

計畫編號：DOH93-DC-2029

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

台灣北部地區 A 群鏈球菌引起猩紅熱之分子流行病學研究

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：周振英

研究人員：陳英彥、張怡菁、姚淑滿

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 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

	頁次
目錄	0
中文摘要	1
英文摘要	3
前言	6
材料與方法	11
結果	16
討論	20
結論與建議	23
參考文獻	24
圖一：台灣北部地區各縣市收集 A 群鏈球菌數量	28
圖二：台灣北部地區各年齡收集 A 群鏈球菌數量	28
圖三：台灣北部地區不同性別收集 A 群鏈球菌數量	29
圖四：台灣北部地區各月份收集 A 群鏈球菌數量	29
圖五：台灣北部地區 A 群鏈球菌脈衝電泳次型別分布	30
圖七：台灣北部地區 A 群鏈球菌脈衝電泳主型別分布	30
圖六：北台灣地區 A 群鏈球菌脈衝電泳次型別親緣關係圖	31
圖八：北台灣地區 A 群鏈球菌脈衝電泳主型別親緣關係圖	32
圖九：台灣北部地區 A 群鏈球菌 emm 基因型別分布	33
圖十：台灣北部地區連續月份收集 A 群鏈球菌數量	33
圖十一：北台灣地區各縣市 A 群鏈球菌脈衝電泳型別數比較	34
圖十二：台北市地區 A 群鏈球菌各月份 PFGE 型別與個案分布	34
表一：北台灣地區 A 群鏈球菌紅黴素與克林達黴素感受性分布	35
表二：北台灣地區 A 群鏈球菌 PFGE type 與紅黴素敏感性分析	35
表三：北台灣地區 A 群鏈球菌 PFGE type 與紅黴素敏感性分析	36
表四：北台灣地區 A 群鏈球菌 emm type 與 PFGE type 比對分析	36

中文摘要

自民國 90 年至 91 年在北台灣地區猩紅熱法定傳染病通報所收集之陽性個案分離出 A 群鏈球菌菌株共 935 株，將相關流行病學與菌株特性資料加以分析；先就流病資料來看，全年度都有個案發生，但較多個案發生在 12 月到隔年 6、7 月間，為主要流行季節；主要感染年齡層是在 5-10 歲之幼童，約佔全部感染人口的 81.3% (760/935)；男性受感染較女性高 1.49 倍；主要感染集中在人口密集的都會區：如台北縣 31.0%、台北市 24.3%、宜蘭縣 19.9% 及桃園縣 18.2%。由這兩年比較來看，個案數有明顯增加，增加比率達 1.94 倍：女性與男性分別增加 1.76 及 2.07 倍，主要年齡層增加 1.80 倍，各地區增加比率分別為：台北縣 1.84 倍、台北市 2.29 倍、宜蘭縣 1.38 倍及桃園縣 2.20 倍，這些都顯示了這兩年間有明顯增加的趨勢。

在菌株特性分析上；已完成建立一套較穩定及快速的脈衝電泳分析技術，經電腦比對後分析，共可分離出 56 種不同 PFGE 次型別，主要有：GAS-S1000(33.8%)、GAS-S2001(13.3%)、GAS-S3000(13.3%)、GAS-S6000(9.3%) 及 GAS-S2003(6.3%)，而在相似度 80% 條件下則可分出 26 種主型別，主要為 GAS-S10(34.5%)、GAS-S20(20.4%)、GAS-S60(15.4%) 及 GAS-S30(14.8%)；在主要感染年齡層及男性女性之主要感染菌株型也大致相仿；但在不同感染區域及年代分析看來，GAS-S30 在整年度比較上增加 1.56 倍 (78/50)，但在台北市卻增加 11 倍 (33/3)，反觀宜蘭縣則降低 0.23 倍 (4/17)，而其他主要型別在各地區都在 3 到 1.3 倍增加之範圍；另外，我們在各個受同一感染個案之接觸者菌株分析上，發現具有相同之脈衝電泳型別。除此我們也進行 emm sequence 分型技術建立，經過比對在相

似度 96% 以上之型別有 11 種 type 及 26 種 subtype，其中 emm 4.0 佔 27.3% 最多、其次為 emm 1.0 佔 25.4%、emm 6.0 佔 9.1%、emm 12.1 佔 7.7% 及 emm12.0 佔 7.2% 等。我們將這兩種分型法來進行交叉比對，結果發現脈衝電泳型別 GAS-S10 又可經由 emm sequence 分型成 11 種不同型別，且在其他脈衝電泳型別下也有不同之 emm 型別；相反的，同一種 emm 型別也分別具有不同之脈衝電泳型別，因此利用這兩種分型方式可以達到更佳的分型效果。另外在我們的抗生素研究結果中，對於主要治療用之盤尼西林，均具有感受性；但對於紅黴素在高度及中度抗藥性上分別為 24.9% 及 58.2%，其中 15 株高抗藥性菌株對克林達黴素同樣具有抗藥性，這也顯示我國與其他國家同樣具有對紅黴素抗藥性增加的趨勢威脅存在。

本研究針對造成猩紅熱感染之菌株為對象，一方面建立相關研究技術平台，作為未來本土細菌特性資料庫設置之工具，另一方面更希望藉此來了解國內 A 群鏈球菌感染的流行概況，以為防治 A 群鏈球菌感染之重要參考依據；此外更可進一步探討細菌的改變及致病機制等相關問題。

英文摘要

We collected 935 strains of Group A Streptococcus in northern Taiwan area from 2001 to 2002. Performs to analyze the epidemiology and the strain characteristic data of bacterium. First the epidemiology data demonstrate that the entire year there have cases of illness to occur. But more cases of illness occur in December to next year June or July, for main popular season.. The main infection age level is in 5-10 years old children, approximately composes the 81.3% in all population of infects. It is 1.49 times higher than women that man are infected. In the densely populated city is the main infection area, for example: 31.0% of Taipei county, 24.3% of Taipei city, 19.9% of Yilan county and Tauyan county 18.2%. Relatively these two years, the case of illness had increased obviously, and the rate is reaches 1.94 times to increase. The female and the male individually increase 1.76 and 2.07 times. The main age level increases 1.80 times, Various areas increase the ratio respectively are Taipei county 1.84 time, Taipei city 2.29 time, Yilan County 1.38 time and Tauyan county 2.20 times. All these have the tendency to obviously increase while showing these two years. In the characteristic of the bacterial strain is analyzed; have already finished setting up a set of more steady and faster analyzing technology about pulse-field gel electrophoresis method. Using computer analyzes ,and then it can separate 56 kind of different PFGE subtype, as follows mainly: GAS-S1000 (33.8%)、GAS-S2001 (13.3%)、GAS-S3000 (13.3%)、GAS-S6000 (9.3%) and GAS-S2003 (6.3%). It may differentiate 26 kind of

dominant type to leave under the similar 80 % conditions, it is mainly GAS-S10 (34.5) , GAS-S20 (20.4) , GAS-S60 (15.4) and GAS-S30 (14.8). The PFGE type of main infection strain is also similar in main infection age level, the male and the female. But looked in the different infection region and the age analysis that GAS-S30 increases 1.56 times (78/50) in the entire year comparison, but actually increases 11 times in Taipei city (33/3), counter- view Yilan County reduces 0.23 time (4/17), but other main type in various areas all in 3 to 1.3 time of increase. Moreover, the bacteria strains isolate from the many contacted cases in the identical infection case, were discovered has the same PFGE type. Eliminates this, we also had established an emm sequence technology to use. We had been possible to differentiate 11 kinds of type and 26 kinds of subtype, most is emm 4.0 accounts for 27.3 % , next is emm 1.0 (25.4 %) , emm 6.0 (9.1 %) , emm 12.1 (7.7 %) and emm12.0 (7.2 %) etc. We compare these two methods; The PFGE type GAS-S10 can be possible to divide into 11 kinds of different emm-type, and there also have different emm-type in other PFGE-type. Opposite, the same kind of emm type also has the different PFGE-type. Therefore uses these two methods to be allowed to achieve the better classified effect. In our result of antibiotic study, it is all susceptible to penicillin. But there are resistant and intermediate to the Erythromycin respectively is 24.9 % and 58.2 % . In the resistant bacteria strain15 strains of resistant bacterium have the same resistance to Clindamycin. This shows that in our country there is a trend to increase of resistance to

erythromycin as other countries. This research in view of the bacteria that cause the scarlet fever infection. On the one hand to set up correlation research technology platform. Will treat as a tool that established a bacterium characteristic database in the future. On the other hand hoped will take advantage to survey the infection disease of Group A streptococcus in Taiwan area. It will be the important reference by takes the preventing and controlling Group A streptococcus infection. In addition may further discuss the related question about the change of bacteria and the pathogenesis mechanism and so on.

