

計畫編號：DOH94-DC-1055

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

二仁溪流域類鼻疽菌之地域分佈調查

## 研究報告

執行機構：國立高雄師範大學 生物科技系(所)

計畫主持人：陳亞雷

研究人員：陳堯生 吳炳輝

執行期間：94年8月15日至94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

中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	5
材料方法.....	7
結果.....	9
討論.....	10
結論與建議.....	11
參考文獻.....	12
圖一、圖二.....	15
圖三、圖四.....	16
圖五.....	17
表一.....	18

## 中文摘要

類鼻疽係 *Burkholderia pseudomallei* 所引起，在台灣是一種新興、嚴重之感染性疾病，近年來台灣之散發性類鼻疽病例逐年增加。2005 年七月時，海棠颱風導致二仁溪流域雨水量激增，並發生類鼻疽之爆發性感染，可能是土壤中 *B. pseudomallei* 藉由大雨沖刷至地表，而導致疫情。然而、迄今並無任何北緯 20° 以外的地區，有大量分離 *B. pseudomallei* 的報告。因此，我們於 2005 年九月，使用 Ashdown's medium 的選擇性培養基的分離技術，以及 16S RNA 與 *fliC* 基因序列的分子診斷，沿著崇德橋分佈至保安橋之二仁溪北岸的耕植土，大量分離出 *B. pseudomallei*，含量約該分離地的  $1.5-2.6 \times 10^3$  CFU/g、佔土壤總細菌數之 0.02 – 0.13%、總 G(-)菌的 0.027-0.152%。雖然 *B. pseudomallei* 的分佈無法直接吻合此次類鼻疽爆發性感染的病例發生址，但其分佈地由二仁溪的崇德橋，順流而下至保安橋的情況，仍然間接暗示了 *B. pseudomallei* 隨著二仁溪氾濫而散佈的可能性，但具體的相關性，仍需進一步以基因型的相似度進行分析。本計劃係國際間第一次於北緯 20° 以外的地區，大量的分離與培養出 *B. pseudomallei*，並且經分子診斷證明其為 *ara* (-) 致病性菌株，研究結果佐證了台灣地區，是爆發類鼻疽的潛在危險區域，醫護人員與民眾都需提高警覺。

關鍵詞：類鼻疽、菌相分佈、二仁河流域

## 英文摘要

Melioidosis, caused by *B. pseudomallei*, is a serious, fatal and infectious disease. The sporadic cases of this disease were increased in Taiwan in recently. On July of 2005, subsequent to the presence of rainfall by a typhoon (Hai-Tang), the outbreak of melioidosis in Er-Ren river basin was occurred. This event of disease onset was suggested that adults had been exposed to *B. pseudomallei* because this bacterium in the depth of the soil drifted to surface of land, following as groundwater drain. Thus, we attempted to be isolated and identified for *B. pseudomallei* using Ashdown's selective technique and molecular diagnosis with the nucleotide sequence of 16S RNA and flagella genes. Results indicated that large amounts of *B. pseudomallei* was isolated, showing the  $1.5-2.6 \times 10^3$  CFU/g of total bacteria, the ratio of pseudomallei-like bacteria to total bacteria or total G(-) bacteria respective were 0.02-0.13% or 0.027-0.152%. The geographical distribution of *B. pseudomallei* in the areas ranging from Chung-Der to Po-An bridge indicated that this distribution associated with overflow of Er-Ren river, although this area was not directly correlated with address of patients with melioidosis, occurring in this outbreak. Whether the clinical patients acquired melioidosis originated from those environmental isolates still needed to identify their correlation of genotyping. This survey was the first time to report that large amounts of *B. pseudomallei* can be isolated from environment in the parts at over 20° N of latitude. The distribution of *B. pseudomallei* in Er-Ren river basin highlights the need for physicians managing these patients in Taiwan to be aware of the possibility of community-acquired pneumonia and sepsis arising from *B. pseudomallei* infection.

Key words: melioidosis, geographical distribution, Er-Ren river basin.

