

封面式樣

計畫編號：DOH90-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十年度自行研究計畫

台灣東部與中部地區 *Shigella sonnei* 所引發之桿  
菌性痢疾分子流行病學研究

## 研究 成 果 報 告

執行機構：疾病管制局

研究主持人：邱乾順

研究人員：

執行期間：90年1月1日至90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 \*

## 摘要

關鍵詞：桿菌性痢疾、脈衝式電泳法、分子流行病學

台灣東部地區與中部山地鄉鎮為桿菌性痢疾流行地區，1996 至 2000 年間東部與中部地區統計病例數介於 25 至 108 例之間，2000 年底花蓮市之四維高中爆發一次大規模桿菌性痢疾流行後，花東地區隨之發生桿菌性痢疾全面流行，2001 年東部地區病例數爆增至 6 倍，中部地區亦於 5 月後病例數大增至 2 倍，統計顯示病例數增加與 *Shigella sonnei* 之分離率具關連性。利用脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 分子分型法分析 1996-2001 年台灣東部與中部地區所分離之 377 株 *S. sonnei* 菌株，分析菌株間之同源性，分型結果結合流行病學資料，探討 2001 年兩地區病例數大增的原因與近 6 年來兩地區 *S. sonnei* 菌株之動態變化，並探討該地區爆發流行事件之關連性，研究結果期能做為擬定防治策略之基礎。

分析之 377 株菌株被分成 15 個 PFGE 型別，主要型別為 D1 (285 株)、D3 (51 株) 與 D10 (20 株)，其中 D1 再細分成 37 個亞型，D3 分成 10 亞型，D10 分成 2 個亞型。分型結果顯示 2000 年至 2001 年台灣東部及中部地區主要流行菌株為 D1 及 D3 型別，1996 至 1999 年間之流行菌株型別每年皆有變化；D1 型別菌株於 2000 年 3 月由一荷蘭籍旅客由印度或新加坡帶入台灣，同年 10 月引發四維高中之大規模流行，並造成花蓮地區 2001 年全

面性大流行，2001 年 5 月該菌株亦傳播至南投縣仁愛鄉互助村，隨後並於埔里鎮與仁愛鄉多數村落造成感染，該年度台中縣及苗栗縣沿海數個鄉鎮之桿菌性痢疾病例亦為此菌株所致，D1 型別菌株是 2001 年全台灣桿菌性痢疾大流行之主要病原菌；D3 型別菌株於 2001 年 7 月 31 日桃芝颱風重創南投縣信義鄉後，8 月初在該地引發一波大流行，追蹤比較菌株型別發現，此菌株與嘉義縣阿里山鄉之爆發流行事件的菌株相同，兩鄉間具有交通地緣關係，D3 菌株除了在信義鄉造成流行，亦傳播至南投縣埔里鎮與仁愛鄉；D10 菌株為 1997 年花東地區主要流行菌株，並於 1998 年出現在南投縣三個鄉鎮市。

研究結果顯示由一外籍旅客引進台灣之一痢疾桿菌菌株是造成 2001 年台灣東部與中部(或全台灣)桿菌性痢疾大流行之主因，菌株藉由人與人間的攜帶，能迅速跨越地理界線而傳播；6 年期間菌株的比較則顯示 *S. sonnei* 的流行菌株型別變化相當大，此與 *S. flexneri* 菌株型別的流行情形可能有相大的差異。

由於脈衝式電泳法對細菌分型具有很高的效能，加上操作方法的改進，美國疾病管制局已經利用脈衝式電泳法進行重要細菌病原的例行分型工作並建立網際網路比對的 DNA 指紋資料庫—PulseNet，用於監測細菌性傳染病之流行，此系統亦已在國際間推廣，除了歐洲及美洲各國外，鄰近

的日本亦已加入此防疫網路，台灣亦應建立國內之重要細菌病原菌之 DNA 指紋資料庫，加入此一國際防疫網，以增強對細菌性傳染病監測及防治能力。

## Abstract

Keywords: shigellosis, pulsed-field gel electrophoresis, molecular epidemiology

Shigellosis is common in the mountainous townships in eastern and central Taiwan. There were 25 to 108 cases annually identified in 1996 to 2000 in the eastern area. However, shigellosis has become epidemic in the eastern area after a large outbreak occurred in a high school in Hualien City in October 2000. In 2001, outbreaks caused by *Shigella sonnei* were dramatically increased in eastern Taiwan as well as in central Taiwan. To investigate the relationship of cases identified in the two areas, we analyzed 377 *shigella* isolates recovered from 1996 to 2001 in eastern and central Taiwan by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The results of PFGE genotyping and epidemiological data of the cases were used to discuss the dynamic change of *shigella* strains appeared in the period of the six years, the relationship among the outbreaks and the increase of cases in 2001.

The 377 isolates were grouped into 15 PFGE pulsotypes of which D1 (285 isolates), D3 (51), and D10 (20) were the major types. D1, D3, and D10 were further divided into 37, 10, and 2 subtypes, respectively. The distribution of pulsotypes (strains) in the two areas was changing by time. D10 strain was detected in eastern Taiwan in 1996 and 1997 and in central Taiwan in 1997 and 1998. D3 strain was detected only in central Taiwan in 2001, whereas D1 strain first appeared in 2000 and became prevalent in 2001 in both areas. D1 strain was very likely imported from southern Asia. It was first isolated from a traveler in March 2000 and caused a large outbreak in a high school of Hualien City in October. Following the outbreak, infection by D1 strain dramatically increased

in Hwalien County and central Taiwan, including Ren-ai and Puli Townships of Nantao County and some coastal townships of Taichung County and Miaoli County. D3 strain was first detected in Sinyi, Nantao County. The source of D3 in Sinyi could be derived from Alishan Township since an outbreak caused by the same strain occurred earlier in the township.

The PFGE analysis indicated that D1 strain was the major causal agent responsible for the abrupt increase of *shigella* infections in eastern and central Taiwan in 2001 and causing the most of the outbreaks during the year. Since PFGE is a very powerful molecular typing method for most bacteria and fast protocols have been developed, PFGE can be used as a routine method for subtyping clinical bacterial pathogens for monitoring emerging outbreak. The Centers for Disease Control and Prevention of the United States has been setup a PFGE subtyping network, called PulseNet, for monitoring foodborne diseases. Many countries, such as Canada, some European countries, and Japan, have been in the PulseNet network. We should setup a “PulseNet-Taiwan network” to PFGE bacterial isolates of important infectious diseases and to participate in the “PulseNet-World” network, to facilitate the international monitoring and control of emerging bacterial diseases.

## 前言

桿菌性痢疾(shigellosis)為具高度傳染性的腸胃道疾病，只要 10~100 個病原體(*Shigella* spp.)即可能造成感染[1]，在衛生條件落後的地區特別容易引發流行。常見症狀有嘔吐、發燒、下痢或伴隨血便等[2]。致病原為痢疾桿菌(又稱志賀氏菌)，共有 *Shigella dysenteriae* (group A)、*S. flexneri* (group B)、*S. boydii* (group C)與 *S. sonnei* (group D)等四個菌種，菌種可再依血清學區分成 1 至 18 個血清型別[2]，人與人之間的直接接觸傳染是最主要的傳播模式。接觸傳染常是造成家族成員間小規模流行的主因，但在人群擁擠的場所如監獄、托兒所、小學等，經由接觸傳染亦可能導致大規模的爆發流行[3, 4, 5]。經由污染的飲水或食物也常引發大規模的桿菌性痢疾爆發流行[6, 7, 8, 9]。

台灣在 1995 至 1999 年間，每年約有 150 至 550 名桿菌性痢疾病例，平均每 10 萬人口年發生率約為 1 至 3 例，遠低於美國的 8.34 至 12.48 例(1988 至 1997 年)[10]，然而病例分佈有極大的地區差異性，即東部地區比西部平原多，山地鄉比平地多，山地鄉桿菌性痢疾發生率約為平地鄉鎮之 50 倍，以散發性流行為主，發生頻率高，菌株以 *S. flexneri* 2a 佔多數，西部城鎮地區之病例大多以集體感染方式出現，菌株種類以 *S. sonnei* 為主，近五年來，超過數百人感染的爆發流行案例時而有聞[11]。