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。

在抗生素發明以前，A 群鏈球菌在世界各地對人類均造成極嚴重的損害，包含了大量流行、感染者的死亡及嚴重後遺症等，自抗生素用來治療 A 群鏈球菌感染後，使得世界各地的疫情及傷害明顯下降；但近年來不只在國際上受到 A 群鏈球菌感染的個案數增加，在台灣地區也經常發生 A 群鏈球菌引起學齡兒童感染造成猩紅熱流行事件，由歷年法定傳染病通報的資料顯示，自民國 89 年開始其年發生率就升高到每十萬人有 2.5 人受感染比往年增加 1 倍，甚至在 91 年高達每十萬人有 4.8 人受感染，而且在其最好發的 5-9 歲年齡層，就由年發生率每十萬人有 5-7 人升高到 20-25 人受感染；另外在許多醫院也發現不同病症感染的個案也有增加情形；這些資料顯示 A 群鏈球菌會不會再度引發大流行，而人類又將如何來加以防範【5、10、12、21、22、25、32】。

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；然而在學校或軍隊這些人口聚集活動的環境下，任何年齡也都容易受其感染及快速傳播。造成猩紅熱等呼吸道感染症狀的流行季節，就如其他呼吸道細菌感染一樣，是在季節交替互換時最為流行；這些資料都顯示台灣便是這些病症流行的一個主要地區【9、29】。

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【8、9、25、26、29】。

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【9、27、29】。

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【23、24、30】，除此仍有可能存在許多尚未被發現的致病機制【9、11、29】。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【7、9、15】。

M protein 是鑲嵌在細胞膜上，向細胞外延伸的一條 α -helical coiled-coiled 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 型便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，再加上他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【7、9、15】；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【1、2、28】。另外也有研究者利用限制酶切割 vir regulon 的片段來分型 (vir typing) 【17、18、19、20、31】，這些不同的分子分型方法將可利用來取代 M protein serotyping 【2】。

除了以 M-protein 來鑑定 A 群鏈球菌不同型別及分析外，尚有利用細菌表現之生化特性、型態及抗藥性等特性來分析；也有使用脈衝式電泳分型法，將細菌之 genomic DNA 利用限制酶作用位置不同，而切割出不同片段大小來分析；另外還有 Multi Locus Sequence Typing (MLST)，利用定序方式區分細菌本身具有 housekeeping gene 的不同來進行分型。【3、6、13、14、16】

本研究計劃是將歷年台灣地區收集到之 A 群鏈球菌，選用能代表其

菌株特性的方法，建立菌株特性資料庫。我們將陸續建立：1.細菌對各種抗生素的感受性。2.在分子生物型別資料庫建立上，使用較穩定表現之脈衝電泳分析（PFGE）技術【4】，建立整個 genomic DNA 的電泳圖譜資料庫。3.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-type【2】；並建立我們自己的序列資料庫。4.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、Streptokinases 等，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【23、24、30】等。

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：自民國九十年至九十一年，由台灣北部地區，包含台北市、基隆市、桃園縣市、新竹縣市、宜蘭縣市、金門及連江縣，各醫療院所通報之法定傳染病猩紅熱個案，由個案之喉頭部採檢，進行菌株分離、鑑定及分型，再與個是否具有典型之草莓舌及皮疹等病徵比對，確定為A群鏈球菌感染所致，由此所分離之菌株共計935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., U.S.A.），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0.5~1.5 mm、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 0.25 ml 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、最小抑菌抗生素濃度試驗：

1. 選用抗生素藥物包括：*penicillin*(P)、*cefotaxime*(CTX)、*erythromycin*

(E)、*clindamycin* (CC)、*vancomycin* (VA) 等。

2. 將新鮮菌株與生理食鹽水混合均勻調至 0.5 McFarland (約 1.5×10^8 cfu/mL) 懸浮液，以機器接種適當菌液 (10^4 cfu) 於含不同濃度抗生素之培養基上，於 35-37°C，5% CO₂ 過夜培養後觀察生長情形，結果依據 National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) 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) GCTTAGAAAATTA	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溶 μ L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、脈衝電泳分析法：

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。將細菌溶於TE buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH8.0) 溶液中，取菌液240μL加入60μL lysozyme (10mg/mL)，置於37°C 10min，將此溶液與預熱56°C之300μL洋菜膠溶液 (1.2% SeaKem Gold agarose/1% SDS) 混合，注入模型內待凝結，取出置於5 mL Cell Lysis Buffer (50mM Tris-HCl、50mM EDTA、1% sarcosine、0.15mg/mL proteinase K) 溶液內，於54°C 培養約2小時，倒掉此溶液並加入15 mL ddH₂O 54°C 水浴震盪15min，重複此步驟一次，再以15 mL TE buffer 54°C 水浴震盪15min，重複四次，將之用10U Sma I 或SgrA I來進行限制酶切割反應。

經脈衝電泳分析：在0.5倍TBE緩衝液中以4-40秒的轉換時間，旋轉角度120度，進行19小時。並使用數位照相系統拍照儲存後，以影像分析系統BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 比對分析。

結果

一、感染 A 群鏈球菌造成猩紅熱症狀之個案分析：

1. 自民國九十年一月一日至九十一年十二月三十一日計有兩年期間，由北台灣地區：包含台北縣市、基隆市、桃園縣市、新竹縣市、宜蘭縣市、金門及連江縣，各醫療院所通報之法定傳染病猩紅熱個案，經確定為感染個案後，分離出 935 株 A 群鏈球菌，台北市 227 例(69、158)、台北縣 290 例 (102、188)、宜蘭縣 186 例 (78、108)、桃園縣 170 例 (53、117) 及其他縣市 62 例 (16、46) 作為本計劃研究材料【圖一】。
2. 根據民國九十年及九十一年年中人口總數來計算該菌感染的年發生率，約每十萬人口有 2.58 及 4.60 人；台北市約每十萬人口有 2.35 及 5.96 人，台北縣約每十萬人口有 2.92 及 4.47 人，桃園縣約為每十萬人口有 2.81 及 5.91 人，宜蘭縣較高約為每十萬人口有 15.91 及 22.36 人。
3. 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 935 例個案中，四歲以下感染者有 58 例 (18、40)，約佔全部感染人口 6.2% (5.6%、6.5%)，粗略發生率約每十萬人口有 4.7 人感染 (2.9 人、6.5 人)，五歲到十四歲間有 845 例(291、554)，約佔全部感染人口 90.3% (91.5%、89.8%)，粗略發生率約為每十萬人口 29.1 人 (20.1 人、38.2 人)，十五歲以上有 32 例 (9、23)，約佔全部感染人口 3.4% (2.8%、3.7%)，粗略發生率約為每十萬人口 0.2 人 (0.1 人、0.3 人)。**【圖二】**。在性別差異上，男性受感染比率約為女性 1.49 倍 (559：376)，

對各年度比率及整體來看，大約每年男性感染率都將近為女性的 1.5 倍左右。【圖三】

4. 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 39.0 例（26.5、51.4），個案數在十二月到隔年七月為較多通報時期共計 782 例（234、508），約佔全部 83.6%（82.3%、73.6%），這段期間平均每月發生 97.8 例，通報病例數最高的月份在十二、三、四及六月份（119、110、109、109 例）。【圖四】

二、A 群鏈球菌之分子生物型別分析：

1. 脈衝電泳型別分析統計（PFGE-Type）：

完成建立一套較穩定及快速的脈衝電泳分析技術，針對 A 群鏈球菌之 genomic DNA 使用限制酶 Sma I 切割，經脈衝電泳分離其切割後 DNA 片段大小，其片段大小分布在 668.9kb 到 33.3kb 之間，使用電腦分析片段大小分布情形來區分，經分析的菌株中大約可區分出 56 種脈衝電泳次型別，主要的 PFGE 次型別為 GAS-S1000、GAS-S2001、GAS-S3000、GAS-S6000、GAS-S2003 及 GAS-S6010 所佔菌株數為 292、115、115、80、54 及 46 例，各佔全部 33.8%、13.3%、13.3%、9.3%、6.3% 及 5.3% 【圖五】，若使用 Dice 忍受度設定在 1.5% 來使用 UPGMA dendrogram 方式分析這些型別之親緣關係圖譜如【圖六】，再以 80% 相似度為區分標準，共可分出 26 種主要 PFGE 主型別，主要的 PFGE 主型別依序為 GAS-S10、GAS-S20、GAS-S60 及 GAS-S30 等，

