口 7.99 及 4.47 人（表

二)。

5. 受感染年齡及性別比較：依照各年齡層來區分，在這兩年收集到 354 例個案中，34 歲以下感染者有 44 例 (29、15)，約佔全部感染人口 12.4%，35 歲到 64 歲間有 150 例 (91、59)，約佔全部感染人口 42.4% (41.4%、44.08%)，粗略發生率約為每十萬人口 0.80 人 (1.06 人、0.69 人)，65 歲以上有 160 例 (100、60)，約佔全部感染人口 45.2% (45.5%、44.8%)，粗略發生率約為每十萬人口 3.42 人 (4.70 人、2.82 人)。在性別差異上，男性受感染比率約為女性 1.85 倍 (230：124)，102 年度比率更高到男性感染率為女性的 2.12 倍左右 (圖二)。
6. 各年齡層發生率比較，雖然在 35 歲以上各個年齡層感染個案數較高，但以人口分布來計算年發生率，則發現 75~84 歲及 85 歲以上為最高發生率年齡層，101、102 年度分別為每十萬人 4.67、9.66 人，及每十萬人 4.24、8.92 人 (圖三、四)。

二、分離 A 群鏈球菌對各類抗生素感受性分析：

由通報分離出 324 株 A 群鏈球菌進行分析，在對 Penicillin 類的 Amoxicillin 及 Penicillin G 均未發現有抗藥性菌株，在 Cephems 類的 Cefepime、Cefotaxime 也未有抗藥性菌株，另外還有 Linezolid、Meropenem 及 Vancomycin 都是具有感受性；在對 Chloramphenicol 的不具感受性 (non-susceptible) 的比例不高，在這兩年分別為 2.6% 及 2.3%；在這兩年的不具感受性菌株比例在 10% 左右的抗生素，有

Clindamycin、Erythromycin 及 Levofloxacin，但其中 Clindamycin 及 Erythromycin 的高抗藥性 (resistant) 菌株比例較高，約在 10% 左右；最後具有較高抗藥性之抗生素為 Tetracycline，這兩年分別只有 29.2% 及 31.6% 菌株具有感受性 (表四、表五)。

三、A 群鏈球菌之分子生物型別分析：

1. emm 基因型別分析 (emm-type)：

進行 emm sequence 與美國 CDC Streptococcus pyogenes emm sequence database 比對分析 A 群鏈球菌相似度在 96% 以上之型別有 43 種，其中 emm12 有 56 (32、24) 株佔了 17.3% (16.3%、18.8%) 為最多、其次為 emm113 有 53 (29、24) 株佔了 16.4% (14.8%、18.8%)、emm22 有 35 (23、12) 株佔了 10.8% (11.7%、9.4%)、emm11 有 21 (16、5) 株佔了 6.5% (8.2%、3.9%) 及 emm102 有 15 (9、6) 株佔了 4.6% (4.6%、4.7%) (圖五)。在各年齡層之 emm 型別分布，在 34 歲以下年齡層感染菌株，主要為 emm12 有 16 例佔 36.4% 最高，在 35-64 歲及 65 歲以上年齡層之型別佔比例大致相同，尤其在 emm113 型為這兩族群最多型別，另外在 65 歲老年人所感染的其他 emm 菌株型別較高 (24.2%) (圖六)。

2. Erythromycin 抗藥基因分析

將 324 株 A 群鏈球菌，進行針對 Erythromycin 抗藥機制中的三種調控基因分析，其中以 *ermB* 共占有比例最高，有 36 (19、17) 株，佔有

比例 11.1% (9.7%、13.3%)，另外有 6 (2、4) 株具有 *mef* 基因，佔有比例 1.9% (1.0%、3.0%)，未偵測到具有 *ermTR* 基因菌株 (表六)。

3. 鏈球菌溶血素及化膿性外毒素 (streptococcal pyrogenic exotoxins) 基因偵測

另外進行 A 群鏈球菌毒素基因偵測，其中都具有鏈球菌溶血素 O (streptolysin O) 基因，有 307 (186、121) 株菌具有 streptococcal pyrogenic exotoxin B (*speB*) 基因；另外有 137 (86、51) 株菌具有 streptococcal pyrogenic exotoxin C (*speC*) 基因，最少的是具有 streptococcal pyrogenic exotoxin A (*speA*) 基因，只有 20 (14、6) 株 (表六)。

四、各類分子生物型別關聯性分析

將 *emm* 基因序列型別與外毒素基因及抗藥性基因比較。發現在 56 例 *emm12* 菌株，其中 55 例具有 *speC* 基因菌株，佔有比例達 98.2%，相同的在 *emm102*、*emm89* 及 *emm77* 這三種型別菌株，其帶 *speC* 基因佔有比例分別為 86.7%、100.0% 及 100.0%；相同的在具有 *speA* 基因的 20 株菌，只發現 3 種 *emm* 型別，分別為 *emm1*、*emm49* 及 *emm113*，在佔有該型別比例為 85.7%、77.8% 及 1.9%。在 36 株具有 *ermB* 基因菌株，有 20 株為 *emm12* 型，為主要型別佔有 55.6% (表七)。

