

計畫編號：DOH96-DC-1002

行政院衛生署疾病管制局 96 年度科技研究發展計畫

台灣地區類鼻疽伯克氏菌之地域分佈與影響其分佈之環境因子探討

研究報告

執行機構：國立高雄師範大學 生物科技系

計畫主持人：陳亞雷

共同主持人：賴信志

研究人員：蕭宇珊

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 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.....	8
結果.....	11
討論.....	14
結論與建議.....	16
計畫重要研究成果及具體建議.....	18
參考文獻.....	20
圖.....	23
表.....	29

中文摘要

類鼻疽係 *Burkholderia pseudomallei* 所引起的致死性感染症，是一種新興疾病，曾於 2005 年於台灣發生爆發性感染，但相關的流性病學資料仍缺乏。鑒於類鼻疽病傳染模式，主要是藉由吸入或接觸污染的土壤(塵埃)所致。為了確認 *B. pseudomallei* 在台灣地區的分佈概況，以分析台灣地區可能盛行的區域。本計畫以國道與省道之兩側，平均每 5-10 km、採集深度為 300-600 mm，進行台灣耕植地的規模性取樣。所有的檢體，使用 PCR 偵測與培養確認的方法分析。結果顯示 *B. pseudomallei* 於台灣地區分佈並不均勻，主要的陽性分離地為台南仁德(分離率 26.6%；PCR 陽性率 29.7%)、屏東滿洲(10.0%；25.0%)、台中豐原(5.2%；12.5%)與嘉義水上(4.5%；11.3%)等四地。其它地區的 PCR 陽性檢出率為 1.6-13.6%，但無活菌分離。26 株經生化與分子鑑定確認之環境分離株，使用 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 基因分型方法，可分為八型，依此基因型分析，嘉義水上、台南仁德與屏東滿洲等地的分離菌有地緣關係，而台中豐原則呈獨立的基因型。這些分離菌之 16S RNA 基因呈現 CAT/GGC heterozygous 的獨特表徵，顯與國際間報告者不同。多種理化與生物因子影響 *B. pseudomallei* 呈不均勻的地域分佈，其中 *B. cepacia* genomovar IIIa 廣存於台灣耕植土中，7.4% 之分離菌對 *B. pseudomallei* 有明顯的拮抗作用，抑制 *B. pseudomallei* 的生長。在模擬 pH 值、溫度、與鹽類濃度變化之環境逆境，*B. cepacia* 較 *B. pseudomallei* 有明顯的適應能力。這些因素可能影響 *B. pseudomallei* 無法廣泛分佈於台灣耕植土的原因。

關鍵詞：類鼻疽伯克氏菌、地域分佈、生物拮抗、環境因子

英文摘要

Melioidosis, an emerging disease, caused by *Burkholderia pseudomallei*, is a fatally infectious disease. Melioidosis had been occurred outbreak in 2005 in Taiwan. Human acquired melioidosis is via directly subcutaneous inoculation or pulmonary inhalation of soil or dust containing *B. pseudomallei*. Thus, this project aimed to survey the geographical distribution of *B. pseudomallei* in Taiwan. The soil at a depth of 300-600mm was sampled following as both sides of national or province roads every 5-10 km. Results indicated that Ren-Der (Tai-Nan), Mein-Chou (Ping-Tong), Shui-Shang (Chiayi) and Feng-Yuan (Tai-Chung) was 26.6% and 29.7%, 10.0% and 25.0%, 5.2% and 12.5%, and 4.5% and 11.3% of isolation- and PCR-positive rate, respectively. Although 1.6-13.6% of PCR-positive rate was detected in other area, no culturalbe *B. pseudomallei* were found in these areas. A total of 26 strains, have been identified to *B. pseudomallei* with biochemical and molecular diagnosis, were typed using RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) methods. The isolates from Ren-Der, Mein-Chou and Shui-Shang were shared with same RAPD types, but theolates from Feng-Yuan exhibited independent type. Some strains were harbored with CAT/GGC heterozygous characteristics in 16S RNA gene sequences. Results indicated that the isolates from Taiwan had independent molecular features, which were different from the isolates from international. However, the unevenly distribution of *B. pseudomallei* in Taiwan was affected by several physical, chemical and biological factors. The isolates of *B. cepacia* genomovar IIIa were widely distributed in cropped field in Taiwan. Among of them, 7.4% of isolates were capable of inhibiting the growth of *B. pseudomallei*. In the media mimicking adverse circumstances, for example, change of pH value, temperature and salt concentration, the adaptive abilities of *B. cepacia* were better than those of *B. pseudomallei*. This is one of reasons to explain why the geographical distribution of *B. pseudomallei* in Taiwan is uneven.

Key words : *Burkholderia pseudomallei* 、 *geographical distribution* 、 *biological antagonistic* 、 *environmental factors*

前言

1. 類鼻疽病於台灣地區的分佈與盛行

類鼻疽依本國傳染病管制法的分類，是屬於第四類的新興傳染病。台灣於1984年以前，並未有類鼻疽的病例報告。至1984年才發現首例境外感染的個案(Lee *et al.*, 1985)。直至1993年起，台灣的類鼻疽病例數開始增加。雖然病歷的分佈，仍屬於散發性，但是卻出現了本土性的病例 (Lee *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Hsueh *et al.*, 2001)。2000年起，類鼻疽列屬於通報性的疾病。依通報病歷顯示，台灣類鼻疽的發生率約0.3/100,000(人)(Su *et al.*, 2007)。2005年時於二仁溪流域，發生台灣第一次的類鼻疽爆發性感染(Ko *et al.*, 2007)，依當年度通報病例統計，類鼻疽發生率為70/100,000(人)(Su *et al.*, 2007)。但依2006與2007年的通報病例，台灣類鼻疽的發生率又恢復0.3/100,000(人)。綜觀之，類鼻疽病例數於1993-2007年，較1993年以前增加的原因，是因類鼻疽實際感染增加，或是因診斷技術進步而促使病歷數增加，尚難界定。但類鼻疽確實發生台灣疾病史上的第一次爆發性感染，因此，於2005年8月5日疾管局主持之『類鼻疽防治研討會』，決議將建置台灣地區的*B. pseudomallei*於土壤分佈的環境監測計畫，本計畫則因之而實施。

2. 類鼻疽與環境監測

針對*B. pseudomallei*於土壤分佈的環境監測的概念，主要是因類鼻疽的傳播模式，主要是藉由吸入或接觸其致病菌-*B. pseudomallei*所污染的土壤或塵埃所致(Dance, 2000)。並且在類鼻疽的主要盛行區，如：泰國、馬來西亞與寮國等熱帶地區的研究，都曾規模性的進行*B. pseudomallei*於土壤分離率的調查，發現*B. pseudomallei*於土壤的分佈並不均勻，但與該地類鼻疽病的盛行，呈現正相關(Inglis *et al.*, 2004; Trakulsomboon *et al.*, 1999; Vuddhakul *et al.*, 1999)。並且進一步的藉由基因的分子分型技術，進行流行病學的追蹤，確定部份類鼻疽病患的感染源，確實與土壤分離菌的基因型相同(U'ren *et al.*, 2007)。因此，土壤內*B. pseudomallei*的含量，成為民眾曝露及感染類鼻疽的重要因素。