台灣東部地區與中部山地鄉鎮為桿菌性痢疾流行地區,1996年至2000年間東部與中部地區統計病例數介於25至108例之間,仍而2000年底花蓮市之四維高中爆發一次大規模桿菌性痢疾流行,隨後花東地區發生桿菌性痢疾全面流行,2001年陸續發生桿菌性痢疾爆發流行事件,例如2001年花蓮縣玉里鎮之春日國小與吳江國小爆發流行事件,南投縣信義鄉潭南村於桃芝颱風重創之後的流行事件,桃園縣中壢市公所南投縣仁愛鄉廬山溫泉旅遊團疑似感染桿菌性痢疾事件等;因此2001年花東地區病例數爆增至往年之6倍,中部地區亦於5月後病例數大增,全年200例病例約為往年之2至12倍;統計顯示病例數的增加與*S. sonnei*之感染率具關連性。

對細菌菌株分型所建立的菌株同源性(clonality)關連性結果,並結合病例之流行病學資料,可用來推測病例間的關連性。由於近年來分子生物學的快速發展,目前已有許多的分子分型方法被應用於痢疾桿菌的分型工作,例如 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)、plasmid profile analysis、enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) typing、ribotyping、與 random amplified polymorphic DNA (RAPD) amplification [12, 13, 14, 15],這些分子分型技術的分型效力也被證明優於傳統的血清分型方法。分子分型方法在分型效力、再現性、技術複雜度、操作所需時間、一次可分析樣本數與設備的需求上,各具優缺點;其中 plasmid profile analysis 與 ERIC 之



分型效力較低且再現性低，但可用於快速分析同一爆發流行事件所分離菌株之比對，而用於區域性菌株之比對工作上，則信度差；ribotyping 因其操作相當不易且也相當費時，在分型效力有限的情況下，非一理想之分型方法；PFGE 因具有最高分型效力、高再現性之優點，而被視為分子分型的 gold standard，已被廣泛用於桿菌性痢疾及其它生物之分子分型工作上，可惜 PFGE 具有不易操作、需時長、每次可操作樣本數少、且需昂貴設備之缺點，一般只在少數參考實驗室方能進行此項分析工作，對分析數量不多的菌株而言，PFGE 是很好的選擇，但最近 Ribot 等人[16]在操作技術的改進，已使 PFGE 在操作時間可縮短至 6 小時，整個操作程序可在兩天內完成，由過去的研究顯示 PFGE 分型結果對桿菌性痢疾流病資料有很好的解釋力[17]，因此本研究將利用 PFGE 技術分析台灣東部與中部之 *S. sonnei* 痢疾桿菌菌株，並結合病例之流行病學資料，探討此兩地區近年來由 *S. sonnei* 引發之桿菌性痢疾之流行面貌及可能之傳染模式。

## 材料與方法

**菌株來源與病例相關流病資料:**台灣東部花蓮縣與台東縣 1996 至 2001 年之 *S. sonnei* 菌株 233 株，由疾病管制局第六分局提供，中部 1996 至 2001 年之 *S. sonnei* 菌株 146 株，由疾病管制局第三分局提供，另本局王添貴技正提供桃園縣 9 株菌株，第四分局林建州技正提供嘉義縣阿里山鄉分離之 2 株菌株，供比較之用。同時收集病例之流行病學資料，基本上病例之流病資料來自通報醫療院所填寫之「傳染病個案(含疑似病例)報告單」，與當地衛生所人員填寫之「防疫檢驗檢體送驗單」；資料包括病人之姓名、性別、出生年月日、居住地、發病日期、採檢日期、臨床症狀、投藥情形、與旅遊記錄。有些個案需由疾管局或當地衛生局人員個別面談，以找出與其他個案間之流病關係，並將這些資料輸入 Excel 電腦程式中貯檔。

**菌體包埋處理操作：**菌體將依據 Ribot 等人的方法[16]進行菌體之包埋、酵素處理及清洗，其過程簡述如下：自單一菌落取菌體接種於 3 ml 的 Tryptic Soy Broth (TSB)，37℃ 與 150 rpm 振盪下培養 16 小時，取 250 ul 隔夜培養菌液，離心取得菌體，菌體以 0.5 ml 的 Phosphate Saline Buffer (PBS, 0.01 M phosphate buffer pH 7.4, 0.85% NaCl) 溶洗後，離心取得菌體後再溶於 200 ul 之 PBS，加 12.5 ul 的 proteinase K (20 mg/ml)，混均勻後加入 200 ul 融化之 1% SeaKem Gold agarose (融化後，回溫至 55℃)，並立即以

micropipet 混均勻，取出混合液注入鑄膠模中，放置 4 °C 下 5 min (或室溫下 15 min)使膠體凝固；取出凝固之膠塊並放入 50-ml 短血清試管，管內含 5 ml 的 Cell Lysis Buffer (CLB, 50 mM TrisCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% sarcosine, 0.1 mg/ml proteinase K)，置於 54 °C 下 15 min 後，膠體以 10 ml 預熱於 54 °C 的 ddH<sub>2</sub>O 沖洗 15 min (54 °C 水浴器微振下沖洗)，再以 10 ml 預熱於 54 °C 的 Tris-EDTA buffer (TE, 10 mM TrisCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 沖洗 15 min (54 °C 水浴器微振下沖洗)三次，膠體最後保存於 5 ml 的 TE 中，置於 4 °C 冷藏，以供 PFGE 電泳分析使用。

**PFGE 電泳分析：**以刀片切取約 2-mm 寬含 chromosome DNA 的膠薄片(slice)，膠薄片先置入 200 ul 的 *NotI* 限制酵素緩衝液，室溫下放置 5 min，吸出緩衝液並再注入含 20 units 的 *NotI* 限制酵素之緩衝液，在 37 °C 下放置 2 h，取出緩衝液注入 200 ul 的 0.25X Tris borate EDTA buffer (TBE pH 8.3, 89 mM Tris borate, 2 mM EDTA)，放置 5 min 後，將膠薄片放置於 0.9% 的 agarose 孔洞中(膠薄片緊貼跑膠方向之孔壁面)，孔洞再以 0.9% 的 agarose 填平。

PFGE 電泳使用 Rotaphor type V 脈衝式電泳儀(Biometra Corp., Germany)，以 program 3 (pulse time 8 s – 14 s, lin; angle 120 °; voltage 190 V)跑 10 小時，再以 program 4 (pulse time 19 s – 28 s, lin; angle 120 °; voltage 跑膠 10 小時，膠片以 0.5 ug/ml 的 ethidium bromide 染色 15 min，DNA 圖譜影像以

數位影像處理系統 AlphaEase™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) 拍照貯存成數位檔案，以供後續比對分析。

**脈衝式電泳法圖譜解讀與菌株型別判定：**依照 Tenover 等人[18]提出的準則做為分析解釋基因圖譜之依據，據此分析菌株的流病關係，即菌株間具 3 條以上之 DNA 片斷之差異時，即判為不同型別的菌株，差異在 1、2 或 3 條 DNA 片斷時判為亞型；但因 *S. sonnei* 菌株容易自外界獲取大型 plasmid，因此菌株間的 DNA 片斷差異數目超過 3 條而此差異乃導因於 plasmid 時，此菌株仍將判為相同型別內之不同亞型。

## 結果

**台灣東部 1996-2001 年桿菌性痢疾：**花東兩縣 6 年(1996-2001 年)期間總計出現 711 桿菌性痢疾病例，主要出現在花蓮縣，有 648 例(91%)，台東縣共有 68 例(表一)。花蓮縣病例以秀林鄉最多，其次為人口密集的花蓮市，秀林鄉為一山地鄉，居民以泰雅族原住民為主，卓溪鄉與萬榮鄉兩個山地鄉亦經常出現桿菌性痢疾，玉里鎮在 2001 年爆發數起流行事件，病例大增。感染的痢疾桿菌種類在 6 年期間(1996-2001 年)有明顯的波動情形(圖一)，*S. flexneri* 數目分佈比較平穩，介於 14 至 70 例之間，而 *S. sonnei* 則有較大波動，1997 年的 2 例到 2001 年的 281 例，圖一顯示 *S. sonnei* 的數量與總病例數間有明顯的關連性。

**台灣中部 1996 至 2001 年桿菌性痢疾：**中部六縣市 7 年(1995-2001 年)期間統計有 498 例桿菌性痢疾病例，主要出現在南投縣，有 373 例，佔總數的 75%，其它 5 縣市合計佔 25% (125 例)，其中以台中縣市有較多病例(表二)；2001 年病例數增加分別為 1997 年與 1995 年的 2 倍與 12 倍之多，該年度病例主要出現在南投縣，13% 出現在台中縣。南投縣病例以仁愛鄉最多，其次為信義鄉與埔里鎮，仁愛鄉與信義鄉為南投縣之兩個山地鄉，埔里鎮鄰近兩鄉鎮。2001 年信義鄉病例大增，特別在桃芝颱風過境之後，曾在潭南村發生爆發流行事件，仁愛鄉在 2000 年病例數曾減至 10 例，但 2001

