

計畫編號：DOH92-DC-2015

行政院衛生署九十二年度

自行研究計畫

台灣地區結核病分子流行病學之研究

研究報告

執行機構： 行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人： 周如文

研究人員： 黃偉倫、張素英、陳盟勳

執行期間： 九十一年三月一日至九十一年十二月三十一日

* * 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 * *

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、中英文摘要	(3)
貳、本文	
一、前言	(5)
二、材料與方法	(7)
三、結果	(9)
四、討論	(10)
五、結論與建議	(11)
六、參考文獻	(12)
七、圖、表	(14)

壹、 摘要：

(中文)

研究目的針對台灣地區結核桿菌菌株，利用間距寡核酸分型 (Spacer Oligonucleotide Typing, Spoligotyping) 進行指紋比對分析，尤其是針對特定菌株北京株(Beijing Strain)進行型別鑑定。除標準化 Spoligotyping 指紋分析等實驗方法外，並將建立之結核桿菌資料庫納入本局重要傳染性病原細菌指紋資料庫及網路資訊系統。

研究方法本研究計畫將運用 Spoligotyping 方法，佐以資料庫建構 Bionumberics 電腦軟體，藉著參照比對標準菌株型態，續由圖譜進行菌株分子型別鑑定與親源性分析。

主要發現台灣地區北京基因型佔 40.6%，其中以北部(51.63%) 與東部 (46.24%) 的比例較高；致病比例與男女性別無統計上顯著性；就年齡層分析小於 24 歲族群感染比例最高。

結論及建議事項利用 spoligotyping 將結核桿菌分型可以提供流行病學上參考，特別是北京株此一型別，其可以作為抗藥性菌株、再復發及社區感染之科學依據。因此，期望藉此分型法，持續分析台灣之結核桿菌型別分佈，以利結核病之防治。

關鍵詞： 結核菌、間距寡核酸分型法、北京株

(英文)

Abstract

Several molecular epidemiological studies revealed that the predominant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in East Asia belong to the Beijing family genotypes. Such strains had been shown to be associated with antituberculosis drug resistance in some areas. To investigate the distribution of Beijing family genotypes of *M. tuberculosis* in Taiwan, 421 *M. tuberculosis* isolates were randomly collected from four geographically regions of Taiwan and were analyzed by spoligotyping. There were 113 resolved spoligotypes, among which 28 clusters were identified. One hundred eighty seven (44.4%) isolates were Beijing family genotypes, consisted of 172 (40.9%) Beijing genotype and 15(3.6%) Beijing-like genotypes. Sex, region and drug resistances (Isoniazid, Streptomycin, Rifampicin) were not associated with Beijing family genotypes. The proportion of Beijing family genotypes were higher among isolates from young age group (<24 y/o) and the elderly (>65 y/o). The results implicated that *M. tuberculosis* Beijing family genotypes might be the predominant strains causing tuberculosis in Taiwan.

貳、 本文

一、 前言：

結核病(tuberculosis)是一古老的傳染病，特別是十九世紀時的工業革命，社會結構迅速改變，人口集中於都市，因而人與人接觸增加，使結核病傳染機會大增，往往造成流行(1)。結核病(Tuberculosis, TB)是由分枝桿菌所引發的一種傳染性疾病，現今全世界有二千萬個患者，每年增加八百萬個新病人，並造成每年兩百萬人死亡(WHO, 1999)。尤其在最近五年內，在已開發國家中發生的病例急劇上昇，使得 TB 不再局限於未開發及開發中國家的專利，演變成為全球的問題。

由於結核桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tubercuosis*)之細胞壁富含脂質，所以其對抗惡劣環境耐力相當強，許多患者不知就醫治療，常藉由患者咳嗽或說話時所散佈的飛沫傳染，使得結核菌易在族群中傳開；一個開放性肺結核病人若不治療，一年平均可以感染 10-15 人，受感染的人在 2 年內有 5-15% 的人會發病(2)。世界衛生組織於 1993 年宣佈結核病為全球之緊急危機(a global emergency)(3)，依目前的統計，結核病是全球各種傳染病中引起最多死亡的疾病，據世界衛生組織估計，全球人口中幾乎有三分之一的人口(約 20 億人)感染結核菌(4)，如果不加強控制，世界衛生組織估計從 2000 年至 2020 年間將會有 10 億以上的新病例, 2 億的人會發病, 7 千萬人將死於結核病(5)。