討論

台灣地區就歷年疫情通報記載，受 A 群鏈球菌感染造成猩紅熱症狀之流行病學資料顯示，每年約有 500 到 1000 例確定個案，其好發季節為 12 月到隔年 6 月間，感染族群為 5-10 歲學齡前後幼童，也因此有學齡前後幼童職業病，此由於 A 群鏈球菌感染造成猩紅熱為藉由飛沫及親密接觸感染，且易攻擊抵抗力較弱族群，導致其在這些年紀幼童及氣候變化溫度較低環境下散播開來。本研究計畫雖同樣針對 A 群鏈球菌來進行調查分析，但由於為侵入性感染，及造成較嚴重之毒性休克症狀，因此感染的方式及菌株的型態都有所不同，因此主要的流行季節在 7 月到 11、12 月間，感染的年齡族群主要在 35 歲以上成年人及老人，與猩紅熱的流行季節及感染族群不同；且因為較嚴重之侵入性感染，至少有約 12 個死亡案例。

就感染的地理區域分布來看，雖然仍以台北地區為最高，但就人口數分析卻是以東區及南部地區有較高的發生率，這可能跟主要的通報醫院多以較具規模之區域級以上醫院有關；由於 A 群鏈球菌侵襲性感染及毒性休克症候群，對感染個案有較嚴重之病症，因此病患必須到有較多醫療資源的醫療院所就診，在台北地區具有較多醫療資源，因而通報個案也就提高。就這兩年通報個案分析，約略可以看出季節流行趨勢，但這必須得再多收集幾年的資料分析來確認；在本計畫所作的監測資料顯示，我國的 A 群鏈球菌侵襲性感染症年發生率約為每十萬人 0.83 人受感染，相較於其他許多國家的年發生率則在每十萬人 2~4 人受感染，明顯有所差異，再深入到各年齡層比較，與其他國家相同的，35 歲以上為主要感染族群，但是許多國家在 5 歲以下幼童也是另一主要感染族群，這與國內有明顯差異存在^{17,18}，

這是否為台灣所具有的特性，尚待更多的監測資料來分析。

在以往研究者發現，存在 A 群鏈球菌表面之 M-protein，與感染病患部位及造成之疾病有關，但就鑑定 M-protein 之抗血清取得不易，因此我們採用其他研究者所使用 emm 定序分型法來進行比較，可以較快速分析感染菌株具有那些 M 蛋白質型別；由實驗結果看出這兩年來主要流行型別為 emm12、emm113、emm22、emm11、emm102 及 emm1，其中 emm12 大部分都帶有 speC 基因，emm1 大多帶有 speA 基因。但在之前國內針對猩紅熱及 A 群鏈球菌感染症的研究報告顯示，emm1、emm4、emm6、emm12 及 emm22，為主要國內流行型別有所差異^{19,20}；然而在另一篇國內研究報告發現，在針對南台灣地區的 A 群鏈球菌感染症分析資料，提到發現在南台灣自 2004 年起，出現新的 emm 型別，分別為 emm11、emm81 及 emm102，並在南部開始流行的重要結論²¹，這與本次研究發現的主要流行型別相同，但其感染地區則分布在全台灣各地。除此，在國際上的其他國家，其流行的 emm 型別也會有所不同^{17,22,23}，也有許多研究發現不同 emm/M-protein 型別與感染症狀有關²⁴，但這些結果將會是本研究必須要去補充調查後，才能夠加以討論。

在本研究針對抗藥性試驗分析中，發現針對 Clindamycin、Erythromycin 及 Levofloxacin 的抗藥性比例並非很高，這是對國內的其他研究來比較¹⁹，但相較歐洲的國家則是比較高，尤其 Tetracycline 在國內只有約 30.2% 菌株具有感受性，但在德國卻還有 88.4% 菌株具有感受性¹⁷；雖然如此，在本研究的菌株，對於其他抗生素都具有 85.0% 以上菌株具有感受性表現，而且在不同年齡層也未發現有特別抗藥性族群。在 Erythromycin 抗藥性，有兩種

主要機制，其中 *ermB*、*ermTR* 為產生甲基化酶造成細菌對 macrolides、lincosamind 和 streptogramin 產生抗藥性，另外一種是 *mefA* 基因調控排出機制 (efflux pump)，讓細菌具有排出抗生素的能力，但在本研究並未偵測到 *mefA* 基因，但這與其他國家偵測到較多 *mefA* 基因的結果不同¹⁵。

