

計畫編號：DOH98-DC-2006

行政院衛生署疾病管制局九十八年度

自行研究計畫

性病病原菌檢驗方法與流病調查計畫-II

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：李淑英

研究人員：李淑英、黃仲德、廖美惠、林昆彥、夏可強、陳國緯、林郁欣

執行期間：98年01月01日至98年12月31日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署意見\*\*

目 錄	頁 碼
1. 封面	1
2. 目錄	2
3. 計畫摘要	3
4. 本文	8
一、 前言	8
二、 材料與方法	17
三、 結果	22
四、 討論	28
五、計畫重要研究成果與具體建議	36
六、參考文獻	39
七、圖、表	43
八、致謝	59
九、附錄	60

計畫摘要：

(1)中文摘要：

中文關鍵詞：性傳染病；淋菌；生殖道披衣菌；抗藥性監測；分子流行病學；國際化監測。

近年來肇因於人類免疫不全病毒(HIV)之感染、社會行為的改變，性傳染病在國內及全球有捲土重來的趨勢。性病的傳播及流行病學具有特殊的高危險族群及危險因子，且涉及心理、社會與種族文化等多種因素。性病患者易被標籤化，加以國人隱諱保守的態度，增加性病防治的障礙。然而多數性病的預防及治療並不困難，可藉由加強衛教宣導、高危險族群的擴大篩檢、正確用藥治療及疫苗的施打等防治介入措施加以遏阻。此外，性傳染病易經由國際旅遊或接觸感染引入，建立國際化監測十分重要。

本多年期計畫擬長期針對國內重要性傳染病建立參考實驗室，發展標準及先進檢驗方法。架構實驗室監測網絡，長期監測抗藥性趨勢及追蹤分子流行病學資料。藉由分析病原分子型別及性狀，瞭解病原引入、崛起傳播情形，鑑別高危險群並瞭解其感染及傳播方式，並協助介入措施之研擬。

本年度主要研究進展有六：**第一**、分析台灣淋菌 2000-2009 年報告病例，發現病例主要集中在北部地區，於 8 月起病例略增，於 10-11 月達高峰，感染年齡層於 20-29 歲最多。值得注意的是在 15-19 歲年齡層的男性病例有明顯逐年升高的趨勢( $R^2 = 0.87$ )。感染者男/女性別比方面由 2000 年的 4.2:1 攀升至 2008 年的 11.5:1，2009 年為 8.4:1，此高性別比推測與男同性戀間傳播有關。**第二**、進行抗藥性監測分析 827 株菌株，發現 penicillin, ciprofloxacin, cefixime, cefpodoxime 及 ceftriaxone 之抗藥性分別為 65.3%, 90.3%, 7.8%, 11.1%及 0%。個別菌株抗藥性及型別資料已回饋給貢獻菌株的醫師，並透過研討會及論文發表等多個管道公開國內抗藥性趨勢以協助治療準則的修訂。值得高興的是 cefixime 及 cefpodoxime 的抗藥性有和緩下降的趨勢，這也反映在男同志專有型別比例變少上，顯現監測配合用藥修正及各界聯合努力下，確實發揮了效果。**第三**、以

NG-MAST 分型進行淋菌分子流行病學研究，先前發現台灣淋病主要基因型為 ST547、ST2180、ST835 與 ST2253 等在男同性戀傳播的型別，這些型別且具有較高的 HIV 和梅毒的共同感染率，多數同時也是對於 cefixime 與 cefpodoxime 具抗藥性的主要型別。2009 年上述這些型別均有明顯減少；新型別 ST3084 則緩步增加。本年度開始發現異性戀為主的型別如 ST421、ST419、ST2178、ST2194 與 ST225 的竄起並逐漸超越同性戀的型別。對 Cefixime 和 cefpodoxime 的抗藥性也在這些型別開始零星出現。我們也監測到 ST3080 及其相關型別的崛起，其類緣性與國內常見型別截然不同。**第四**、2004-2009 年國內砂眼披衣菌型別盛行率依序為 E (19.5%)、F (19.0%)、J (17.8%)、D/Da (16.1%)、G (9.2%)、K (8.0%)。E 仍是最盛行的型別，但 2007 年後 F、J、D/Da 型別逐漸增加。**第五**、協助性病匿名篩檢計畫，817 件尿液中分別檢驗出 39 件(4.77%)披衣菌及 2 件淋菌(0.24%)。**第六**、建立可同時檢測陰道滴蟲，人類黴漿菌，生殖道黴漿菌，生殖道披衣菌，淋菌及解尿支原體六種性病原體的快速多重檢驗技術。初步結果顯示性病多種病原同時感染十分普遍。本年度研究成果至少產出 3 篇 SCI 論文 (1 篇已發表，2 篇投寄中)，亦有多篇撰寫中。

本研究顯示青少年尤其是男性性早熟及初次性經驗提早，父母及學校應提早加強青少年性教育，醫療機構應提供青少年及年輕男同志諮商的管道。在台灣淋菌對 penicillin 及 ciprofloxacin 抗藥性均相當高，故 fluoroquinolone 類藥物不再適合用於治療淋菌，應改用頭孢菌素類抗生素。在同性戀網絡傳播的淋菌多半為主要及特殊型別，且為抗頭孢菌素之多重抗藥性菌株比例較高，其患者也有較高比例的 HIV 及梅毒的共同感染。顯現持續監測抗藥性菌株傳播動態，除可遏阻抗藥性菌株崛起外亦有助於發掘高危險族群性接觸網絡以及間接協助 HIV 的防治。性病有高比例的多種性病病原共同感染，檢測出其中一種病原有助於發掘其他性病病原的潛在感染。我們的研究發現亦將提供權責疾病組，以研擬更周延的防治策略。抗藥性及型別資料將回饋提供菌株的醫師以供治療及諮詢之參考。

## (2)Abstract:

Keywords : Sexually transmitted infections, *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, molecular typing; molecular epidemiology, international surveillance

Sexually transmitted infections (STIs) have resurged in the last decade owing to HIV pandemic and change of social behavior. STIs have distinct transmission pattern and epidemiology with specific high-risk groups and high-risk factors. In addition, STIs are further complicated with psychological, social, ethnic and cultural context. Stigmatization and taboo have further impeded STI control efforts. However, most STIs are intervenable and can be prevented and controlled by measures such as: public health campaign and education, expanded screening in target high-risk groups, proper antibiotic regimens and vaccination. In addition, STIs can be easily acquired and introduced via international travel or contact. Hence, international collaborative surveillance is important.