年病例數又爆增至 85 例。感染的痢疾桿菌種類在 1995-2000 年間以 *S. flexneri* (主要為血清型 2a) 為主，*S. sonnei* 所佔比率甚低(圖二)，然而 2001 年 *S. sonnei* 造成的感染激增為 *S. flexneri* 的 5 倍，*S. sonnei* 的感染亦為該年度中部地區病例數倍增的主因。

**PFGE 分子型別：**依照 Tenover 等人[18]提出的準則為依據，即菌株間具 3 條以上之 DNA 片斷之差異時，即判為不同型別的菌株，差異在 1、2 或 3 條 DNA 片斷時為判為亞型；然因 *S. sonnei* 有些菌株 DNA 圖譜差異達 4-5 條 DNA 片斷，差異原因在於大型 plasmid 之有無，而非基因體之差異，故此菌株仍將判為相同型別內之不同亞型，本研究以 D 英文字母加上阿拉伯數字代表不同型別，例如 D1、D2、D3 等，在型別後面加連字號(-)並加上阿拉伯數字代表亞型，其後括弧內之數字代表與代表型別間差異之 DNA 片斷數目，例如 D1-4(3)代表 D1 型別之第 4 個亞型，其與 D1 型別相差 3 個 DNA 片斷。圖三為 PFGE 圖譜，代表 D1、D3 與一些 D1 的亞型，D1 與 D3 相差 13 個 DNA 片斷(圖三，6 & 7)，plasmid 的有無常是造成不同亞型的主因(圖三，2 & 8)，D1-4(3)亞型有出現在基因體的差異(圖三，10)，而 D1-26(5)與 D1 有 5 條 DNA 片斷的差異，但因其中三條 DNA 片斷的差異導因於 plasmid (圖三，9)，故仍將此菌株判定為同一 D1 型別。圖四顯示 D10、D17、D18 菌株之 PFGE 圖譜，D17 及 D18 分別為 1998 年桃園縣武漢國小

與大忠國小桿菌性痢疾爆發流行事件之菌株型別。D1 型別依上述標準，可再細分成 37 個亞型，D3 分成 10 亞型，D10 分成 2 個亞型。

**PFGE 型別年度與地區分佈：**花東地區 231 株 *S. sonnei* 菌株分成 8 個 PFGE 型別，D1 菌株佔 208 株(90%)最多，其次為 D10 菌株(表三)；D1 菌株最先出現於 2000 年，並為 2001 年主要流行菌株，D10 菌株出現在 1996 年，是 1997 年花東地區最主要流行菌株，D16 菌株曾為 1996 年之主要流行菌株。中部地區 146 株 *S. sonnei* 菌株分成 10 個 PFGE 型別，D1 菌株佔 77 株(53%)最多，其次為 D3 菌株 51 株(35%)，D10 菌株有 6 株(表四)；D1 菌株最先出現於 2000 年，在 2001 年成為主要流行菌株，D3 菌株則出現在 2001 年，此菌株目前尚未出現在花東地區，D10 菌株出現在 1997-1998 年，此菌株與 D1 菌株一樣，同時出現在東部與中部地區。合計東部與中部地區 377 株 *S. sonnei* 菌株共分成 15 個 PFGE 型別(表五)，以 D1、D3、及 D10 型別最重要，其中 D1 與 D10 曾在兩地區造成流行，D3 目前侷限於中部地區。

**D1 型菌株流行病學：**D1 型別菌株於 2000 年 10 月引發花蓮市四維高中之爆發流行事件後，2001 年在台灣東部與中部大量引發感染，造成多起爆發流行事件。分析東部與中部 2000 年 10 月以前之 *S. sonnei* 菌株發現，D1 菌株最早出現在台中縣，時間在 2000 年 3 月 31 日，患者名 Micha，男

性 28 歲，為一荷蘭籍旅客，喜愛自助旅行，於 1999 年 10 月至 2000 年 3 月 28 日待在印度，2000 年 3 月 29 日至 3 月 31 日待在新加坡，在 3 月 30 日即感腹瀉、腹痛不適，3 月 31 日入境台灣後，症狀加劇，住進台中縣沙鹿鎮童綜合醫院治療，在該院採檢，菌株於 4 月 5 日送三分局確認；因此造成全台灣 2001 年桿菌性痢疾大流行的菌株，極可能是由該旅客自印度或新加坡引入。D1 菌株在四維高中引發流行事件後，逐漸向外擴散，並於 2001 年 5 月出現在南投縣仁愛鄉的互助村，引發中部地區痢疾的流行。

**D1 型菌株花東地區流行病學：**圖五描繪 D1 菌株在花蓮縣的時空分佈，在 D1 菌株於 2000 年 3 月 31 日進入台中縣後，相隔近 7 個月後引爆花蓮市四維高中爆發桿菌性痢疾流行事件，隨後在一山地鄉——萬榮鄉出現，之後在花蓮市周圍的新城鄉、秀林鄉、吉安鄉擴散傳播，11 月底傳到南部的玉里鎮後，南部的卓溪鄉、富里鎮、壽豐鄉、瑞穗鄉亦相繼傳出病例，另中部的光復鄉、壽豐鄉與鳳林鎮亦在 2001 年初傳出感染事件出現；同樣位於東部的台東縣亦於 2001 年 1 月中確定有 D1 的感染病例，台東縣目前確定至少 6 例 D1 菌株感染病例。

**D1 型菌株中台灣流行病學：**圖六描繪 D1 菌株在中部縣市鄉鎮的時空分佈；D1 菌株在 2000 年 3 月 31 日境外移入台灣台中縣，半年後引爆花蓮市四維高中爆發流行事件，再經半年的 2001 年 5 月傳播到南投縣仁愛鄉的



互助村，5 個月內仁愛鄉大部份村落皆出現病例，由於仁愛鄉與鄰近的台中縣和平鄉境內叢山峻嶺，交通不便，疾病大致沿著道路交通路線散播(圖六)，痢疾在台中縣與苗栗縣沿海幾個鄉鎮的傳播亦見地域上的關連性。仁愛鄉的力行村位於中橫附近，交通上由埔里鎮台 14 線經霧社出入並不方便，居民大多由中橫公路到花蓮縣或經南澳鄉到宜蘭縣，流病調查認為力行村的痢疾應由花蓮縣或宜蘭縣的南澳鄉引入。

**D3 型菌株流行病學：**南投縣信義鄉在 2001 年 7 月前，痢疾病例大多為 *S. flexneri* 所感染，但在 7 月底桃芝颱風重創信義鄉後，8 月初在潭南村與地利村發生痢疾的爆發流行事件，感染菌株皆為 *S. sonnei*，當地防疫人員懷疑病原來自仁愛鄉，但 PFGE 分型結果發現信義鄉的 *S. sonnei* 與仁愛鄉完全不同，完整的分型資料顯示信義鄉在 2001 底之前，所有 *S. sonnei* 菌株皆屬 D3 型別，此菌株在桃芝颱風之前的 7 月份已出現在望美村與羅娜村(兩村地理位置上鄰近阿里山鄉)，流病調查人員認為信義鄉與嘉義縣的阿里山鄉有地緣上的關係，兩地有省公路連接具交通之便(圖七)，信義鄉的病原可能與 4-6 月時阿里山鄉的痢疾爆發流行事件有關連，PFGE 分析兩地的菌株，証實此項推測，兩地菌株皆屬 D3 型別(圖八)，且此菌株早於颱風之前已經進入信義鄉，在颱風破壞當地的飲用水系統之後，引發流行。D3 菌株亦於 8 月底傳到埔里鎮與仁愛鄉，目前 D3 菌株已繼 D1 菌株之後在仁愛鄉