除此為了更深入探討這些菌株基本特性，我們利用聚合酶鏈鎖反應來偵測其具有之毒素基因，發現所有分析的菌株中均帶有產生鏈球菌溶血素 (streptolysin O) 之 *slo* 基因，帶有 Streptococcal pyogenic exotoxin B 之 *speB* 基因佔有 94.8%，但對 *speA* 及 *speC* 基因，並非每一株菌都具有，且相較於其他國家，我們所偵測到具有 *speA* 及 *speC* 基因比率較低¹⁷；綜觀本研究所分離到 A 群鏈球菌侵襲性感染症之病原菌，經這些基因型別分析，可顯見與國外的流行菌株有某種程度的差異性，相較於國內其他學者之研究，似乎有較相同的菌株型別²⁵，顯示這些菌株都是在國內傳播及改變。

在本研究中發現到 A 群鏈球菌侵襲性感染在國內發生率並不高，每年每十萬人有 0.83 人感染，但以東部地區每年每十萬人有 6.39 人及 85 歲以上年長者 9.66 人感染來看，且預估尚有許多未通報個案，顯示 A 群鏈球菌侵襲性感染在國內仍是一重要危害國人的疾病。由本研究所獲得的資料，雖然無法直接證實這些致病菌是否具有較高的感染力或致病性，甚至具有較高的傳播能力，但就本研究結果的分析，可以瞭解到 A 群鏈球菌侵襲性感染症在台灣的流行情形，及在針對這些治病菌株的治療防治上，提供具有相當價值的參考資料。

結論與建議

以往台灣只針對 A 群鏈球菌感染造成猩紅熱症狀進行防治工作，然而在 A 群鏈球菌造成較嚴重之侵襲性感染上，並未能加以監測及防範；藉由本研究可以提供給防治相關單位，了解台灣地區 A 群鏈球菌侵襲性感染及毒性休克症候群的流行概況，亦可提供給醫療院所之醫療人員，有關治療及流行的相關資料，對未來在面對這感染症能夠及時的因應。另外，在未來是否要使用疫苗等防治措施，本研究將可再深入去探討疫苗等相關菌株特性分析，來及時提供參考，以期達到做到儘早預作防範工作。

參考文獻

1. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical microbiology reviews*. Jul 2000;13(3):470-511.
2. Todar K.. Streptococcus pyogenes. Bacteriology 330 Home Page 2002. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturespyo>.
3. Schwartz B, Facklam RR, Breiman RF. Changing epidemiology of group A streptococcal infection in the USA. *Lancet*. Nov 10 1990;336(8724):1167-1171.
4. Cone LA, Woodard DR, Schlievert PM, Tomory GS. Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock-like syndrome due to Streptococcus pyogenes. *The New England journal of medicine*. Jul 16 1987;317(3):146-149.
5. Stevens DL. Invasive group A streptococcus infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Jan 1992;14(1):2-11.
6. Stollerman GH. Rheumatic fever. *Lancet*. Mar 29 1997;349(9056):935-942.
7. Kotb M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clinical microbiology reviews*. Jul 1995;8(3):411-426.
8. Hsueh PR, Wu JJ, Tsai PJ, Liu JW, Chuang YC, Luh KT. Invasive group A streptococcal disease in Taiwan is not associated with the presence of streptococcal pyrogenic exotoxin genes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Mar 1998;26(3):584-589.
9. Tyler SD, Johnson WM, Huang JC, et al. Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. *Journal of clinical microbiology*. Dec 1992;30(12):3127-3131.
10. Descheemaeker P, Van Loock F, Hauchecorne M, Vandamme P, Goossens H. Molecular characterisation of group A streptococci from invasive and non-invasive disease episodes in Belgium during 1993-1994. *Journal of medical microbiology*. May 2000;49(5):467-471.
11. Teixeira LM, Barros RR, Castro AC, et al. Genetic and phenotypic features of Streptococcus pyogenes strains isolated in Brazil that harbor new emm sequences. *Journal of clinical microbiology*. Sep 2001;39(9):3290-3295.
12. Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *Journal of clinical microbiology*. Apr 1996;34(4):953-958.
13. Beall B, Facklam R, Hoenes T, Schwartz B. Survey of emm gene sequences and T-antigen types from systemic Streptococcus pyogenes infection isolates collected in San Francisco, California; Atlanta, Georgia; and Connecticut in 1994 and 1995. *Journal of clinical microbiology*. May 1997;35(5):1231-1235.
14. D'Ercole S, Petrelli D, Prenna M, et al. Distribution of mef(A)-containing genetic elements in erythromycin-resistant isolates of Streptococcus pyogenes from Italy. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Nov 2005;11(11):927-930.
15. Rubio-Lopez V, Valdezate S, Alvarez D, et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of Streptococcus pyogenes isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC microbiology*.

