

台灣地區北京型結核菌盛行情形調查

摘 要

北京型(Beijing family genotypes)結核菌，已在全球造成許多優勢流行及抗藥性等問題。本調查目的，在瞭解北京型結核菌在台灣地區盛行現狀。由北、中、南及東部四區隨機取樣，共收集民國九十一年自臨床檢體分離之 421 株結核菌，利用間隔寡核酸分型方法(spacer oligonucleotide typing, spoligotyping)進行北京型分析。共分析出 113 種型別，其中有 28(24.8%)型為群組(cluster)。盛行率顯示 187(44.4%)株為北京型，其中 172 (40.9%)為純北京型及 15 (3.6%)為類北京型(Beijing-like)。依地域分析北京型盛行情形顯示：北部地區佔 51.6%；東部地區佔 46.2%；中部地區佔 31.6%；而南部地區僅佔 28.0%。就年齡層分析，小於 24 歲群組因北京型結核菌致病比例最高(61.5%)，依次為大於 65 歲群組(46.8%)，最低者為介於 45 至 54 歲群組(34.%)。多變相分析結果顯示，地域及年齡與北京型感染具統計上顯著性差異。依據以上證據推論，北京型結核菌在台灣應存在已久並造成新進傳播(recent transmission)。

前 言

台灣地區五十多年來因為實施國家結核病防治方案(National Tuberculosis Programme, NTP)，結核病的盛行率與死亡率明顯下降。然而，結核病仍佔台灣地區法定通報傳染病第一位。民國九十年，共通報 14,486 例，發生率為每十萬人 64.9 例[1]。

北京型結核菌首次於民國八十四年報導，因大陸北京地區 86%結核菌被鑑定出屬於同一型別而命名[2]。後經證實香港[3]、馬來西亞[4]、越南[5, 6]、泰國[7]及南韓病人[2]亦大部份因感染此型結核菌致病。一般認為當北京型結核菌株導入並流傳於新族群時，極有可能成為優勢之流行菌株[8]。在越南的研究顯示，北京型結核菌與年輕族群相關且推論是新進傳播之主要菌型[5]。

本調查目的，即在運用 *spoligotyping* 瞭解台灣地區北京型結核菌盛行情形，以規劃更有效率之防治策略。

Kamerbeek 等人利用結核菌之重複序列(direct repeat, DR)，將結核菌特有之 43 個重複序列之區間分型，稱為 *spoligotyping* [9]，其中北京型僅出現 35 至 43 之 9 個間隔片段序列。此方法同時具備鑑定與基因分型功能，並有量化及再現性高之優點，目前已運用到許多結核病感染及傳播監測上。

材料與方法

一、菌株收集

收集台灣地區民國九十一年經由細菌學檢驗確認的結核菌 421 株（依北、中、南、東地區分布，菌株數分別為 215、38、75、93 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。

二、間隔寡核酸分型法

（一）、設備與試劑

Spoligotyping 所需之設備包括樣品注入槽、核酸複製儀、雜交烘箱、水浴槽、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、2 x SSPE/0.1% SDS、2 x SSPE/0.5% SDS、2 x SSPE。

（二）、聚合酶連鎖反應

微量離心管內添加 17µl 水，依序加入各 2.5µl DRa、DRb 引子，最後加入檢體菌液 3µl，每管再加入 25µl 礦物油後蓋上蓋。PCR 程式設定為 95°C 5 分鐘；再以 95°C 1 分鐘、55°C 1 分鐘、72°C 0.5 分鐘進行 30 次循環；72°C 5 分鐘，4°C ∞。

（三）、核酸雜交試驗

以八連排微量試管，每管以微量吸管分裝 150µl 2 x SSPE /0.1% SDS 溶液後，注入 20µl PCR 反應產物，以核酸複製儀加熱至 95°C 將核酸雙股結