成為主要流行菌株。

**D10 型菌株流行病學：**D10 型菌株在 1996 年 12 月出現在花蓮縣，1997 年成為花東地區最主要的流行菌株，並於 1997 年 8 月之後傳到南投縣南投市、埔里鎮與仁愛鄉。

**桃園縣中壢市公所旅遊團感染桿菌性痢疾事件：**桃園縣中壢市公所職員與當地里長組團於 2001 年 9 月底到南投縣仁愛鄉精英村的廬山溫泉旅遊後感染桿菌性痢疾，有 15 名以上人員檢出 *S. sonnei*，桃園縣衛生局人員認為該旅遊團應在仁愛鄉遭到感染，並要求疾病管制局進行菌株分析以利追查案情。PFGE 分析共分析旅遊團員分離之 6 株菌株，桃園縣其它地區 3 株菌株、仁愛鄉精英村 8 株菌株與大同村 1 株菌株(表六)，結果顯示旅遊團 6 株菌株同屬 D1-25(2)菌株，與之前桃園縣 3 株菌株屬不同型或不同亞型，D1-25(2)具有一特定之 plasmid (圖九)，雖屬於 D1 之一亞型，但此亞型從未曾在此之前所分析過之 200 多株 D1 菌株出現過，精英村與大同村也有菌株同屬 D1-25(2)，特別是在 9 月 24 日發病的蘇姓病患，其父親在旅遊團投宿的飯店打雜工，住在飯店後之鐵皮屋，其在女兒發病前也曾腹瀉過，蘇姓病例發病時間接近但早於旅遊團到達時間，因此中壢市旅遊團的感染地點相當可能在仁愛鄉精英村。

## 討論

本研究利用 PFGE 的技術分析台灣東部與中部近 6 年來的 *S. sonnei* 菌株，分析結果能很有效的解釋 *S. sonnei* 在該兩地區所引發的桿菌性痢疾流行，也能解釋此地區發生的幾次爆發流行事件，特別是追蹤出 2001 年台灣桿菌性痢疾大流行的原因，大多起因於 2000 年初之一個境外移入的菌株(D1 型)，研究結果亦指出南投縣仁愛鄉與信義鄉的流行菌株不同，並顯示出不同菌種在時間上的動態消長情形，即單一菌株常難以持續流行，例如 1996-1997 年流行 D10 菌株，但此菌株到 1999 年即消失不見。

在研究方法上，PFGE、技術已被應用於分析 *S. sonnei* 菌株，以調查 *S. sonnei* 引起之食品中毒案[19]與托兒中心之流行案件[12]、偵測地區桿菌性痢疾之傳染形態(patterns of transmission)[20]等。然而本研究發現，285 株 D1 型的 *S. sonnei* 菌株，即有 37 種亞型，這些亞型大多在於大型 plasmid 的差異，顯示 plasmid profile analysis 的技術是不適合應用在 *S. sonnei* 的分析應用。

PFGE 被認為是現行的分子分型技術中分型效力最高的技術，然而過去 PFGE 的操作甚為費時、費力，需要經過很好訓練技術純熟的人員方能操作，然而最近 Ribot 等人[16]發表的操作方法，對 Gram-negative 的細菌只需 6 小時的時間即可上機跑膠，兩天即能得到結果，既省時且操作容易，

使得每天可分析的菌株量由 20-30 株菌株提升到可分析 80-120 株菌株，而且所得到的圖譜清晰容易比對，本研究利用 Ribot 等人的方法，於四個月期間即分析 500 多株菌株，因此多年來即構思利用 PFGE 技術建構「台灣重要病原細菌之 DNA 指紋資料庫」的想法，已不再是不可能的事，目前美國疾病管制局(Centers for Disease Control and Prevention)已建構一利用 PFGE 進行細菌分型的網路系統，稱之為 PulseNet，用於監測流行中的重要細菌性傳染病[21]，此系統計畫擴大連結成為世界性的監測網，除了歐美各國外，鄰近的日本亦已加入此系統，台灣有必要儘速建立本土的”PulseNet”，強化細菌性傳染病監測，並加入世界性的監測網，達到防疫國際化的目標。

本研究只進行 *S. sonnei* 的分析，乃因 2001 年的痢疾大多是 *S. sonnei* 所造成的，且限於時間先進行 *S. sonnei* 菌株的分析。*S. flexneri* 一直是引發台灣東部與中部山地鄉痢疾的主因，初步分析結果發現 *S. flexneri* 與 *S. sonnei* 相當不同，*S. sonnei* 的基因體相當穩定，但容易獲得外界的 plasmid，推測其容易有抗藥性的變化，*S. flexneri* 顯得不易有多樣的 plasmid，但其基因體很容易變化，經常同一病人相差 1-2 禮拜分離之菌株，其基因體排列已有變化，因此在解讀上相當不易，此需借助於電腦軟體的分析，例如 BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)，*S. flexneri* 菌株的 PFGE 分析有必要進行，方能對台灣桿菌性痢疾的流行之完整面貌有所了解。

PFGE 分析結果確定台灣 2001 年的桿菌性痢疾大流行，乃導因於一境外移入的 *S. sonnei* 菌株，南投縣仁愛鄉、台中縣與苗栗縣沿海的痢疾皆源於同一型別菌株的感染，南投縣仁愛鄉的病例，其病原與四月份嘉義縣阿里山鄉痢疾爆發流行事件的病原相同，桃園縣中壢市旅遊團痢疾感染事件與南投縣仁愛鄉有關。為了加強痢疾的即時監測，並追蹤防治的成效，有必要建立痢疾桿菌的 PFGE 分析中心，建立痢疾桿菌的 DNA 指紋資料庫，並加入國際上利用 PFGE 分析病原細菌 DNA 圖譜的監測網，進行國際合作，達到防疫國際化的目標。

## 結論與建議

- 1、 造成台灣 2001 年桿菌性痢疾大流行的病原菌，極可能是於 2000 年 3 月底由外籍旅客境外引入台灣的 *S. sonnei* 菌株。
- 2、 PFGE 對 *S. sonnei* 菌株的分型效果非常有助於桿菌性痢疾流行病學研究，本研究指出台灣 2001 年桿菌性痢疾大流行主要導因於同一菌株的傳播，並指出其在台灣東部、中部山區與沿海地區傳播情形，南投縣信義鄉流行事件之病原與嘉義縣阿里山鄉的病原同源，且支持桃園縣中壢市旅行團痢疾感染事件的流病調查結果。
- 3、 建議應繼續針對 *S. flexneri* 菌株的 PFGE 分析研究，了解此菌種的分子流行病學。
- 4、 建議成立重要傳染性病原細菌的 PFGE 分析核心實驗室，期能針對如桿菌性痢疾等流行菌株進行即時的分子分型工作，監測疾病之流行，以收立即防治之時效並追蹤防治之成效，而非只是成為學術研究，發表論文而已。
- 5、 建議應成立台灣本土之「重要傳染性病原細菌之 DNA 指紋資料庫」，加入以美國疾病管制局為核心之 PulseNet 國際監測網，落實防疫國際化之目標。
- 6、 建議檢討桿菌性痢疾防治策略，應加強山地部落之長期衛生教育，對