3. *B. pseudomallei*的生態棲息與影響因子

依據*B. pseudomallei*於土壤的生態棲息位置，物理、化學與生物因子都可

能影響 *B. pseudomallei* 於環境中的分佈，亦可能影響 *B. pseudomallei* 於土壤分佈、環境監測的調查(Dance, 2000)。研究顯示，*B. pseudomallei* 主要在潮濕的土壤中分離，菌落化在地表下 300mm-600mm 處(Wuthiekanun *et al.*, 2005; Kao *et al.*, 2003)。並可適應 >pH 4.5 的環境中生長(Dejsirilert *et al.*, 1991)、生長的溫度界於 24°C-42°C 間、適合於 >10% 水含量的土壤中存活(Chen *et al.*, 2003)，但對於紫外線非常敏感(Tong *et al.*, 1996)。並且環境中的 *B. pseudomallei* 呈現 arabinose assimilation(-) 與 arabinose assimilation(+) 兩種異化作用的 biotype，其中 arabinose assimilation (-) biotype 菌株係屬毒力菌株，對人類有致病性，但 arabinose assimilation (+) 則大多不具毒性。現已重新命名 arabinose assimilation (+) 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)。此外，*B. cepacia* complex 亦是廣存於土壤與水源的腐生菌，其對溫度、pH 值與乾旱的適應性，遠比 *B. pseudomallei* 強(Dejsirilert *et al.*, 1991)。特別是使用土壤滋養 *B. pseudomallei* 時，*B. cepacia* complex 常常會抑制 *B. pseudomallei* 的生長(數據未列)。其它化學性(土壤組成、除草劑、殺蟲劑)、生物性(嗜菌體的溶解、原生蟲[如：*Acanthamoeba*、*Hartmannella* spp.]的吞噬或放射線菌的拮抗作用)等因子，亦會造成分離 *B. pseudomallei* 的限制 (Dance, 2000; Woods, 2002; Inglis *et al.*, 2004)。因此，建立一個環境偵測 *B. pseudomallei* 的滋養分離方法，是環境調查的首要工作。

4. *B. pseudomallei* 的多樣性

B. pseudomallei 呈 Gram's stain (-)、短桿菌、具運動性。於宿主細胞內寄生時，會累積 β -hydroxy butyric acid，因此產生雙極端深染(Sprague and Neubauer, 2004)，但環境分離株，通常不易累積 β -hydroxy butyric acid，而使菌體不易著染(Inglis *et al.*, 2000)。地方性類鼻疽流行區的臨床分離 *B. pseudomallei* 的方法，是使用 Ashdown's 選擇性固態培養基(Wuthiekanun *et al.*, 1990)。典型的菌落型態呈現高度皺摺、圓形、乾燥與紫紅色的菌落型態。但菌落型態呈現多樣性，出現不規則、細小、黏稠等多變性。並且在繼代培養時，菌落型態會相互轉換(Ulett *et al.*, 2001; Howard and Inglis, 2003)。雖然有報告指出，細小、黏稠、平滑的菌落，是受培養基內 crystal violet 抑制所致(Howard and Inglis, 2003)，但在非含 crystal violet 的培養基，如：血液平板；亦出現類似的菌落，致使菌落型態產生多樣性

的原因，仍不清楚(Ulett *et al.*, 2001)。不同地域所分離出的 *B. pseudomallei*，其菌落型態多樣性出現的比率，亦有相當的差異(Virginio *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2006)。為避免 *B. pseudomallei* 類似菌或 *B. pseudomallei* 本身多樣性的變化，造成環境分離時的偽陽性或偽陰性的干擾，正確的鑑別診斷環境中的 *B. pseudomallei*，亦是本計畫成功的關鍵。

5. 目的及重要性

類鼻疽在台灣地區是新興疾病，但其感染性強，並且多樣性的臨床表徵，使診斷困難。過去台灣不曾有過類鼻疽的流行病學調查，對於可能爆發類鼻疽疫情的地區，更無法掌握。本計劃執行台灣地區的環境調查，將建置台灣本島 *B. pseudomallei* 的地域分佈的全貌，可清楚勾劃可能發生類鼻疽疫情的地區。

B. pseudomallei 的臨床分離，在各教學醫院均有分離鑑定的經驗。但對環境分離的方法，以及環境分離株的形態，則付之闕如。本計畫將建立 *B. pseudomallei* 環境分離與診斷的方法，亦有助於日後類鼻疽的流行病學調查。

材料與方法

1. 土壤採樣點

土樣採集點是以 1 號與 3 號國道、1 號與 3 號省道，進行採樣。南部沿海地區則以 19 號省道，北部沿海地區以 2 甲、2 乙、2 丙與 2 丁省道，進行採樣。東部地區則以 9 號與 11 號省道，進行採集。採樣範圍以每 5-10 平方公里為一代表性地域，每個代表性地域取四處耕植地，並避免農藥或除草劑剛噴灑的區域，以排除特定之有機或無機物的干擾。為使土樣採集地點，儘可能平均分佈於台灣整島的耕植面積，各採集點都進行衛星定位，並與地圖比較，使採集點均勻遍佈於全島。

土樣的採取是使用鑿土器向地表下鑿深。每個採樣點，分別取表層與深層樣品。地表下 20-30 cm 土樣，視為表層土。地表下 50-60 cm 土樣，則視為深層土。每個樣點取土約 500 g，置入樣品收集瓶，16 h 內迅速送於實驗室，進行儲存與分離。

2. 菌株的篩檢

取 15g 土壤與磷酸緩充液(PBS)強烈震盪，重複於培養基上進行三區劃線後(至少三片)。另滋養性培養是將 15g 土壤與 15mL Ashdown's broth 均勻混合後，於 42°C、通氣震盪培養。培養兩日後，進行培養基的三區劃線。並另取 3 mL 置於另一 15mL Ashdown's broth 的培養瓶中，繼續於 42°C、通氣震盪培養兩日。培養畢、於 Ashdown's medium 培養基上進行三區劃線分離。所有的培養基均於 42°C 培養，連續觀察六日。將 *B. pseudomallei* 的典型菌落(皺摺、乾燥、粉紅)，進行 Gram's stain、oxidase 反應。所得之 G (-) dipolar rods、oxidase (+)，視為篩選之陽性菌株，進行進一步的鑑定。

菌株的篩檢分別使用分子檢測(Bauernfeind *et al.*, 1998)與選擇性培養基(Wunthikanun *et al.*, 1990)之菌落型態進行篩選。分子篩檢法簡述如下：1g 土壤經 pH 9.0 10mM Tris base 的活化洗滌液(商用產品; TAKARA)洗滌後，移除大量之 humic acid，並使用其洗滌之 total microorganisms 打破。使用 solid phase elution (商用產品; Promega)方法，取其染色體 DNA 為 template。篩檢之 primer 設計，則依據 GenBank 之鞭毛特異區 central region (AF084813)設計 forward prime 與 reverse primer。分別為

5'-TTTTGGTACCATGCTCGGAATCAACAGCAACATTA AC-3' 與
5'-TTTTGGATCCTATTGC AGGGGCTTGACCACCGTT-3'，進行 PCR 反應。反應條件為：Denature：94°C、1min；Anneal：55°C、30sec；Extention：72°C、1min。若得 specific amplicon，視為篩選陽性土 (Chen *et al.*, 2002)，進一步的進行滋養性培養。

3. *B. pseudomallei* 的菌株鑑定

B. pseudomallei 的菌株鑑定，依據生化特性與分子檢定鑑別之。取乾扁、粗糙、皺摺的可疑菌落，進行 colony PCR，primer 是採用 16S RNA 之 sense primer 5'-CGGCAGCRCGGGCTTCGG-3' 與兩條 antisense primer 5'-TGTGGCTGGTCGTCCTCTC-3' 及 5'-CACTCCGGGTATTA GCCAGA-3' 進行 multiplex PCR 反應，條件為 denature：95°C、1min；anneal：60°C、1min；extention：72°C、1min。若得 405bp 與 243bp 兩段 specific amplicon，初步診斷為 *B. pseudomallei* (Dharakul *et al.*, 1999)。所得之陽性檢測菌株，以 API 32 GN 生化檢定 (Inglis *et al.*, 1998) 之。為避免偽陽性檢定，對於陽性菌株，再佐以 fliC 基因 central regions 之 RFLP (Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003) 與 16S-23S gene 之 spacer regions 核酸定序資料 (Kunakorn and Markham, 1995)，皆符合者，方鑑別為 *B. pseudomallei*。