所佔菌株數為 298、176、133、及 128 例，各佔全部 34.5%、20.4%、15.4% 及 14.8% 【圖七】，再以軟體分析親緣關係圖譜如【圖八】。

2. 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 11 種 type 及 26 種 subtype，其中 emm 4.0 有 57 株佔了 27.27% 為最多、其次為 emm 1.0 有 53 株佔了 25.4%、emm 6.0 有 19 株佔了 9.1%、emm 12.1 有 16 株佔了 7.7% 及 emm 12.0 有 15 株佔了 7.2% 【圖九】。

三、抗生素感受性分析：

依據兩年對抗生素分析資料顯示，對盤尼西林及萬古黴素均具有感受性 (Susceptible)；在 90 年所收集菌株對於紅黴素具高抗藥性有 82 株 (30.7%)，中度抗藥性有 64 株 (24.0%)，對克林達黴素有 5 株具高抗藥性 (1.9%)，其他均具有感受性。在 91 年度 A 群鏈球菌菌株對於紅黴素具高抗藥性有 126 株 (22.2%)，中度抗藥性有 422 株 (74.3%)，對克林達黴素有 10 株具高抗藥性 (1.7%)，其他均具有感受性。兩年總計對於紅黴素具高抗藥性共有 208 株 (24.9%)，中度抗藥性有 486 株 (58.2%)，對克林達黴素有 15 株具抗藥性 (1.8%)，其他均具有感受性。【表一】。

四、染色體型別與抗藥性之比對：

1. 將脈衝電泳分析出之主要主型別 GAS-S10、GAS-S20、GAS-S60、

GAS-S30、GAS-SA0 及 GAS-S21，分析其對紅黴素感受性分布，發現 GAS-S20 型具有 109 株（64.9%）及 GAS-SA0 有 33 株（86.8%）高抗藥性表現，而 GAS-S10、GAS-S60 及 GAS-S30 之高抗藥性菌株分別為 9 株（3.2%）、10 株（7.9%）及 6 株（4.8%），但這些主型別菌株之中度抗藥性菌株分別為 192 株（67.4%）、88 株（69.3%）及 108 株（86.4%）。【表二】

2. 在 emm 基因序列型別分析上，主要型別 emm4.0、emm1.0、emm6.0 及 emm 12.1，對於紅黴素具高抗藥性依序為：44 株（80.0%）、2 株（3.8%）、1 株（5.6%）及 4 株（25.0%），而在中度抗藥性則依序為 7 株（12.7%）、22 株（42.3%）、5 株（27.8%）、及 9 株（56.3%）。【表三】

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，有其好發季節及感染族群等；由本研究自民國 90 年至 91 年收集到北台灣地區通報資料，也有相同流行情形；但以各年度通報數、陽性個案數、各地區個案數、男女性別個案數以及分離菌株分子型別來看，都顯示 91 年全年度較 90 年度約增加 2 倍上下；另外就兩年度各月份延續統計看來，A 群鏈球菌感染是有其季節性規律變化，但增加部分卻發現自 90 年 12 月起到 91 年 7 月為這兩年間陽性個案增加最高時期【圖十】，是否這段時間內，有致病力、感染力或散播力較強的特殊菌株在此階段流行。

首先我們由脈衝電泳分析出之菌株型別分布來看，主要型別分布並無顯著差異；再更仔細分析，將整個北台灣地區流行之主要 PFGE-subtype 為 GAS-S1000、GAS-S2001、GAS-S3000 及 GAS-S6000 只佔全部 70%，若以 80% 相似度來進一步區分主型別 PFGE-type，則主要主型別為：GAS-S10、GAS-S20、GAS-S30 及 GAS-S60，就佔全部菌株 85% 以上，這增加的 15% 次型別菌株可能與其主型別有所關聯存在；另外以 PFGE 主型別種類來看北台灣地區各縣市型別改變情形，發現主型別在這兩年間由 15 種增加到 26 種，各縣市也都有明顯增加【圖十一】，唯獨在宜蘭縣型別種類則僅由 7 種增為 8 種，這可能與宜蘭縣的交通環境有關，較不利於菌株散播，以致造成局部地區流行菌株且改變較少的原因；另外在探討這些主要 PFGE 型別改變情形，就整年度看來並無法看出有明顯差異，但就單獨縣市來看，在台北縣市是型別較多的縣市，因此由台北市來作一比較，在 PFGE 主型別各月份改變情形看來，主要感染月份，其 PFGE 主型別菌數也較多，但

其中 GAS-S30 則發現是在 91 年度較 90 年度多增加 11 倍之多【圖十二】；若再仔細去追蹤其個案資料，或可看出這些菌株的感染途徑，這也將是下一研究方向之一。對於流行案件的分析，自個案及接觸者所分離到之菌株均具有相同的 PFGE 主型別均；相反的當同一受感染者，但受感染時期不同，其中最短者只有相差約 4 個月，發現其個別分離到之菌株，具有不同 PFGE 主型別，這些結果都顯示，PFGE 分型方法運用在探討這些感染情形時，均具有其分析效益存在。

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；由於定序需要有較高成本，因此本實驗僅完成 210 株之定序及比對，但仍可看出這兩年來主要流行型別為 emm1.0 及 emm4.0，由此可看出在台灣地區造成猩紅熱症狀之 A 群鏈球菌主要流行之 emm 型別。

將本實驗所使用這兩種分子分型方式加以交叉比對，在脈衝電泳分析之同一主型別中，又可區分出不同 emm 型別，而相同 emm 型別也具有不同 PFGE 主型別【表四】，這將有助於從主要型別中再進一步探討菌株差異之比較分析。除此為了更深入探討這些菌株基本特性，我們純化部分分離之菌株 genomic DNA，利用聚合酶鏈鎖反應偵測其具有之毒素基因，初步發現到進行分析的菌株中均帶有產生 Streptococcal pyogenic exotoxin B 之 *spe B* 基因及產生 streptolysin O 之 *slo* 基因，但對 *spe A* 及 *spe C* 基因，並非每一株菌都具有。

在本研究中發現到 A 群鏈球菌對於盤尼西林均具有感受性，但某些病

患對盤尼西林治療會造成過敏現象，因此必須使用紅黴素來治療，在對紅黴素抗藥性試驗中發現，到雖然高抗藥性菌株所佔比率僅有 24.9%，但在中度抗藥性上卻高達 58.2%，尤其是在民國 91 年中度抗藥性竟高達 74.3%；將脈衝電泳分析菌株型別與抗藥性分析作一比較，主要的 PFGE-type 中：以 GAS-S20、GAS-SA0 及 GAS-S21 抗藥性菌株佔有率最高，另外在 emm 基因型中以 emm4.0 之抗藥性菌株佔有率最高。

由本研究所獲得的資料，雖然無法直接證實這兩年來菌株改變情形，但似乎發現這些菌株在北台灣地區改變概況及盛行情形，這些本土資料建立將有助於未來在防治猩紅熱之參考依據。

結論與建議

台灣位處溫帶及亞熱帶地區，加上地球的氣候變化，國際間交流日益頻繁，增加人與人間呼吸道傳播之病原菌的散佈，不僅人類儼然已經形成一廣大地球村，就連許多病原菌也都在各地區及各國間互相交流，病原菌的改變，將造成人體再度受到感染，甚至造成更嚴重之感染或後遺症；在本年度研究中，首要是建立起對 A 群鏈球菌特性研究之各項技術平台，並且將民國 90 年及 91 年度北台灣地區由法定傳染病通報之 A 群鏈球菌，藉由這些技術建置這些菌株基本特性之資料，藉此再進一步探討其中各項變化概況，並且在日後陸續將以往及目前收集菌株，一一建立其菌株特性資料，用來了解該疾病在台灣地區流行趨勢，這有助於未來在防治 A 群鏈球菌感染的參考資料，如此能儘早預作防範工作。