對於結核病的防治，一直是國內公共衛生及醫療的重要課題，近五年來，結核病的死亡率約維持在每十萬人口 9 人左右，居台灣死因的第十二位，雖然台灣的防治工作已使結核病逐漸受到控制，但是據世界衛生組織認定之結核病已受控制之標準，制定盛行率 0.143% 以下、死亡率每十萬人口不超過 2 人，而尚有一大段距離。根據世界衛生組織的資料顯示，在全球所有國家之中，有三十四個國家在結核病的防治方面較我

國進步，而台灣被 WHO 列為中度流行地區，預估至少要 25 年後才能符合 WHO 的標準。

1995 年 Soolingen, 等人首先針對東亞各國家包括中國大陸，蒙古、南韓和泰國之結核分枝桿菌分型。由於中國大陸之菌株分型當中，其一特殊菌株佔一相當比例，命名為北京株(Beijing Strain)(6)。據夏威夷大學分析 1956 至 1990 年期間北京當地病理檢體結果指出，高達 92% 為北京基因型(7)。

雖然北京株最主要出現於亞洲，但卻流傳於全球，普遍推論北京株結核分枝桿菌較易突變成具有抗藥性之菌株(8)，而且因致病力較強易爆發區域感染。2001 年 Kruuner 愛沙尼亞之北京株，高達 87.5% 具有 isoniazid 及 rifampin 多重抗藥性；其中 67.2% 對 streptomycin、isoniazid、ethambutol 及 rifampin 全部皆具有抗性，僅只有 12% 無抗藥性(9)。在一項北京株與抗藥基因的研究發現，isoniazid 與 rifampin 對應的抗藥基因 *katG315* 與 *rpoB531*，在北京株當中有 96.8% 的 *katG315* 以及 77.3% 的 *rpoB531* 發生突變，然而相較於非北京株，僅有 85.7% 及 28% 突變頻率(10)，由此推測北京株較易突變為抗藥性菌株。

另外，北京株之結核分枝桿菌有逐年增加之趨勢，以西班牙 Gran Canaria Island 的研究為例，1993 年北京株僅佔 5.5%；1994 年佔 8.1%；1995 年達 16.4%；而 1996 年已達 27.1%(11)，由此數據可以看出北京株之增加情形。此外，許多研究指出北京株較易產生抗藥性，且推測其具有較強之致病能力(12)，因此，世界各國常以北京株作為研究結核病流行病學的重要依據，如俄國的北京株約佔結核菌總數之 58.9%(12)，香港約 70%(13)。

1997 年 Judith Kamerbeek 等人利用結核分枝桿菌之重複序列(direct repeat, DR)，將此結核分枝桿菌特有之 43 個重複序列之區間分型，稱為 spoligotyping(14)，其中北京株僅出現 35 至 43 之 9 個間隔片段序列。由

於 spoligotyping 具良好之特異性，可在短時間內檢測出基因圖譜，再依其圖譜同源性樹狀圖，可據為基因分型的良好工具。

由於北京株具結核菌流行病學的重要意涵，其對社區感染、再復發和多重抗藥性有相當大的關聯性。本實驗之目的是以收集台灣地區之確定菌株，建立菌株資料庫，並以 spoligotyping 分析台灣北京株分布情形，以期能在結核病防治上有所助益。

二、 材料與方法

1. 收集菌株

由台灣地區北(榮總及台大)、中(中山醫院)、南(成大醫院)、東(慈濟醫院)各區選定醫療院所收集菌株檢體，先經由細菌學檢驗確認的結核分枝桿菌實驗樣本 421 株。菌株以 Lowenstein-Jensen 斜面培養基，於 37 °C 下培養。M. Tuberculosis H37Rv 或 M. Bovis 標準菌株做為 spoligotyping 之對照組。檢體經標準化程序處理後，保存於超低溫冷凍櫃，並將菌株之流病資料以電腦軟體 Access 建立菌株之流病基本資料：包括菌株分離者與單位；採檢與菌株分離日期病人之姓名、年齡、性別、地址；發病日期；其它疾病歷史及其他相關流病資料等。