個案及家庭進行長期衛教與流病追蹤，以取代目前「以檢驗做防治，用藥做防治」之策略。

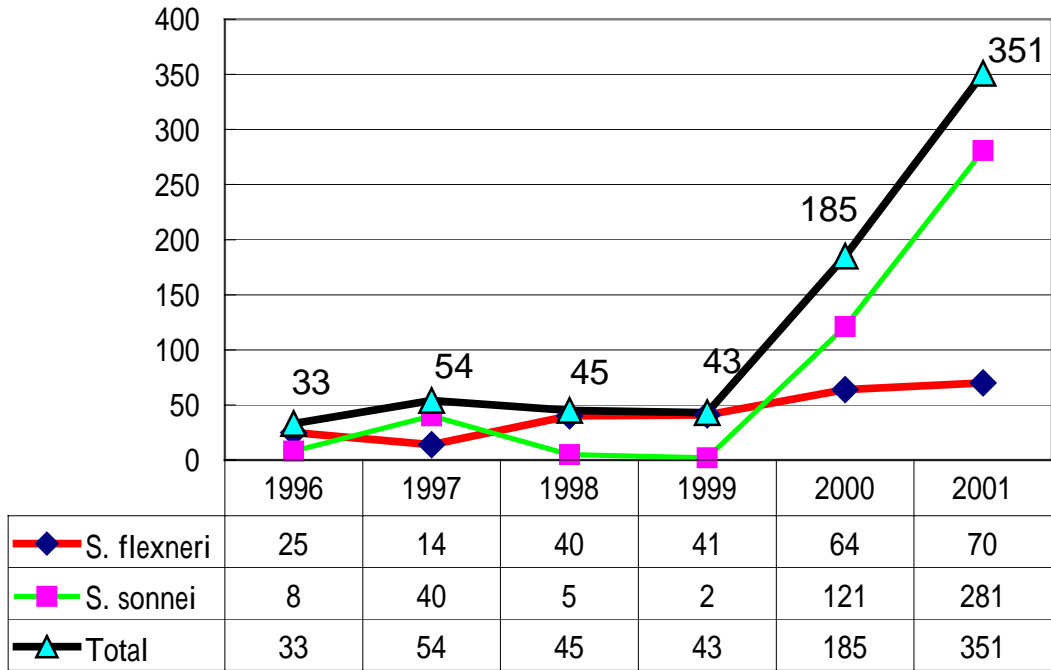
## 參考文獻

1. DuPont HL, Levine MM, Hornick RB: Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis* 1989; 159: 1126-8.
2. Benenson AS: *Control of Communicable Diseases Manual*. 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 1995; 421-25.
3. Caldwell GG, Fiegel D, Bryant L: *Shigella* in Tulsa County, 1993: epidemiology, day care center association, and control. *J Okla State Med Assoc* 1995; 88:198-204.
4. Maguire HC, Seng C, Chambers S: *Shigella* outbreak in a school associated with eating canteen food and person to person spread. *Commun Dis Public Health* 1998; 1:279-80.
5. 邱乾順、李翠鳳。某少年觀護所桿菌性痢疾流行調查。疫情報導。民國八十六年十二月；第十三卷第十二期：371-85 頁。
6. Dunn RA, Hall WN, Altamirano JV: Outbreak of *Shigella flexneri* linked to salad prepared at a central commissary in Michigan. *Public Health Rep* 1995; 110:580-86.
7. Swaddiwudhipong W, Karintraratana S, Kavinum S: A common-source outbreak of shigellosis involving a piped public water supply in northern Thai communities. *J Trop Med Hyg* 1995; 98: 145-50.
8. 邱瑞斌、魏秀芬、陳國東等人。台中市某小學痢疾流行事件調查初報。

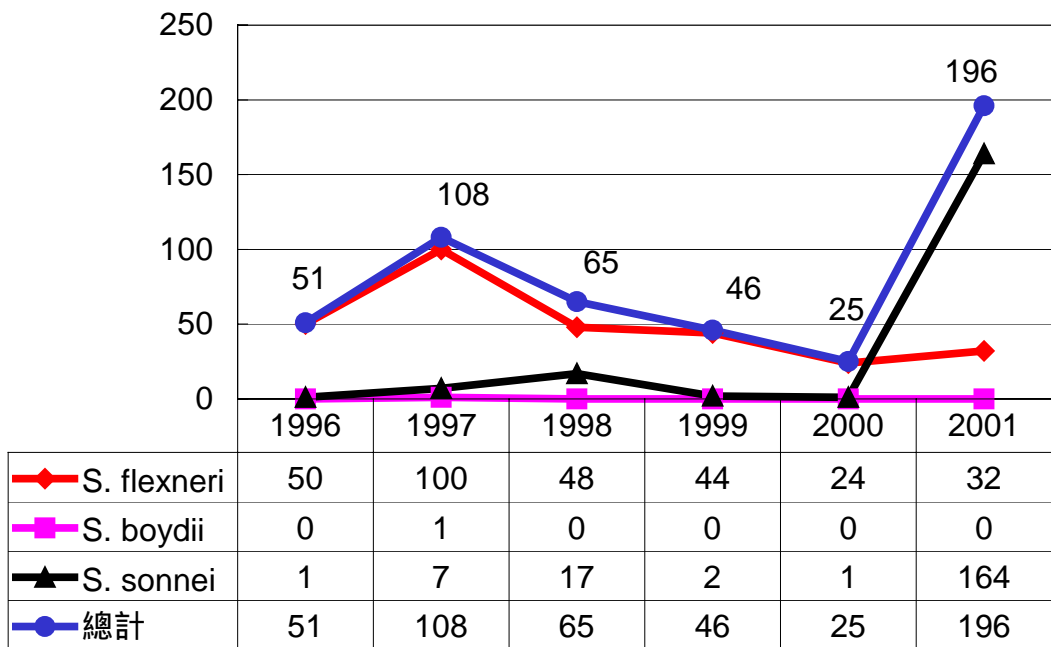


- 疫情報導 民國八十三年四月；第十卷第四期：75-88 頁。
9. 盧冠霖、江大雄、潘子明等。新竹縣關西鎮某國小桿菌性痢疾爆發事件。  
疫情報導 民國八十七年五月；第十四卷第五期：147-57 頁。
10. CDC: Summary of notifiable diseases, United States 1997. MMWR 1998; 46(No. 54):73.
11. Pan TM: Bacillary dysentery in Taiwan, 1995-1996. Epidemiol Bulletin 1997; 13:151-61.
12. Brian MJ, Van R, Townsend I: Evaluation of the molecular epidemiology of an outbreak of multiple resistant *Shigella sonnei* in a day-care center by using pulsed-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. J Clin Microbiol 1993; 31:2152-6.
13. Liu PY, Lau YJ, Hu BS: Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. J Clin Microbiol 1995; 33:1779-83.
14. Mendoza MC, Martin MC, Gonzalez-Hevia MA: Usefulness of ribotyping in a molecular epidemiology study of shigellosis. Epidemiol Infect 1996; 116:127-35.
15. Soldati L, Piffaretti JC: Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. Res Microbiol 1991; 142:489-98.
16. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K: Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 2001; 39:1889-94.

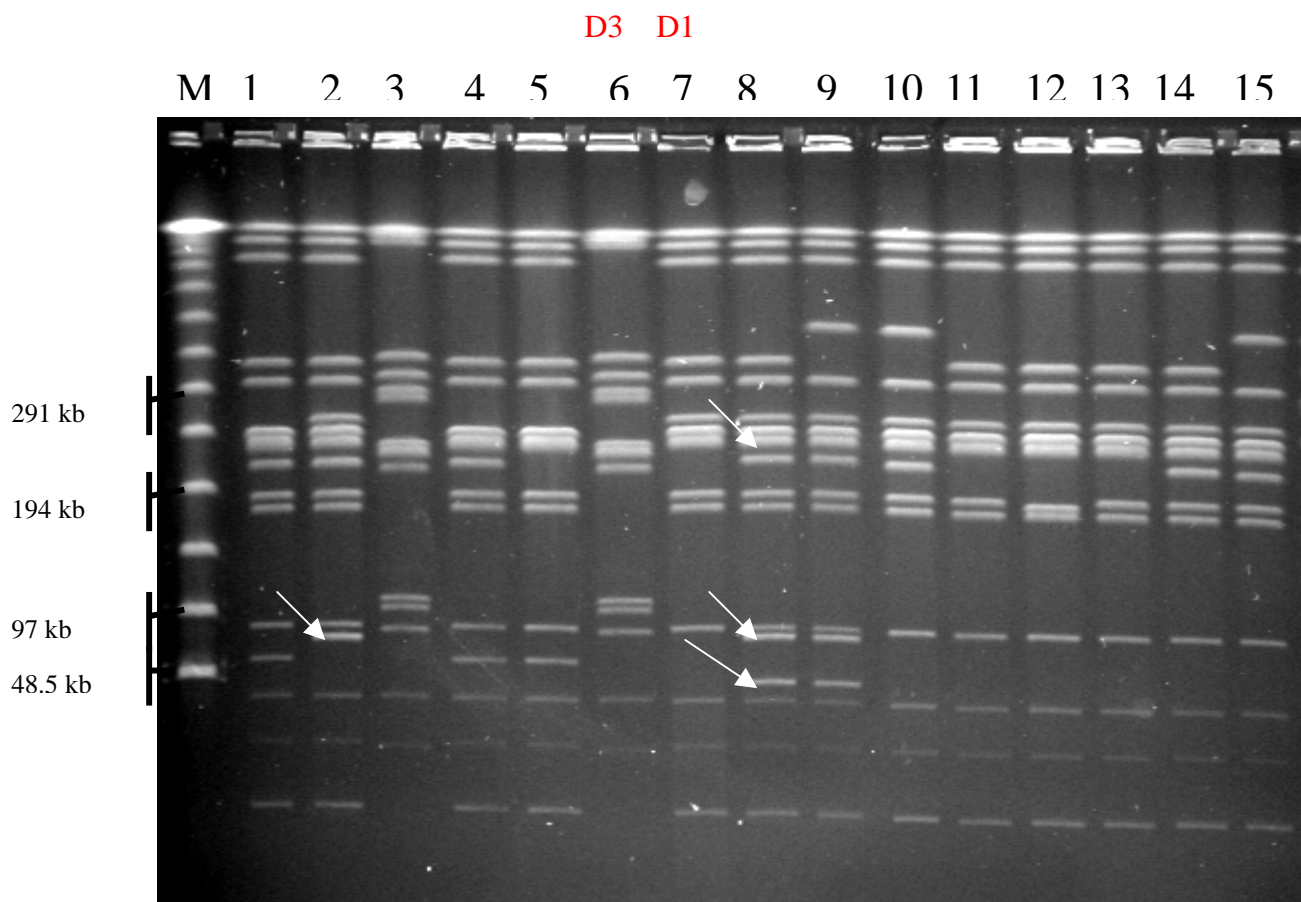
17. Chiou CS, Hsu WB, Wei HL: Molecular epidemiology of a *Shigella flexneri* outbreak in a mountainous township in Taiwan, Republic of China. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1048-56.
18. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-39.
19. Gericke B, Liesegang A, Reissbrodt R: Analysis of a foodborne *Shigella sonnei* outbreaks in northern Europe by conventional and molecular methods. *Med Microbiol Lett* 1995; 4:165-72.
20. Litwin CM, Leonard RB, Carroll KC: Characterization of endemic strains of *Shigella sonnei* by use of plasmid DNA analysis and pulsed-field gel electrophoresis to detect patterns of transmission. *J Infect Dis* 1997; 175:864-70.
21. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB: PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:382-89.