The goals of this five-year project (2008-2012) are aiming at building up reference laboratory, developing standardized and advanced diagnostic methods. A laboratory-based surveillance system will be established to collect representative strains, to trace long-term antibiotic resistance trend and to conduct molecular epidemiology studies in Taiwan. Such studies will help to elucidate introduction, emergence and transmission patterns of specific clones. Analysis of the phenotypic and genotypic characteristics of specific clones can help to identify high-risk groups as well as transmission dynamics of STIs within distinct sexual networks.

Our major findings can be summarized into six points: **Firstly**, epidemiological analysis of gonorrhoea cases during 2000-2009 showed a concentration of cases in Northern area, cases rose in August and culminated during October and November. Infections were highest in the 20-29 age groups. Notably, a significant increase trend was identified in male of the age

group 15-19 ( $R^2 = 0.87$ ). The male/female sex ratio of gonorrhoea cases increased from 4:1 in 2000, reached a peak of 11.5 in 2008 and slightly decreased to 8.4 in 2009. The high male/female sex ratio may be associated with increased transmission among MSM. **Secondly**, resistance rates of 827 *N. gonorrhoeae* isolates to penicillin, ciprofloxacin, cefixime, cefpodoxime and ceftriaxone were 65.3%, 90.3%, 7.8%, 11.1% and 0%, respectively. The resistance and genotype data of respective strains have been feed backed to physicians contributing strains. The resistance trend has been made public through symposium and publications to aid treatment recommendation. The resistance rates of cefixime and cefpodoxime showed slow declining trend and coincided with diminution of MSM-specific STs. This indicates that our concerted efforts and campaigns are rewarding and effective. **Thirdly**, molecular epidemiology of *N. gonorrhoeae* in Taiwan by NG-MAST previously showed the predominant sequence types ST547, ST2180, ST835 and ST2253 were also MSM specific sequence types and with higher syphilis and HIV co-infection rates with as well as higher cefixime and cefpodoxime resistant rates. These STs decreased rapidly in 2009, while a new ST3084 increase slowly. In 2009, we also discovered emergence and predominance of heterosexual STs, such as ST421, ST419, ST2178, ST2194 and ST225, with some strains resistant to cefixime and cefpodoxime. The emergence of a phylogenetically distinct ST3080 and related STs was also noted. **Fourthly**, molecular typing by sequencing the MOMP gene of *C. trachomatis* has identified the prevalent genotypes in decreasing order as: E (19.5%), F (19.0%), J (17.8%), D/Da (16.1%), G (9.2%) and K (8.0%); E genotype is the most prevalent genotype. **Fifthly**, 39 chlamydia (4.77%) and 2 gonorrhoea cases (0.24%) were identified from 817 urine samples of people participating HIV and STI anonymous screening program. **Sixthly**, a rapid multiplex PCR method was set up to detect six STI agents simultaneously, namely, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma urealyticum*. The preliminary result showed that co-infections are quite

common. At least 3 SCI papers have been generated: 1 paper has already been published, 2 are submitting. And many others are under preparation and will be submitted to SCI journals soon.

Our study indicates that early sexual debut of our adolescent is increasing. Thus enhancement and early initiation of sexual education and provision of counselling in young age group especially for male adolescent and young MSM are needed. In Taiwan, resistance rates of gonococci to penicillin and ciprofloxacin are extremely high. Therefore, fluoroquinolones are no longer recommended for treatment of gonococci and cephalosporins should be used instead. A large proportion of gonococci circulating in MSM sexual networks belong to major and specific STs and are resistant to multiple antibiotics including cephalosporins. Patients contracting these strains are more likely to be co-infected with syphilis and HIV. Continuous monitoring of the transmission dynamics of resistant clones can not only help to contain the spreading of gonorrhoea but also aid identification of high-risk sexual network and potentially assist HIV control. Our multiple STI pathogen detection result suggests that co-infection with multiple STI agents is quite common in STI patients. Identification of one pathogen could help to discover other STI pathogens. The findings will be provided to our control divisions to fine tune their control strategies. We will also feedback the resistance and subtyping data to respective hospitals/clinics which have contribute strains to this surveillance programs to refine their therapy regimens and patient consultation.

## 本文

### 一、前言：

細菌性性病如梅毒、淋菌等拜抗生素之賜一度曾獲控制，然而近年來尤其在先進國家又有死灰復燃的趨勢，主要歸因於人類免疫不全病毒(HIV)之感染、社會行為的改變。尤有甚者，近年來這些病原的肆虐又交雜了年齡層下降、男同性戀(MSM)族群行為鬆懈、色情交易增加、性行為多樣化、伴侶間之乒乓效應、抗藥性菌株崛起、愛滋病及其他性病多重感染、藥癮、矯正機構留置等因素，使得問題更加複雜化，值得深入探討各種性病病原，在國內高危險族群的感染率及其流行病學趨勢，以防止其在社區傳播擴散。性病的傳播及流行病學具有特殊的高危險族群及危險因子，加以性病患者易被標籤化，國人對性病普遍持隱諱保守的態度，就醫意願低。除此而外，多數性病的感染症狀並不明顯，因此各種性病之盛行率如淋病有被低估的傾向。美國估計其國內性病通報病例僅為其實際病例的50-80%，國內研究亦指出性病低估之現象<sup>1</sup>，其他新興性病的盛行率資料更僅為零星資料或付之厥如。

1990年以來因性交易增加及性行為的多樣化，許多先進國家尤其是都會地區均同步發現性病及HIV感染增加的現象。此外，愛滋病、砂眼披衣菌、淋病、梅毒，透過性行為由高危險群跨國或兩岸間傳播時有所聞，使用利於國際接軌之檢驗及分型方法，聯合監測密切監測流行病學之變化，方能有效遏阻國際間蔓延及延燒至國內。

性病與性接觸 HIV 的感染有相同的感染途徑，從事危險性行為的性病者及其性伴侶感染 HIV 的機率亦高。根據本局三組統計 91 年至今的性病病例，國內梅毒通報個案數為 17,356 名，梅毒且感染 HIV 之通報個案數為 779 名，佔梅毒總通報人數的 4.49%；而淋病通報個案數為 5,647 名，其中淋病且感染 HIV 之通報個案數為 63 名，佔淋病通報人數的 1.12%，顯示性病者感染愛滋病毒的機率比常人高出許多。近年研究顯示，若干非潰瘍性性病如淋菌、披衣菌的感染，可能增加 3-4 倍 HIV 的感

