

台灣地區多重抗藥性結核菌之基因變異性與分子流行病學

摘要

爲了瞭解台灣地區多重抗藥性 (multidrug resistance, 簡稱 MDR) 結核菌株之基因變異性、演化關聯性和傳染動態, 遂利用基因定序、間隔寡核酸分型方法 (spacer oligonucleotide typing, 簡稱 spoligotyping) 及 IS6110 限制酶片段多型性 (restriction fragment length polymorphism, 簡稱 RFLP) 分型等方法, 分析收集自不同地理區域的菌株。本研究基因定序分析 162 株多重抗藥菌株及 40 株藥物敏感性菌株, 深入探討 *rpoB* 基因上不同的位點突變、序列缺失 (deletion) 和序列插入 (insertion) 與造成瑞比新 (rifampin, 簡稱 RMP) 抗藥性生成的關聯性。結果顯示, 162 株多重抗藥性菌株中 146 株 (90.1%) 在 81-鹼基對長度區域 (81-base-pair region) 有突變發生, 而 40 株藥物敏感性菌株在此區域則無發現任何突變點。進一步分析結果, 總共發現 32 種不同的突變型, 包括 30 種密碼子 (codon) 位點突變, 1 種序列缺失和 1 種序列插入型突變, 並鑑定出 11 個新的對偶基因 (allele) 突變型。定序結果明確指出, 多重抗藥性菌株之發展與 *rpoB* 基因發生突變有關。另外, 多重抗藥性菌株中 60.5% 屬於北京型 (Beijing family), 北京型與各密碼子的突變頻率沒有統計關聯性。再者, 因爲 IS6110 限制酶片段多型性分型結果顯示多重抗藥性菌株基因變異性高, 推論台灣地區結核菌對 RMP 抗藥性的產生, 可能較傾向於是感染結核菌後 *rpoB* 基因發生突變所造成, 而非由多重抗藥結核菌的直接傳播所致。

前言

結核菌多重抗藥性的發生已經成爲全球的重大問題[1], 已知平均的抗藥性盛行率爲: 19.6% 對異菸鹼醯 (isoniazid, 簡稱 INH), 12.4% 對鏈黴素 (streptomycin, 簡稱 SM), 12.0% 對 RMP, 5.9% 對孟表多 (ethambutol, 簡稱 EMB), 9.3% 對 INH 和 RMP 皆有抗藥性[2]。在德國、亞塞拜然

(Azerbaijan)、古巴、愛沙尼亞、美國紐約和南非等國研究，發現抗藥性結核菌的傳播與北京型結核菌有關[3]。台灣地區施行全國結核病防治計畫 (National Tuberculosis program, NTP) 已經超過五十年，疾病盛行率和死亡率已有明顯的下降，然而每年仍有許多新的病例產生。根據民國九十年資料顯示，有 14,486 通報的結核病個案，通報率為 64.9 人/每十萬人[4]。在台灣地區，RMP 用於結核病治療開始於民國六十七年。抗藥性盛行率的增加情形，從民國四十九年至九十一年分別為 8.4-22.6% (INH)，4.8-15.4% (SM)，0.2-2.1% (RMP)，0.1-5.8% (EMB)，1.2-2.1% (MDR)。

通常對 RMP 具抗藥性之菌株，約有 90 %同時對 INH 具有抗藥性，因此，RMP 抗藥性可以當成具有多重抗藥性與否的指標。結核菌會對 RMP 藥物有抗藥性，是由於核糖核酸聚合酶 (RNA polymerase) β -subunit 的 *rpoB* 基因中一段 81 個鹼基對區域去氧核糖核酸 (DNA) 發生突變所造成 [5,6,7,8]。本研究擬由聚合酶連鎖反應產物進行 DNA 自動定序的結果，得知台灣地區抗藥性菌株 *rpoB* 基因上多變區域發生突變的位置及頻率。此外，亦利用間隔寡核酸分型方法瞭解北京型結核菌株和突變頻率的關聯性；另外由 IS6110 限制酶片段多型性分型建立每個抗藥性菌株特有的基因圖譜，以分析菌株間傳染及流行病學上的關聯性。本研究的目的，在協助了解台灣地區多重抗藥性菌株分子遺傳學上的特性。若整合本研究所獲得的資訊，有助於發展快速且早期的診斷方法及確認對第一線藥物具有抗藥性的菌株特性，提供有效的治療和正確的疾病感染控制。