圖一、花東地區 1996 至 2001 年痢疾桿菌菌種分佈，*S. sonnei* 的數量與總病例數有明顯的關連性。

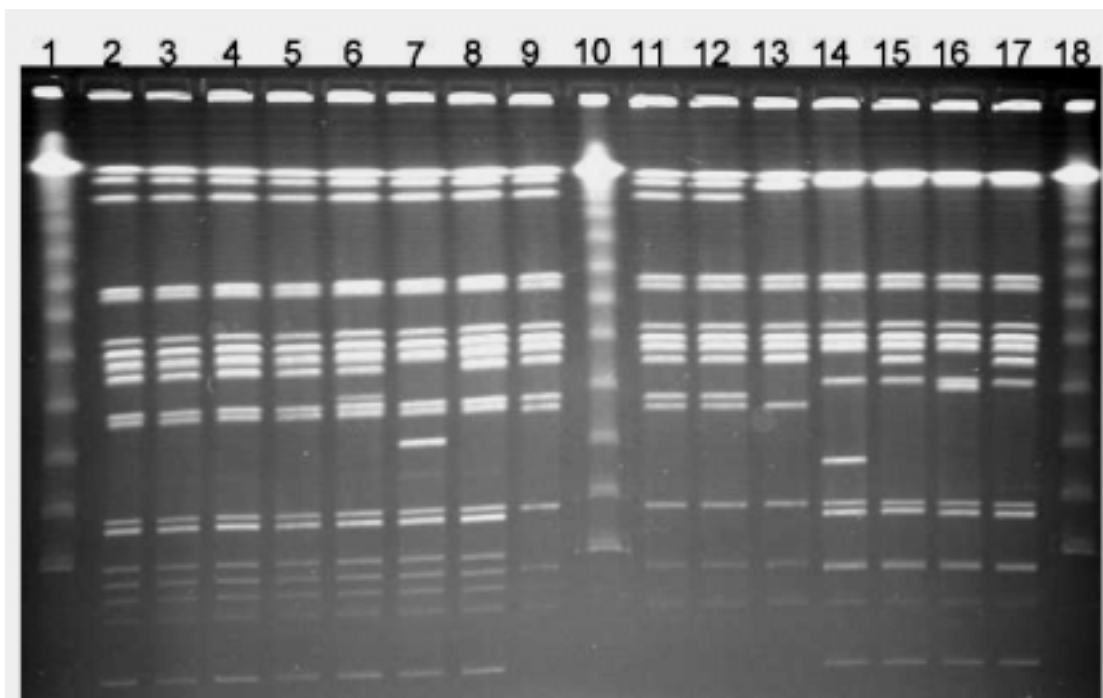


圖二、中部六縣市 1995 至 2001 年痢疾桿菌菌種分佈，除了 2001 年外，*S. sonnei* 的數量所佔比率甚少，而 2001 年 *S. sonnei* 病例數激增，是該年度總病例數增加之主要原因。



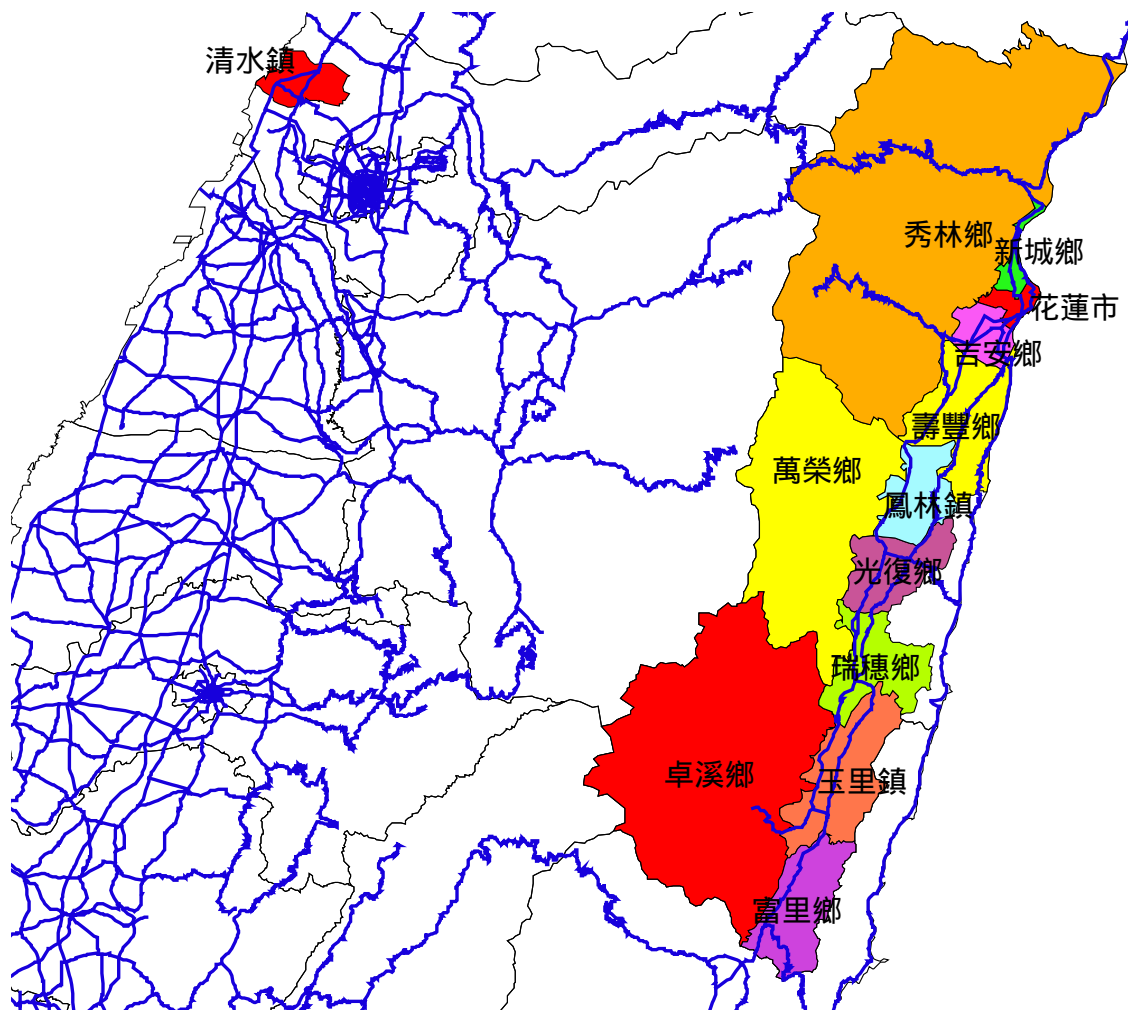
圖三、PFGE 圖譜。菌株間具 3 條以上之 DNA 片斷之差異時，即判定為不同型別的菌株，差異在 1、2 或 3 條 DNA 片斷時為判為亞型。M 為 lambda DNA 多合體之 size marker。劍頭指向之 DNA 片斷為 plasmid，plasmid 的有無，是造成 *S. sonnei* 不同亞型的主因。1-12 之菌株編號及 PFGE 型別如下，6 與 7 分別代表兩個主要流行菌株 D3 與 D1；圖譜之菌株編號及 PFGE 型別如下。

號碼	菌株編號	PFGE 型別
1	C23525	D1-6(3)
2	C23679	D1-9(2)
3	C23680	D3
4	C23746	D1-6(3)
5	C23752	D1-11(2)
6	C23784	D3
7	90E2992	D1
8	90E2994	D1-12(3)
9	90E2995	D1-26(5)
10	90E2998	D1-4(3)
11	90E3002	D1
12	90E3005	D1
13	90E3010	D1
14	90E3157	D1-7(1)
15	90E3158	D1-4(3)