## 前言

自 1984 年首例類鼻疽於台灣發現後,台灣的類鼻疽的病例數就逐年增加(Hsueh et al., 2001), 其中有多起本土性的病例(Lee et al., 1996; Chen et al., 1999; Hsueh et al., 2001)。並於 2004 年發生高雄陸軍官校疑似類鼻疽聚集感染事件, 又於 2005 七月發生類鼻疽的確定爆發性感染, 計有數十件的類鼻疽確定病例, 死往率達 30-40%。類鼻疽的傳播模式, 主要藉由吸入或接觸 *B. pseudomallei* 所污染的土壤與塵埃所致(Dance, 2000), 並且 *B. pseudomallei* 於土壤的分離率與類鼻疽病的發生率呈正相關 (Inglis et al., 2004; Trakulsomboon et al., 1999)。因此, 進行 *B. pseudomallei* 於的地理分佈調查, 對於適當的對特定地區提出醫療警訊, 可減緩類鼻疽的發生(Inglis et al., 2004; Trakulsomboon et al., 1999)。

環境中的 *B. pseudomallei* 呈現 ara (-) 與 ara (+) 兩種異化作用的 biotype, 其中 ara (-) biotype 菌株係屬毒力菌株, ara (+) 則大多不具毒性, 現以重新命名 ara(+)的菌株為 *B. thailandensis* (Brett et al., 1998)。不過這兩種菌株的性狀類似, 不易由型態或生化反應中區別(Brett et al., 1997)。因此, 需利用 16S RNA(Dharakul et al., 1999) 23S RNA (Bauernfeind et al., 1998)與 flagella gene(Chen et al., 2002)特定序列的分子診斷鑑別之。*B. pseudomallei* 雖是土壤的腐生菌, 但卻不是土壤中的優勢菌種, 可能與其受限於多種生長條件有關。諸如: 鼻疽菌必須在有 15 %含水量的土壤、地表下 30-60 公分深、常年土壤溫度能保持 16 以上、有機碳、磷較豐富的土壤中生長(Kao et al., 2003; Dance, 2000)。目前最常分離出類鼻疽菌的位置, 就是熱帶地區的稻田土壤、或土壤附近的灌溉用水(Kao et al., 2003; Thomas et al., 1979; Wuthiekanun et al., 2005)。在泰國、澳洲等地, 類鼻疽產生的流行, 明顯的與雨季相關。因此, 部分學者認為, 當雨量充沛的時候, 土壤飽含水量, 類鼻疽菌就會藉用它快速運動的單鞭毛, 迅速由土壤深層漂移至地表, 使人們接觸並且致病(Dance, 2000)。不過, 環境中許多物理性(紫外線的傷害、乾旱、溫度)、化學性(土壤組成、除草劑、殺蟲劑)、生物性(嗜菌體的溶解、原生蟲的吞噬或放射線菌的拮抗作用)等等, 可能限制了地表類鼻疽的繁殖, 因此, 除了雨季外, 地表則不易分離類鼻疽菌(Dance, 2000; Cheng and Currie., 2005)。

*B. pseudomallei* 主要棲息於熱帶之南、北緯 20 度以內的區域(Dance et al., 2000)。

既然 *B. pseudomallei* 於土壤的分離率與類鼻疽的發生率呈正相關(Inglis et al., 2004; Trakulsomboon et al., 1999)。泰國政府(類鼻疽的高度流行區)特別沿著全國高速公路網，進行 5 公里間隔的土壤採樣，並且分離 *B. pseudomallei*。結果顯示 *B. pseudomallei* 於土壤的地理分佈並不平均，主要集中於泰國之東北部地區，該地區即為泰國類鼻疽盛行率最高的區域(Trakulsomboon et al., 1999)。但是另一種使用血清盛行率分析民眾體內抗體的調查，卻發現血清抗體盛行率高的地區，並非是泰國東北部地區(Kanaphun et al., 1993)。本矛盾的結果，可能是民眾暴露於類鼻疽的類似菌(*B. thailandensis*)，所造成血清抗體 cross-reaction 的偽陽性的結果(Cheng and Currie, 2005)。因此，評估類鼻疽可能發生的敏感區域，仍是以實際 *B. pseudomallei* 於土壤分離率為主要的方法。