- 2012;12:215.
16. Villasenor-Sierra A, Katahira E, Jaramillo-Valdivia AN, et al. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains isolated from invasive and non-invasive infections from Mexico and the USA during 1999-2010. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. Mar 2012;16(3):e178-181.
 17. Imohl M, Reinert RR, Ocklenburg C, van der Linden M. Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany during 2003-2007. *FEMS immunology and medical microbiology*. Apr 2010;58(3):389-396.
 18. Martin J, Murchan S, O'Flanagan D, Fitzpatrick F. Invasive Group A streptococcal disease in Ireland, 2004 to 2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2011;16(41).
 19. Chen YY, Huang CT, Yao SM, et al. Molecular epidemiology of group A streptococcus causing scarlet fever in northern Taiwan, 2001-2002. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. Jul 2007;58(3):289-295.
 20. Su YF, Wang SM, Lin YL, et al. Changing epidemiology of *Streptococcus pyogenes* emm types and associated invasive and noninvasive infections in Southern Taiwan. *Journal of clinical microbiology*. Aug 2009;47(8):2658-2661.
 21. Chiang-Ni C, Wu AB, Liu CC, et al. Emergence of uncommon emm types of *Streptococcus pyogenes* among adult patients in southern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. Dec 2011;44(6):424-429.
 22. Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Group A *Streptococcus*, 2012.
 23. Friaes A, Pinto FR, Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J, Portuguese Group for the Study of Streptococcal I. Group A streptococci clones associated with invasive infections and pharyngitis in Portugal present differences in emm types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. *BMC microbiology*. 2012;12:280.
 24. Luca-Harari B, Darenberg J, Neal S, et al. Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *Journal of clinical microbiology*. Apr 2009;47(4):1155-1165.
 25. Wu PC, Lo WT, Chen SJ, Wang CC. Molecular characterization of Group A streptococcal isolates causing scarlet fever and pharyngitis among young children: A retrospective study from a northern Taiwan medical center. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. Apr 29 2013.

表一、各地區不同醫院評鑑層級通報個案分析（2012/01~2013/10）

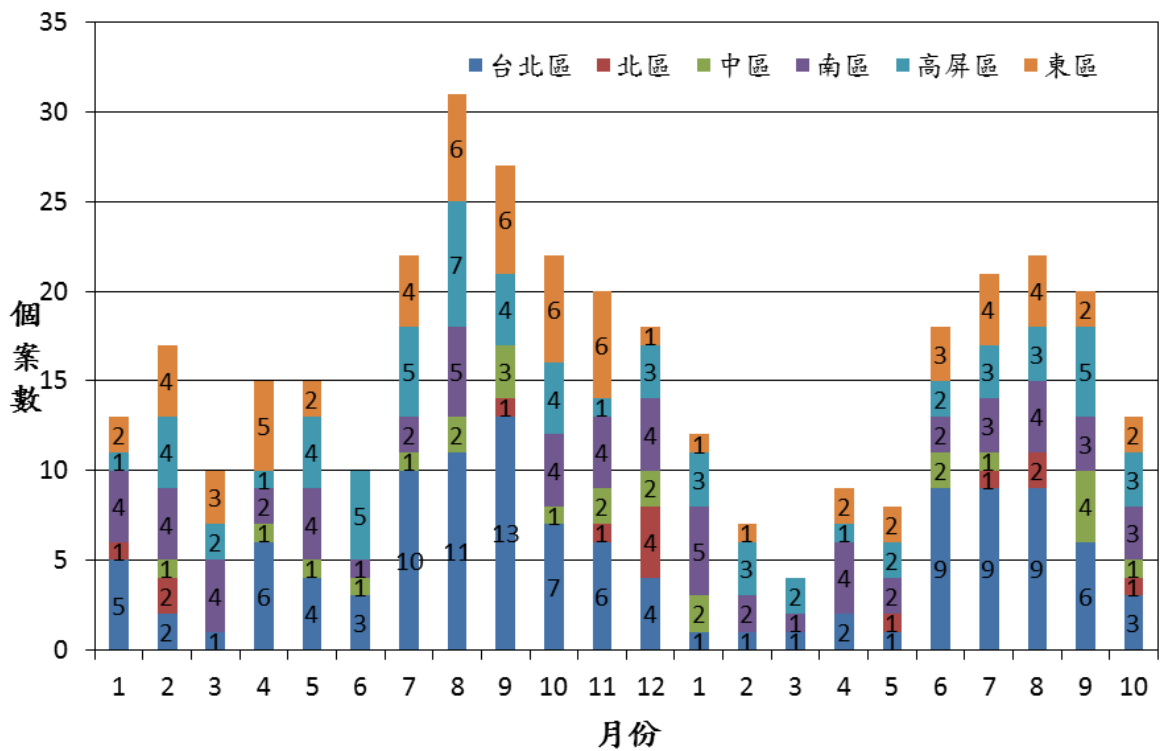
	醫院層級 [院所數(個案數)]			
	地區醫院	區域醫院	醫學中心	總計
台北區	4(16)	10(57)	4(41)	18(114)
北區		3(14)		3(14)
中區	1(4)	1(5)	3(16)	5(25)
南區	3(3)	8(31)	3(33)	14(67)
高屏區	3(3)	4(22)	3(43)	10(68)
東區	2(16)	1(21)	1(29)	4(66)
總計	13(42)	27(150)	14(162)	54(354)