染及傳播的機率<sup>2,3</sup>；若是潰瘍性性病，如初期梅毒、軟性下疳、性器官疱疹等，增加的機率則更高達 10-20 倍。這可能導因於病灶細胞發生病變，破壞了宿主防禦屏障。而發炎潰瘍反應，匯集了免疫細胞，助長了 HIV 病毒的滋長。此外，若淋菌等性病感染在 HIV 之後，可能意味著患者感染 HIV 後仍無視於散佈病毒給伴侶的風險，持續從事危險性行為，此舉嚴重時可視為犯罪行為。由此觀之，性病的檢驗及監測或有助 HIV 的防治。

社會風氣的開放及行為的改變使得性行為及高危險族群趨於多樣化，在國內高危險族群如傳統的 HIV 感染者、女性性工作者等傳統族群外，新興族群如藥癮者、矯正機構留置者、援交族、網交族等。需瞭解族群人口學特性、危險因子及流行動態，方能設定優先順序，進行符合成本效益的篩檢。

多數性病的預防及治療並不困難，可藉由加強檢驗、衛教宣導諮詢、高危險族群的擴大篩檢、正確用藥治療、性伴侶追蹤及管理治療、疫苗的施打等防治介入措施加以遏阻。臨床重要及新興性病病原菌包括梅毒、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、生殖道披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)、陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)、人類黴漿菌(*Mycoplasma hominis*)、生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)、杜克氏嗜血桿菌及解尿支原體(*Ureaplasma urealyticum*)等。性病共同感染的情形甚為普遍，據估計 60% 的患者，同時感染至少二種性病。

**梅毒**可經由性接觸或母子垂直感染，常造成生殖道潰瘍。無論患梅毒的男女都有相同的跡像和徵兆，這些病徵很難察覺，與帶菌者性接觸後通常要大約 3 個月才會出現，梅毒分幾期，初期和第二期梅毒最易傳染他人。目前梅毒主要是利用血清抗體與暗視野的免疫螢光偵測為主要的診斷方法，但這對於感染 HIV 的病人可能會造成盲點<sup>4</sup>。

**淋病**是由格蘭氏陰性雙球菌 *Neisseria gonorrhoeae* 感染所引起，引發的症狀包括尿道炎、子宮頸炎、骨盆腔炎，嚴重者可導致不孕、子宮外孕 (ectopic pregnancy) 等嚴重長期後遺症。淋病發生率與感染率在歐美國家有逐年上升的趨勢。淋菌主要感染子宮內頸及尿道等生殖泌尿道黏膜細胞。

但近來口咽及直腸部位的感染亦屢見報導。日本最近報告顯示口咽的感染因為治療不易，經由口咽的傳播或許是日本近年來淋菌增加的主因<sup>5</sup>。許多國家報導淋病病例在 MSM<sup>6</sup> 及年輕男性增加最多。每年淋菌在全球新增病例高達 6 千 2 百萬人。在台灣依據疾病管制局的監測統計，2008 年淋病的病例為 1629 例，發生率約為每十萬人 7.1 人<sup>7</sup>。不過由於缺乏精確的檢驗，病例被低估的可能性極大<sup>8</sup>。近十年來淋菌對抗生素如 penicillin 和 tetracycline 的抗藥性迅速增加。Quinolone 抗藥性菌株的迅速竄起更限制了用藥的選擇<sup>9,10</sup>。Ciprofloxacin 抗藥性菌株傳播擴及全球，尤其在亞洲為甚<sup>11,12</sup>。在北台灣，依據 2005 年薛博仁醫生及我們 2007 年與台北市立聯合醫院合作的資料顯示，ciprofloxacin 抗藥性甚高，分別為 95.2% 及 76.7%<sup>13,14</sup>。如此高的抗藥性，勢必削減了治療及防治的效果，因此有必要建立參考實驗室，進行系統化抗藥性監測，俾能即時提出用藥修正指引，例如至少在一些地區或針對特殊族群做出停用 fluoroquinolone 的建議<sup>15</sup>。近來第三代的頭孢菌素(cephalosporins)逐漸被用來治療淋菌。不過，在台灣對口服頭孢菌素 cefixime 的抗藥性也由 2003 年的 9% 升高至 2007 年的 16.4%；而對 cefpodoxime 的抗藥性，依據我們 2007 年的資料也高達 21.2%<sup>13,16</sup>。至於對注射用 ceftriaxone (CRO) 的抗藥性，在台灣和全世界一樣尚無抗藥性菌株的發現。

淋菌可以分子分型方法如 *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) 輔以流病調查資料，來瞭解病原在高危險族群之流行傳播趨勢及高抗藥性菌株國際間之崛起及流竄情形。荷蘭在阿姆斯特丹一項調查研究顯示，特殊 MSM、異性戀、偏好網交等高危險族群各有其獨特流行病學樣貌<sup>17</sup>。英國倫敦以 MAST 為分型方法，輔以流病接觸史之調查資料，得以建立更精確之性接觸網絡(sexual networks)，並進而發現，在異性戀族群中淋菌型別與膚色種族、性別及愛滋病感染與否具相關性，而少數獨特在英國罕見型別則好發在年長且具國外接觸史之患者<sup>18</sup>。Ciprofloxacin-抗藥性菌株之崛起又是另一議題，國內薛博仁醫師分析 1999 ~ 2003 年 55 株菌株顯示，Ciprofloxacin-抗藥性菌株已由 25% 竄升至 93%<sup>13</sup>。結合 NG-MAST 和淋菌抗藥性樣式有助於鑑別帶有抗藥性菌株的特殊高危險族群<sup>19,20</sup>。英國分析其國內抗藥性菌株型別後顯示，多為 WI 血清型，進一步以 NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing) 分型屬於 ST338。尤有甚者，感染 ST338 多屬 MSM 男同性戀、在

英國本國感染或有多位性伴侶之患者<sup>21</sup>。顯示網路化並以por和tbpb基因序列為主的MAST分型不僅已成國際型別公認命名法，也是十分有效的分型工具。