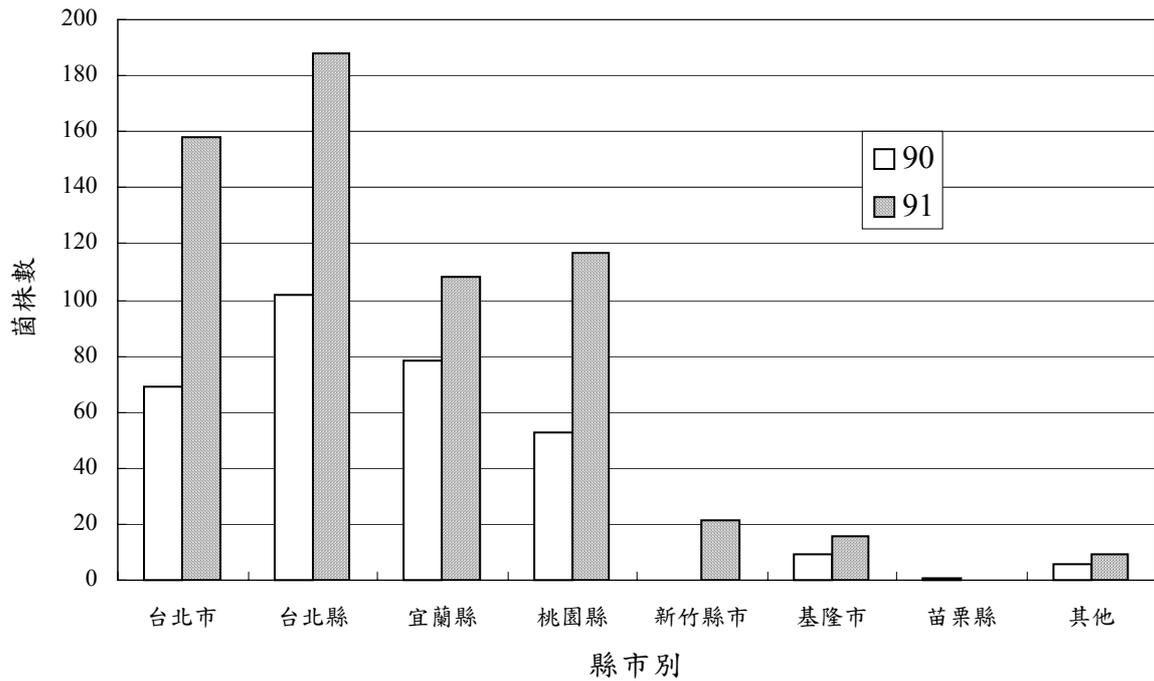
參考文獻

1. Beall B., Facklam R., Hoenes T., and 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. *J. Clin. Microbiol.* 1997 ; 35 : 1231-1235.
2. Beall B., Facklam R., Thompson T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1996 ; 34 : 953-958.
3. Bessen, D.E., Hollingshead, S.K. Molecular epidemiology, ecology, and evolution of group a streptococci.2000;117-24. In Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J J., Portnoy, D.A., Rood, J.I.. *Gram-Positive Pathogens American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
4. Bert F., Branger C., Lambert-Zechovsky N.. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Curr Microbiol.* 1997 ; 34(4) : 226-9.
5. Betriu C., Sanchez A., Gomez M., Cruceyra A., Picazo J.J.. Antibiotic susceptibility of group A streptococci : a 6-year follow-up study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 1717-19.
6. Bouvet A., Geslin P., Kriz-Kuzemenska P., Blanc V., Devine C., and Grimont F.. Restricted association between biotypes and serotypes within group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1994 ; 32 : 1312-17.
7. Caparon, M.. Genetics of group a streptococci.2000;53-65. In Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J J., Portnoy, D.A., Rood, J.I.. *Gram-Positive Pathogens American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
8. Cone, L., Woodard, D.R., Schlievert, P.M., Tomory, G.S.. Clinical and bacteriologic observations of a toxic-shock like syndrome due to

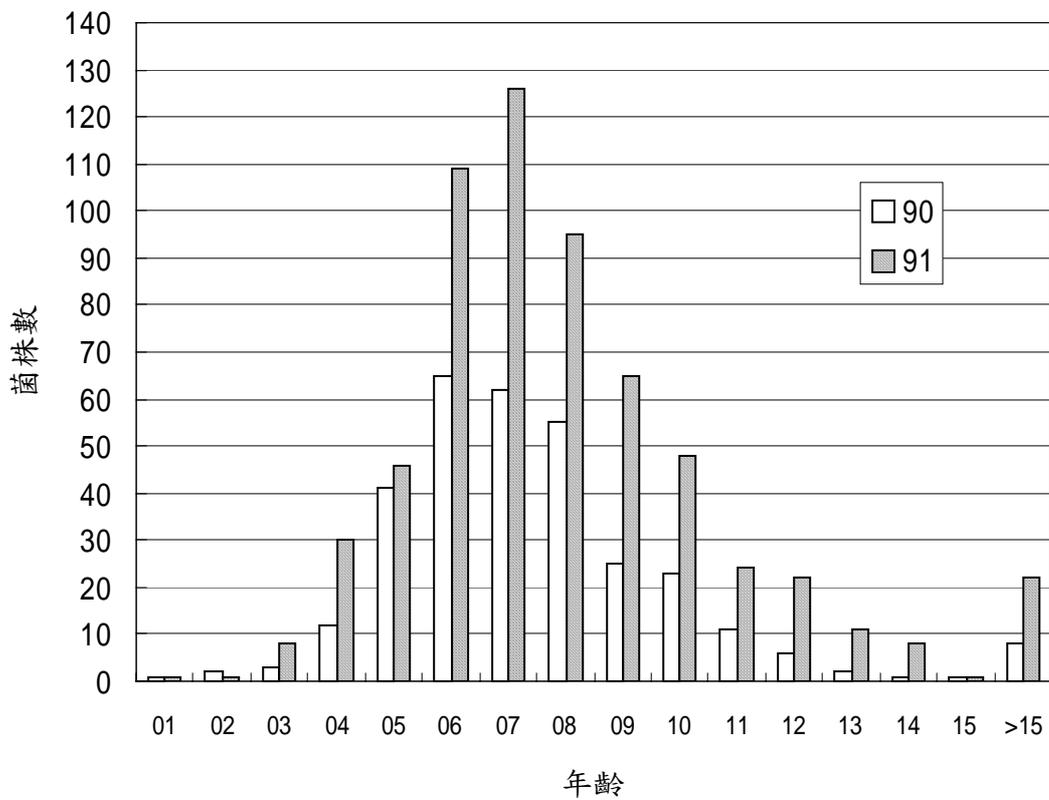
- Streptococcus pyogenes*. *N. Engl. J. Med.* 1987;317:146–49.
9. Cunningham M.W.. Pathogenesis of group a Streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000 ; 13 : 470-511.
 10. De Melo MC, Sa Figueiredo AM, Ferreira-Carvalho BT. Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of *Streptococcus pyogenes* isolated in 1978-1997 in different Brazilian cities. *J Med Microbiol.* 2003 ; 52 : 251-8.
 11. Descheemaeker P, Van LF, Hauchecorne M, Vandamme P, and Goossens H. Molecular characterisation of group A streptococci from invasive and non-invasive disease episodes in Belgium during 1993–1994. *J Med Microbiol* 2000 ; 49 : 467-471.
 12. Dicuonzo G, Fiscarelli E, Gherardi G, Lorino G, Battistoni F, Landi S, De Cesaris M, Petitti T, Beall B. Erythromycin-resistant pharyngeal isolates of *Streptococcus pyogenes* recovered in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 ; 46 : 3987-90.
 13. Dicuonzo G, Gherardi G, Lorino G, Angeletti S, Cesaris M, Fiscarelli E, Bessen D, Beall B. Group a Streptococcal genotypes from pediatric throat isolates in Rome, Italy. *J. Clin. Microbiol.* 2001 ; 39 : 1687-90.
 14. Enright, M.C., Spratt, B.G., Kalia, A., Cross, J.C., Bessen, D.E.. Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus pyogenes* and the Relationships between emm Type and Clone. *Infect. Immun.* 2001;69:2416-2427.
 15. Fischetti, V.A. Vaccine approaches to protect against group a Streptococcal pharyngitis.2000;96-04. In Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J J., Portnoy, D.A., Rood, J.I.. *Gram-Positive Pathogens* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 16. Gardiner D.L., and Sriprakash K.S.. Molecular epidemiology of impetiginous group A streptococcal infections in aboriginal communities of