4. 土壤菌相分析

為確定 PCR 陽性但培養陰性，是否存在 *B. pseudomallei*。因此，使用土壤總菌相分析，排除 PCR 的偽陽性結果。簡述之，土壤之 total chromosomal DNA 是使用 1-3 g 土壤，以 UltraClean soil DNA isolation kit (BIOzymTC, Landgraaf, The Netherlands) 萃取之 (Duineveld *et al.*, 1998)。所得之 total chromosomal DNA 為模板 (5-10 ng)，並以含有 400nmol 之 GC-clamp (CGCCCGGGGCGCGCC CCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG) 之 16S RNA gene specific primer (Chen *et al.*, 2005)，於 mixtures (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 10 mmol/L KCl, 3.75 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L each deoxyribonucleoside triphosphate, 1% (vol/vol) formamide, 0.25 μg T4 gene 32 protein (Boehringer, Mannheim, Germany), 5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Stoffel fragment; Perkin-Elmer, Nieuwerkerk,

The Netherlands)中反應。PCR 反應採取 touchdown 方式，條件如下：Anneal 起始溫度為 62°C、逐步分 50 cycles 平均降溫至 50°C，並於多加之 25 cycles 以 58°C 實施之。Denature 溫度以 94°C、1 min；extension 溫度以 72°C、2 min 實施之。

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)係使用 50-60%梯度，於 100V 電泳 15 h (Salles *et al.*, 2004)。電泳畢、以 SYBR Gold I nucleic acid gel stain (Molecular Probes Europe, The Netherlands)染色並照相之。DGGE 的圖譜以 Molecular Analyst software (version 1.61; Bio-Rad)分析之。

為確定菌相中 16S RNA amplicons 圖譜的菌種，將電泳後之 amplicon targets 切出，並於透析袋內引流之。引流後的液體，使用 16S RNA specific primer 重新擴增(條件為 denature : 95°C、1min ; anneal : 60°C、1min ; extention : 72°C、1min)。所得之 PCR 產物以 High Pure PCR product purification kit (Boehringer)純化之，並選殖進 pGEM-T easy vector (Promega)。所得之陽性選殖株，經 Wizard Plus SV miniprep DNA purification system (Promega)萃取其質體，並經 DNA 定序。所得之定序結果，以 BLAST 比對 Genebank 資料，以確定菌相之菌種。

5. 基因圖譜分析

基因圖譜分析是使用 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)的方法。其 primer 選擇是使用 OPH03 與 OPQ-16。PCR 反應容積為 25 µl，包括 50 pmol random primer、2 mM MgCl₂、2 U Taq polymerase、250 µM dNTP。反應條件：95°C 1 min., 35°C 2 min., 72°C 2 min.進行 5 次循環，95°C 1 min., 35°C 1 min., 72°C 1 min.再進行 35 次循環。反應畢，以 1% agarose gel 電泳之。

結果

1. 篩檢方法與陽性土壤的定義

篩檢 *B. pseudomallei* 的地域分佈，可使用 PCR 檢測與培養確認等兩種方法 (Brook *et al.*, 1997)。茲因 PCR 檢測土壤內含 *B. pseudomallei* 之敏感度、特異性與方便性，都較培養確認的方法佳 (Kao *et al.*, 2003)，但 PCR 反應陽性的結果，卻常受 non-specific amplicon 的干擾。為評估本研究使用之 16S RNA 基因之 PCR 反應的陽性結果，可作為推論土壤中含有 *B. pseudomallei* 的依據。因此，使用 16S RNA PCR-DGGE 技術，分析代表性土壤之總菌群的圖譜。為使實驗檢體不受其它理化因子的干擾，因此所選擇檢測的代表性土壤樣品，都證實其有機碳、含水量、重金屬、總活菌數等，均無明顯的差異(表一)。結果顯示，培養陰性的土壤，確實在 DGGE 總菌相分析時，亦沒有 *B. pseudomallei* 16S RNA 基因之 specific amplicon。而在培養陽性的土樣中，則可明顯偵測到 *B. pseudomallei* 之 16S RNA specific amplicon。但是在部份 PCR 陽性的土壤樣品，卻可偵測到 16S RNA specific amplicon，而無法培養出活的 *B. pseudomallei* 菌體(圖一)。顯示部份土壤曾經出現過 *B. pseudomallei*，或者存在著 pseudomallei-like bacteria，(其 16S RNA 基因序列與 *B. pseudomallei* 一致)，可能干擾 PCR 實驗的結果。茲因 *B. pseudomallei* 的活體，才是主要造成民眾曝露而感染的威脅，因此本研究之陽性土壤的定義，是以培養確認者定義之。

2. 台灣之 *B. pseudomallei* 分佈概況

為描述 *B. pseudomallei* 的地域分佈，將台灣南北全長三百九十四公里，以每四十公里，概分為十個區域。台灣東半部因無 *B. pseudomallei* 分離率，並且 PCR 檢測率 < 5%，因此僅概分一個區域 (圖二)。*B. pseudomallei* 的陽性分離地域，分佈並不平均，主要位於台中豐原、嘉義水上、台南仁德(二仁溪流域)與屏東滿洲等四地(圖二)。其中以台南仁德(區域 7)之 26.6% 的分離率最高，屏東滿洲(區域 10) 10.0% 的分離率次之，再依續為嘉義水上(區域 6) 5.2% 與台中豐原(區域 4) 之 4.5%。此分離率符合目前台灣類鼻疽通報病例的地理位置，主要出現在台南、高雄與屏東縣。若以 PCR 檢測率觀察，經培養確認的陽性分離地，亦有較高的 PCR 檢測陽性率，包括台南仁德之 29.7%、屏東滿洲 25.0%、嘉義水上 12.5% 與台中豐原之 11.3% 的陽性檢出(表二)。但台灣大部份地區，則只有 < 10% 之 PCR

陽性檢出，並且該地區並無法培養出 *B. pseudomallei* 的活體。

3. 不同地域之基因型探討

為探討環境分離株間的親緣關係，經過生化與分子檢定確認之的環境分離菌，計 26 株。使用 RAPD 分子分型技術分析，結果顯示台灣環境分離株，主要有八種 RAPD type (type A-I) (表三)。其中台南仁德的分離菌，主要是 Type A-D。屏東滿洲主要呈現 Type A，以及一株獨立的 RAPD 基因型，嘉義水上呈現 Type A 與 B，以及一株獨立的 RAPD 基因型，台中豐原之分離菌，則都屬獨立的基因型 (Type H, I)(表三)。顯示在地緣分佈上，嘉義以南 *B. pseudomallei* 的地緣分佈有相關性，而台中則呈獨立分佈的狀態。

此外，*B. pseudomallei* 16S RNA 基因序列之 424-426 核酸位置，分別呈現 CAT 與 GGC 的多型性變異(圖三)。其 CAT 系與現存 GeneBank 所保存的 *B. pseudomallei* 之基因序列一致，但 GGC 的變異則屬台灣本土分離菌的特異性變異(CAT/GGC 之 hybrid) (圖三)，按 *B. pseudomallei* 包含 2 個 chromosomal DNAs、共 4 個 copies 之 16S RNA 基因，顯示 *B. pseudomallei* 之環境分離株之 16S RNA 基因序列，可能呈現 heterozygous(圖三)。藉由此分子證據顯示，台灣本土環境分離之 *B. pseudomallei* 之基因型與熱代地區盛行之基因型不同。

4. 特定生物因子對 *B. pseudomallei* 生長的影響

B. pseudomallei 於地域分佈呈不平均狀態，而集中於特定區域。我們特別將 *B. pseudomallei*(10^5 CFU/ml) 植入於分離陰性的土壤，發現其生長被抑制，但將土壤經 autoclave 後，抑制現象即消失(數據未列)。顯示台灣土壤普遍存在著某生物因子，可抑制 *B. pseudomallei* 的生長。這或可解釋類鼻疽在台灣不易盛行的原因。為確定此特別的生物因子存在，我們篩檢陰性土壤樣品的主要菌群，並依其對 *B. pseudomallei* 的抑制能力，分離出對 *B. pseudomallei* 強抑制力的菌種，於 LB 培養基上呈現 7-32mm 的抑制圈(圖四 a)，經生化與分子鑑定後，確認其為 *B. cepacia* genomovar IIIa (數據未列)。並且於 *B. pseudomallei* 的 co-culture 實驗，證實 16 h 後，開始對 *B. pseudomallei* 產生抑制作用(圖四 b)。