2004 年七月、台灣發生首次的類鼻疽爆發性感染，病例集中於高雄縣茄定鄉、台南市南區與台南縣仁德鄉一帶，都屬於二仁溪畔。目前推論很可能是因海棠颱風的大量雨水，把土壤深層的細菌冲刷出來，然後污染了水域，使得民眾因為直接接觸而致病。由於研究顯示 *B. pseudomallei* 於地理分佈並不平均(Inglis et al., 2004; Trakulsomboon et al., 1999)，依據類鼻疽病於流行區的防治經驗，必須對 *B. pseudomallei* 的地域分佈能充分掌握，方可適時的預警與防治。因此，本計劃之目的，係建立二仁河流域之 *B. pseudomallei* 地域分佈的基礎資料，協助特定地區適時提出醫療警訊。

## 材料與方法

### 採樣點與採集法

土樣採集點，依據類鼻疽病例發生址(如：台南市南區、高雄縣茄定、台南縣仁德等地)，以及二仁溪之橋樑為地標，於流域的行政區內(如：台南縣仁德、永康、歸仁、關廟鄉、龍崎等鄉，與高雄縣內門、田寮、阿蓮、路竹及湖內等鄉)進行採樣。土壤樣品的選擇，則依據 *B. pseudomallei* 的主要棲息位置，選擇耕植土採樣 (Trakulsomboon et al., 1999)。部份地區(永安、茄荳、南區)多已開發成魚池，因此進行水樣採集。為使該區域採樣均衡，平均每平方公里流域，至少有 1 個樣點。

土樣的採集是使用鑿土器，於選定之耕種土、向地表下鑿深，分別採集地表土(0-30cm)與深層土(31-60cm)。每個採集點，選擇三個樣品，進行後續的實驗。水樣的採集則使用魚池水，於岸邊 3m 處進行水樣收集。所有的檢體於 8 h 內迅速送於實驗室，進行儲存與後續的分離實驗。

### 菌株的培養與分離

土壤菌的分離與培養係取 1g 土壤與 9ml PBS (phosphate-buffered saline) 均勻混合，取 20 $\mu$ l 置於三個細菌培養皿中，各培養皿分別加入液態之 TSA (Tryptic Soy Agar)、EMB (Eosin Methylene Blue agar) 與 Ashdown's medium，於 37 $^{\circ}$ C 培養之。24 h 後計數 TSA 的菌落為 Total counts，48 h 計數 EMB 菌落為 Total G(-) bacteria counts，7 d 後計數 *B. pseudomallei* 典型菌落為 pseudomallei-like counts。水樣菌的分離與培養，則取 100ml 水樣，經 25 $\mu$ m 孔徑濾膜進行粗過濾後，再將水樣過濾於 0.45 $\mu$ m 孔徑濾膜上，將濾膜放置於細菌培養皿後，分別加入液態之 TSA (Tryptic Soy Agar)、EMB (Eosin Methylene Blue agar) 與 Ashdown's medium，混合均勻，並於 37 $^{\circ}$ C 培養之。其菌落的計數法，如前述。

### 菌株的篩檢與鑑定

取 Ashdown's medium 培養 7d 後的乾扁 粗造 皺摺的 *B. pseudomallei* 典型菌落，進行 Gram's stain、oxidase 與 TSI 等實驗，取 G(-) dipolar、oxidase (+)、TSI 呈 K/K 反應之菌落，進行 colony PCR。Primer 系採用 16S RNA 之 sense primer 5'-CGGCA

GCRCGGGCTTCGG-3'與兩條 antisense primer 5'-TGTGGCTGGTCGTCCTCTC-3'及 5'-CACTCCGGGTATTA GCCAGA-3'進行 multiplx PCR 反應,條件為 denature : 95 、 1min ; anneal : 60 、 1min ; extention : 72 、 1min。若得 405bp 與 243bp 兩段 specific amplicon ,初步診斷為 *B. pseudomallei* ,若得 243 bp 一段 specific amplicon 則初步診斷為 *B. thailandensis* (Dharakul et al., 1999)。若無 specific amplicons 則視為其它 *pseudomallei*-like bacteria 而捨棄。

*B. pseudomallei* 的毒性菌株的鑑別診斷,則使用 commercial kits 之生化檢定(Inglis et al., 1998)與 flagella 特異性之 central regions 之 RFLP,兩者陽性者(Chen et al., 2002),則認定為 *B. pseudomallei*。其 flagella primer 設計,則依據 GenBank 之 AF084813 設計 forward prime 與 reverse prime (5'-TTTTGGTACCATGCTCGGAATCAACAGCAACAT TAAC-3'與 5'-TTTTGGATCCTTATTGCAGGGGCTTGACCACCGTT-3')。進行 PCR 反應。反應條件為 : Denature : 94 、 1min. ; Anneal : 55 、 30sec ; Extention : 72 、 1min。所得 specific amplicon ,以 *pst*I *Xho*I 進行限制酵素切割,並以 1.5% agarose gel 電泳之。