另外發現由於gyrA與parC的胺基酸序列中發生突變，導致淋菌對於quinolone類抗生素如：ciprofloxacin產生高度抗藥性。以及PBP2蛋白結構改變如發生鑲嵌構造可能與頭孢菌素抗藥性有關。所以，利用基因定序的方式與抗藥性檢測的結果進行關連性比較，可得知台灣地區的淋菌在基因上是否有哪些變異，而導致抗藥性菌株的產生。依據結果，除了可為醫師用藥上的參考，也可得知台灣地區淋菌抗藥性菌株的流行病學。本計畫擬廣泛收集國內淋病菌株，加以PFGE-spe、MAST分型，配合流病資料、抗藥性樣式及抗藥性基因之定序，以更明確瞭解淋病在國內傳播之模式。我們初步的研究顯示台灣淋病好發於21-50歲族群(佔81.7%)，主要的型別為ST547 (13.4%)，ST835 (7.0%)和ST2180 (5.1%)，其中ST547和ST835曾為國外報導之型別，而ST547更是英國男同性戀MSM族群中盛行的型別之一。更有趣的是每一種型別的族群各有不同抗藥性樣式、梅毒及HIV共同感染率。這再再彰顯鑑別出不同高危險群，對於擬定防治與投藥策略及優先順序之重要性。

砂眼披衣菌感染已成為全球最重要的細菌性性傳染病之一，感染率遠超過淋病，是目前全世界三億性傳染病病例中是最廣泛的一種。據估計，每年約有8千9百萬人受到感染<sup>22</sup>。披衣菌感染極具侵略性，快速蔓延，不容易被診斷出來而接受治療，在男性及女性各約有50%和80%的人遭受感染後並無症狀呈現，性活動活躍之男女性及其後代也易處於危險的情況，所以實際感染人數應遠高於報告病例數。由於砂眼披衣菌為絕對細胞內寄生的細菌，病原分離需以細胞培養進行，所需之時間較長，技術上要求較高。因此，以核酸增幅檢測(NAATs)的技術在世界各地已被大量的運用，並有商品化檢驗試劑在臨床檢驗室中使用，如Roche Amplicor (Roche Diagnostics Corporation)、Abbott LCx (Abbott Laboratories)、BDProbeTec<sup>TM</sup>ET (Becton, Dickinson and company)等試劑皆是針對砂眼披衣菌的質體DNA作檢測，另有Gen-Probe APTIMA<sup>TM</sup>是以23S ribosomal RNA為偵測標的。NAATs技術的優點在於其所針對的為較不具侵入性的檢體，如泌尿道拭子、尿液等可由病人自行採檢的檢體，且其專一性與靈敏度相對較高。

針對其外膜蛋白可分為 19 種血清型，及多種變性型<sup>23</sup>。這些血清型及基因型依據其基因相似度及血清交叉反應又可大分為三大群: B 群 (B/Ba、D/Da、E、L1、L2 和 L2a)、C 群 (A、C、H、I/Ia、J、K 和 L3)、及中間群 (F、Ga 和 G)。不同血清型有其不同臨床表徵，依據其病原性，血清型 A、B、Ba 和 C 常與砂眼（造成百萬人失明的慢性結膜炎）有關。血清型 D - K 常與生殖泌尿道感染有關，例如尿道炎、副睪丸炎、子宮頸炎、輸卵管炎、骨盆腔炎與子宮外孕等。血清型 L1 - L3 常與性病淋巴肉芽腫(lymphogranuloma venereum, LGV) 的發生有關<sup>24</sup>。除此之外，血清型 G、I 與 D 推測與子宮頸鱗狀上皮細胞癌的形成有關，而且女性血清型 K 的慢性感染已經確認與不孕症的發生有關<sup>25</sup>。尤有甚者，血清型差異可能與某些特殊高危險群或特殊行業工作者有相關性，對往後運用於疫苗的開發上有很大的幫助。我們研究台灣砂眼披衣菌型別分布發現 9 種基因型，其中 E 型的比率最高(22%)，D 與 Da 型為 19%，F 型為 16%，J 型為 15%，K 型為 11%，G 型為 11%，H 型為 6%，Ba 型為 2%。我們除發現 H 型在北台灣與南台灣的分布上有地理上的差異( $p < 0.018$ )外，與國際上比較，台灣的型別分布與日韓相近。經由 NCBI 的 GenBank 比對之後，在 102 個檢體中也發現 12 種基因變異序列。其中，J 型與 K2 型的突變點與中國砂眼披衣菌分離株一致的情形，凸顯了監測二國間砂眼披衣菌感染及傳播之重要性。分子流行病學研究，在鑑定高危險族群與追蹤性接觸者方面是相當重要的，因此擬藉本計畫開發具多重檢測的核酸增幅技術，並結合液相的微珠陣列系統與基因定序，除了檢測砂眼披衣菌並可同時進行 omp1 gene 的 VS2 片段的分子分型。

從 2003 年春季開始，在荷蘭的鹿特丹與阿姆斯特丹發現一百名同性戀男子肛門感染了 C. trachomatis L2b，而導致入侵性性病：花柳性淋巴肉芽腫(Lymphogranuloma venereum, LGV)的產生。許多病例通報敘述曾經未戴保險套從事肛交以及拳交。被列入高危險群的包括人類免疫缺乏病毒(HIV)帶原者、皮衣族及派對常客。藉由定序的型別資料分析，配合患者提供的流病資料進行性接觸史的追蹤與確認來建立，或可提供探討砂眼披衣菌感染及國與國之間傳播之參考，所以歐美各國正在嚴密監控疫情擴散的與否<sup>26</sup>。近來在比利時的安特衛普、德國漢堡、法國巴黎與瑞典等歐美國家的同性戀與雙性戀男子中傳播，病例迅速累積中成為嚴重的公共衛生議題。美國 CDC 也曾警告其 MSM 族群，此罕見性病可能蔓延至美國，

諸如紐約、舊金山與亞特蘭大也發現患者。台灣 LGV 的存在不無可能，應建立預應配套檢驗措施。雖然 LGV 只要診斷得宜，施以較長約三個星期的抗生素 deoxycycline 類藥物，即可獲得控制，可是由於這個病症相當罕見，有時未在醫師診斷考慮的範圍，誤診的機率相對提高，有時會被誤診為克隆氏症及潰瘍性結腸炎等發炎性腸道疾病被施以類固醇或進行腸道開刀反而延誤加重病情。在同志的 LGV 檢驗，檢體種類也十分重要，尿液中檢出率僅 3.5%，肛門拭子檢出率則有 8.0%。無奈的是，至今尚無經 FDA 等機構驗證核可的適用肛門拭子的 LGV 檢驗試劑上市，需靠實驗室本身的 in-house 檢驗方法。LGV 迄今幾乎都侷限在 MSM 族群，因此有必要針對 MSM 族群加以衛教宣導，並加強 LGV 的鑑別診斷，而照護 HIV 病患的醫師也應將 LGV 感染加入診斷考慮的範圍。在英國 LGV 患者除了幾乎都是同性戀男子外，其中有 80% 為愛滋病病毒帶原者，梅毒及淋菌的感染率分別為 50 及 30%，感染 C 型肝炎則有 10%。