茲因 *B. cepacia* genomovar IIIa 係廣存於台灣耕植土中，其中 7.4% 的分離菌，有明顯的拮抗作用(數據未列)。因此比較 *B. cepacia* genomovar IIIa 與 *B.*

pseudomallei 對環境逆境的適應力。結果顯示，不論是 pH (圖五 a, b)、溫度(圖六 a)與鹽濃度的變化(圖六 b)，都顯得 *B. cepacia* 較 *B. pseudomallei* 更能適應逆境。此一結果，可解釋 *B. cepacia* genomovar IIIa 為台灣耕植土的主要菌群，而 *B. pseudomallei* 卻於台灣耕植土中，不易分離的原因之一。

討論

近年來台灣地區的類鼻疽感染的病歷數，有增加的趨勢，並且大多發生於台灣南部。然而，台灣南部是否應列屬類鼻疽的盛行區，這些類鼻疽病患是否真屬於本土性感染，而非境外移入，近年來亦頗有爭議。鑒於類鼻疽主要是藉由接觸或吸入污染土壤的 *B. pseudomallei* 而致病，因此本計畫針對台灣地區進行土壤採樣調查，結果顯示，*B. pseudomallei* 的分佈並不遍及台灣，主要分佈於台灣南部，並且集中於特定地區，如台中豐原、嘉義水上、台南仁德與屏東滿洲等四地。但值得注意的是，實際 *B. pseudomallei* 的分離地，並不與類鼻疽病患之居住址直接相關，通常與最近的病患址，有距離 10-15 km 之遙。因此，類鼻疽病患若真的因接觸此感染源而致病，當然需要藉由一些適當的載體條件（如：大量的雨水、河道泛濫或巨風等），才能使得病患可接觸到環境中之 *B. pseudomallei* (Su *et al.*, 2007)。但依台灣類鼻疽的分佈概況，並不如地方流行區（如泰國），有連續與高分離率的狀況(Trakulsomboon *et al.*, 1999)，或可間接說明台灣類鼻疽盛行的狀況，不及於泰國。然而，疾病管制局已證實部份的環境分離菌與臨床分離菌具有相同的基因圖譜，顯示部份類鼻疽病人確實藉由本土環境為媒介而感染(數據未列)。因此，仍需要注意這些陽性分離地可能發生盛行類鼻疽的危險性。

台灣目前僅於 2005 年發生一次類鼻疽的爆發性感染(Ko *et al.*, 2007)，當年於感染地區的類鼻疽發生率為 70/100,000 (Su *et al.*, 2007)。不過，當時值台灣高鐵於台灣仁德路段(二仁溪流域)施工中，大量深層土壤遭挖掘(本區土壤目前已證實含有 *B. pseudomallei* 的菌群)。同時值颱風過境，大量雨水使二仁溪泛濫，造成下游地區的住戶淹水。依據當時對該地居民的問卷資料與血清抗體的效價資料顯示，淹水的居民與發生高抗體效價呈正相關(Su *et al.*, 2007)。顯然台灣類鼻疽的散佈需要特殊事件，才可能造成規模性的感染。依據 2006 與 2007 年類鼻疽發生率，恢復與歷年類鼻疽之發生率相當，約 0.3/100,000 (人)。因此，高曝露 *B. pseudomallei* 的危險因子，可能已排除。

依據分離 *B. pseudomallei* 的結果，顯見 *B. pseudomallei* 不是環境中主要菌落群。然而，台灣耕種土主要的 *Burkholderia* genus 是 *B. cepacia*，包括 *B. cepacia* genomovar IIIa，實驗顯示有 7.4% 的 *B. cepacia* 分離菌，有拮抗 *B. pseudomallei*

生長的特性。並且在模擬環境逆境時，顯見 *B. cepacia* 比 *B. pseudomallei* 具有生存競爭的優勢。據此推論，2005 年 7-9 月爆發性感染時，雖然 *B. pseudomallei* 可能擴散在地表或更多的地域分佈，但因氣溫降低、乾旱、陽光照射以及土壤 *B. cepacia* 菌群間的拮抗與生存競爭等，可能致使 *B. pseudomallei* 不能廣泛的於耕植土中擴散或存活，以致於 2005 年 9 月後，類鼻疽的疫情就逐漸趨緩，目前則無特別出現高發生率的情形。當然其他之物理性(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[如：*Acanthamoeba*、*Hartmannella* spp.]的吞噬或放射線菌的拮抗作用)等因子(Dance, 2000; Woods, 2002; Inglis *et al.*, 2004)，仍不能完全排除其影響 *B. pseudomallei* 分佈的可能性。

值得注意的是，分析 *B. pseudomallei* 之 16S RNA 基因型顯示，台灣耕種土分離之 *B. pseudomallei* 有 CAT/GGC heterozygous 的表徵，顯有別於國際間報告者。這可能是 *B. pseudomallei* 在不同環境土壤，經過長期演化而產生的變異。這些是否暗示，台灣本土環境分離株，亦可能在毒性的強弱或致病性的表徵上，亦有所變異，而有別於國際間的環境分離株，值得進一步探討。

本計畫順利完成台灣全島的 *B. pseudomallei* 分佈概況。對於主要分離地：台中豐原、嘉義水上、台南仁德與屏東滿洲等四地的附近地區，宜特別注意類鼻疽的發生，特別是在特殊的人工或天然事件之後，如：大量深層土的挖掘、大雨或強風後，有 *B. pseudomallei* 散佈的可能性。

結論與建議

針對台灣地區 *B. pseudomallei* 之地域分佈研究，得具體結論如下：

- (1) 台灣地區之耕種土壤的規模性取樣，證實 *B. pseudomallei* 在台灣地域分佈呈不均勻狀態，主要分佈於台中豐原、嘉義水上、台南仁德與屏東滿洲等四地分離出。其分離率依序為台南仁德、屏東滿洲、嘉義水上與台中豐原。
- (2) 依據基因型分子檢定分析，環境之 *B. pseudomallei* 分離株，呈現八個主要的基因型。嘉義水上、台南仁德與屏東滿洲之土壤分離菌，具有相同或類似的基因型，但台中豐原之分離菌，則呈獨立的基因型。
- (3) 台灣分離菌於 16S RNA 基因有 CAT/GGC heterozygous 的獨特表徵，顯與國際間報告者不同。顯示台灣耕種土分離之 *B. pseudomallei*，可能有地域不同而演化的獨立性。但其獨立性的地域演化，是否會呈現不同毒性的表徵，則尚待證實。
- (4) 任何理化、生物因子均可能造成 *B. pseudomallei* 地域不均勻的分佈。但台灣土壤常見菌 *B. cepacia*，有 7.4% 菌株會抑制 *B. pseudomallei* 的生長，並且比 *B. pseudomallei* 更能適應環境逆境，成為土壤中的優勢菌種。這天然的拮抗機制，可能是台灣耕植土不易分離 *B. pseudomallei* 的重要原因之一。

藉此研究成果，我們建議：

- (1) 依據 *B. pseudomallei* 的地域分析，可推論台中豐原、嘉義水上、台南仁德與屏東滿洲等四地或鄰近地區，應有較高的盛行類鼻疽的機會。因此，在特定條件發生：如大雨、強風特報，規模性的土壤挖掘施工等，可通知當地的衛生機關或醫療院所注意類鼻疽的發生，以及對民眾宣導工作，促使以衣物或雨鞋等，阻隔於野地時、皮膚傷口接觸或曝露類鼻疽的機會。特別對免疫低下者加以宣導(如：糖尿病患者)。
- (2) 茲因類鼻疽的傳染途徑，可能是接觸環境因子。並且類鼻疽的臨床症狀多樣性，醫師不易即時診斷。因此，讓民眾懷疑週遭環境是否污染，進而產生草木皆兵的恐慌。然而，在本計畫研究土壤中菌群的變化與實際分離 *B. pseudomallei* 的野外實驗，均證實 *B. pseudomallei* 並非土壤的主要菌群。