材料與方法

一、菌株收集

自前台北胸腔病院收集民國八十七年至九十二年的多重抗藥性結核菌共 162 株。並以民國九十二年收集自台北榮民總醫院 40 株藥物敏感性結核菌株作為對照。

二、菌株培養及藥物敏感性試驗

所有研究的檢體接種在 Löwenstein-Jensen 固態培養基，在 37°C 下培養 4 到 8 個星期。利用細菌學及分子遺傳方法鑑定菌種。藥物敏感性試驗是利用間接瓊脂比例法（indirect agar proportion method）進行[9]，培養基中抗結核桿菌一線藥物的濃度分別為 INH 0.2 及 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ，SM 2.0 及 10.0 $\mu\text{g/ml}$ ，EMB 5.0 及 10.0 $\mu\text{g/ml}$ ，RMP 1.0 及 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 。具有抗藥性的定義為：在添加藥物的培養基上結核菌之生長相對於不加藥的對照組，出現至少 1% 的生長量。多重抗藥性的定義為：至少對第一線抗結核菌藥物 RMP 及 INH 具抗藥性。

三、去氧核糖核酸萃取

基因組 DNA 抽取方法，簡單的敘述如下：菌株的菌落懸浮於 TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl（酸鹼值 8.0），1 mM EDTA（酸鹼值 8.0）），接著加熱去活化，懸浮液加入溶菌酶（lysozyme）後，置於 37°C 作用 2 小時，接著加入蛋白酶 K（proteinase K）和 10% 介面活性劑（SDS），置於 56°C 放置隔夜，再加入 NaCl CTAB/NaCl 置於 65°C 反應 10 分鐘，利用酚/氯仿/異戊醇分離法將蛋白質去活化和移除，最後以酒精純化及沉澱，最後回溶於 TE 緩衝液。藉分光光度計（DU 640B, Beckman Coulter）測量 260nm 及 280nm 吸光值以定量。

四、IS6110 限制酶片段多型性分型法

所有分離菌株皆進行標準的 IS6110 限制酶片段多型性分型法[10]。扼要描述如下：基因組(genomic)DNA 以限制酶 *Pvu* II 反應作用 6 個小時，接著注入 0.8% 洋菜膠瓊脂，以 1 倍 TBE 緩衝液，於固定電壓 30 伏特進行隔夜電泳。以參考菌株 Mt 14323 的基因組 DNA 為外部對照（external control），及以混合之超螺旋(supercoiled) DNA 標記/*Pvu* II 限制酶切割和 Φ X174/*Hae* III 限制酶切割為內部對照（internal control）。產生的 DNA 片段轉移到雜交膜（Hybond N⁺，Amersham Pharmacia 廠牌）上，續以 245 個鹼基對片段長

度的IS6110 探針進行雜交。放置隔夜後，雜交片段以ECL DNA偵測套組（Amersham Pharmacia廠牌）偵測，最後曝光於BioMax 底片（Eastman Kodak廠牌）上。

五、間隔寡核酸分型方法

結核菌基因組中，直接重複（direct repeat，DR）為含相同的 36 鹼基對長度之序列。直接重複以 35 至 41 個鹼基對之非重複序列間隔，具有結核菌株群特異的遺傳多態性。Kamerbeek等人利用結核菌群之重複序列，將結核菌群特有之 43 個直接重複間隔片段之有無進行分型，稱為間隔寡核酸分型方法[11,12]。此方法是以聚合酶連鎖反應為基礎，隨之利用已經發展的商業套組（Isogen Bioscience BV, Maarsse, The Netherlands）進行後續實驗，詳細的操作方法可參考說明書。簡單描述如下：聚合酶連鎖反應以DRa 和 DRb兩對引子進行放大反應，接著與雜交膜上預先共價鍵結的 43 個間隔寡核苷探針進行雜交，利用ECL[®]系統進行最後的影像偵測及顯影。每次雜交實驗都以結核菌及牛型結核菌(*M. bovis*)標準菌株，同時使用兩者或擇一做為陽性對照組。純北京（Beijing）株定義為僅出現第 35 個至第 43 個之 9 個間隔片段，而類北京（Beijing-like）株則定義為僅出現最後 9 個間隔之部分片段，前述兩類群合稱為北京型。