在泌尿 生殖道黴漿菌 方面，感染男性會導致非披衣菌、非淋菌的尿道發炎<sup>27,28</sup>，而女性則有子宮頸、子宮壁發炎症狀<sup>29,30</sup>。由於此菌極度難以從臨床檢體中分離出，因此在進行黴漿菌病原鑑定時，難以利用傳統微生物學的方式去鑑定。因此，針對其菌特有的 *mgpB* gene 設計專一性引子，進行 PCR 實驗得到約 281bp 的基因片段，便可針對該基因進行定序、分析，便可同時得到病原鑑定與分子分型的結果<sup>31</sup>。而目前台灣地區對於泌尿生殖道黴漿菌的流行病學還需進一步的研究，以明瞭其流行趨勢。本計畫擬廣泛收集國內泌尿生殖道檢體，加以 *mgpB* 基因分型，配合流病資料，以更明確瞭解泌尿生殖道黴漿菌在國內傳播之模式針對生殖泌尿道及口咽拭子，美國 CDC 研發的可同時檢測包括梅毒(針對 47Kd 的 lipoprotein 基因)、杜克氏嗜血桿菌(針對 haemolytic cytotoxin 基因)及單純皰疹病毒(針對 glycoprotein D 基因)這三種病原的 multiplex real-time RT PCR 快速多重檢測方法；針對組織病灶的檢體則發展可同時檢測梅毒、杜克氏嗜血桿菌、單純皰疹病毒及披衣菌(著重 LGV)四種病原的 multiplex real-time RT PCR。近年來除黴漿菌外 支原體(ureaplasmas) 亦崛起成為 prostatitis 和 urethritis 的主要病原之一。

造成生殖道潰瘍常見的細菌病原為梅毒，與台灣少見的 杜克氏嗜血桿菌，且對於這些病原目前皆已有良好的治療方法，但由於症狀上的相似性，造成在臨床與實驗室診斷方面仍有難度。而杜克氏嗜血桿菌為一種挑剔菌，由於缺乏合成血紅素的生化路徑，因此需要使用含有血紅素的

培養基，並在含有CO<sup>2</sup>且33°C的環境下培養2到3天才可成功生長。而從潰瘍處分離到的菌株往往會受到其他生長快速的菌株污染而導致誤判。利用培養方式分離杜克氏嗜血桿菌的敏感度大約介於56%到84%之間<sup>32</sup>。近來的研究以PCR的方式去輔助或取代傳統檢測的方法，以增加敏感度與專一性，並成功開發出可多重偵測造成生殖道潰瘍的細菌與病毒<sup>33</sup>。本計畫擬廣泛收集標準菌株、DNA與國內泌尿生殖道檢體，開發檢測造成生殖道潰瘍的病原菌，以協助臨床醫師診斷與用藥。

**人類乳頭狀瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)**是最常見的性傳播感染病之一。生殖部位出現生殖器疣(Genital warts)，甚且出現粉紅/白色的小腫塊或較大形似椰菜花的腫塊，其他身體部份，例如手部也可能受波及。HPV病毒有100多種，其中16及18型為高危險型別，盛行率為8%，會導致女性70%的子宮頸癌，6及11型則造成男女兩性90%的生殖器官疣。HPV感染力甚強除了進行口交、陰道或肛門接觸的性活動外，HPV也會經由皮膚接觸傳染。HPV可感染整個生殖器官及周遭的皮膚，包括陰道、子宮頸、直腸、陰莖、陰門和肛門。同一時間感染超過一種HPV的情況，也有可能發生。感染HPV的人，大多沒有任何徵狀，甚至將該病毒傳染別人仍不自知。每4個性活躍的女性當中，有3個會在其一生中，最少受到1次HPV感染。在美國HPV的年發生率為550萬人。感染年齡層為14-19歲:35%; 20-29歲:29%; 30-39歲:14%; 40-49歲:12%; 50-65歲:6%。性伴侶愈多，感染和傳播HPV的機會愈大。大多數子宮頸受HPV感染的女性，其感染會在兩年內消退。感染若持續不退，受感染的子宮頸細胞可能會在1至20年內變為癌細胞。2006年6月美國FDA核准針對6,11, 16, 18 四型的HPV疫苗上市，並建議年齡介乎9歲至26歲的女童和女性，在性活躍前接種該疫苗，可以得到最大的保障。由於HPV疫苗無法預防所有種類的子宮頸癌，性活躍的女性定期接受柏氏子宮頸抹片檢查，仍然十分重要。

**生殖器疱疹Genital herpes**由單純疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)傳染，感染甚為普遍，常為慢性、反覆發作，並伴隨終身。HSV可分為HSV-1和HSV-2兩型，85-90%的生殖器疱疹是由HSV-2型所引起。美國估計其國內感染人數約5000萬人，每年新增100萬新病例。病毒感染後藏匿在神經線內，許多完全察覺不到且沒有任何病徵，故多數人感染後並不自覺。疱疹感染部位包括口腔、生殖器、肛門附近的皮膚和手指。病徵包括生殖或肛門部位發生小疱、潰瘍。