2. 間隔寡核酸分型法

2.1 設備與試劑

spoligotyping 所需之設備包括 Miniblottor MN45、PCR machine、Hybrization Oven、Water Bath、微量吸管、抽氣幫浦、沖片機、X-ray 底片。所須之試劑為 puReTaq Ready-To-Go PCR Beads、streptavidin-HRP、ECL、2xSSPE/0.1% SDS、2xSSPE/0.5% SDS、2xSSPE。

2.2 聚合酶連鎖反應

微量離心管內添加 17 μ l 水，依序加入各 2.5 μ l DRa、DRb，最後加入檢體菌液 3 μ l，每管再加入 25 μ l 礦物油後蓋上蓋。PCR 程式設定為

95 5分鐘；95 1分鐘、55 1分鐘、72 0.5分鐘，30cycles；72 5分鐘，4。

2.3核酸雜交試驗

以八連排微量試管，每管以微量吸管注入150 μ l 2 \times SSPE/0.1 % SDS，注入20 μ l PCR產物，以PCR machine denatnre加熱。將雜交膜以250 ml、60 之2 \times SSPE/0.1 % SDS清洗再置於Miniblotter。PCR產物分別注入每條溝中，置於60 烘箱雜交。再於60 雜交烘箱內以250ml 2 \times SSPE/0.5 % SDS溶液鐘清洗2次。

2.4呈色及沖片

雜交膜置於雜交管內。將10 μ l Streptavidin-HRP加入10 ml 2 \times SSPE/0.5 % SDS溶液混合均勻後，加入含雜交膜之雜交管中，以雜交烘箱42 溫度反應45分鐘。反應完後以42 250 ml 2 \times SSPE/0.5 % SDS溶液清洗兩次。之後於以250 ml 2 \times SSPE溶液清洗。倒乾清洗液後加入ECL反應試劑10 ml震盪。再置於壓片夾內，於暗房內壓片5分鐘後，進行沖片。

2.5雜交膜的保存

沖片完畢將雜交膜置於玻璃皿內，倒入80 250mL 1 % SDS震盪清洗。於室溫下以250mL 20mM EDTA 清洗15分鐘後，置入塑膠袋內，並添加少許EDTA後封口，於4 冰箱保存。

3.電腦分析與建立資料庫：

Spoligotyping 圖譜之影像檔以 Gel Compar (Applied Matts, Kortrijk, Belgium) 分析軟體，依據核酸分子量標記 (DNA size marker) 定位法，並利用 unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering 或 neighbor-joining 方法，常態化圖譜後，依疾管局規範編號建檔，並與菌株之流病資料連

結。採用 Dice Index 分析相似性 (計算誤差容忍度為 3.0%) , 將具相似圖譜之結核分枝桿菌分類並以樹狀圖(dendrogram) 標示 , 做成可供比對型式之數位化資料與資料庫。

三、結果

本研究自台灣地區臨床檢驗實驗室之收集菌株共 421 株 , 每一菌株皆由不同病人身上分離 , 菌株基本資料列於表一。其中北部地區為 215 個病例佔 51.5% ; 中部為 38 病例佔 9.0% ; 南部 75 個病例佔 17.8% ; 東部 93 個病例佔 22.1% ; 而男性為 332 個病例、女性 99 個病例。

台灣地區結核分枝桿菌之分型 , 421 個病例中可以區分成 113 型別(圖一)。而此 113 型當中主要群集(cluster)區分為 28 類(圖二) , 而有 85 型為單一株。其中北京株此一型共有 172 個病例佔 40.6%。表二中列出 : 北京株在台灣各區域之比例分別各有差異 , 北京株於北部所佔之比例為 51.63% (111/215) 中部為 31.58% (12/38) 南部為 28% (21/75) 而東部為 46.24% (43/93)。值得注意的是南部地區有一特定非北京株型菌株亦佔約 22.7%(17/75) , 其傳染或致病力情形值得由其它技術於探討北京株同時進行分析。

北京株於感染發病年齡層分布情形列於 , 以 24 歲以下青少年比例最高(16/26; 61.5%) , 其中以北部地區為比例最高(9/10; 90.0%) ; 其次為 25-34 歲的族群(17/35,48.6%) , 再次為大於 65 歲的族群(102/218; 46.8%)。至於 , 北京株致病力在性別上則無明顯差異性 : 男性為 44.7% ; 女性為 43.4%。