表二、各地區感染個案年發生率分析/十萬人口（2012/01~2013/10）

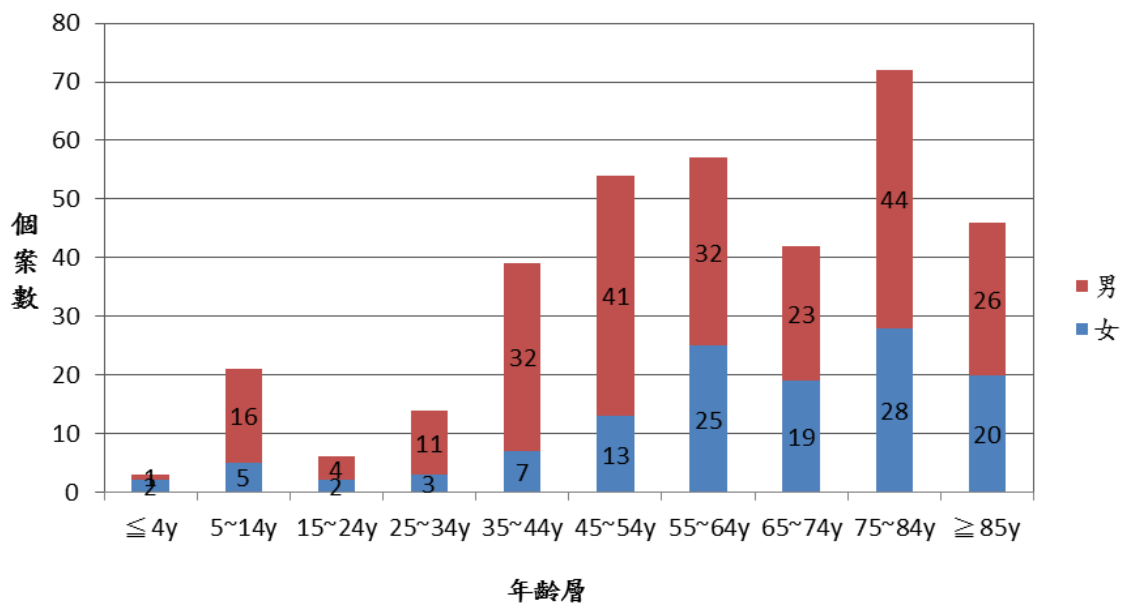
	台北區	北區	中區	南區	高屏區	東區	全國
101	0.94	0.26	0.33	1.12	1.13	7.99	0.95
102	0.66	0.17	0.27	1.02	0.89	4.47	0.69

表三、感染個案主要發病症狀及臨床疾病分析（2012/01~2013/10）

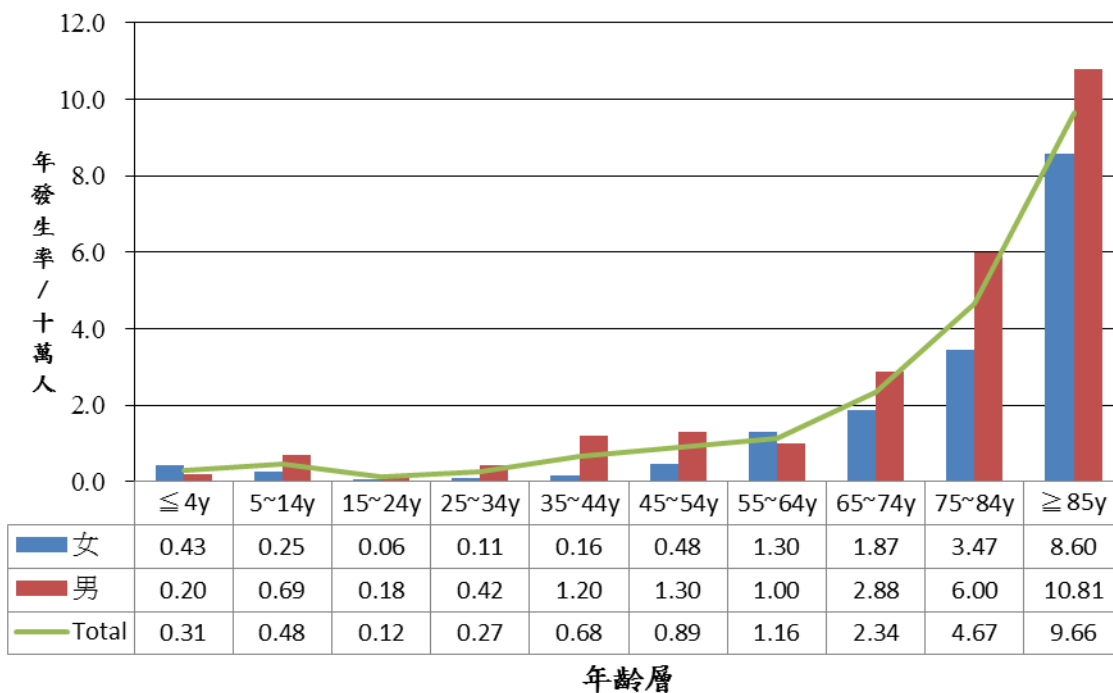
主要症狀	個案數	臨床疾病	個案數
發燒	217	休克	42
患部腫痛	56	敗血症/菌血症	68
咳嗽	30	壞死性筋膜炎	27
呼吸困難	30	蜂窩性組織炎	16
嘔吐	12	肺炎	7
呼吸過速	12	關節炎	3
活動力差	5	敗血性休克	4
頭痛	3	化膿性關節炎	1
吞嚥困難	3	腹膜炎	1