**傳染性軟疣病毒(Molluscum Contagiosum)**俗稱軟疣Molluscum是性交傳播或經皮膚接觸傳播傳播的皮膚病。特徵是大腿、屁股、生殖器皮膚出現珍珠形小丘疹，數星期甚至數年。

**阿米巴痢疾(Amoebiasis)**和**賈第蟲病(Giardiasis)**則是經由病患者口交或肛交時傳播開來的性傳播的腸道感染，會導致腹瀉和肚子痛。

**陰道毛滴蟲 Trichomonas Vaginitis** 俗稱毛髮蟲(Trich)是由寄生蟲引起的生殖道疾病。

**生殖器念珠菌**俗稱鵝口瘡(Thrush)，會導致癢、紅腫、痛楚和白色分泌物流出的現象。

**疥瘡 Scabies** 是由細小肉眼是看不到蟎寄生蟲鑽入皮下導致搔癢的疾病，手部、屁股及生殖器皮下有紅線。傳染方法主要是經性交，罕見經由病患者的毛巾和衣服傳染。傳染後的 2~6 週病患者開始有癢的感覺。

**杜克氏嗜血桿菌**會造成類似梅毒的生殖道潰瘍，台灣少見的且對於這些病原目前皆已有良好的治療方法，但由於症狀上的相似性，造成在臨床與實驗室診斷方面仍有難度。杜克氏嗜血桿菌為一種挑剔菌，由於缺乏合成血紅素的生化路徑，因此需要使用含有血紅素的培養基，並在含有  $\text{CO}_2$  且  $33^\circ\text{C}$  的環境下培養 2 到 3 天才可成功生長。而從潰瘍處分離到的菌株往往會受到其他生長快速的菌株污染而導致誤判。因此根據統計，利用培養方式分離杜克氏嗜血桿菌的敏感度大約介於 56%到 84%之間<sup>32</sup>。近來的研究以 PCR 的方式去輔助或取代傳統檢測的方法，以增加敏感度與專一性，並成功開發出可多重偵測造成生殖道潰瘍的細菌與病毒<sup>33</sup>。本計畫擬廣泛收集標準菌株、DNA 與國內泌尿生殖道檢體，開發檢測造成生殖道潰瘍的病原菌，以協助臨床醫師診斷與用藥。

為求對於國內重要性病原如淋菌可能的抗藥性機制以及具有臨床意義的基因能有更深的了解和研究，我們擬發展全基因體分析技術如光學圖譜(optical mapping)或全基因體定序。光學圖譜是一個研究基因體學的一個新方法，原理為利用特殊的方式使微生物染色體帶電荷，通過晶片通道後，使得單一染色體分子能夠拉開並且固定，接著以限制酵素(restriction enzyme)作用，再加以染色和照相，就可以得到高解析度、具有順序的whole genome restriction maps<sup>34</sup>。由於這項技術可以建構完整且具有順序的基因限制酵素圖譜，故可應用於許多方面，包括輔助全基

因定序(sequencing finishing)、分子分型(strain typing)以及基因分析比較(Comparative Genomics)；(1)在全基因定序中，genome sequence若帶有許多短片段的重複序列，會造成定序結果出現許多無法比對組合的序列片段(contig)，亦或富含GC的部分，也會造成定序的困難<sup>35</sup>，如果搭配現制圖譜的技術加以比對，則可以解決這個問題；(2)在分子分型的應用上，與傳統PFGE做比較，由於解析度很高，可達到1.6kb，加上具有順序的特性，分型效果會遠比PFGE來的好，且傳統PFGE在不同實驗室或者不同人操作所造成的差異或也不會發生在optical mapping的技術上；(3)具有順序的全基因體限制酵素切位圖譜可以觀察基因的重組排列，包含插入序列(insertion)、遺失序列(deletion)、反轉序列(inversions)或者雙倍序列(duplications)等情況，藉由基因層面的變化推測可能造成的生理代謝改變、抗藥性的發生、或者毒力的增減等現象<sup>36,37</sup>。本實驗將台灣臨床重要性病菌與已知全基因序列的標準菌株做分析比較，希望可以藉由optical mapping等全基因體分析技術讓我們對於國內重要性病原有更深入的了解，以期協助解決性病所造成的醫療問題。

多數常見性病若能透過方便的篩檢及精確的診斷，追蹤新生病例的源頭，可藉由適當的抗生素及性伴侶共同治療，加以控制，遏阻其持續傳播。因此發展快速正確的檢驗方法十分重要。本多年期計畫擬長期針對國內數個重要性傳染病，建立檢驗方法及分子流行病學資料，監測抗藥性趨勢，協助鑑別高危險族群提供防治之參考，並從分子層次深入探討本土盛行菌株致病及傳播之機制。釐清病原抗藥性/高病原性菌株在國內各醫院及高危險族群間，以及跨國間傳播情形，進而有助於臨床治療及防治對策的研擬。

## 二、材料與方法：

### 1. 菌株與檢體的收集：

從國內外各菌種中心引進標準菌株，北部主要與教學醫院及聯合醫院性病防治中心合作，全國監測方面收集全國具地理分佈代表性醫療院所合作，設計問卷，收集檢體臨床檢體及菌株，所有菌株皆加以保菌及繼代培養。淋菌培養基為巧克力培養基(Creative Microbiological Products, Taipei County, Taiwan)檢體種類為血清、子宮頸拭子、潰瘍處拭子與尿液檢體等。填寫同意書暨問卷一份，每位抽血 1 支，留前段尿 1 管。血液檢體進行梅毒抗體篩檢，尿液檢體進行披衣菌/淋菌 PCR 檢測。

披衣菌檢體通常為子宮頸拭子與尿液檢體，經由Roche COBAS Amplicor C. *trachomatis* test (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, N.J.)的檢測，得知檢體陽性與否，陽性與陰性檢體都保存在-20°C 冰箱中，再進行後續DNA萃取，定序分型的實驗。梅毒檢體先經由RPR與TPPA檢測，以得知檢體陽性與否並保存於-70°C 冰箱。泌尿生殖道黴漿菌與杜克氏嗜血桿菌存放於-70°C 冰箱中，以利後續實驗之進行。另外於2009年6月開始「愛滋病個案管理及性病匿名篩檢計畫」，收集到的尿液檢體將先儲存於-20°C 冰箱中，待收集至45件後，再經由Abbott m<sup>TM</sup> Sample Preparation SystemDNA (Abbott Molecular Inc) 及 m2000sp<sup>TM</sup> (Abbott Molecular Inc.) 全自動核酸萃取系統砂眼披衣菌與淋菌的檢測。

### 2. 病原分離株及檢體 DNA 的萃取：

細菌分離株培養後用 PUREGENE DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA)萃取 DNA。簡言之，在培養基培養 1~2 天後，取兩個接種環的細菌量攪散於 2ml PBS 內，加入 10-15  $\mu$ l 分解酵素，置於 37°C 過夜。13,000 x g 離心 3 分鐘之後，去除上清液；加入 2 ml Cell Lysis Solution，將細胞胚累沖散以達到分解細胞的效果。之後加入 1 ml Protein Precipitation Solution，高速震盪 20 秒；13,000 x g 離心 10 分鐘。取上清液加入 100%異丙醇使 DNA 沉澱；以 70%酒精洗過後，加入 50  $\mu$ l 的 Hydration Solution 讓 DNA 溶水。以分光光度計測 DNA 的質量，保存於-80°C。性病尿液及生殖泌尿道拭子則依循市售 QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany)套組，按照其說明書指示進行尿液與子宮頸拭子檢體 DNA 萃取的實驗。萃取出來的 DNA 冰存於-20°C 冰箱中，供後續實驗的分析。