表三所示 , 本研究中台灣地區結核分枝桿菌北京型與非北京型

的抗藥性比例：其中以北京型對 isoniazid (33.7%) 與 rifampin (20.99%)；而非北京型則對 streptomycin(36.63%)抗藥性比例較高。多重抗藥菌株之比例北京型也比非北京型略高(19.34% vs 15.70%)。

四、討論

由近年來多個地區與國家之結核菌株分子流行病學數據得知，北京株(Beijing strain)正於世界各地區流行。例如：北京(多於 80%)、香港(70%)、越南及東歐國家。台灣與中國大陸及香港據地緣關係，相關分子流行病學資料之建立，刻不容緩。此菌群(family)中之 W 株更曾於 1990s 後期流行於美國，並由 *IS6110* 指紋及 PCR 分析證實與多重抗藥性相關。如能長期監測瞭解台灣地區：北京株於不同地區族群之流行趨勢；不同族群不同年齡層感染北京株之比例，以測知北京株流傳情形；不同族群間北京株與抗藥性之關聯性。以上訊息，將有利於台灣日後結核病防治。

本研究數據顯示，台灣地區結核分枝桿菌之分型，421 個病例中可以區分成 113 型別，除去北京株外，菌株型別具相當多樣化。北京株致病比例在男、女性別之關聯分析並無統計上顯著性差異；北京株好發於 24 歲以下青少年新病例，推測可能是近期傳播(recent transmission)造成感染的主要菌株型；事實上，在北部區域所收集之 10 株 24 歲以下病人菌株經分析後發現，比例竟高達 90%。進一步，若以 34 歲以下病人進行統計，則北京株所佔比例高達 54.1%。卡介苗相對於北京株之保護效果需要加以瞭解，結核病防治措施整體性值得探討，並可能需與時漸進加以適度修正。另外，北京株抗藥性比例略高於非北京型，此情形與世界各國研究結果相似。因此，北

京株極有可能在台灣持續演化成最主要的致病菌株，必須密切監測其傳染途徑模式、菌株感染族群（population）結構及致病情形。

雖然藉由結核菌不同的基因標幟為分析標的之 *IS6110*-RFLP 的分型效果較 Spoligotyping 佳，但處理步驟多較耗時且較不易標準化。反觀，Spoligotyping 易操作且易標準化，可同時鑑定結核分枝或非分枝桿菌。此 Spoligotyping 分析方法，可同時應用於菌株鑑定與分子流行病學研究，以深入瞭解台灣地區結核分枝桿菌菌株之種類與特異性。此計畫，本年度已經建立結核菌分子指紋分析標準化實驗室；收集流行病學基本資料；建立標準化 Spoligotyping 分析核心技術；建立電腦數位化資料庫；進行結核菌株收集及建立菌株庫及架構國內外結核病相關機構資訊與技術聯繫系統。目前，已經完成 2002 年度台灣地區北京株流傳情形之研究，並進行特定主題分子流行病學所需菌株之收集、培養與保存。預定長期監測結核桿菌菌株於 age-adjusted 不同族群之流行趨勢、接觸者追蹤、復發或再感染、機構內散播、實驗室交叉感染、抗藥性菌株演化等。以上訊息，將有利於台灣日後結核病防治。

五、結論與建議

Spoligotyping 為一簡單快速且易標準化之結核桿菌鑑定及分型方法，可同時鑑定結核分枝或非分枝桿菌。此分析方法可輔助現行標準之 *IS6110*-限制性斷片長度多態型分析法，以應用於菌株鑑定與分子流行病學研究，以深入瞭解台灣地區結核分枝桿菌菌株之種類與特異性。但此法需仰仗外購之試劑組，架高級品質不易控制，目前實驗室已著手開發新基因分型法，並朝自動化方式規劃。

台灣地區北京株之分佈有明顯之地域性差異,其中北及東部所佔比例比中南部高,由於北京株此一型別,可以作為抗藥性菌株、再復發及社區感染之科學依據。因此,藉此分型法,持續分析台灣之結核桿菌型別分佈,以利結核病之防治參考。