構打斷形成單股。將雜交膜以 250 ml、60°C 之 2x SSPE /0.1% SDS 清洗再置於樣品注入槽。單股 PCR 產物分別注入每條溝中，置於 60°C 烘箱雜交。再於 60°C 雜交烘箱內以 250 ml 2x SSPE /0.5% SDS 溶液中清洗 2 次。

(四)、呈色及沖片

雜交膜置於雜交管內。將 10 μ l Streptavidin-HRP 加入 10 ml 2x 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°C 溫度反應 45 分鐘。反應完後以 42°C 250 ml 2x SSPE /0.5% SDS 溶液清洗兩次。之後於以 250 ml 2x 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，沖片完畢將底片掃描影像進行判讀。

(五)、雜交膜的保存

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

結 果

分析結果顯示，421 株結核菌株具 113 型 spoligotyping (圖一)。其中有 28 (24.8%) 型為群組 (圖二)，其餘 85 (75.2%) 株則各具單一獨特之型別。共有 187 (44.4%) 株為北京型：172 (40.9%) 純北京型及 15 (3.6%) 為類北京型；剩餘之 243 (55.6%) 為非北京型。

病人感染北京型之比例，依據區域、性別及年齡之分層分析列於表一。依地域分析，北京型盛行情形顯示：北部地區佔 51.6%；東區地區佔 46.2%；中部地區佔 31.6%，而南部地區僅佔 28.0%。南部地區，則另外有一主要 (25/75, 33.3%) 流行菌株屬於某一特定古典株 (ancestral strain)，典型之古典株為具間隔片段序列 33，但缺少 29 至 32 及 34 之位點。就性別而言，男性與女性感染北京型之比例相當。就年齡層分析，小於 24 歲群組因北京型結核菌致病比例最高 (61.5%)，依次為大於 65 歲群組 (46.8%)，最低者為介於

45 至 54 歲群組(34.%)。北部及中部地區，小於 24 歲群組各有 90% (9/10) 及 100% (2/2)感染北京型結核菌。單一變相分析結果顯示，地域與北京型感染具統計上顯著性差異;多變相分析結果顯示，地域上北部地區(95% CI 1.7-5.3)及東部地區(95% CI 1.2-4.7)，及年齡小於 24 歲群組(95% CI 1.3-10.1)與北京型感染具統計上顯著性差異。

討 論

在免疫不全老鼠之動物模式上，證實北京型結核菌毒性較強(10)，並且可能會使卡介苗保護效果不彰(11)。針對全球不同地區北京型結核菌盛行及傳播之研究(12)指出：南美佔 2%;中美歐洲非洲佔 3-5%;中東佔 10%;大洋洲佔 13%;北美佔 16%，大西洋國家則佔 45 to 86%。由結果顯示，台灣地區北京型結核菌佔 44.4%，與韓國 43%(13)相當，但是低於越南(54%)(5)香港(70%)(3)及大陸(86%)(13)。

台灣土地面積 36,000 平方公里，是個人口密度相當高的國家。北京型結核菌在北部及東部地區盛行率高於中部及南部地區。依據內政部 2002 年台灣地區人口分佈及密度普查結果資料(14)顯示，北部地區人口密度最高(大台北地區每平方公里 9,690 人)遠高於東部地區(花蓮地區每平方公里 76 人)。值得注意的是，此二不同人口密度及結核病盛行率區域具相近比例(北部 51.6%及東部 46.2%)的病人感染北京型結核菌。值得再深入調查台灣地區北京型結核菌如何散播，尤其是在東部地區。

Brosh 等人最近的報導中指出，依據演化之狀態(scenario)結核菌具備特定缺失片段 (TbD1)與否，可將結核菌分類為古典型或現代型(15)。本研究發現南部地區除 28.0%北京型結核菌外，另發現一主要流行株(30/75, 40%)屬於古典型。推測古典型結核菌可能已在南部區域持續傳播一段時日。