同時台灣耕植土，富有 *B. cepacia* genomovar IIIa。本研究亦證實，7.4%的 *B. cepacia* 菌種，對 *B. pseudomallei* 有明顯的拮抗作用。並且，*B. pseudomallei* 並不適應環境逆境(如：溫度、pH 值、鹽類濃度等變化)。基於此，*B. pseudomallei* 雖然可能因為特定因素的發生，造成短暫的增殖或散佈，但卻受上述因子的影響，並不易廣泛的擴散於台灣各地的土壤，造成規模性的感染。因此，可對民眾適度的宣導 *B. pseudomallei* 的屬性，以免除過度的心理恐慌。

(3) 依據目前對台灣本土菌株的基因分析，發現台灣耕種土分離之 *B. pseudomallei* 有 CAT/GGC heterozygous 的表徵，顯有國際間報告者不同。由於類鼻疽的多樣性表徵，可能源自於 *B. pseudomallei* 基因多樣性(Ulett *et al.*, 2001)。因此，建立台灣 *B. pseudomallei* 本土性菌株的表徵與毒性分析，是有利於本土性類鼻疽的治療與防制。

計畫重要研究成果及具體建議

本計畫之重要研究成果：

1. 清楚的界定台灣地區 *B. pseudomallei* 地域分佈，主要位於台中豐原、嘉義水上、台南仁德與屏東滿州等地區。顯見 *B. pseudomallei* 並非規模性的散佈於台灣地區，而局限於特定地區。這些地區可做為防疫類鼻疽的重要依據。
2. 本計畫以及前期研究使用二仁溪爆發性感染的地域，建立研究模組。確立 *B. pseudomallei* 的地域分佈與類鼻疽病例發生的相關性，並且推論出該爆發性感染與特定的天候事件有關，如當時颱風造成的淹水事件。本研究之成果，已發表於 *J. Clin. Microbiol.* (2007) 45(8):2599-603. 供國際間參考，其摘要如下：

An increase in melioidosis cases compared to other areas in Taiwan was observed in the Er-Ren River Basin, southwestern Taiwan, from November 2001 to August 2006. The objective of this study was to determine the association between the level of exposure to *Burkholderia pseudomallei* and the incidence rate of melioidosis and to survey the transmission modes of *B. pseudomallei* in the Er-Ren River Basin. The serosurveillance of melioidosis gave seropositivity rates of 36.6%, 21.6%, and 10.9%, respectively, for residents in regions A, B, and C within the Er-Ren Basin area. Culture and PCR-based detection of *B. pseudomallei* from soil demonstrated that the geographical distribution of this bacterium was confined to a particular site in region B. The distribution of seropositive titers was significantly associated with the incidence rate of melioidosis (120, 68, or 36 incidence cases per 100,000 population in region A, B, or C in 2005), whereas it did not correlate with the geographical distribution of *B. pseudomallei* within the soil. A survey of transmission modes showed that residents with seropositivity were linked to factors such as having confronted

flooding and having walked barefoot on soil, which are potential risk factors associated with exposure to *B. pseudomallei*. Our findings indicated that the Er-Ren River Basin in Taiwan has the potential to become a high-prevalence area for melioidosis. This is the first report that documents a high prevalence of melioidosis in an area north of latitude 20 degrees N.

3. *B. pseudomallei* 地域分佈受許多因子影響，本研究確定台灣耕植土的主要菌群 -*B. cepacia* genomovar IIIa，有明顯的抑制 *B. pseudomallei* 的能力，可能成為台灣土壤自潔的重要因素。此外，*B. pseudomallei* 對逆境的適應力亦明顯較 *B. cepacia* 差。綜合言之，*B. pseudomallei* 並不易在台灣耕植土快速的繁殖與散佈。

具體建議：

1. 適度的對特定地區，包括台中豐原、嘉義水上、台南仁德與屏東滿州等地，對一般民眾實施類鼻疽的衛教工作，以避免傷口的直接接觸感染。並且可於特定天候條件，對於當地的醫療院所，實施警訊，特別注意類鼻疽病例的發生。
2. 雖然 *B. pseudomallei* 的地域分佈結果，可暗示高分離率的地區，民眾可能亦有高的曝露率，但實際台灣地區民眾的曝露情形，卻不得而知，特別是台中豐原、嘉義水上、台南仁德與屏東滿州等地居民的實際曝露情形。因此，可對於該地區實施適當的取樣，進行血清學的調查，以建立台灣地區的曝露情形。
3. *B. pseudomallei* 的基因多樣性可能與類鼻疽症狀的多樣性相關，既然台灣本土菌株呈現獨立的基因型。則可進一步建立本土菌株多樣性的表徵與毒性間的關係。此結果將對提高臨床檢驗室診斷有所幫助，亦可協助臨床醫師對類鼻疽疾病的診斷與治療。

參考文獻

- Brook MD, Currie B, Desmarchelier PM.** Isolation and identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil using selective culture techniques and the polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol.* 1997; 82, 589-596.
- Brett PJ, DeShazer D, Woods DE.** Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiol Infect* 1997; 118, 137-148
- Brett PJ, DeShazer D, Wood DE.** *Burkholderia thailandensis* sp nov, a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int J Syst Bacteriol.* 1998; 48, 317-320.
- Chen KF, Kao CM, Hsieh CY, Chen SC, Chen YL.** Natural biodegradation of MTBE under different environmental conditions: microcosm and microbial identification studies. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2005; 74:356-364.
- Chen YH, Peng CF, Hwang KP, Tsai JJ, Lu PL, Chen TP.** An indigenous melioidosis: a case report. *Kaohsiung J Med Sci* 1999, 15, 292-296.
- Chen YS, Chen SC, Kao CM, Chen YL.** Effects of soil pH, temperature and water contents on the growth of *Burkholderia pseudomallei*. *Folia Microbiol.* 2003; 48, 253-256
- Chen YS, Lin HM, Pan NC, Chien SM, Chen YL.** Comparison of 16S RNA, flagella and type III secretion gene PCR primer sets for diagnosis of *Burkholderia pseudomallei* in paddy soil. *J Biomed Lab Sci* 2002; 14:95-100.
- Dance DA.** Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia spp.* and human-animal hosts. *Acta Trop* 2000; 74, 159-168.
- Dejsirilert S, Kondo E, Chiewslip D, Kanai K.** Growth and survival of *Pseudomonas pseudomallei* in acidic environments. *Jpn J Med Sci Biol* 1991; 44, 63-74.
- Dharakul T, Tassaneetrithep B, Trakulsomboon S, Songsivilai S.** Phylogenetic analysis of Ara+ and Ara- *Burkholderia pseudomallei* isolates and development of a multiplex PCR procedure for rapid discrimination between the two biotypes. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1906-1912.
- Duineveld BM, Rosado AS, van Elsas JD, van Veen JA.** Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:4950-4957.

Francis A, Aiyar S, Yean CY, Naing L, Ravichandran M. An improved selective and differential medium for the isolation of *Burkholderia pseudomallei* from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 55, 95-99.

Howard K, Inglis TJ. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41, 3312-3316.

Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Ho SW, Luh KT. Melioidosis: an emerging infection in Taiwan? *Emerg Infect Dis.* 2001; 7, 428-433.

Inglis TJ, Chiang D, Lee GS, Chor-Kiang L. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE. *Pathology.* 1998; 30:62-64.

Inglis TJ, Foster NF, Gal D, Powell K, Mayo M, Norton R, Currie BJ. Preliminary report on the northern Australian melioidosis environmental surveillance project. *Epidemiol Infect.* 2004; 132, 813-820.

Inglis TJ, Mee JB, Chang BJ. The environmental microbiology of melioidosis. *Rev. Med. Microbiol.* 2000; 12, 13-20.

Lee N, Wu JL, Lee CH, Tsai WC. *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 1985; 22, 352-354.

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

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

Ko WC, Cheung BM, Tang HJ, Shih HI, Lau YJ, Wang LR, Chuang YC. Melioidosis outbreak after typhoon, southern Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:896-898.

Kunakorn M, Markham RB. Clinically practical seminested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by enzyme immunoassay with and without solution hybridization. *J Clin Microbiol.* 1995; 33, 2131-2135.

Salles JF, van Veen JA, van Elsas JD. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:4012-4020.

Sprague LD, Neubauer H. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004; 51:305-320.