六、電腦分析

將基因分型結果以掃描機將圖檔存入電腦後，利用Bionumerics[®] 第二版軟體（Applied Maths., Kortrijk, Belgium）進行分析。此軟體自動分析影像檔案的片段分布。圖譜相似性的比較是利用不加權配對法（unweighted pair group method）使用算數平均數進行歸群。群組（cluster）的定義為：兩個或更多病人分離出的菌株具有相同的分子指紋基因型。限制酶片段多型性圖譜之常態化程序和正確性判讀，是以標準參考菌株結核菌Mt 14323 進行對照參比。

七、PCR放大反應和基因定序

根據標準參考菌株結核菌H37Rv已發表的基因序列（GenBank

accession no. NC_000962.1)，設計兩條核酸引子，放大 *rpoB* 基因上的多變異區域（81 bp region）。PCR反應分別加入 320nM 寡核苷： *rpoB*-F（5'-TCGGCGAGCCCATCACGTCG-3'）和 *rpoB*-R（5'-GCGTACACCGACAGCGAGCC-3'）。萃取純化的DNA（50ng）加入PCR反應試劑：包含 1 unit 聚合酶（AmpliTaq DNA polymerase, Applied Biosystems 廠牌），deoxynucleoside triphosphate各 200 μ M，50mM KCl，10mM Tris-HCl（pH 8.3），和 2.5 mM MgCl₂。反應在ABI 9700（Applied Biosystems）設備上進行，程式設定為：96°C 下 10 分鐘；96°C下 1 分鐘、64°C下 1 分鐘、72°C下 2 分鐘 30 個循環；72°C下 7 分鐘；最後維持在 4°C。PCR產物以 2%瓊脂，1 倍之TBE緩衝液以電泳分析確認 541 鹼基對片段長度的產物，最後再以ABI 3700 DNA分析儀（Applied Biosystems）進行雙股定序。

八、統計分析

各項數值則利用 EpiInfo 6.04 軟體（美國疾病管制局提供）進行統計分析，P 值小於 0.05 認定達顯著水準。

結果

藥物敏感性

162 株多重抗藥性菌中，37 株（22.8 %）對 INH 和 RMP 具有抗藥性，62 株（38.3 %）對 INH、RMP 和 EMB 具有抗藥性，15 株（9.3 %）對 INH、RMP 和 SM 具有抗藥性，48 株（29.6 %）對四種藥物皆具有抗藥性，詳見表一。

IS6110 限制酶片段多型性

共有 155 株多重抗藥性菌株有足夠品質與量的基因組 DNA 可以進行 IS6110 限制酶片段多型性分析。結果共顯示 139 種不同的 RFLP 指紋型，18.7%（29/155）菌株形成群組（圖一）。如設定以 98%的相似性基準下分析，一共得到 14 個群組：其中 12 個群組，包含 2 個分離菌株；1 個群組，

包含 3 個分離菌株及 1 個群組，包含 4 個分離菌株（圖一）。此外，有 1 個群組因為只有 1 個 IS6110 片段，續由間隔寡核酸分型結果的差異，排除彼此為同一群組。3 個菌株的群組則皆為北京型結核菌，而且抗藥性情形雷同（對 INH、RMP、EMB 有抗藥性但對 SM 敏感），其密碼子 531 均產生單一點突變（TCG→TTG, Ser→Leu）。另一個有 4 個菌株的群組，除了其中 1 株菌對 EMB 敏感外，其餘 3 株對 4 種治療藥物皆有抗藥性，並且這 4 株菌在密碼子 513 和 514 間都有 TTC（Phe）插入性突變。當再進行該 4 株菌相對應之病人流行病學相關性調查後，發現其中 2 人有共同居住接觸而相互傳染的可能性，而其他的群組病人並無明顯的流行病學關聯性。

間隔寡核酸分型

本研究共有 98 株（60.5%, 98/162）結核菌屬於北京型，其中純北京株及類北京株分別為 91 株（92.9%, 91/98）及 7 株（7.1%, 7/98）。北京型中具有至少 3 種一線藥物抗藥性的比例為 80%（78/98），高於非北京株的 73.4%（47/64）。