- northern Australia. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34 : 1448-1452.
17. Gardiner D.L., Goodfellow A.M., Martin D.R., Sriprakash K.S.. Group A streptococcal Vir types are M-protein gene (emm) sequence type specific. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 902-7.
 18. Gardiner D.L., Hartas J., Currie B., Mathews J.D., Kemp D.J., Sriprakash K.S.. Vir typing : A long-PCR typing method for group a Streptococci. *PCR Methods Appl.* 1995 ; 4 : 288-93.
 19. Gardiner D.L., Goodfellow A.M., Martin D.R., and Sriprakash K.S. Group A Streptococcal Vir Types Are M-Protein Gene (emm) Sequence Type Specific. *J. Clin. Microbiol.* 1998 ; 36 : 902-907.
 20. Hartas J., Hibble M., and Sriprakash. K.S.. Simplification of a Locus-Specific DNA Typing Method (Vir Typing) for *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 1998 ; 36 : 1428-1429.
 21. Hsueh P.R., Chen H.M., Huang A.H., Wu J.J.. Decreased activity of erythromycin against *Streptococcus pyogenes* in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995 ; 39 : 2239-42.
 22. Hsueh P.R., Teng, L.J., Lee, P.I., Yang, P.C., Huang L.M., Chang, S.C., Lee, C.Y., Luh, K.T.. Outbreak of scarlet fever at a hospital day care center: analysis of strain relatedness with phenotypic and genotypic characteristics. *J. Hosp. Infect.* 1997;36:191-200.
 23. Hsueh P.R., Wu J.J., Tsai P.J., Liu J.W., Chuang Y.C., Luh K.T.. Invasive group a Streptococcal disease in Taiwan is not associated with the presence of Streptococcal pyrogenic exotoxin genes. *Clin. Infect. Dis.* 1998 ; 26 : 584-9.
 24. Kotb M.. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Jul ; 8(3) : 411-26.
 25. Schwartz B., Facklam R.R., Breiman R.F.. *Epidemiology : Changing*

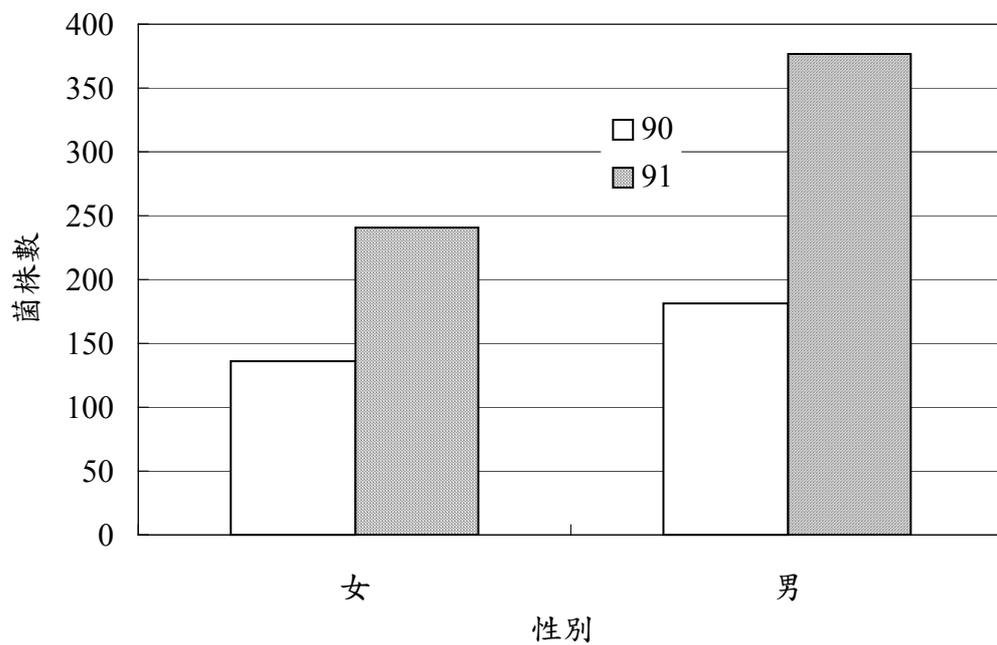
- epidemiology of group a Streptococcal infection in USA. *Lancet*.1990 ; 336 : 1167-71.
26. Steven, D.L. Invasive group A streptococcal infections. *Clin. Infect. Dis.* 1992;14:2-13.
 27. Stollerman G.H.. Rheumatic fever. *Lancet*. 1997 ; 349 : 935-42.
 28. Teixeira L.M., Barros R.R., Castro A.C., Peralta J.M., Da Gloria S. Carvalho M., Talkington D.F., Vivoni A.M., Facklam R.R., Beall B.. Genetic and phenotypic features of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Brazil that harbor new emm sequences. *J Clin Microbiol*. 2001 ; 39(9) : 3290-5.
 29. Todar K.. *Streptococcus pyogenes*. *Bacteriology 330 Home Page* 2002. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturespyo>
 30. Tyler S.D. ,Johnson W.M. ,Huang J.C. ,Ashton F.E. ,Wang G, Low D.E., Rozee K.R.. Streptococcal erythrogenic toxin genes : detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. *J. Clin. Microbiol*. 1992. 30 : 3127-3131.
 31. Vitali L.A., Zampaloni C., Prenna M., Ripa S.. PCR M typing : a new method for rapid typing of group a Streptococci. *J. Clin. Microbiol*. 2002 ; 40 : 679-81.
 32. York M.K., Gibbs L., Remington P.F., Brooks G.F.. Characterization of antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates from the San Francisco Bay area of Northern California. *J. Clin. Microbiol*. 1999 ; 37 : 1727-31.



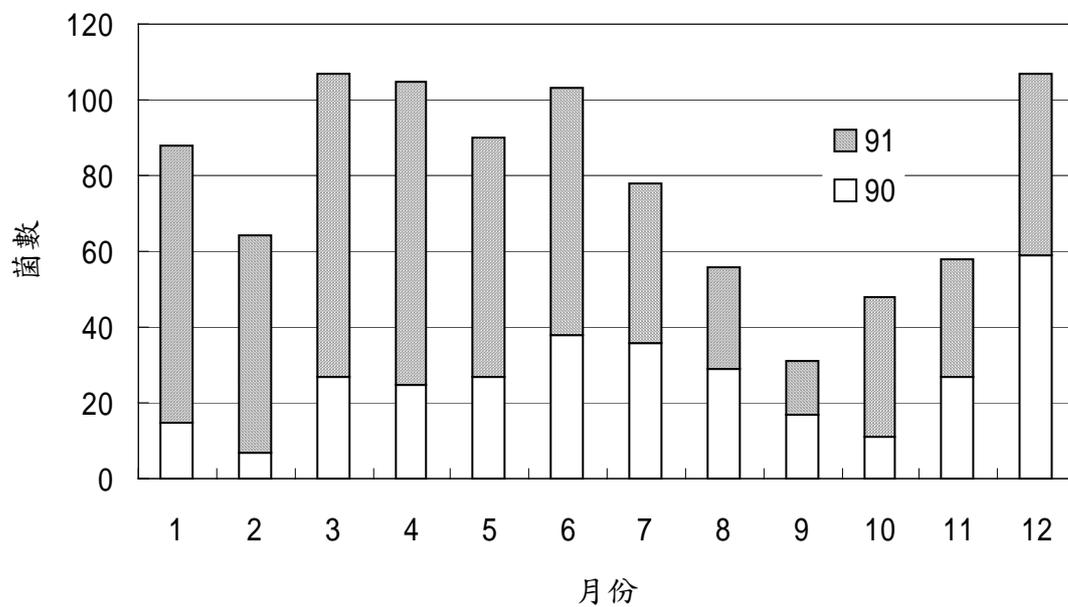
圖一：台灣北部地區各縣市收集 A 群鏈球菌數量 (2001~2002)