## 結果

二仁溪全長 65.18 公里，流域面積 350.04 平方公里，發源地點標高 460 公尺，流域全年平均溫介於 17.4~28.9 。流域內類鼻疽病例發生址，多位於二層行橋下游地區(圖一)。因此，樣品的採集以二仁溪上游較稀鬆，中游較密，而下游則最密集，除上游少部分地區，因地勢造成採集困難外，整個流域皆維持每平方公里至少有一個樣點(圖二)。總計土壤樣品收集 220 件檢體分離，水樣檢體收集 156 件檢體分離。土壤樣品計 57(26%; 57/220)件樣品，經初步形態、生化鑑定為 *pseudomallei*-like bacteria。經 16S RNA(圖三)與 *fliC* 基因(圖四)分子診斷後，57 樣品中，4 件(7%; 4/57)土壤樣品確定為 *B. pseudomallei* 26 件(45.6%; 26/57)確定為 *B. thailandensis* 餘 27 件(51.4%; 27/57)仍歸屬餘 *pseudomallei*-like bacteria。此 4 件樣品點，經 GPS 定位後，分別位於崇德橋(1 處)、高苓橋(2 處)、中路橋(1 處)沿岸之耕植土(圖五)。至於水樣之 156 件檢體，經初步形態 生化鑑定為 *pseudomallei*-like bacteria 的樣品數為 3 件(2%; 3/156)，但經 16S RNA 與 *fliC* 基因分子診斷後，皆屬於 *pseudomallei*-like bacteria。顯示 *B. pseudomallei* 與 *B. thailandensis* 皆不易由水樣檢體分離出。

為了瞭解 *B. pseudomallei* 於分離地的含量，分別計算該地的總菌數、G(-)菌與 *pseudomallei*-like bacteria 的相對比值。結果顯示 *B. pseudomallei* 的菌量分佈，密集於二仁溪北岸的耕植土(高苓橋附近)(表一)，依據 *B. pseudomallei* 分離地的分佈，亦暗示了 *B. pseudomallei* 的分佈，隨著二仁溪擴散(圖五)。但至二仁溪下游之中路橋後，隨著市鎮開發，耕植地多數已變更為建築用地。二仁溪再往西行至仁德、湖內之耕植地，雖進行非常密集的土壤採樣(圖二)，但皆無法分離出 *B. pseudomallei*。

## 討論

2005 七月發生台南市南區與高雄縣茄萣一帶(圖一)，發生類鼻疽爆發性感染，死亡率達 40%，時值海棠颱風導致二仁溪氾濫，依據類鼻疽於流行區盛行都與大雨發生有關的經驗(Chaowagul et al., 1989)。因此，多數學者推論二仁溪氾濫導致土壤中 *B. pseudomallei* 飄移至地表，致使民眾接觸而致病。本研究自 2005 九月起，開始至二仁溪流域(特別於類鼻疽病例發生址)進行採樣分離，雖然無法直接由病例發生址或附近分離出 *B. pseudomallei*，但由 *B. pseudomallei* 的分佈地由二仁溪的崇德橋，順流而下至保安橋的情況，仍然間接暗示了 *B. pseudomallei* 隨著二仁溪氾濫而散佈的可能性。是否因為這些 *B. pseudomallei* 隨著二仁溪氾濫至下游，使一般民眾接觸而致病，則需進一步的進行環境分離株與臨床致病株進行基因型比對，才能加以證明。