事實上，因為大於 65 歲群組(46.8%)感染北京型結核菌比例高於中年群組(34.0%)，可能排除北京型結核菌是新進才傳入台灣地區的新興菌株，並顯示北京型結核菌早已存在並持續傳播著。此外，小於 24 歲族群相當高比

例的感染北京型結核菌，表示北京型是目前優勢流行株並造成社區中之新進傳播。

由於北京型具結核菌流行病學的重要意涵，其對社區感染、復發和多重抗藥性有相當大的關聯性。疾病管制局將持續追蹤分析北京型結核菌之盛行情形，除瞭解危險因子及傳播模式外，並期待能阻斷其傳播達到結核病防治目標。

附 註

內容已投稿 J. Clinical Microbiology 複審中,本報告擷取其部分資料。

誌 謝

臺大醫院、台北榮總、花蓮慈濟、中山醫院及成大醫院提供菌株及相關資料。

撰稿者：周如文¹、黃偉倫¹、陳盟勳¹、江振源²

¹衛生署疾病管制局研究檢驗組 ²衛生署胸腔病院

參考文獻

1. Chen ZC : Tuberculosis annual report 2002, Annual Rep., 2002 ; Center Disease Control. Department of Health, R.O.C.
2. Qian L, Embden JDV, Zanden AGVD, et al: Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. J. Clin. Microbiol. 1999 ; 37:471-4.
3. Chan MY, Borgdorff M., Yip CW, et al: Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represents the Beijing genotype. Epidemiol. Infect. 2001 ; 127:169-71.
4. Dale JW, Nor RM, Ramayah S, et al: Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. J. Clin. Microbiol. 1999 ; 37:1265-8.
5. Anh DD., Borgdorff MW, Van LN, et al: *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