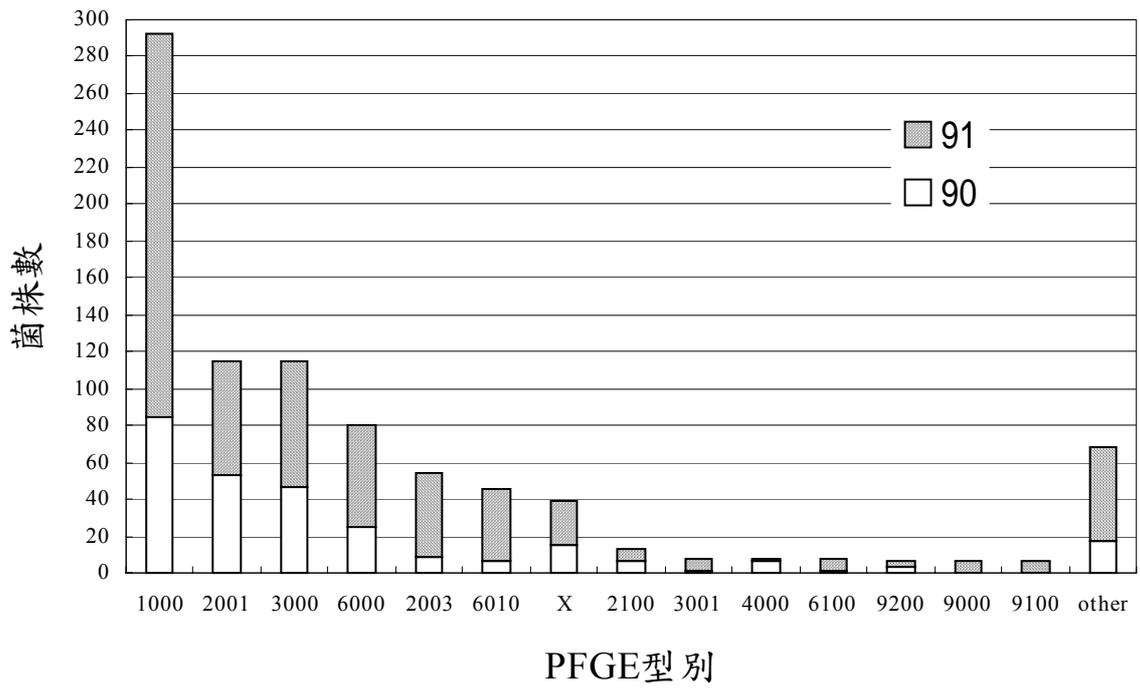
圖二：台灣北部地區各年齡收集 A 群鏈球菌數量 (2001~2002)



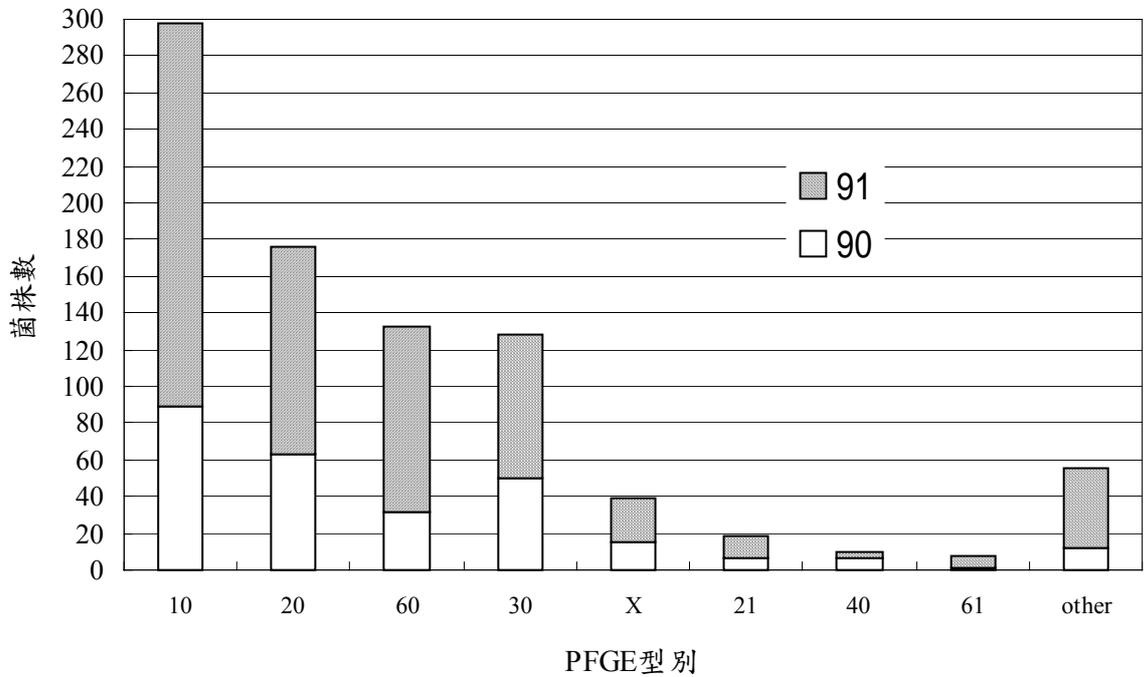
圖三：台灣北部地區不同性別收集 A 群鏈球菌數量



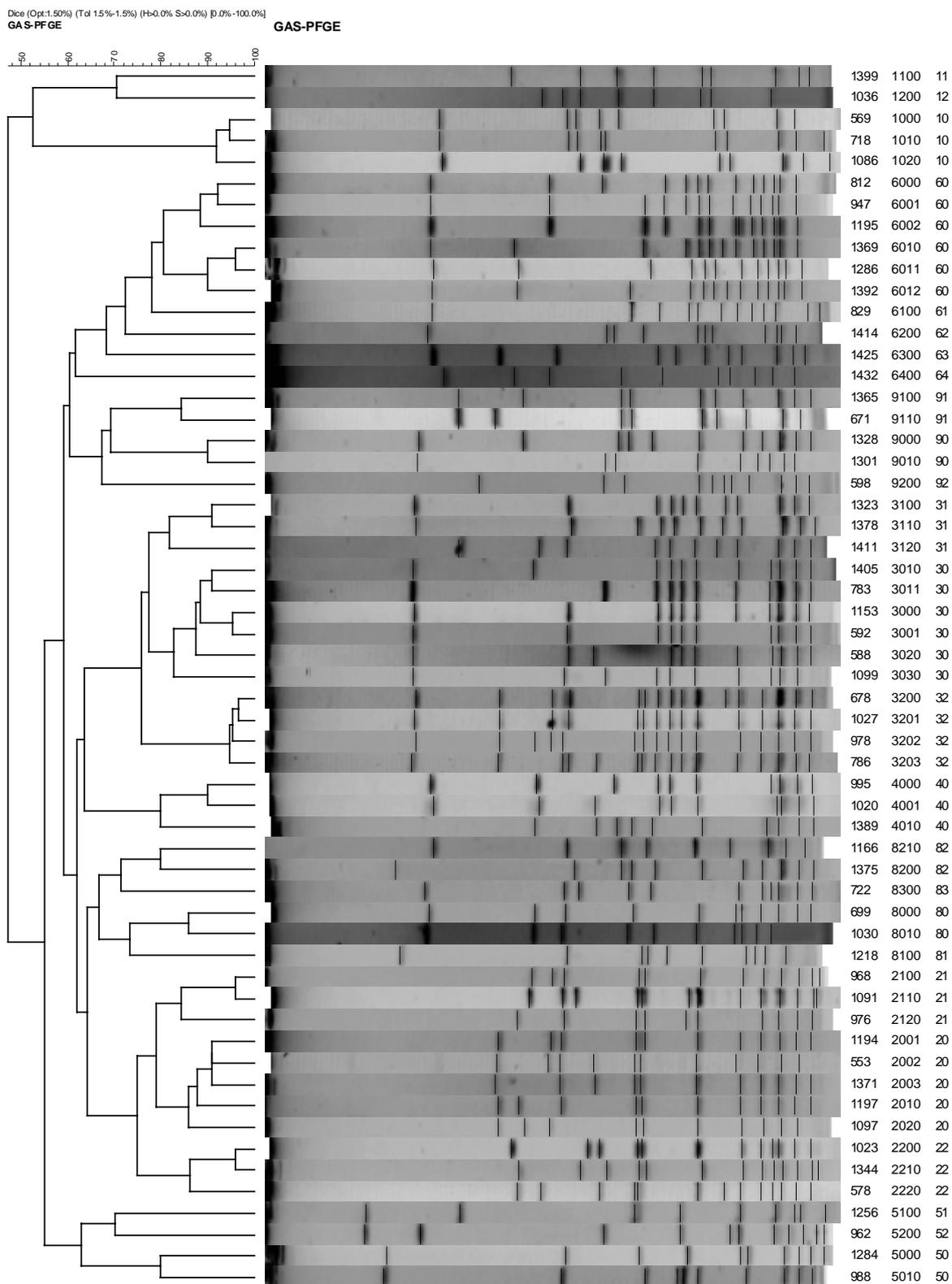
圖四：台灣北部地區各月份收集 A 群鏈球菌數量(2001~2002)