*B. pseudomallei* 雖是環境中的腐生菌，但不是土壤中的主要菌落群，研究中顯示，土壤中分離之 pseudomallei-like bacteria 中，僅有 7% 是致病性的 *B. pseudomallei*，另 51.4% 是屬於非致病性的 *B. thailandensis* 或 41.6% 屬於 unidentified pseudomallei-like bacteria。*B. pseudomallei* 約佔土壤總細菌數之 0.02 – 0.13% (約  $1.5-2.6 \times 10^3$  CFU/g)，遠比 *E. coli*、*Bacillus subtilis* 或 *Pseudomonas sp.* 的含量低。類鼻疽於流行區調查的經驗顯示，*B. pseudomallei* 於土壤中呈不均勻的分佈(Dance, 2000)。我們前期研究中，亦發現使用同一塊耕植地的 14 個樣品點，進行 *B. pseudomallei* 特異性的 16S RNA 或 *fliC* 基因的篩檢，僅有 2-8 個樣品可偵測到 *B. pseudomallei* (Kao et al., 2003)。本計劃雖於相同地區(100 公尺見方內)之不同地點採樣(如二仁溪北岸中路橋至南雄橋間)，並不一定都能偵測或分離到 *B. pseudomallei*，亦都顯示其於土壤中分佈的不均勻性。

前期研究中證實，*B. pseudomallei* 無法在河口的水源中存活(Chen et al., 2003)。本研究雖然有密集性採樣與分離，亦無法於二仁溪出海口附近偵測或分離到 *B. pseudomallei*，顯示 *B. pseudomallei* 對於環境中某些生物性或化學性因子敏感，使其生長與散佈受到限制。此點或可說明，此次類鼻疽的疫情，隨著七月顛峰過後，疫情逐漸緩和，到達九月則少有新病例的發生，我們亦無法由該地區分離 *B. pseudomallei*。

無論如何，我們確實證明台灣部分地區存在著本土性的致病菌株。有鑑於類鼻疽是一種嚴重致死性的感染性急症，仍需讓民眾了解暴露於 *B. pseudomallei* 的威脅，並對菌株分離地提出適當警訊，讓醫護人員重視。

## 結論與建議

利用 Ashdown's medium 的選擇性培養基的篩選與 16S RNA 與 *fliC* 基因序列的分子診斷，我們證明了二仁溪流域中，*B. pseudomallei* 的地域分佈係沿著崇德橋分佈至保安橋，順著河畔北岸的耕植土分佈。雖然這個分佈的結論，無法直接吻合此次類鼻疽爆發性感染的病例發生址，但由 *B. pseudomallei* 的分佈地由二仁溪的崇德橋，順流而下至保安橋的情況，仍然間接暗示了 *B. pseudomallei* 隨著二仁溪氾濫而散佈的可能性。本計劃係國際間第一次於北緯 20° 以外的地區，大量的分離與培養出 *B.*

*pseudomallei*，並且經分子診斷證明其為 *ara* (-) 致病性菌株。配合我們曾調查台灣地區有 2.5-5% 的血清抗體陽性率(Chen et al., 2004)，傾向說明台灣可能爆發類鼻疽的潛在危險。因此，我們建議：

- (1) 依據二仁溪流域的調查經驗，擴大對台灣地區進行 *B. pseudomallei* 的地域調查。

依據 *B. pseudomallei* 需要熱帶地區才易繁殖、過去類鼻疽病例多發生於南台灣的經驗、以及 *B. pseudomallei* 對某些環境因子敏感與呈現不均勻的分佈的特性。推斷 *B. pseudomallei* 僅分佈於特定地區。徹底的調查其分佈狀況，可避免民眾無知而恐慌，並可對特定地區提出適時的醫療警訊。

- (2) 現今國際研究報告指出，類鼻疽個案發生數與民眾曝露污染源(土壤)的 *B.*

*pseudomallei* 的含量有關(Dance, 2000)。然而，*B. pseudomallei* 又棲息於 30-60 cm 深層土壤(Dance, 2000; Kao et al., 2003)。因此，甚麼因素導至土壤的翻騰，致使 *B. pseudomallei* 能棲息於表層土，並且存活相當時間，致使民眾接觸並感染。因此，使用分子診斷技術(如：immuno-PCR 技術或 DGGE [denature gel gradient electrophoresis])，研究土壤中 *B. pseudomallei* 漂移機制，則可對類鼻疽可能發生的區域，更具體的掌握與設定防疫措施。

- (3) 長期以來，多起類鼻疽的個案，係屬於本土性的感染或境外移入感染，仍多有爭議。藉由這次環境中分離出的 *B. pseudomallei*，宜與本次類鼻疽事件中的臨床分離株，進行基因圖譜的比對，以徹底釐清台灣本土性感染的可能性，並清楚的建構環境污染菌與臨床感染間的相關性，以建立防疫的措施。