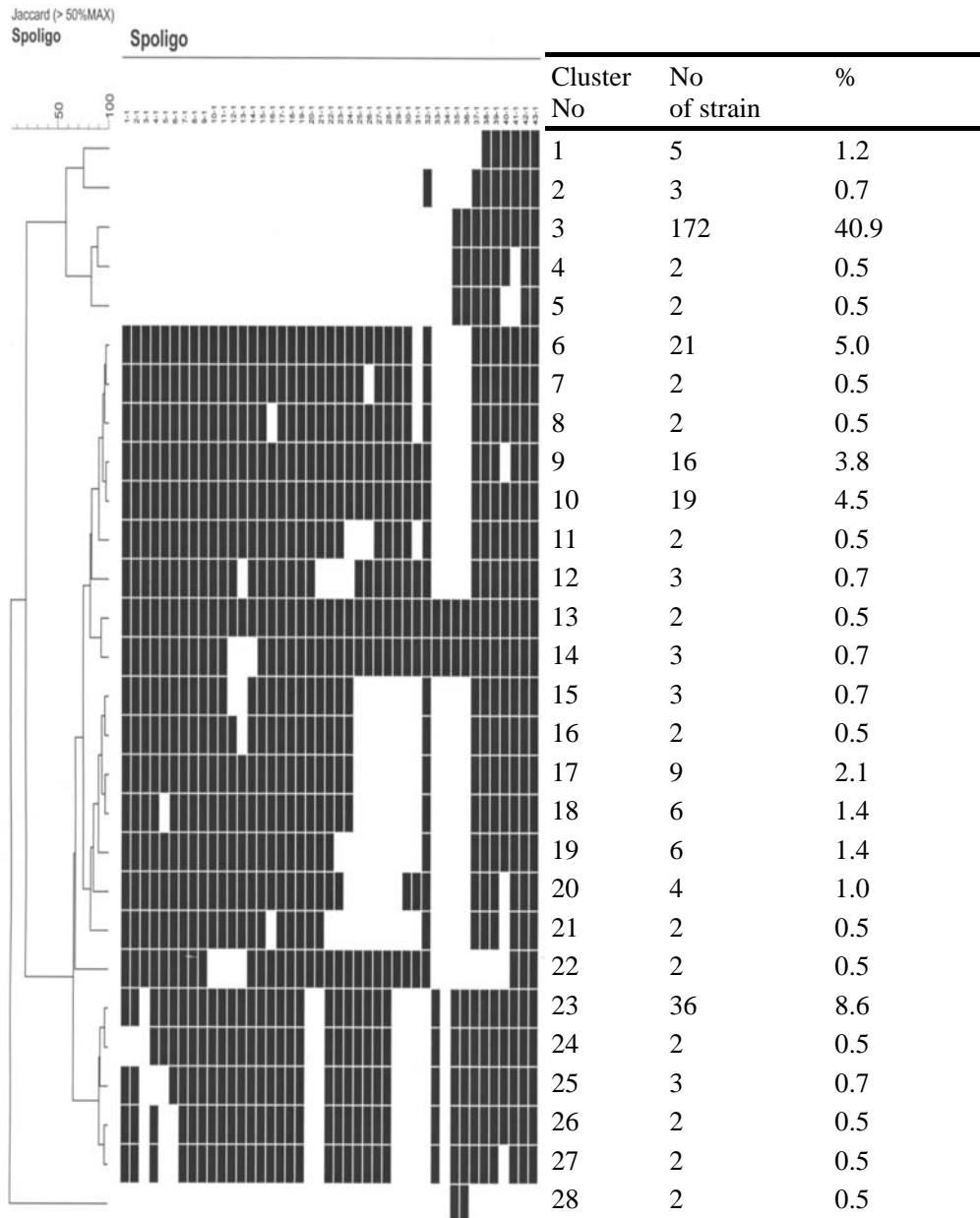
- genotype emerging in Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2000 ; 6:302–5.
6. Lan NTN., Lien HTK, Tung LB, et al: *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2003 ; 9:1633-5.
 7. Prodinge WM, Bunyaratvej P, Prachaktam R., et al: *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype in Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 2001 ; 7:483–4.
 8. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al: Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001 ; 164:1165–70.
 9. Kamerbeek J., Schouls L, Kolk A, et al: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997 ; 35: 907-14.
 10. Manca C., Tsenova L, Bergtold A, et al: Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001 ; 98:5752-7.
 11. Lopez B., Aguilar D, Orozco H, et al: A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 2003 ; 133:30-7.
 12. Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al: Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J. Clin. Microbiol.* 2003 ; 41:1963-70.
 13. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.* 1995 ; 33:3234–8.
 14. Statistical Yearbook of Interior, R.O.C.. Annual Rep., Department of Statistics,

Ministry of Interior, R.O.C. 2002.

15. Brosch R., Gordon SV, Marmiesse M, et al: A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002 ; 99: 3684-9.



圖一、民國九十一年台灣地區 421 株結核菌間隔寡核酸分型法型別結果



圖二、民國九十一年台灣地區 421 株結核菌間隔寡核酸分型法群組結果

表一、民國九十一年台灣地區 421 株結核菌分析結果（依地區、性別、年齡群）

	Isolate	Beijing genotype		family	Univariate	
		Number (%)	Number		%	Odds ratio
Total	421	187	44.4			
Region						
Northern	215 (51.1)	111	51.6	2.7	1.5-5.1	
Central	38 (9.0)	12	31.6	1.2	0.5-3.0	
Southern	75 (17.8)	21	28.0	1.0		
Eastern	93 (22.1)	43	46.2	2.2	1.1-4.5	
Sex						
Male	322 (76.5)	144	44.7	1.1	0.7-1.7	
Female	99 (23.5)	43	43.4	1.0		
Age Group						
<24	26 (6.2)	16	61.5	3.1	1.0-9.5	
25-34	35 (8.3)	17	48.6	1.8	0.7-5.0	
35-44	43 (10.2)	18	41.9	1.4	0.5-3.6	
45-54	47 (11.2)	16	34.0	1.0		
55-64	52 (12.4)	18	34.6	1.0	0.4-2.6	
>65	218 (51.8)	102	46.8	1.7	0.8-3.5	

^a CI, confidence interval