Su HP, Yang HW, Chen YL, Ferng TL, Chou YL, Chung TC, Chen CH, Chiang CS, Kuan MM, Lin HH, Chen YS. Prevalence of melioidosis in the Er-Ren River Basin, Taiwan: implications for transmission. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:2599-2603.

Tong S, Yang S, Lu Z, He W. Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol Immunol.* 1996; 40:451-453.

Trakulsomboon S, Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-Gnam N, Suputtamongkol Y, Thamlikitkul V. Epidemiology of arabinose assimilation in burkholderia pseudomallei isolated from patients and soil in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1999; 30:756-759.

Ulett GC, Currie BJ, Clair TW, Mayo M, Ketheesan N, Labrooy J, Gal D, Norton R, Smith CA, Barnes J, Warner J, Hirst RG. *Burkholderia pseudomallei* virulence: definition, stability and association with clonality. *Microbes Infect.* 2001; 3:621-631.

U'ren JM, Hornstra H, Pearson T, Schupp JM, Leadem B, Georgia S, Sermswan RW, Keim P. Fine-Scale Genetic Diversity among *Burkholderia pseudomallei* Soil Isolates in Northeast Thailand. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:6678-6681.

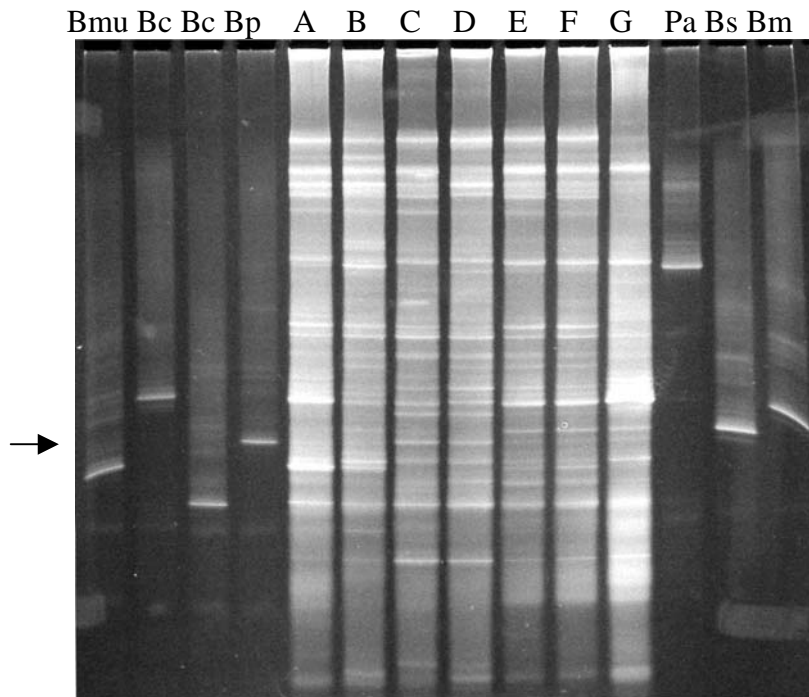
Virginio CG, Teixeira MF, Frota CC, Cafe VS, Rocha MF, Sidrim JJ. Phenotypic characterization of three clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101, 95-97.

Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-Engam N, Jitsurong S, Kunthawa B, Noimay P, Noimay P, Binla A, Thamlikitkul V. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60:458-461.

Woods DE, Jeddelloh JA, Fritz DL, DeShazer D. *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a temperate bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. *J Bacteriol.* 2002; 184, 4003-4017.

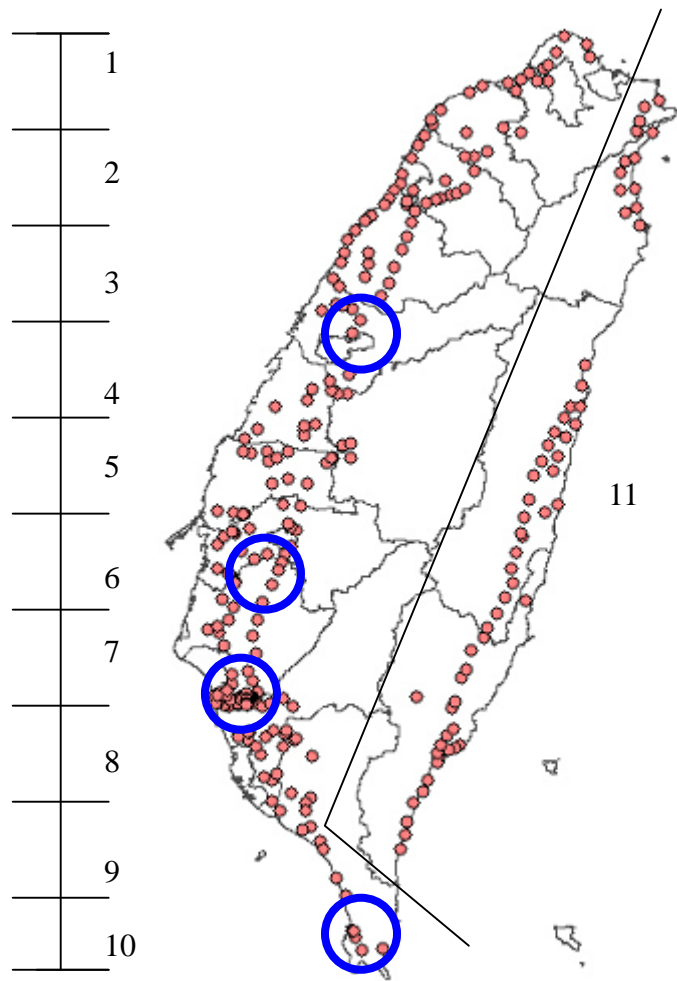
Wuthiekanun V, Dance DA, Wattanagoon Y, Suputtamongkol Y, Chaowagul W, White NJ. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice. *J Med Microbiol.* 1990; 33:121-126.

Wuthiekanun V, Mayxay M, Chierakul W, Phetsouvanh R, Cheng AC, White NJ, Day NP, Peacock SJ. Detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil within the Lao People's Democratic Republic. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:923-924.