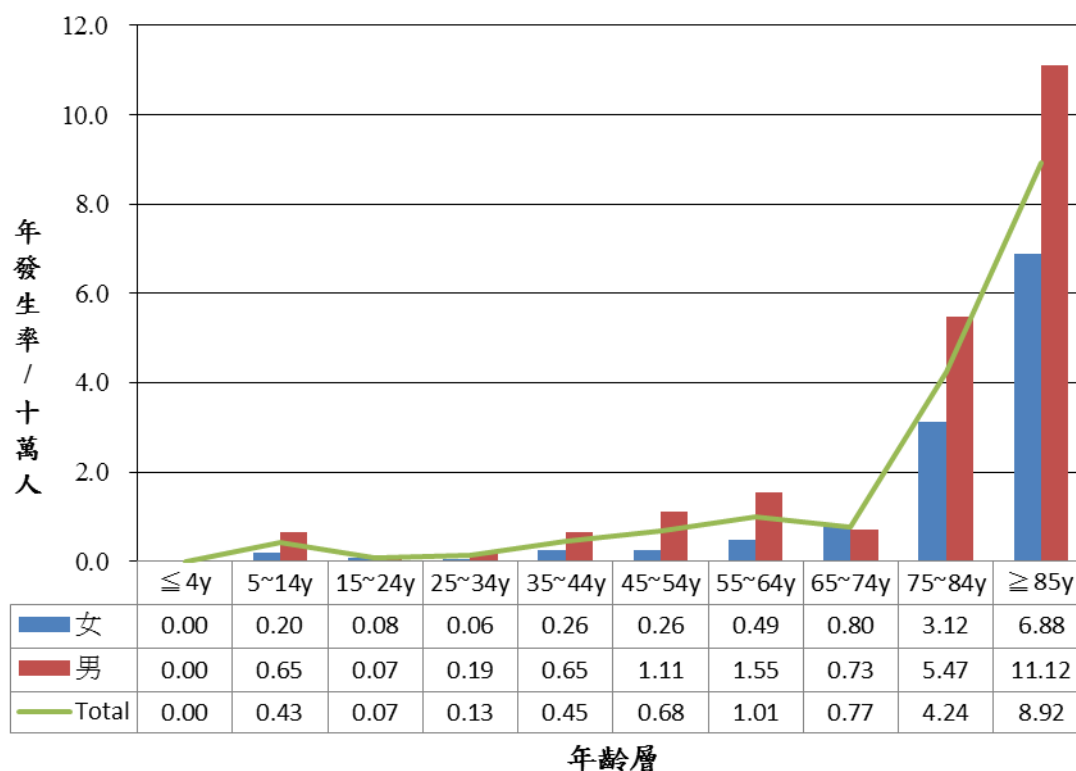
圖一：各月份通報 A 群鏈球菌侵襲性感染個案分布 (2012/01~2013/10)



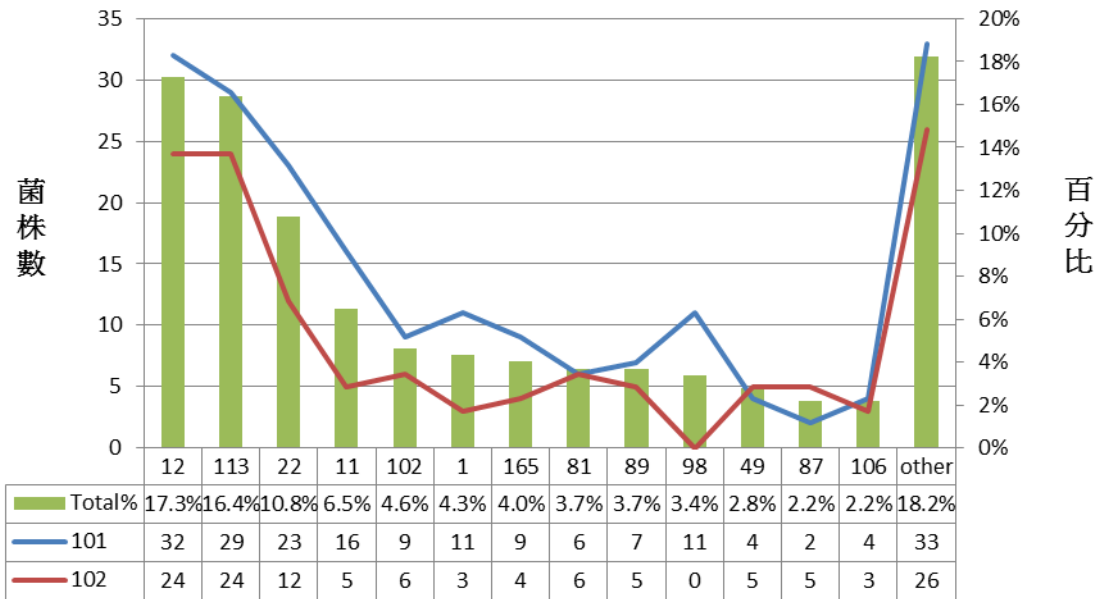
圖二：各年齡層 A 群鏈球菌侵襲性感染個案性別分布 (2012/01~2013/10)