*rpoB*基因定序

總共定序分析 162 株多重抗藥性菌株及 40 株藥物敏感性菌株的 *rpoB* 基因，於 541 鹼基對片段長度區域是否有突變點。結果發現藥物敏感性菌株都沒有發現突變點，而 162 株多重抗藥性菌株中，146 株（90.1%）在 81 鹼基對的高變異區域發現突變點。在密碼子 531（Ser）、526（His）、516（Asp）的錯意突變（missense mutation）佔 84.9%（124/146）。146 株有突變的多重抗藥性菌株中有 32 種不同的突變型，包括 30 種單一或 2 個核苷取代突變，1 種序列插入在密碼子 513 和 514 之間，1 種序列缺失發生在密碼子 509 到 511 之間（表二）。密碼子 531 突變為 TCG 佔 54.8%（80/146），密碼子 526 突變為 CAC 佔 22.6%（33/146），密碼子 516 突變為 GAC 佔 9.6%（14/146）。結果顯示有 91.8%（134/146）為單一位點突變，其他有多個突變位點的結果請見表三。

98 株北京型菌株在密碼子 531 和 526 發生突變的頻率，分別為 50.0% (49/98) 和 20.4% (20/98)；而 64 株非北京型菌株，則分別為 46.8% (30/64) 和 18.8% (12/64)。北京型的分型結果與各個突變點的突變頻率，在統計上沒有顯著相關性。

本研究在 *rpoB* 基因的 81 鹼基對區域發現 11 個新的對偶基因 (表二)：密碼子 508 點突變 (ACC→ATC; Thr→Ile)，密碼子 509-511 序列缺失，密碼子 513 點突變 (CAA→CCG, Gln→Pro)，密碼子 515 點突變 (ATG→GTG, Met→Val)，密碼子 516 點突變 (GAC→GAG; Asp→Glu)，密碼子 517 點突變 (CAG→CCG; Gln→Pro)，密碼子 522 點突變 (TCG→TTC; Ser→Phe)，密碼子 526 點突變 (CAC→CGA; His→Arg 及 CAC→GGC; His→Gly)，密碼子 531 點突變 (TCG→GGG, Ser→Gly 及 TCG→GTG, Ser→Val)。本研究在新對偶基因位置發現突變的序列於 GenBank 已註冊，序號如下：AY823310, AY823311, AY823312, AY823313, AY823314, AY823315, AY823316, AY823317, AY823318。

討論

本研究總共分析台灣地區 162 株多重抗藥性菌株，發現有 90.1% 結核菌株在 *rpoB* 基因 81 鹼基對片段長度區域有突變，這個發現顯示 *rpoB* 基因定序搭配例行使用的藥物敏感性試驗，應當可以做為例行的臨床診斷。解決了抗藥性菌株診斷延遲的問題，能夠即時對再復發或新衍生抗藥性的病患給予適當治療。這個研究證實已被報導的突變型結核菌株在台灣地區的分布情形；然而，也發現了 11 個新的突變型。這些結果，提供關於台灣地區結核菌生物變異度的資料。本研究多重抗藥性菌株中，在 *rpoB* 基因沒有發現突變點的比率低於另外兩篇台灣地區的相關研究，但卻高於其他國家的研究結果 (表四)。抗藥性菌株之基因變異度，可能與某些宿主因子及伴隨不同地理區域之結核菌株品系演化有關。至於，對沒有偵測到突變之抗藥性結核菌

株，N 端密碼子 146 對低程度抗藥性，以及密碼子 562 可能皆與 RMP 抗藥性有關[13]。另外，已知基因 *arr*[14,15]與 *P. aeruginosa* 以及其他種分枝桿菌（other mycobacteria）之 RMP 抗藥性有關，可能亦是造成多重抗藥性結核菌產生之因素。相關的蛋白質體研究顯示，某些特定基因的過度表現可能會促進多重抗藥性菌株分子演化機制和致病性的呈現[13]。

前述的兩篇台灣地區 *rpoB* 基因定序相關研究中，其中一篇分析北台灣地區收集的 20 株 RMP 抗藥結核菌株，發現 4 種鹼基取代突變和 1 種序列插入突變[16]。另一篇分析南台灣地區 53 株抗藥結核菌株在 69 個鹼基對區域（密碼子 511-533 間）有 16 種突變型和 5 個新對偶基因突變[17]。本研究則對 162 株多重抗藥性結核菌進行序列分析，總共發現 32 種突變型和 11 個新對偶基因突變，並在密碼子 513、526、531 有較高之突變頻率（表二）。一個競爭性的動力學研究指出在密碼子 531、526 的突變 可能會改變酵素活性及造成結核菌在培養中失去複製生存的能力[18]。