六、主要參考文獻

1. Bloch AB, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992;257:1055-1064.
2. WHO. Tuberculosis. WHO Information Fact Sheets NO.104. April, 2000, WHO, Geneva. 2000
3. WHO. TB a global emergency-WHO Report on the Tuberculosis Epidemic. Geneva. 1994.
4. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):496-514
5. WHO. TB a global emergency-WHO Report on the Tuberculosis Epidemic. Geneva. 1997.
6. Dick Van Sooligen, Lishi Qian, Petra E. W. Haas, James T. Douglas, Humadou
7. Traore, Françoise Portaels, Huang Zi Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, and Jan D. A. van Embden. Predominance of a Single Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Countries of East Asia. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Dec. 1995, p. 3234–3238
8. Lishi Qian, Jan D. A. Van Embden, Adri G. M. Van Der Zanden, Evert F. Weltevreden, Hongjin Duanmu, and James T. Douglas. Retrospective Analysis of the Beijing Family of *Mycobacterium tuberculosis* in Preserved Lung Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, February 1999, Vol. 37, No. 2, p. 471-474.
9. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, Van Sooligen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis*. 2002 Aug;8(8):843-9
10. Annika Krüüner, Sven E. Hoffner, Heinart Sillastu, Manfred Danilovits, Klavdia

Levina, Stefan B. Svenson, Solomon Ghebremichael, Tuija Koivula, and Gunilla Källenius. Spread of Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis in Estonia. *Journal of Clinical Microbiology*, September 2001, p. 3339-3345, Vol. 39, No. 9, p. 3339-3345.

11.I. Mokrousov, T. Otten, A. Vyazovaya, E. Limeschenko, M. L. Filipenko, C. Sola, N. Rastogi, L. Steklova, B. Vyshnevskiy and O. Narvskaya. PCR-Based Methodology for Detecting Multidrug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family Circulating in Russia. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis* 2003, Jun 3.

12. Jose A. Caminero, Maria J. Pena, Maria I. Campos-Herrero, Jose C. Rodriguez, Isbel Garcia, Pedro, Cabrera, Carmen Lafoz, Sofia Jose Torres, Dick Van Soolingen, Donald A. Enarson, and Carlos Martin. Epidemiological Evidence of the Spread of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain of the Beijing Genotype on Gran Canaria Island. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 164, Number 7, October 2001, 1165-1170

13. Vishnevskii BI, Narvskaya OV, Mokrousov IV, Istomin EA, Otten TF. Sensitivity to levofloxacin of *Mycobacterium tuberculosis* strains with various phenotype isolated from patients with newly diagnosed and chronic tuberculosis. *Antibiot Khimioter.* 2002;47(6):31-3.

14. Chan MY, Borgdorff M, Yip CW, de Haas PE, Wong WS, Kam KM, Van Soolingen D. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. *Epidemiol Infect.* 2001 Aug;127(1):169-71

15. Judith Kamerbeek, Leo Schouls, Arend Kolk, Miranda Van Agterveld, Dick Van Soolingen, Sjoukje Kuijper, Annelies Bunschoten, Henri Molhuizen, Rory Shaw, Madhu Goyal, and Jan Van Embden. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Apr. 1997, p. 907-914

圖一.台灣地區之421個病例中可以區分成113型

圖二. 台灣地區421株結核分枝桿菌中有28個群組

表一.台灣地區 421 株結核分枝桿菌基本資料

	菌株數	百分比
研究總數	421	
區域		
北部	215	51.1
中部	38	9.0
南部	75	17.8
東部	93	22.1
性別		
男性	322	76.5
女性	99	23.5
年齡		
<24	26	6.2
25~34	35	8.3
35~44	43	10.2
45~54	47	11.2
55~64	52	12.4
> 65	218	51.8

表 2. 台灣各區域北京型結核菌株之比例

	總數	北京型	
		菌株數	%
<u>區域</u>			
北部	215	111	51.63
中部	38	12	31.58
南部	75	21	28.00
東部	93	43	46.24
<u>性別</u>			
男性	322	144	44.72
女性	99	43	43.43
<u>年齡</u>			
<24	26	16	61.54
25-34	35	17	48.57
35-44	43	18	41.86
45-54	47	16	34.04
55-64	52	18	34.62
>65	218	102	46.79

表 3.北京株與非北京株結核分枝桿菌之抗藥性比例

	INH*	RMP*	EMB*	SM*	MDR*
北京株	33.7%	20.99%	27.07%	20.99%	19.34%
非北京株	24.42%	15.70%	27.33%	36.63%	15.70%

*INH, isoniazide; SM, streptomycin; RMP, rifampin;
EMB, ethambutol; MDR, multidrug resistance