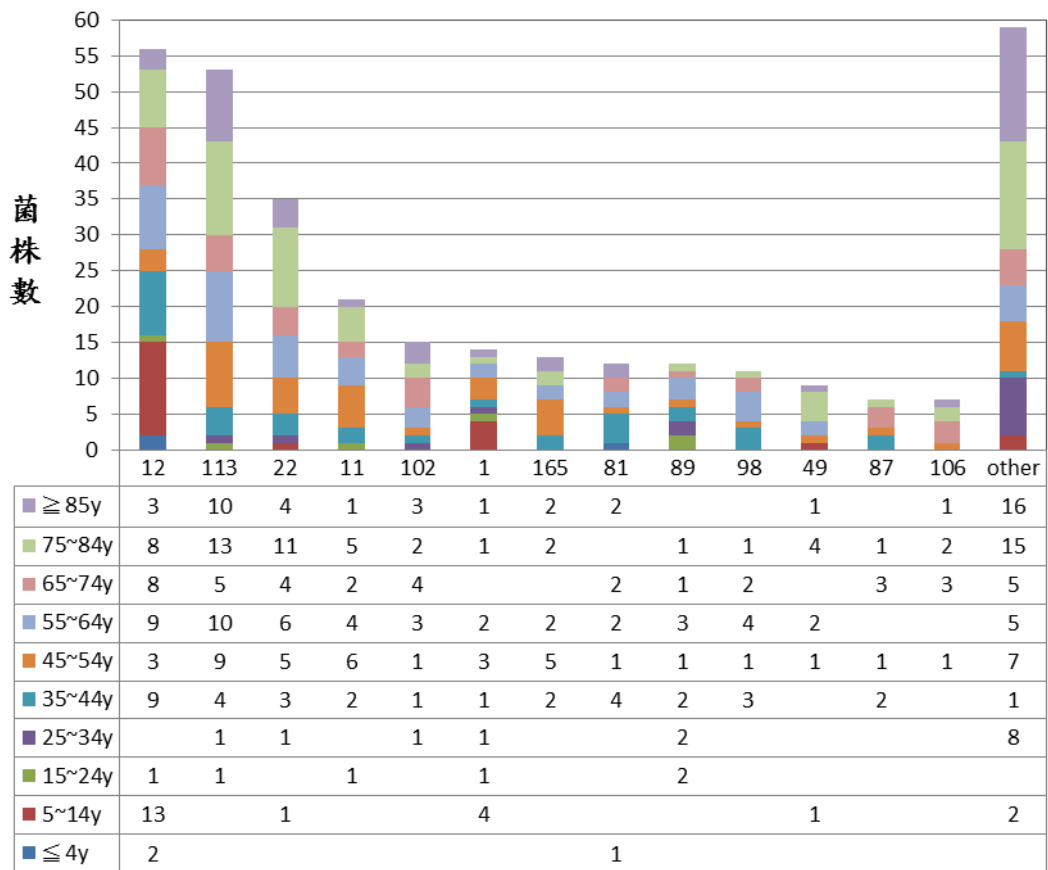
圖三：各年齡層 101 年 A 群鏈球菌侵襲性感染個案性別發生率分布 (2012/01~2012/12)



圖四：各年齡層 102 年 A 群鏈球菌侵襲性感染個案性別發生率分布 (2013/01~2013/10)



圖五：各年感染侵襲性 A 群鏈球菌菌株 emm 基因型別分布 (2012/01~2013/10)



圖六：各年齡層感染侵襲性 A 群鏈球菌菌株 emm 基因型別分布 (2012/01~2013/10)

表四、101 年分離 A 群鏈球菌抗生素感受性分析 (2012/01~2012/12)