## 參考文獻

- Cheng AC, Currie BJ. (2005)** Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:383-416.
- Bauernfeind A, Roller C, Meyer D, Jungwirth R, Schenider I. (1998).** Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *B. pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2737-2741.
- Brett P J, DeShazer D, Woods DE. (1997).** Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiol Infect* 118, 137-148
- Brett PJ, DeShazer D, Wood DE. (1998).** *Burkholderia thailandensis* sp nov, a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 317-320.
- Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, Looareesuwan S, Pitakwatchara N. (1989).** Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis* 159, 890-899.
- Chen YH, Peng CF, Hwang KP, Tsai JJ, Lu PL, Chen TP. (1999)** An indigenous melioidosis: a case report. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 15, 292-296.
- 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. Chen, SC. Wu, TR. Ji, DD. Chen, YL\*. (2004)** Seroprevalence of anti-flagellin antibody against *B. pseudomallei* in Taiwan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:224-5.
- Chen YS. Lin HM. Pan NC. Chien SM. Chen YL. (2002)** Comparison of 16S RNA, flagella and type III secretion gene PCR primer sets for diagnosis of ara- *Burkholderia pseudomallei* in paddy soil. *J Biomed Lab Sci* 14:95-100.

**Inglis TJ, Foster NF, Gal D, Powell K, Mayo M, Norton R, Currie BJ.** (2004) Preliminary report on the northern Australian melioidosis environmental surveillance project. *Epidemiol Infect.* 2004 Oct;132(5):813-20.

**Dance D.A.** (2000) Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia spp.* and human-animal hosts. *Acta Trop* 74, 159-168.

**Dharakul T, Tassaneetrithep B, Trakulsomboon S, Songsivilai S.** (1999). Phylogenetic analysis of ara+ and ara- *Burkholderia pseudomallei* isolate and development of a multiplex PCR procedure for rapid discrimination between the two biotypes. *J Clin Microbiol* 37, 1906-1912.

**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, Chiang D, Lee GS, Chor-King L.** (1998). Potential misidentification of *B. pseudomallei* by API 20NE. *Pathology* 30, 62-64.

**Kanaphun P, Thirawattanasuk N, Suputtamongkol Y, Naigowit P, Dance DA, Smith MD, White NJ.** (1993) Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei*: a prospective study in 1000 hospitalized children in northeast Thailand. *J Infect Dis.* 167(1):230-3.

**Lee SS, Liu YC, Chen YS, Wann SR, Wang JH, Yen MY, Wang JH, Lin HH, Huang WK, Cheng DL.** (1996). Melioidosis: two indigenous cases in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 95, 562-566.

**Kao, CM. Chen, SC. Chen, YS. Lin, HM. Chen, YL.** (2003) Detection of *Burkholderia pseudomallei* in the paddy soil with PCR-based technique. *Folia Microbiol.* 48: 521-524.

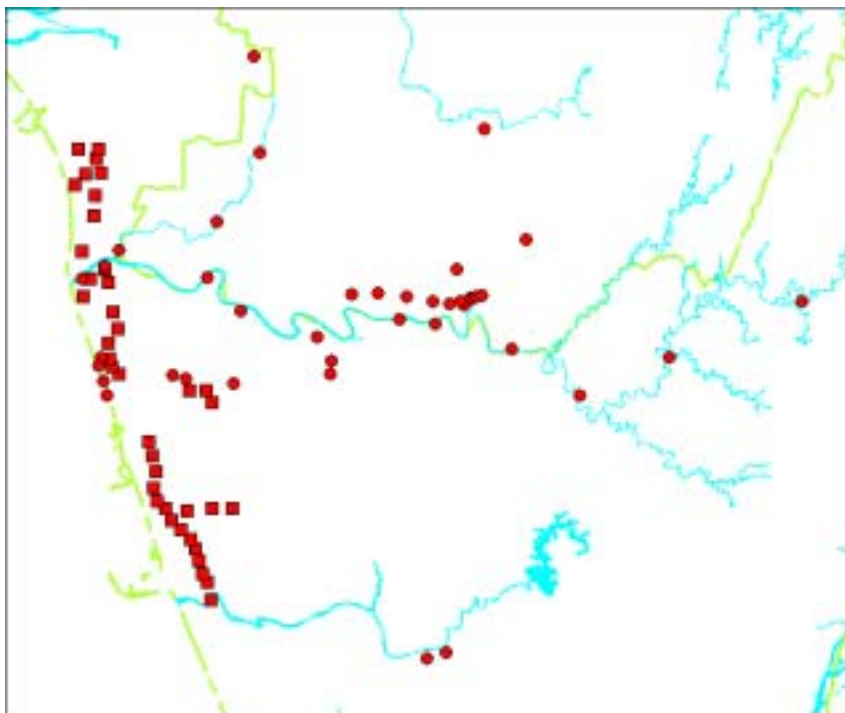
**Thomas AD, Forbes J, Parker M. (1979)** Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers at defined depths. Am. J. Epidemiol. 110:515-521.