在民國九十一年進行台灣地區北京型結核菌盛行率與抗藥性的監測計畫中，顯示北京型的盛行率為 44.5%，對其中任何藥物具有抗藥性的比率為 46.4% [11]。本研究分析之多重抗藥性菌株中 60.5%屬於北京型，但是北京型與各密碼子的突變頻率沒有統計關聯性。（後面部份已往上移一段）

利用 Bionumerics® 軟體進行的比較分析，本研究的菌株群中並沒有發現 IS6110 限制酶片段多型性分析型別與多重抗藥性菌株 W 品系 [19,20,21]完全相同者。然而，162 株多重抗藥性結核菌中有 54.9%和 W 品系有相同的突變點發生在 *rpoB* 基因（526（His→Tyr）或 531（Ser→Leu））[19]。多重抗藥性結核的發生，有可能是感染結核菌後再演變成具有抗藥性，或是直接來自於外在多重抗藥菌株的新感染。許多不同的 IS6110 限制酶片段多型性型別，卻具有完全相同的 *rpoB* 基因突變型，顯示台灣地區結核菌 RMP 抗藥性的盛行，可能較傾向於感染結核菌後 *rpoB* 基因突變所引起，而非多重抗藥結核菌的直接傳播所導致。

誌謝

本研究經費來源得自衛生署疾病管制局 DOH92-DC-2035 計畫。感謝國家衛生研究院臨床研究組蘇益仁主任、國際抗癆暨肺病聯盟 (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, IUATLD) 江振源醫師、台北市立萬芳醫院余明治醫師、成大醫院顏經洲醫師及台北榮民總醫院蘇維鈞醫師之協助。

撰稿者：陳煌耀、劉璇、陳盟勳、勤沛儒、張素英、黃偉倫、周如文
衛生署疾病管制局研究檢驗中心分枝桿菌實驗室

參考文獻

1. Espinal M, Laszlo A, Simonsen L, et al: Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health organization – International Union Against Tuberculosis and lung Disease Working Group on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. N Engl J Med 2001;344: 1294-1303.
2. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Third Global Report. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2004
3. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al: Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis 2002;8: 843-849.
4. Chen, ZC: Tuberculosis annual report 2002, Annual Rep., 2002; Center Disease Control. Department of Health, R. O. C.
5. Miller LP, Crawford JT, Shinnick T: The rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1994;38: 805-811.
6. Musser JM: Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 1995;8: 496-514.

7. Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, et al: Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the beta subunit gene of the rifampicin resistant rpoB255 mutant. *Mol Gen Genet* 1981;184: 536-538.
8. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341: 647-650.
9. American Thoracic Society. Diagnostic standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-1395.
10. van Embden JDA, Crawford JT, Dale JW, et al: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31: 406-409.
11. 周如文、黃偉倫、陳盟勳等：台灣地區北京型結核菌盛行情形調查。行政院衛生署疫情報導，民國九十三年第二十卷第十二期：710 頁-719 頁。
12. 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: 907-914.
13. Zhang Y, Telenti A: Genetics of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs WR, eds. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM press, Washington, DC. 2000: 235-254p.
14. Alexander DC, Jones JR, Liu J: A rifampin-hypersensitive mutant reveals differences between strains of *Mycobacterium smegmatis* and presence of a novel transposon, IS1623. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3208-3213.
15. Tribuddharat C, Fennewald M: Integron-mediated rifampin resistance in

- Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43: 960-962.
16. Qian L, Abe C, Lin TP, et al: rpoB genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from east asian countries. J Clin Microbiol 2002;40: 1091-1094.
 17. Hwang HY, Chang CY, Chang LL, et al: 2003. Characterization of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J Med Microbiol 2003;52: 239-245.
 18. Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH: Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43: 1866-1869.
 19. Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V, et al: Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. JAMA 1996;275: 452-457.
 20. Farr BM: Rifamycins. In: Mandell GL, Douglas J, Bennett JE, eds. Principles and practices of infectious diseases, 4th ed. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.. 1994:317-328p.
 21. Moss AR, Alland D, Telzak E, et al: A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. Int J Tuberc Lung Dis 1997;1: 115-121.
 22. Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al: Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994;38: 2380-2386.
 23. Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E: Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. J Clin Microbiol 1998;36: 20-23.
 24. Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the rpoB gene of

- rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol 1999;37: 2663-2666.
25. Yuen LK, Leslie D, Coloe PJ: Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. J Clin Microbiol 1999;37: 3844-3850.
26. Pozzi G, Meloni M, Iona E, et al: rpoB mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. J Clin Microbiol 1999;37: 1197-1199.
27. Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, et al: Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. J Clin Microbiol 2000;38: 3119-3122.
28. Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, et al: Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. J Clin Microbiol 2001;39: 3736-3739.
29. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, et al: Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. J Clin Microbiol 2001;39: 2987-2990.
30. Garcia L, Alonso-Sanz M, Rebollo MJ, et al: Mutations in the rpoB gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 2001;39: 1813-1818.
31. Tracevska T, Jansone I, Broka L, et al: Mutations in the rpoB and katG genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. J Clin Microbiol 2002;40: 3789-3792.

32. Cavusoglu C, Hilmioğlu S, Guneri S, et al: Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. J Clin Microbiol 2002; 40: 4435-4438.
33. Yue J, Shi W, Xie J, et al: Mutations in the rpoB of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. J Clin Microbiol 2003;41: 2209-2212.

表一、162 株多重抗藥結核菌株藥物敏感性試驗結果

藥物 菌株數量 (%)	異菸鹼醯 (INH)	瑞比新 (RMP)	鏈黴素 (SM)	孟表多 (EMB)
48 (29.6)	R ^a	R	R	R
62 (38.3)	R	R	S ^b	R
15 (9.3)	R	R	R	S
37 (22.8)	R	R	S	S

a: 抗藥性

b: 敏感性

表二、162 株多重抗藥性結核菌 *rpoB* 基因在密碼子 507-533 間的 81 個鹼基對易突變區域定序結果。表中指出密碼子突變位置與相對應之胺基酸變異的菌株

數量和頻率

突變位置	核苷酸改變型	胺基酸改變型	菌株數量	頻率 (%)
508	ACC→ATC	Thr→Ile	1	0.6
513	CAA→CCA	Gln→Pro	5	3.1
	CAA→AAA	Gln→Lys	2	1.2
	CAA→CCG	Gln→Pro	1	0.6
515	ATG→GTG	Met→Val	1	0.6
516	GAC→TAC	Asp→Tyr	5	3.1
	GAC→GTC	Asp→Val	4	2.5
	GAC→GGC	Asp→Gly	2	1.2
	GAC→GCC	Asp→Ala	1	0.6
	GAC→TTC	Asp→Phe	1	0.6
	GAC→GAG	Asp→Glu	1	0.6
517	CAG→CCG	Gln→Pro	1	0.6
522	TCG→TTG	Ser→Leu	2	1.2
	TCG→TGG	Ser→Trp	1	0.6
	TCG→TTC	Ser→Phe	1	0.6
526	CAC→TAC	His→Tyr	14	8.6
	CAC→GAC	His→Asp	5	3.1
	CAC→CTC	His→Leu	5	3.1
	CAC→CGC	His→Arg	3	1.9
	CAC→TGC	His→Cys	2	1.2
	CAC→AAC	His→Asn	1	0.6
	CAC→ACC	His→Thr	1	0.6
	CAC→CGA	His→Arg	1	0.6
	CAC→GGC	His→Gly	1	0.6
	531	TCG→TTG	Ser→Leu	75
TCG→TGG		Ser→Trp	2	1.2
TCG→CAG		Ser→Gln	1	0.6
TCG→GTG		Ser→Val	1	0.6
TCG→GGG		Ser→Gly	1	0.6
533		CTG→CCG	Ser→Pro	6
509-511	deletion	-	1	0.6
513-514	insertion	TTC (Phe)	4	2.5