	Range($\mu\text{g/mL}$)	MIC ⁵⁰	MIC ⁹⁰	S(%)	I(%)	R(%)
Amoxicillin	$\leq 0.25 \sim \leq 0.25$	≤ 0.25	≤ 0.25	100.0%	0.0%	0.0%
Cefepime	$\leq 0.5 \sim \leq 0.5$	≤ 0.5	≤ 0.5	100.0%	0.0%	0.0%
Cefotaxime	$\leq 0.5 \sim \leq 0.5$	≤ 0.5	≤ 0.5	100.0%	0.0%	0.0%
Chloramphenicol	$\leq 2 \sim > 8$	≤ 2	4	97.4%	2.1%	0.5%
Clindamycin	$\leq 0.03125 \sim > 2$	0.0625	0.25	91.3%	1.5%	7.2%
Erythromycin	$\leq 0.0625 \sim > 4$	≤ 0.0625	2	88.2%	1.0%	10.8%
Levofloxacin	$\leq 0.5 \sim > 4$	1	4	88.2%	3.6%	8.2%
Linezolid	$\leq 1 \sim 2$	≤ 1	≤ 1	100.0%	0.0%	0.0%
Meropenem	$\leq 0.125 \sim > 0.5$	≤ 0.125	≤ 0.125	100.0%	0.0%	0.0%
Penicillin G	$\leq 0.03125 \sim 0.125$	≤ 0.03125	≤ 0.03125	100.0%	0.0%	0.0%
Tetracycline	$\leq 0.5 \sim > 8$	> 8	> 8	29.2%	1.5%	69.2%
Vancomycin	$\leq 0.5 \sim \leq 0.5$	≤ 0.5	≤ 0.5	100.0%	0.0%	0.0%

表五、102 年分離 A 群鏈球菌抗生素感受性分析 (2013/01~2013/10)

102	Range($\mu\text{g/mL}$)	MIC ⁵⁰	MIC ⁹⁰	S(%)	I(%)	R(%)
Amoxicillin	$\leq 0.25 \sim 1$	≤ 0.25	≤ 0.25	100.0%	0.0%	0.0%
Cefepime	$\leq 0.5 \sim \leq 0.5$	≤ 0.5	≤ 0.5	100.0%	0.0%	0.0%
Cefotaxime	$\leq 0.5 \sim \leq 0.5$	≤ 0.5	≤ 0.5	100.0%	0.0%	0.0%
Chloramphenicol	$\leq 2 \sim > 8$	≤ 2	4	97.7%	1.5%	0.8%
Clindamycin	$\leq 0.03125 \sim > 2$	0.0625	> 2	86.5%	0.0%	13.5%
Erythromycin	$\leq 0.0625 \sim > 4$	≤ 0.0625	> 4	85.0%	0.0%	15.0%
Levofloxacin	$\leq 0.5 \sim > 4$	1	2	93.2%	0.8%	6.0%
Linezolid	$\leq 1 \sim 2$	≤ 1	≤ 1	100.0%	0.0%	0.0%
Meropenem	$\leq 0.125 \sim > 0.5$	≤ 0.125	≤ 0.125	100.0%	0.0%	0.0%
Penicillin G	$\leq 0.03125 \sim 0.125$	≤ 0.03125	≤ 0.03125	100.0%	0.0%	0.0%
Tetracycline	$\leq 0.5 \sim > 8$	> 8	> 8	31.6%	2.3%	66.2%
Vancomycin	$\leq 0.5 \sim \leq 0.5$	≤ 0.5	≤ 0.5	100.0%	0.0%	0.0%

表六、A 群鏈球菌菌株 Erythromycin 抗藥基因及外毒素基因分析
(2012/01~2013/10)

		Erythromycin resistant gene			Streptococcal pyrogenic exotoxin			
		<i>ermB</i>	<i>mef</i>	<i>ermTR</i>	<i>speA</i>	<i>speB</i>	<i>speC</i>	<i>slo</i>
101	Positive	19 (9.7%)	2 (1.0%)	0	14 (7.1%)	186 (94.9%)	86 (43.9%)	196
	Negative	177	194	196	182	10	110	0
102	Positive	17 (13.3%)	4 (3.1%)	0	6 (4.7%)	121 (94.5%)	51 (39.8%)	128
	Negative	111	124	128	122	7	77	0
Total	Positive	36 (11.1%)	6 (1.9%)	0	20 (6.2%)	307 (94.8%)	137 (42.3%)	324
	Negative	288	318	324	304	17	187	0

表七、A 群鏈球菌菌株分子型別比較分析 (2012/01~2013/10)

		<i>speC</i> (+)	<i>speC</i> (-)	<i>speA</i> (+)	<i>speA</i> (-)	<i>ermB</i> (+)	<i>ermB</i> (-)
emm type	12	55	1			20	36
	113	21	32	1	52		
	11	14	7			1	20
	102	13	2			1	14
	89	12				1	11
	106	5	2				7
	1	3	11	12	2	2	12
	22	3	32				
	77	3				2	1
	49			7	2		
	other	8	100		248	9	187
	Total	137	187	20	304	36	288