**Trakulsomboon S, Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-Gnam N, Suputtamongkol Y, Thamlikitkul V. (1999)** Epidemiology of arabinose assimilation in burkholderia pseudomallei isolated from patients and soil in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health.30(4):756-9.

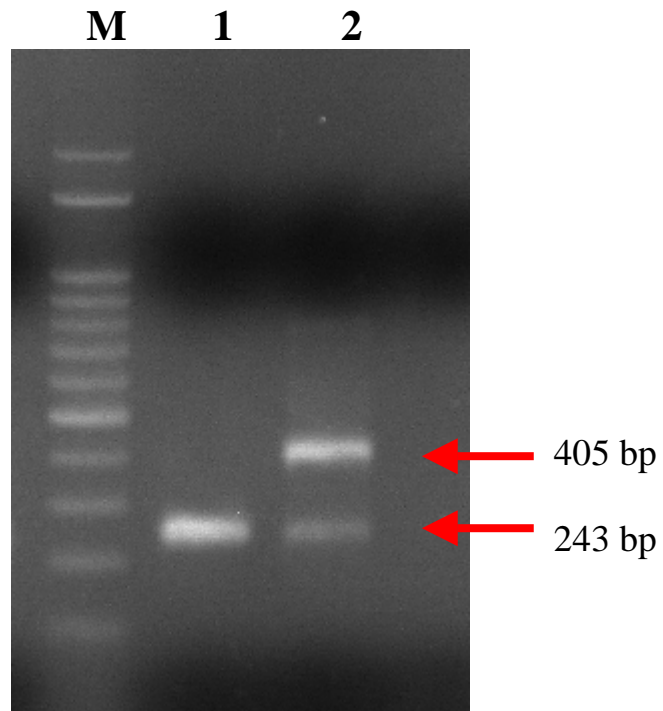
**Wuthiekanun V, Mayxay M, Chierakul W, Phetsouvanh R, Cheng AC, White NJ, Day NP, Peacock SJ. (2005)** Detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil within the Lao People's Democratic Republic. : J Clin Microbiol. 43(2):923-4.



圖一、類鼻疽病例發生址之 GPS 定位圖。  
紅點所示為病例發生址。

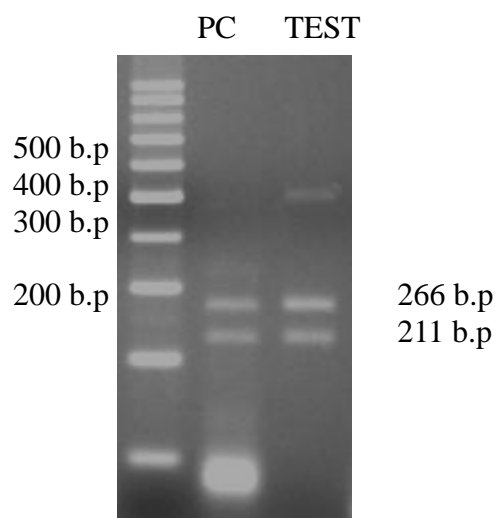
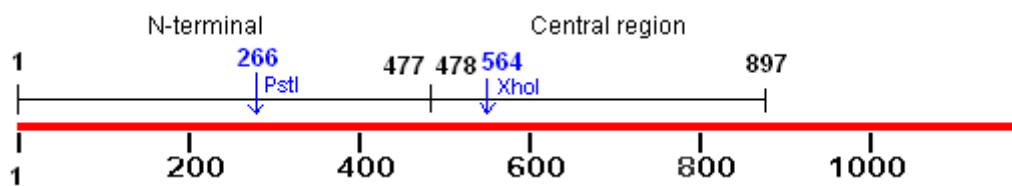