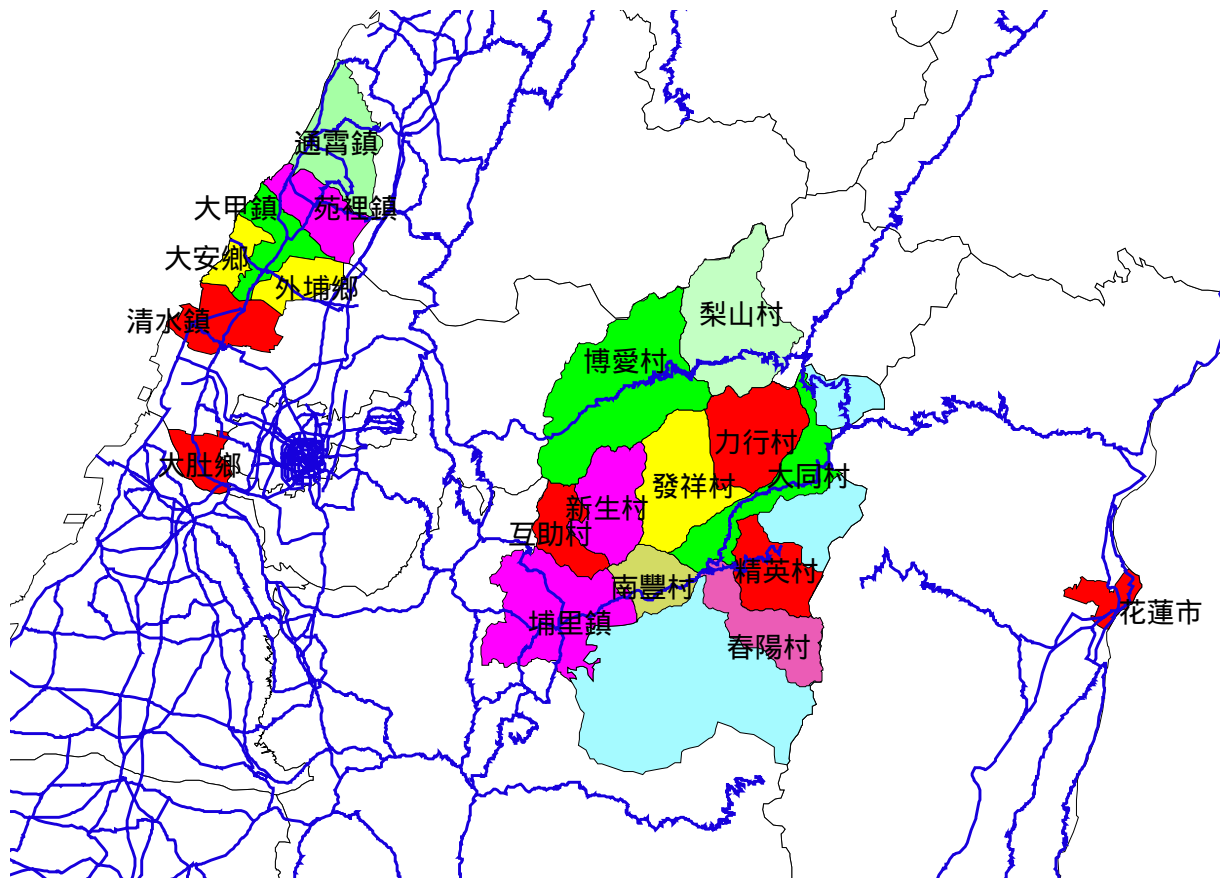


圖四、PFGE 圖譜。代表 D10、D17、D18 型別及其亞型，D17 及 D18 分別為 1998 年桃園縣武漢國小與大忠國小桿菌性痢疾爆發流行事件之菌株型別。圖譜之菌株編號及 PFGE 型別如下。

編號	菌株編號	PFGE 型別
1	Marker	
2	96E47360	D10
3	96E 47382	D10
4	96E 47397	D10
5	96E 47498	D10
6	96E 47499	D10
7	96E 47517	D10-4(2)
8	96E 47518	D10
9	C12324	D17
10	Marker	
11	C 12342	D17
12	C 12435	D17
13	C 12446	D17-1(3)
14	C 12941	D18-1(2)
15	C 12971	D18
16	C 12999	D18-2(2)
17	C 13039	D18
18	Marker	



圖五、D1 菌株在花蓮縣各鄉鎮之時空分佈，藍色粗線代表省公路線。2000-2001 年在各地出現之經過與兩年間感染之個案數：2000/3/31 境外移入台中縣清水鎮  
 2000/10/23 花蓮市，124 例    2000/10/31 萬榮鄉，15 例    2000/11/3 新城鄉，21 例  
 2000/11/5 秀林鄉，77 例    2000/11/15 吉安鄉，48 例    2000/11/27 玉里鎮，61 例  
 2000/12/5 卓溪鄉，13 例    2001/1/29 富里鄉，14 例    2001/2/13 壽豐鄉，3 例  
 2001/5/22 瑞穗鄉，2 例    2001/7/8 光復鄉，3 例    2001/7/20 鳳林鎮，3 例。



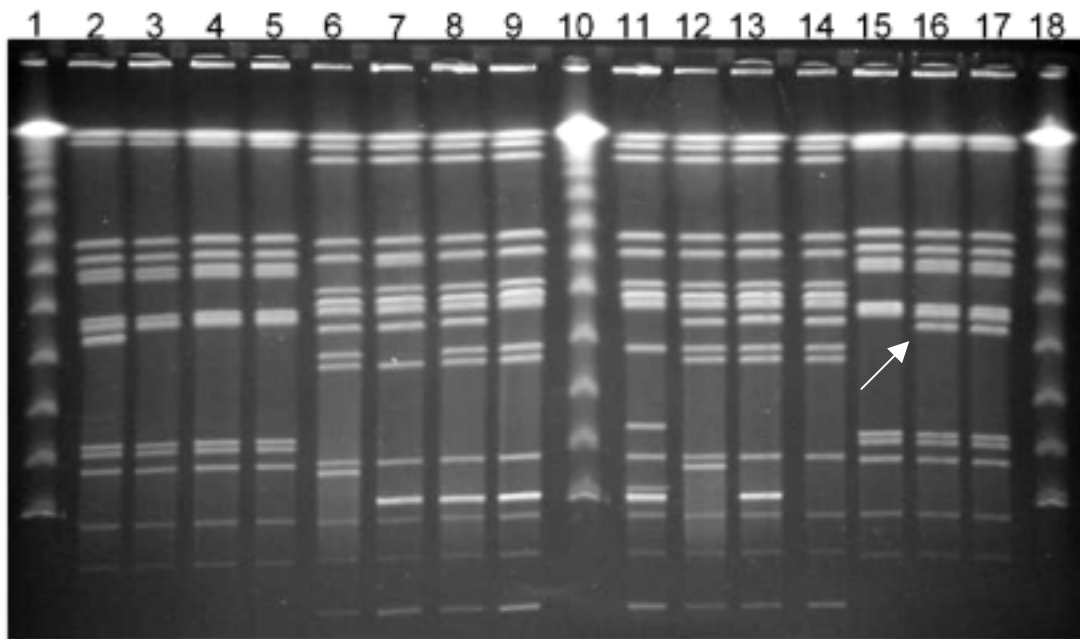
圖六、D1 菌株在中台灣鄉鎮或山地鄉村里間之時空分佈，藍色粗線代表省公路線。

2000-2001 年在各地出現之經過與兩年間感染之個案數：2000/3/31 境外移入台中縣清水鎮  
 2000/10/23 花蓮縣花蓮市, 124 例  
 2001/5/17 南投縣仁愛鄉互助村, 9 例  
 2001/5/30 埔里鎮, 7 例  
 2001/6/16 南投縣仁愛鄉南豐村, 1 例  
 2001/8/7 南投縣仁愛鄉力行村, 25 例  
 2001/8/21 台中縣和平鄉梨山村, 2 例  
 2001/8/23 南投縣仁愛鄉發祥村, 8 例  
 2001/8/24 台中縣和平鄉博愛村, 1 例  
 2001/9/2 苗栗縣通霄鎮, 1 例  
 2001/9/4 台中縣大甲鎮, 5 例  
 2001/9/9 南投縣仁愛鄉春陽村, 1 例  
 2001/9/11 苗栗縣苑裡鎮, 1 例  
 2001/9/25 南投縣仁愛鄉精英村, 2 例  
 2001/9/23 台中縣外埔鄉, 1 例  
 2001/9/30 台中縣大肚鄉, 1 例  
 2001/10/2 台中縣大安鄉, 4 例  
 2001/10/8 南投縣仁愛鄉新生村, 3 例  
 2001/10/13 南投縣仁愛鄉大同村, 1 例。