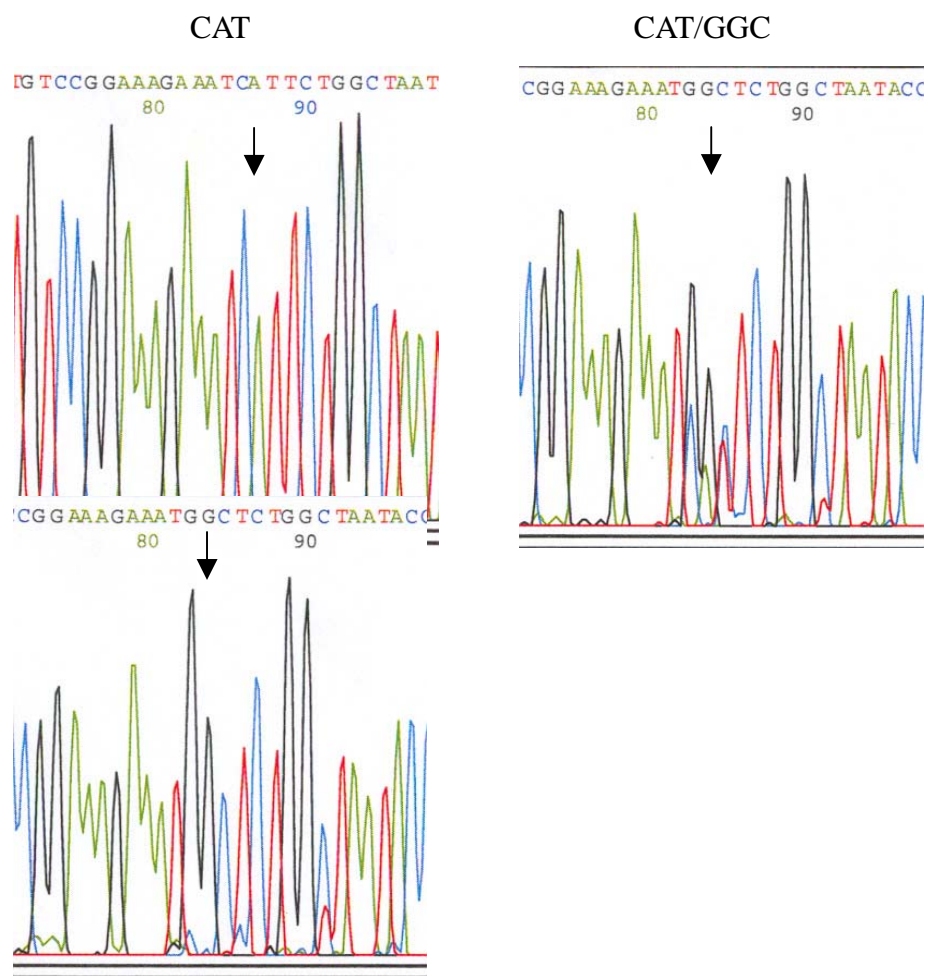
圖一、PCR-DGGE 菌相分析圖

代表性土樣(A-G; Table 1)之 total chromosomal DNA 經萃取後，以 PCR-DGGE 分析其總菌相。使用控制組(Bmu: *Burkholderia multivorans*; Bc: *B. cepacia*; Bp: *B. pseudomallei*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Bs: *Bacillus subtilis*; Bm: *Bacillus megaterium*)之 16S RNA amplicons，證明 DGGE 圖譜可將不同序列之基因鑑別之。



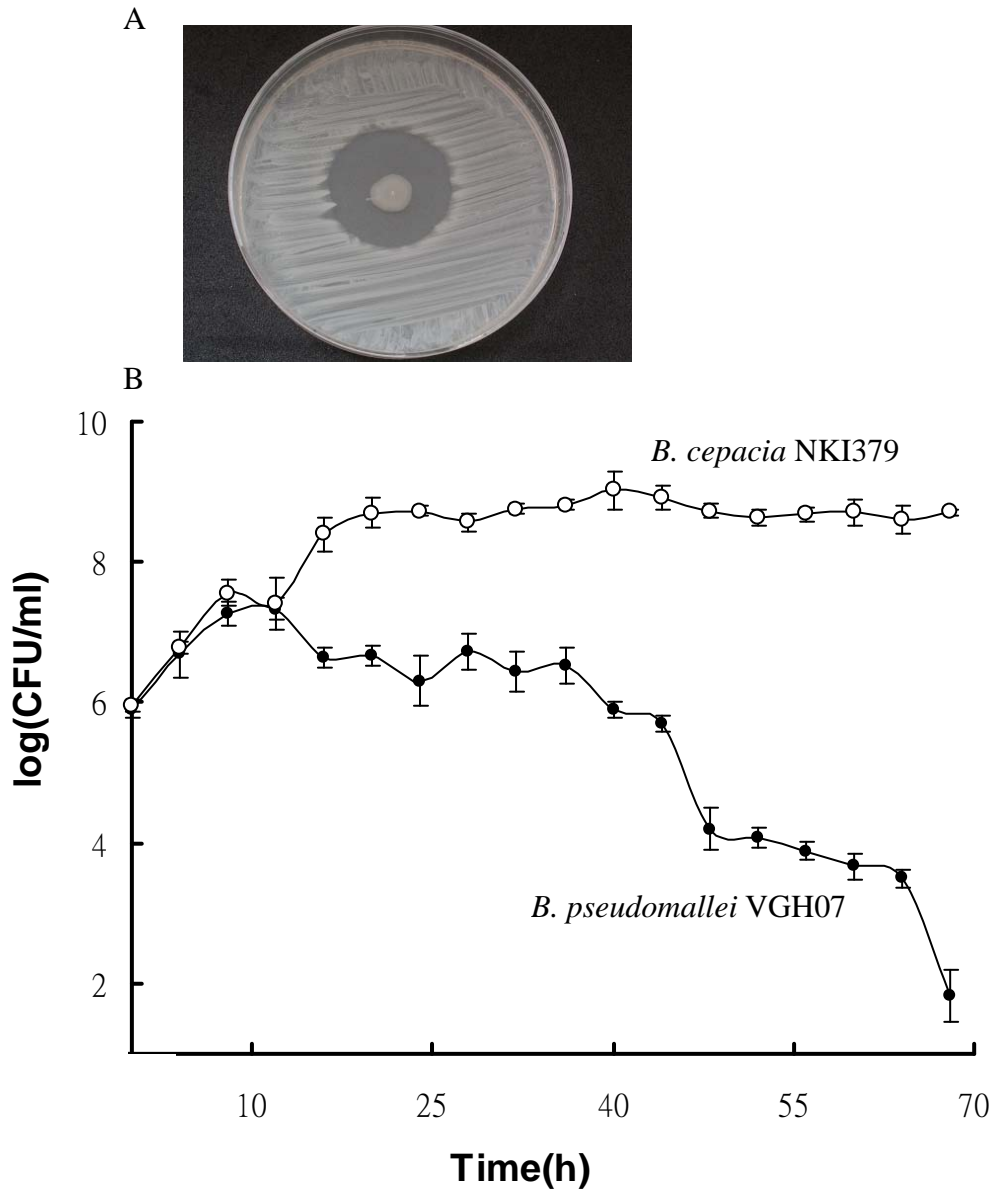
圖二、土壤採樣之衛星地位圖

土壤採樣是依台灣地區之國道與省道兩側採集之。紅小點所示表採集點的位星定位址，每一衛星定位址，取四個代表性耕植地。圓圈所示 *B. pseudomallei* 培養確定址。全島概分 11 個地區，分別統計 PCR 與選擇性培養基培養之結果(如表二)。7 號地段之分離率>20%，因此以較密採集方式。



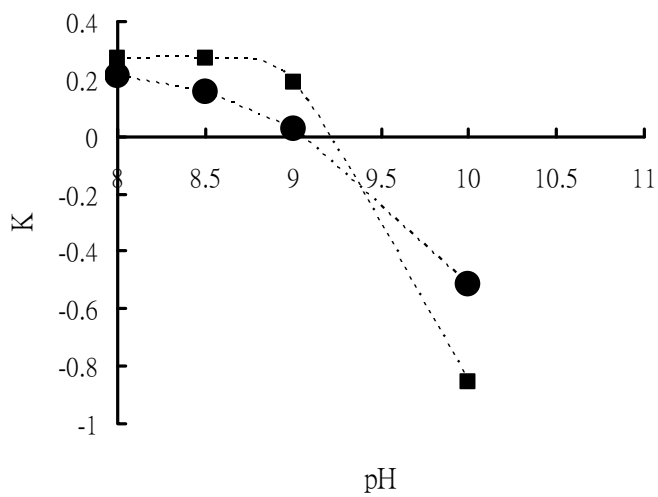
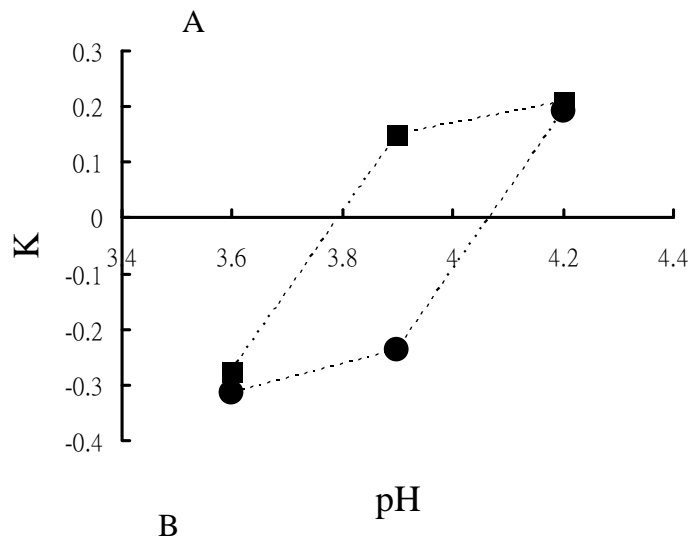
圖三、*B. pseudomallei* 之 16S RNA 基因多型性