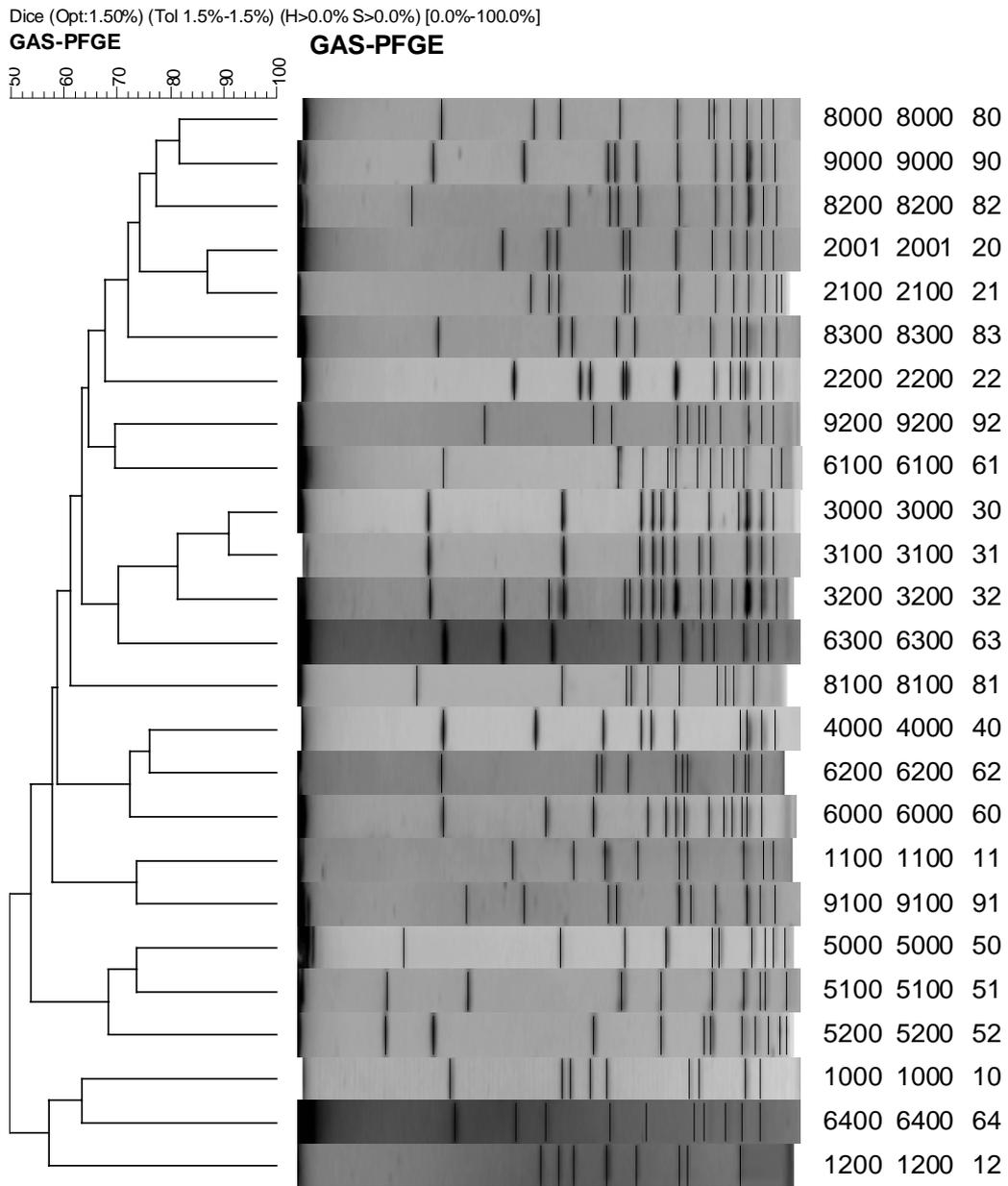
圖五：台灣北部地區 A 群鏈球菌脈衝電泳次型別分布 (2001~2002)



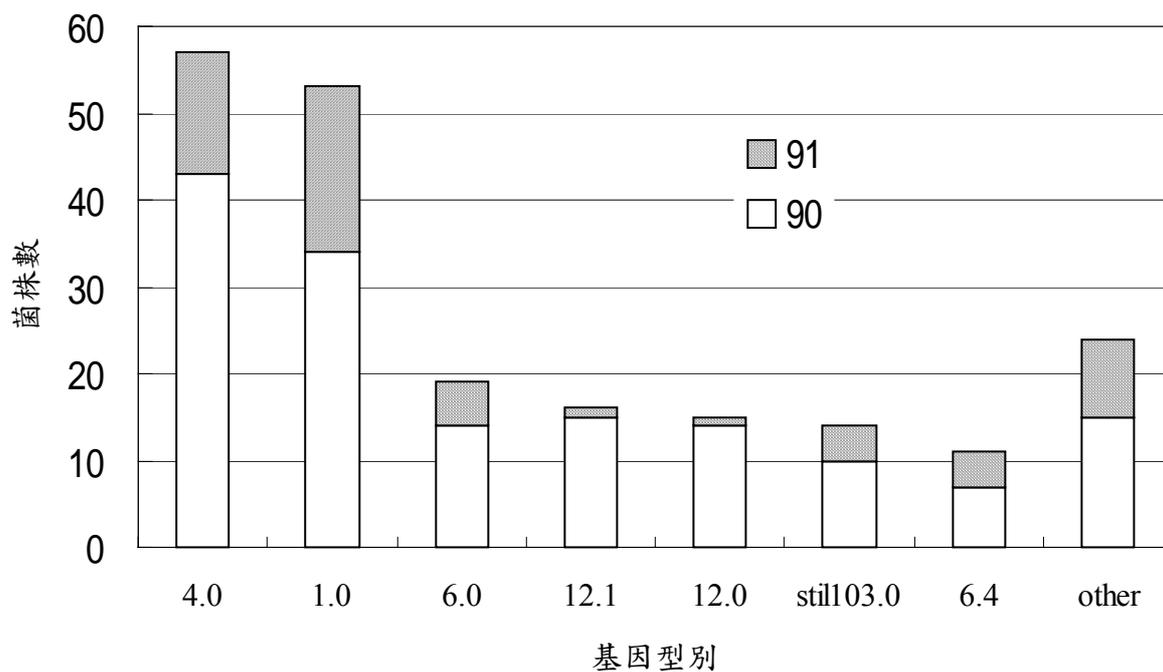
圖七：台灣北部地區 A 群鏈球菌脈衝電泳主型別分布 (2001~2002)