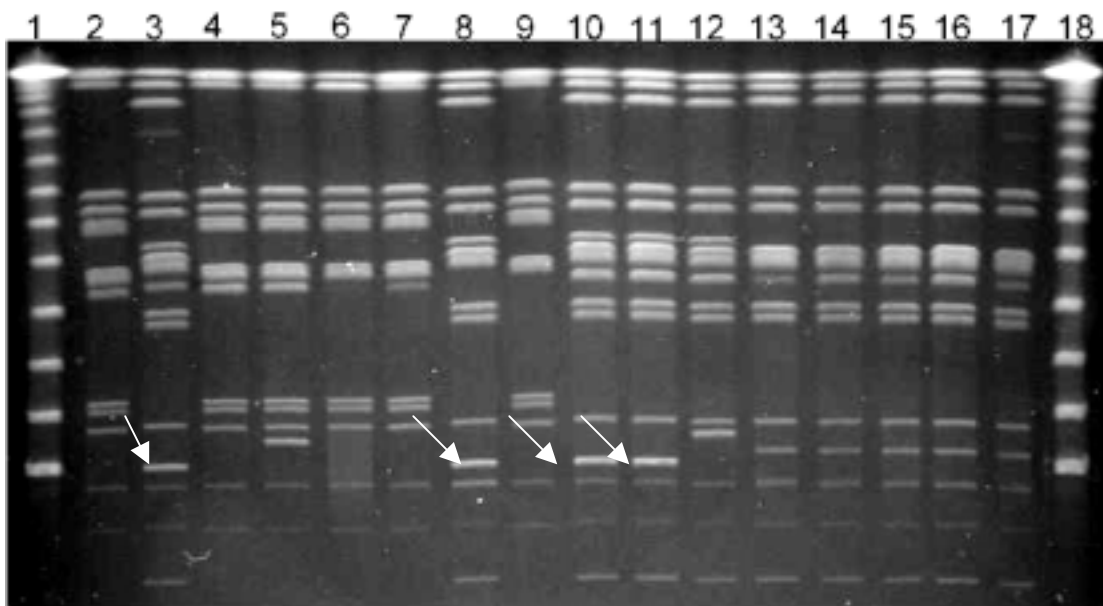


圖七、阿里山鄉與信義鄉望美村、羅娜村、潭南村、地利村地理位置圖，兩鄉間有省公路相交通。綠色粗線代表省公路。





圖八、PFGE 圖譜。第 16 & 17 行圖譜來自兩菌株來自阿里山爆發流行事件，屬於 D3 型別，與信義鄉之 D3 (第 2 行圖譜) 菌株相同，與 D3-1(1) 菌株(第 3-5、15 行) 只差一 DNA 片斷(白色劍頭所示)，此 DNA 為一巨大 plasmid，容易在次培養(subculturing)過程中消失。



圖九、PFGE 圖譜。第 3、8 行圖譜菌株來自仁愛鄉精英村，10、11 行圖譜菌株來自桃園縣中壢市，同屬 D1-25(2) 亞型，此亞型具有一多套的 plasmid(白色劍頭所示)。

表一、花東地區 1996 至 2001 年桿菌性痢疾地區分佈

	1996	1997	1998	1999	2000	2001	總計
<b>花蓮縣</b>							
秀林鄉	6	12	11	13	44	105	191
卓溪鄉	5	0	7	3	8	13	36
萬榮鄉	4	1	8	4	11	7	35
花蓮市	3	9	5	8	77	51	153
玉里鎮	1	1	0	1	2	75	80
其它	7	13	10	9	27	87	153
小計	26	36	41	38	169	338	648
<b>台東縣</b>							
台東市	3	8	2	2	3	4	22
蘭嶼鄉	1	1	2	0	1	0	5
海端鄉	1	2	0	1	3	2	9
其它	2	7	0	2	9	7	27
小計	7	18	4	5	16	13	63
<b>總計</b>	<b>33</b>	<b>54</b>	<b>45</b>	<b>43</b>	<b>185</b>	<b>351</b>	<b>711</b>

表二、台灣中部六縣市 1995 至 2001 年桿菌性痢疾分佈

	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	總計
<b>南投縣</b>								
仁愛鄉	4	35	38	26	18	10	85	216
埔里鎮	0	3	14	9	7	4	11	48
信義鄉	3	1	4	3	7	5	69	92
其它	1	0	3	10	0	0	3	17
小計	8	39	59	48	32	19	168	373
台中市	1	2	45	3	2	0	0	53
台中縣	6	6	3	9	7	4	24	59
彰化縣	1	0	2	1	0	0	2	6
雲林縣	0	2	0	0	0	0	0	2
苗栗縣	0	0	0	1	2	0	2	5
<b>總計</b>	<b>16</b>	<b>49</b>	<b>109</b>	<b>62</b>	<b>43</b>	<b>23</b>	<b>196</b>	<b>498</b>

表三、花東地區 1996-2001 年 *Shigella sonnei* 菌株 PFGE 型別年度分佈

	1996	1997	1998	1999	2000	2001	總計
<b>D1</b>					<b>31</b>	<b>177</b>	<b>208</b>
D5					1		1
D6					1		1
D7						1	1
D8						1	1
<b>D10</b>	<b>1</b>	<b>13</b>					<b>14</b>
D15	1						1
<b>D16</b>	<b>4</b>						<b>4</b>
<b>總計</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>33</b>	<b>179</b>	<b>231</b>

表四、台灣中部地區 1996-2001 年 *Shigella sonnei* 菌株 PFGE 型別年度分佈

	1996	1997	1998	1999	2000	2001	總計
<b>D1</b>					<b>1</b>	<b>76</b>	<b>77</b>
<b>D3</b>						<b>51</b>	<b>51</b>
D4						2	2
D8	1						1
D9		3					3
<b>D10</b>		<b>3</b>	<b>3</b>				<b>6</b>
D11			1				1
D12			1				1
D13			3				3
D17				1			1
<b>總計</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>129</b>	<b>146</b>

表五、台灣東部與中部地區 1996-2001 年 *Shigella sonnei* 菌株 PFGE 型別年度分佈

	1996	1997	1998	1999	2000	2001	總計
<b>D1</b>					<b>32</b>	<b>253</b>	<b>285</b>
<b>D3</b>						<b>51</b>	<b>51</b>
D4						2	2
D5					1		1
D6					1		1
D7						1	1
D8	1					1	2
D9		3					3
<b>D10</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>3</b>				<b>20</b>
D11			1				1
D12			1				1
D13			3				3
D15	1						1
D16	4						4
D17				1			1
<b>總計</b>	<b>7</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>34</b>	<b>308</b>	<b>377</b>

表六、桃園縣中壢市及其它鄉鎮分離之 *S. sonnei* 菌株與仁愛鄉所分離菌株之 PFGE 型別

姓 名	發病日	縣市	鄉鎮區	村里	菌株種類	PFGE 型別
陳 xx	90/9/1	桃園縣	桃園市		<i>S. sonnei</i>	D14
巫 xx	90/9/12	桃園縣	平鎮市		<i>S. sonnei</i>	D3-12(2)
邱 xx	90/9/24	桃園縣	大溪鎮		<i>S. sonnei</i>	D1-7(1)
蘇 xx	90/9/24	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
林 xx	90/9/25	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D3
林 xx	90/9/30	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D3
吳 xx	90/10/4	桃園縣	中壢市		<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
張 xx	90/10/4	桃園縣	中壢市		<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
施 xx	90/10/4	桃園縣	中壢市		<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
林 xx	90/10/4	桃園縣	中壢市		<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
汪 xx	90/10/4	桃園縣	中壢市		<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
吳 xx	90/10/5	桃園縣	中壢市		<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
沈 xx	90/10/5	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D3-1(1)
黃 xx	90/10/7	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D3-7(1)
江 xx	90/10/13	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D1-27(1)
邱 xx	90/10/13	南投縣	仁愛鄉	大同村	<i>S. sonnei</i>	D1-25(2)
林 xx	篩檢(無病狀)	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D3-1(1)
林 xx	篩檢(無病狀)	南投縣	仁愛鄉	精英村	<i>S. sonnei</i>	D3