註：灰色方格為本研究新發現的 11 個對偶基因突變。

表三、7 株多重抗藥性結核菌株具有多個核苷酸突變點

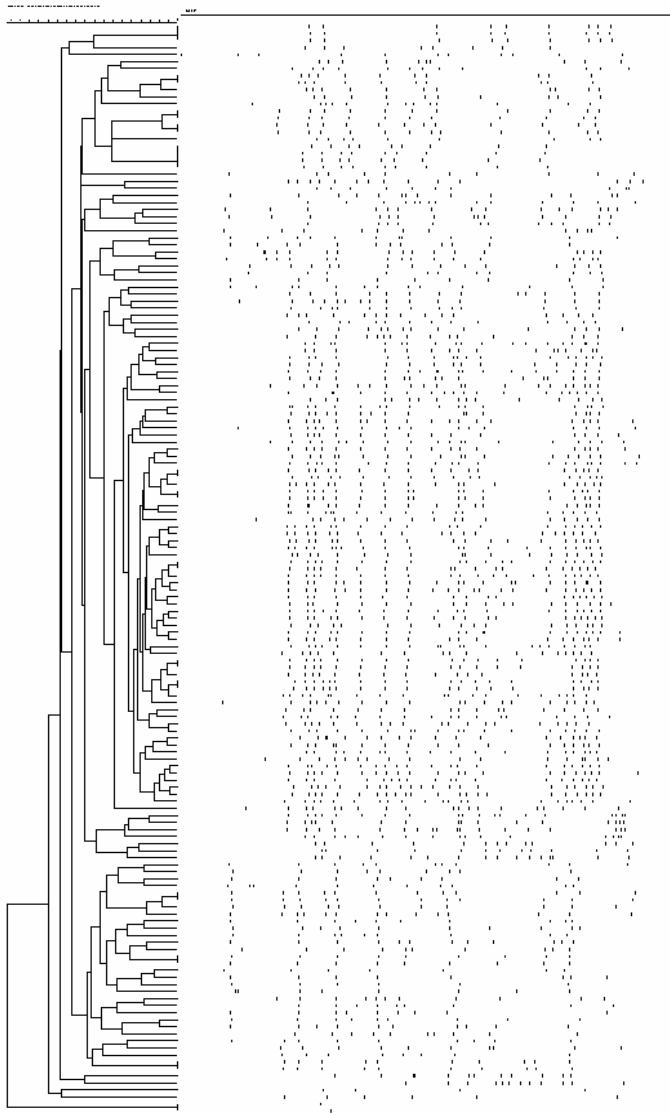
抗藥性	突變位置	菌株數量 (%)
對四種藥物具有抗藥性 ^a	498, 531, 561	1 (0.6)
對三種藥物具有抗藥性 ^b		
	508, 526	1 (0.6)
	515, 526	1 (0.6)
	516, 517	1 (0.6)
	516, 522	1 (0.6)
	516, 526	1 (0.6)
	516, 531	1 (0.6)

a: 對 INH,RMP,SM 和 EMB 四種藥物具有抗藥性

b: 對 INH,RMP 和 SM 或對 INH,RMP 和 EMB 具有抗藥性

表四、不同地區 RMP 抗藥結核菌其密碼子突變位置之頻率比較

Country (reference ; no. of isolates)	Frequency (%) of mutated codons								no mutation within hot- spot region
	533	531	526	522	516	513	511	508	
United States (22; n=61)	-	-	-	-	-	-	-	-	8.2
Greece (23; n=17)	-	52.9	17.6		12.0			5.9	5.9
Asia (24; n=90)	-	53.3	16.7	1.1	14.0	5.6	1.1	-	6.5
Australia (25; n=33)	-	-	30.3	6.1	9.1	-	-	-	3.0
Italy (26; n=37)	2.7	59.4	35.1	-	8.1	-	2.7	-	0.0
Brazil (27; n=82)	1.2	55.7	23.2	2.4	7.4	1.2	1.2	-	3.6
Hungary (28; n=29)	-	31.0	6.9	-	38.0	6.8	-	-	10.3
India (29; n=44)	2.2	63.6	22.7	-	4.5	2.2	6.8	2.2	2.3
Spain (30; n=50)	2.0	48.0	22.0	-	14.0	2.0	6.0	-	0.0
East Asian (16; n=66)									
(China 20, Japan 3, Korea 18, Taiwan 20)	3.0	51.5	10.6	-	17.0	6.0	-	-	10.6
Latvia (31; n=34)	-	41.2	20.6	-	32	-	-	-	-
Turkey (32; n=41)	4.8	56.1	19.5	4.9	7.2	2.4	-	-	2.4
China (33; n=86)	2.0	41.0	40.0	3.0	4.0	2.0	2.0	-	10.0
Kaohsiung, Taiwan (17; n=63)	7.5	41.5	18.9	1.9	15.1	-	6.3	-	15.9
Taiwan (this research) (n=162)	3.7	54.8	20.0	2.4	9.6	4.8	0.0	0.6	9.9



圖一、以 IS6110 限制酶片段多型性分型法分析 155 株多重抗藥性結核菌株之結果