### 3. 瓊脂膠體電泳分析 (agarose gel electrophoresis)：

使用 2.0% (wt/vol)的瓊脂膠體搭配 1X 的 TBE 緩衝溶液(0.1 M Tris, 0.09 M boric acid, 1 mM EDTA [pH 8.4]) 100V 進行電泳 1~2 小時；染膠 15 分鐘，接者以蒸餾水去染數次。

### 4. 脈衝式電泳(pulsed field gel electrophoresis)

試劑：Lysis buffer：10mM Tris-HCl (pH=8.0)，0.45M EDTA (pH=8.0)，1% N-lauroylsarcosine, 1% SDS, 1mg/ml proteinase K

**TE buffer** : 10mM Tris-HCl (pH=8.0) , 1mM EDTA (pH=8.0)

- (一) plug 製作: 畫適量菌至培養基中於 37°C 培養 24hrs 後, 刮取菌溶至 Lysis buffer 中測其透光值 20%以估算所需菌液量, 均勻混合後取 300  $\mu$ l 加入加入 300  $\mu$ l Seakem Gold agarose 1% (溶於 0.5 $\times$  TE buffer), 混合均勻後加入 plug mold 內 (避免氣泡產生), 於室溫靜置 10min 以上使其凝固將 plug 推出後置於 lysis buffer 中於 54°C 的震盪箱以 150rpm 放置 2 小時。再以 MQ 水洗 3 次, 每次間隔 10min。TE buffer 洗 3 次, 每次間隔 10min。最後加 TE buffer 置於 4°C 保存。淋菌以限制酵素 SpeI 進行水解。
- (二) 做膠及塞 plug: 準備底座及外框, 用螺絲將外框鎖於底座上, 調整底座之水平。稱 2g Seakem Gold agarose 加至 250ml 0.5 $\times$  TBE 中 (0.8% ), 微波爐加熱溶解、靜置約 10min 於框之內側封一層 gel 降溫至 50°C 左右倒膠, 並且放上 comb。靜置 20min 之後放置於 4°C, 10min 自 4°C 取出後取下 comb, well 內加 0.5 $\times$  TBE 切適當大小的 plug 塞入 well 中溶 0.8% Seakem Gold agarose 填充 plug 以外之空隙
- (三) 跑膠: 設定 120V~90V 電壓, 120° 角度, 60~700S 變換秒數, 於 0.5 $\times$  TBE buffer 跑 66 hr。
- (四) 染色及去染: Et-Br 1.5 ug/ml 染 30min, 去染 30min。

## 5. 砂眼披衣菌套疊式聚酶合鏈反應(nested PCR)

詳細條件參見本實驗室已發表之文獻<sup>38</sup>。第一次聚酶合鏈以 NLO-NRO 的引子對增幅出 omp1 基因上 1130 bp 的片段。PCR 反應容積為 25  $\mu$ l, 內含 5  $\mu$ l 待測 DNA(50ng), 12.5  $\mu$ l 2X PCR Master Mix (MBI, Fermentas, Lithuania), 0.5  $\mu$ l 各種引子 (10  $\mu$ M), 其餘加蒸餾水混勻。增幅初始變性反應 95°C 5 分鐘溫度, 35 次循環的變性反應 94°C 60 秒 $\rightarrow$ 黏和 54°C 60 秒 $\rightarrow$ 72°C 80 秒聚合延長反應, 最後為 72°C 10 分鐘聚合延長反應。第二次聚酶合鏈以 MOMP87-C214 的內縮引子對增幅出第一次聚酶合鏈產物 1130 bp 片段內長度為 584 bp 的小片段, 而此配對引子在其 5 端有做生物素(biotin)修飾, 因此得到的聚酶合鏈產物 PCR DNA 的 5 端會有生物素。PCR 反應容積為 25  $\mu$ l, 內含 3  $\mu$ l 第一次聚酶合鏈產物 PCR DNA, 12.5  $\mu$ l 2X PCR Master Mix (MBI, Fermentas, Lithuania), 0.5  $\mu$ l 各種引子 (10  $\mu$ M), 其餘加蒸餾水混勻。相關引子序列如(表一)所示。增幅初始變性反應 95°C 5 分鐘溫度, 35 次循環的變性反應 95°C 50 秒 $\rightarrow$ 黏和 56°C 50 秒 $\rightarrow$ 72°C 50 秒聚合延長反應, 最後為 72°C 10 分鐘聚合延長反應。引子序列如表一所示。PCR 機器使用 PTC-200(MJ research)。聚酶合鏈反應的產物以 2.0% 甲醛瓊脂膠體進行 DNA 電泳分析。

Primer	Strand	Sequence (5'-3')	Position
NLO	Sense	ATGAAAAAACTCTTGAAATCG	1-21
NRO	Antisense	CTCAACTGTAAGTGCATTTT	1108-1128
MOMP87	Sense	TGAACCAAGCCTTATGATCGACGGA	87-111
C214	Antisense	TCTTCGAYTTTLAGGTTTAGATTGA	648-671

## 6. 砂眼披衣菌 DNA 定序及型別比對

*omp1* 基因片段經由電泳跑膠後並切膠，以 QIAquick PCR purification kit (Qiagen) 純化 PCR 產物，將片段 584 bp 與 1130 bp 上機進行定序分析(3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems)。所使用的引子對為 MOMP87-C214 與 NLO-NRO，可以將 VS1-2 與 VS1-4 區域定序出來。所有的 PCR 產物都經過順向與逆向的定序。

將同源序列與 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) 上的 *C. trachomatis* 參考菌株如 B/IU-1226 (AF063208), B/B-16 (AY950630), D/B-120 (X62918), Da/TW-448 (X62921), E/Bour (X52557), F/ICCa3 (X52080), G/UW57 (AF063199), H/Wash (H/UW4) (X16007), J/UW36 (AF063202), 與 K/UW31 (AF063204) 等序列進行比對。使用 BioEdit 7.0 版軟體進行多重序列比對。