圖二、採樣點的 GPS 定位圖。  
紅點所示為土壤樣品採集點，方格所示為水樣品採集點。



圖三、16S RNA 分子診斷代表性圖形。

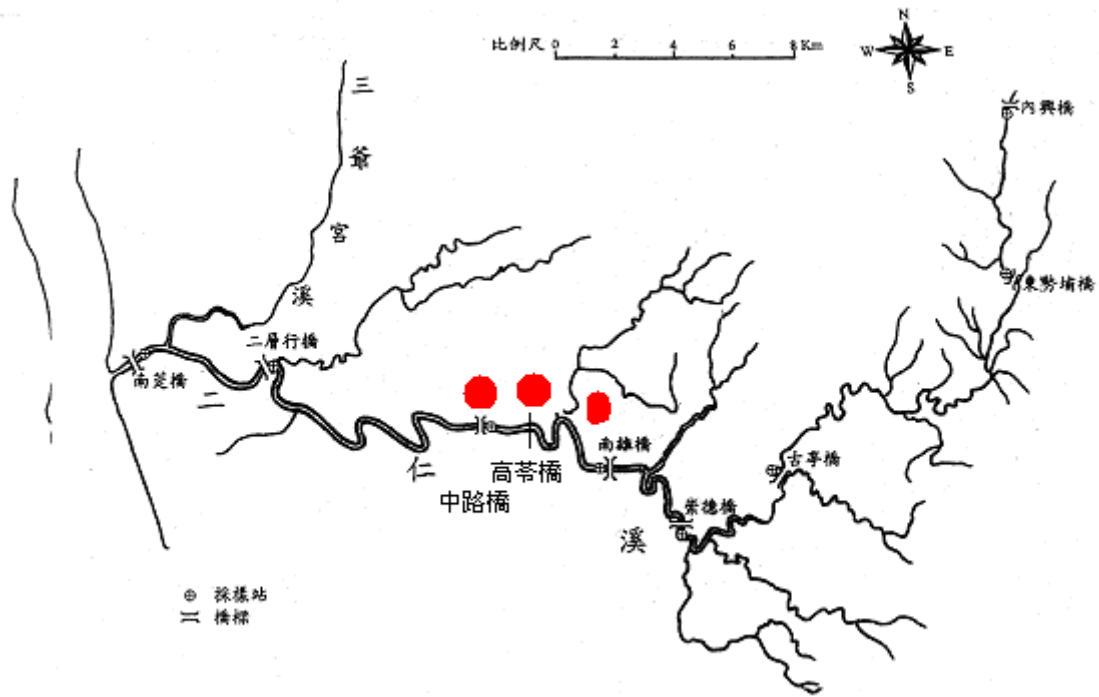
M 表 molecular weight marker; 100 bp ladder. 1: *B. thailandensis* 2: *B. pseudomallei*。



圖四、flagella gene RFLP 圖譜。

圖示 266 bp、211 bp 為分子診斷之依據。





圖五、*B. pseudomallei* 分離地圖示。

表一. *B. pseudomallei* 分離地之相對菌相比較

地點	總菌數	G(-)菌	Pseudomallei- Like bacteria	P/T ratio <sup>a</sup>	P/N ratio <sup>b</sup>	GPS 定位	
	(CFU/g)	(CFU/g)	(CFU/g)	%	%	x	y
崇德橋	9.2x10 <sup>6</sup>	9.0x10 <sup>6</sup>	2.4x10 <sup>3</sup>	0.26	0.27	184699	2530655
高苓橋	5.6x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>3</sup>	0.27	1.25	180551	2534274
高苓橋	1.2x10 <sup>7</sup>	3.6x10 <sup>6</sup>	2.6x10 <sup>3</sup>	0.22	0.72	180745	2534375
中路橋	2.0x10 <sup>6</sup>	1.7x10 <sup>6</sup>	2.6x10 <sup>3</sup>	1.30	1.52	177886	2533546

<sup>a</sup>P/T ratio = counts of pseudomallei-like bacteria/counts of total bacteria

<sup>b</sup>P/N ratio = counts of pseudomallei-like bacteria/counts of total G(-) bacteria