16S RNA 之基因多型性(polymorphism)以 PCR 後定序分析之。CAT 或 GGC 表 426-428 核酸位置系 CAT、GGC 之 homozygous。CAT/GGC 表 426-428 核酸位置 系 CAT/GGC 之 heterozygous。



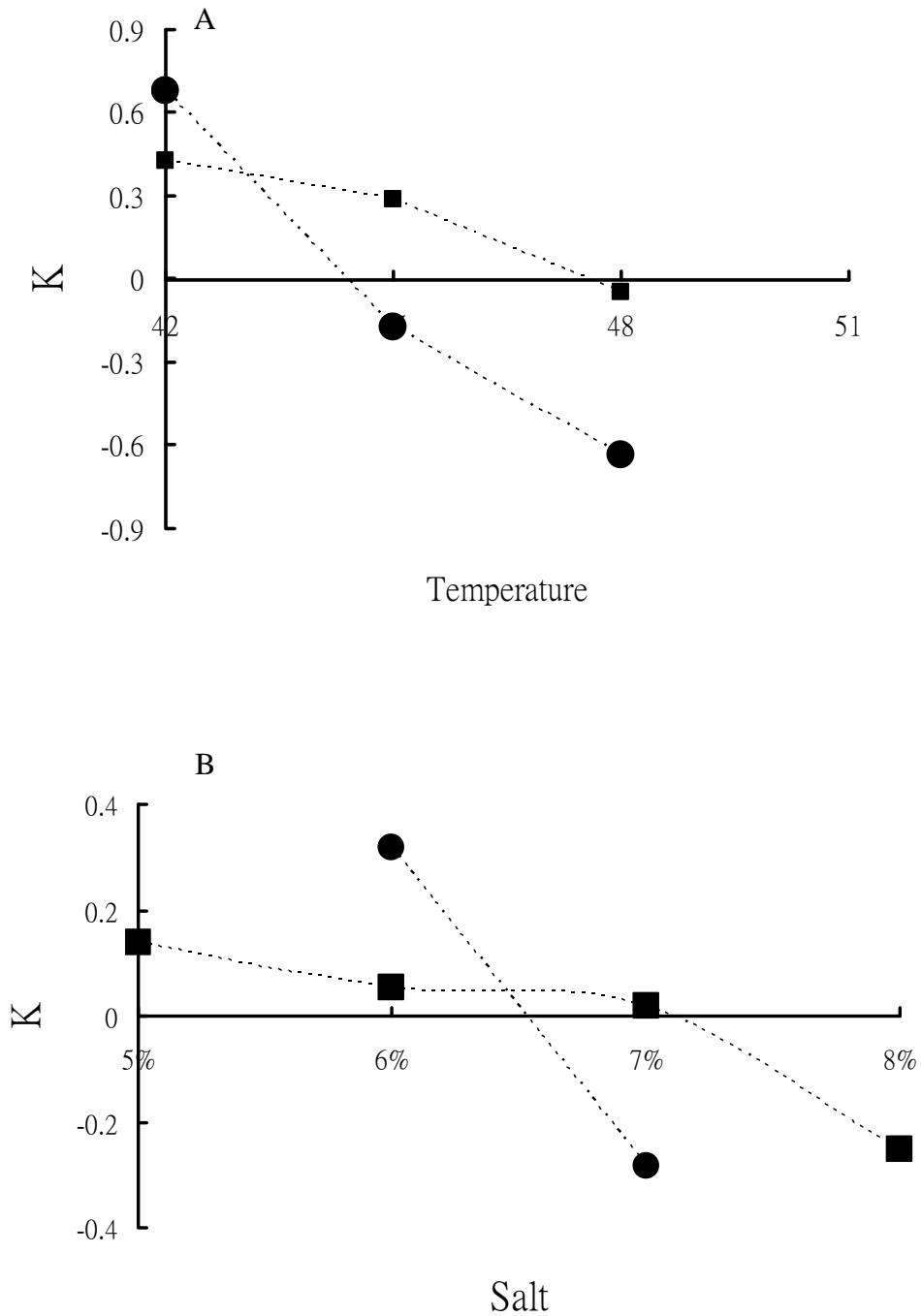
圖四、The antagonist effect between *B. cepacia* NKI379 and *B. pseudomallei* VGH07.

(A) The inhibitory zone surrounding the colony of *B. cepacia* NKI379 on the lawns of *B. pseudomallei* VGH07 in Luria-Bertani agar plate. (B) The growth curve of *B. cepacia* NKI379 (Ap^rCm^r) and *B. pseudomallei* VGH07 (Ap^rCm^s) on co-culture system.



圖五、pH值對生長的影響圖

10^5 CFU/ml *B. pseudomallei* (●) 與 *B. cepacia* (■) 分別置於(a)酸性與(b)鹼性之培養基培養24 h。取4 h (T_0) 之生長菌數定義為 N_0 ，8 h (T_t) 生長菌數定義為 N_t 。K值定義為 $K = \ln(N_t / N_0) / (T_t - T_0)$ 。



圖六、溫度與NaCl對生長的影响圖

10^5 CFU/ml *B. pseudomallei* (●) 與 *B. cepacia* (■) 分別置於(a)不同溫度與(b)不同NaCl濃度之培養基培養24 h。取4 h (T_0) 之生長菌數定義為 N_0 ，8 h (T_t) 生長菌數定義為 N_t 。K值定義為 $K = \ln(N_t / N_0) / (T_t - T_0)$ 。

Table 1. General background of soil characteristics from representative specimens

		Sampling sites						
		A	B	C	D	E	F	G
Representative	PCR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Isolation	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Water contents (%)		17.90-23.06	6.23-22.76	11.56-23.61	16.90-20.82	16.11-18.03	17.39-18.87	18.17-18.28
Organic carbon (%)		1.69-3.68	1.26-3.86	1.76-9.34	1.07-2.81	2.50-2.68	2.13-2.15	1.98-3.50
Metal concentration in mg/kg (dry weight basis)								
	Cu	ND-130.0	ND-202.0	ND-39.2	ND	ND	ND	ND
	Zn	50.0-61.7	22.7-93.8	29.5-86.6	28.0-48.6	35.6-36.6	39.5-45.4	26.8-52.7
	Mn	217.0-259.0	5.1-303.0	183.0-323.0	14.9-288.0	269.0-284.0	202.0-226.0	291.0-310.0
	Cr	ND-5.9	ND-9.0	ND	ND-14.9	ND	ND	ND
	Ni	ND-50.6	ND	ND-0.6	ND	ND	28.8-54.8	ND-33.7
	Cd	ND-4.7	ND-4.5	ND-4.3	ND	ND	1.3-3.6	ND
	Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Fe	2.1-2.4 x 10 ⁴	1.5-2.7 x 10 ⁴	1.8-2.7 x 10 ⁴	1.4-2.3 x 10 ⁴	2.2-2.3 x 10 ⁴	1.9-2.1 x 10 ⁴	1.7-2.7 x 10 ⁴
MPN (CFU/g)		3.2±0.4 x 10 ⁷	4.8±0.7 x 10 ⁷	9.8±0.6x 10 ⁶	1.8±0.5 x 10 ⁷	2.7±0.9 x 10 ⁷	2.9±0.8 x 10 ⁷	4.4±0.8x 10 ⁷

Table 2 Summary of geographical distribution of *B. pseudomallei* in Taiwan

	Sampling site*										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Specimens (n)	64	108	184	44	88	96	64	104	44	20	256
PCR positive rate (%)	1.6	2.8	4.3	11.3	4.6	12.5	29.7	8.7	13.6	25	2.8
Isolation rate (%)	0	0	0	4.5	0	5.2	26.6	0	0	10	0

*: sampling site was following as shows in Fig 2.

Table 3. Summary of RAPD typing derived from environmental isolates in Taiwan

Isolation site	RAPD type (strain number)									
	number (n)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
台中豐原(4)*	2								1	1
嘉義水上(6)	5	2	1				1			
台南仁德(7)	17	7	4	3	3					
屏東滿州(10)	2	1						1		

*: indicate the sampling site (see fig. 2)