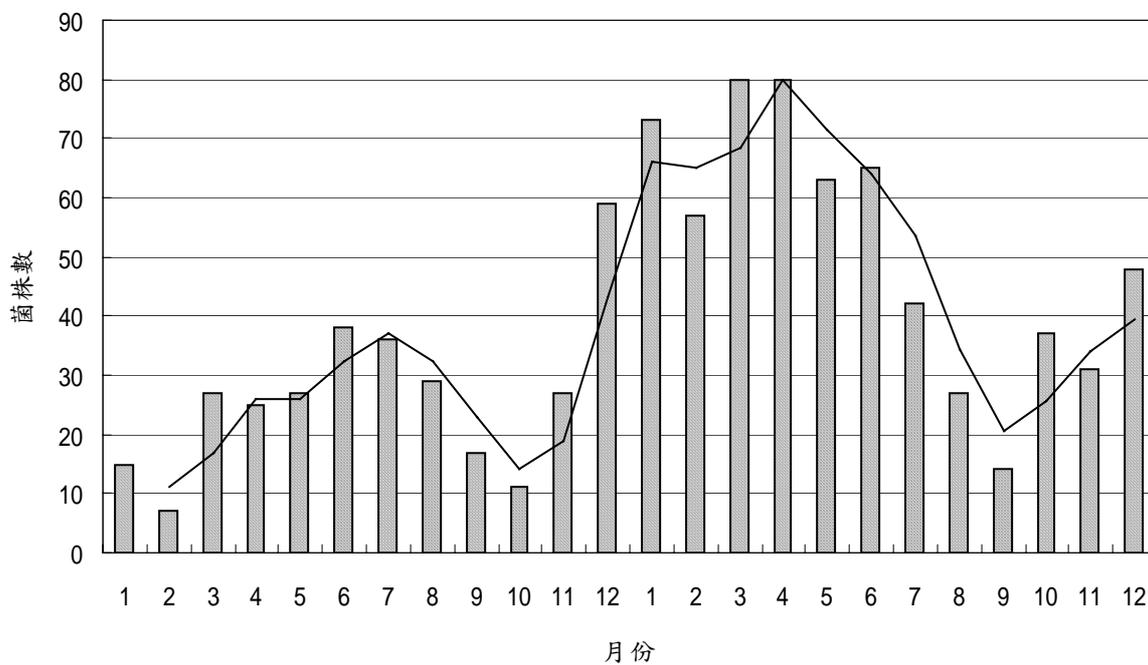
圖六：北台灣地區 A 群鏈球菌脈衝電泳次型別親緣關係圖（2001~2002）



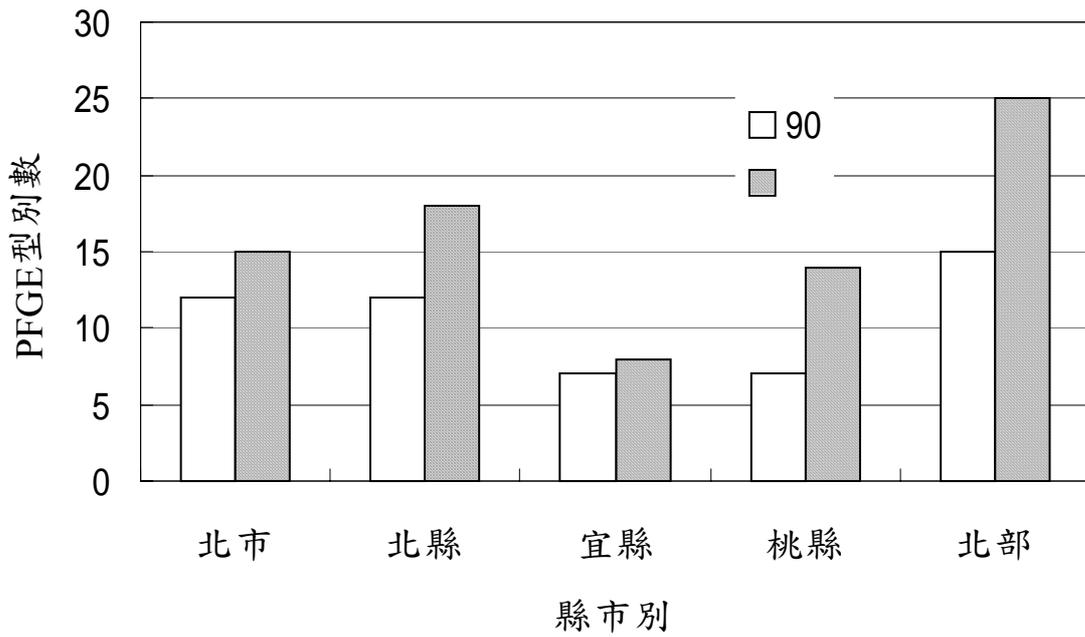
圖八：北台灣地區 A 群鏈球菌脈衝電泳主型別親緣關係圖（2001~2002）



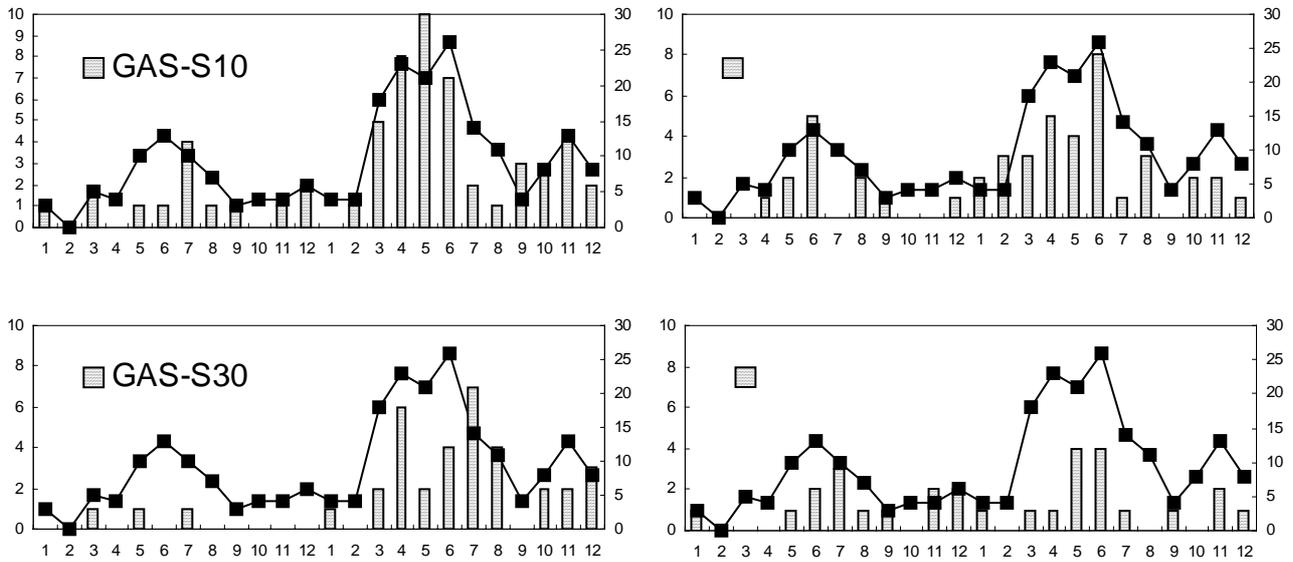
圖九：台灣北部地區 A 群鏈球菌 emm 基因型別分布 (2001~2002)



圖十：台灣北部地區連續月份收集 A 群鏈球菌數量 (2001~2002)



圖十一：北台灣地區各縣市 A 群鏈球菌脈衝電泳型別數比較(2001~2002)



圖十二：台北市地區 A 群鏈球菌各月份 PFGE 型別與個案分布 (2001~2002)

表一：北台灣地區 A 群鏈球菌紅黴素與克林達黴素感受性分布(2001~2002)

年代	No. (%) of Erythromycin			No. (%) of Clindamycin		
	R	I	S	R	I	S
90	82 (30.7)	64 (24.0)	121 (45.3)	5 (1.9)	0 (0.0)	259 (98.1)
91	126 (22.2)	422 (74.3)	20 (3.5)	10 (1.7)	0 (0.0)	577 (98.3)
Total	208 (24.9)	486 (58.2)	141 (16.9)	15 (1.8)	0 (0.0)	836 (98.2)

R : Resistant I : Intermediate S : Susceptible

表二：北台灣地區 A 群鏈球菌 PFGE type 與紅黴素敏感性分析(2001~2002)

PFGE Type	No. of Erythromycin			% of Erythromycin		
	R	I	S	R	I	S
GAS-S10	9	192	84	3.2%	67.4%	29.5%
GAS-S 20	109	52	7	64.9%	31.0%	4.2%
GAS-S 60	10	88	29	7.9%	69.3%	22.8%
GAS-S 30	6	108	11	4.8%	86.4%	8.8%
GAS-S A0	33	4	1	86.8%	10.5%	2.6%
GAS-S 21	17	0	0	100.0%	0.0%	0.0%

R : Resistant I : Intermediate S : Susceptible

表三：北台灣地區 A 群鏈球菌 PFGE type 與紅黴素敏感性分析(2001~2002)

Emm-Type	No. of Erythromycin			% of Erythromycin		
	R	I	S	R	I	S
emm4.0	44	7	4	80.0%	12.7%	7.3%
emm1.0	2	22	28	3.8%	42.3%	53.8%
emm6.0	1	5	12	5.6%	27.8%	66.7%
emm12.1	4	9	3	25.0%	56.3%	18.8%
emm12.0	3	6	5	21.4%	42.9%	35.7%
stil103.0	1	3	10	7.1%	21.4%	71.4%

R : Resistant I : Intermediate S : Susceptible

表四：北台灣地區 A 群鏈球菌 emm type 與 PFGE type 比對分析(2001~2002)

emm type	No. of isolate of PFGE type													
	10	20	60	30	X	21	40	80	91	92	31	52	83	
emm1.0	49	2					1					1		
emm1.10	1													
emm1.13	4													
emm1.14	1													
emm1.17	1													
emm1.24	1													
emm12.0	1			11	2		1							
emm12.1	2			11	2						1			
emm12.13				1										
emm12.23				3										
emm2.0								1						
emm33.0					1									
emm4.0		49	1	2		5								
emm4.3		1												
emm6.0	1	1	17											
emm6.13			1											
emm6.37			1											
emm6.4			11											
stil103.0	13		1											
other	1				1	1		1	1	1			1	