## 7. 砂眼披衣菌 LGV 的 real-time PCR

real-time PCR, 引子序列 LGV-F CTG TGC CAA CCT CAT CAT CAA, LGV-R AGA CCC TTT CCG AGC ATC ACT, 探針序列為 LGV-Probe 6-FAM-CCT GCT CCA ACA GT-MGB。反應條件為 50°C, 2min, 1cycle; 95°C, 10min, 1 cycle; 最後為 40cycles 的 95°C 及 15sec; 60°C, 60sec。針對的是披衣菌的 *pmp* 基因, LGV 的 L1, L2, L3 三個血清型比一般披衣菌少了 36bp 的缺失, 所以 LGV 的增幅片段為 60bp, 一般披衣菌則為 96 bp。經 real-time PCR 檢測陽性的檢體, 則進一步做 *momp* 基因的 PCR, 再以定序做次分型。

## 8. 砂眼披衣菌多重快速分子分型

### a. 設計針對不同基因型的專一性探針

針對於砂眼披衣菌 *omp1* 基因的 VS2 變異區段去設計探針, 利用 BioEdit version 7.0 軟體去進行基因比對以設計探針, 並確保所設計的探針可以檢測台灣所特有的型別。所使用的參考基因編號如下: B/IU-1226 (AF063208), D/B-120 (X62918), E/Bour (X52557), F/ICCa3 (X52080), G/UW57 (AF063199), H/Wash (H/UW4) (X16007), J/UW36 (AF063202), 與 K/UW31 (AF063204)<sup>39</sup>。

### b. 聚酶合鏈反應

第一次聚酶合鏈以 NLO-NRO 的引子對增幅出 *omp1* 基因上 1130 bp 的片段。第二次聚酶合鏈以 MOMP87-C214 內縮引子對增幅出第一次聚酶合鏈產物 1130 bp 片段內長度為 584 bp 的小片段, 而此配對引子在其 5 端有做生物素 (biotin) 修飾, 因此得到的聚酶合鏈產物 PCR DNA 的 5 端會有生物素。PCR 反應容積為 25 $\mu$ l, 內含 1-5 $\mu$ l 第一次聚酶合鏈產物 PCR DNA 或質體 DNA, 12.5 $\mu$ l 2X PCR Master Mix (MBI, Fermentas, Lithuania), 0.4  $\mu$ M 各種引子 (10 $\mu$ M), 其餘加蒸餾水混勻。同時會有陰性的檢體當做對照組。聚酶合鏈反應的產物以 2.0 % 瓊脂膠體進行 DNA 電泳分析。

### c. 鏈結固定化探針於微珠上

取  $2.5 \times 10^6$  磁珠 (Luminex, TX), 加入 50 $\mu$ l 0.1M 2-(N-morpholino)

ethanesulfonic acid (MES) buffer pH 4.5 (Sigma)與1 mM 探針oligonucleotide。探針序列的設計為在5' amino端加上12-carbon linker。加入3 µl現配製1-ethyl-3-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) solution (10 mg/ml) (Pierce Biotechnology)，可將探針與微珠結合，置於室溫反應30分鐘。之後再加入3 µl現配製的EDC反應30分鐘。EDC反應後，加入0.5 ml 0.02% Tween 20，混合均勻，8000 rpm離心2分鐘，去除上清液，加入0.5 ml of 0.1% SDS清洗後，再以8000 rpm離心2分鐘，去除上清液。最後磁珠以50µl Tris-EDTA回溶，置於4°C暗房保存。

d. 流式微珠陣列檢測

微珠以1.5X tetramethylammonium chloride (TMAC) solution (Sigma, St. Louis, MO) 稀釋。TMAC solution包含4.5 M TMAC、0.15% Sarkosyl、75 mM Tris-HCl pH 8.0與6 mM EDTA (pH 8.0)。取33 µl 1.5X TMAC包含5,000 顆微珠與17 µl PCR產物混合均勻，置於暗室於95°C 反應5分鐘，接著於45°C反應30分鐘。以8000 rpm離心2分鐘，去除上清液，加入75 µl 1X TMAC solution 包含10 ng/µl streptavidin-R-phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR)，置於45°C反應15分鐘。最後將樣本分別加至96孔ELISA盤，以Bio-Plex 200 Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA)檢測。螢光強度中位數值(Median fluorescent intensity, MFI)為測量100個訊號數值之中位數，再由Bio-Plex Manager 4.1.1 軟體分析結果。

9. **統計分析:**

使用SPSS (10.0版)軟體分析基因型與檢體種類、性別、年齡、地理區、HIV感染與否之相關性。

10. **淋病的 multiantigen sequence typing (MAST):**

增幅*por*基因的約737bp的使用5'-<sup>350</sup>CAA GAA GAC GAC CTC GGC AA<sup>366</sup>-3' (*por* forward) 和5'-<sup>1086</sup>CCG ACA ACC ACT TGG T<sup>1071</sup>-3' (*por* forward)。增幅*tbpB*基因的約589bp的使用5'-<sup>1098</sup>CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC<sup>1118</sup>-3' (*tbpB* forward) 和5'-<sup>1686</sup>TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG<sup>1666</sup>-3' (*tbpB* forward)。PCR反應條件詳見前人文獻<sup>40</sup>。

11. **核酸序列比對及資料庫建立:**

將定序後的圖形檔轉入 Bionumerics 4.0 分析軟體，在軟體上比對每個 locus 的序列後，淋菌上網(<http://test3.mlst.net>)比對各 locus 的基因型。並且可將所有菌株所有 loci 的型別組合為個別的 sequence types(STs)，建立台灣菌株之資料庫。泌尿生殖道黴漿菌、梅毒與杜克氏嗜血桿菌則經由 NCBI 網站 Blast 以知其基因是否為該菌所有，而鑑定該菌在檢體中之有無。

12. **淋病的抗藥性檢測:**

以penicillin, ciprofloxacin, ceftriaxone, cefixime與cefepodoxime五種抗生素紙錠

檢測。

### 13. 軟性下疳杜克氏嗜血桿菌(*Haemophilus ducreyi*)的培養及PCR檢測<sup>33</sup>

*Haemophilus ducreyi* 的 loci 中選出其 16S rRNA 基因當作偵測的標的。經 PCR 反應放大至 439bp 的片段大小

HDF: CAAGTCGAACGGTAGCACGAAG

HDR: TTCTGTGACTAACGTCAATCAATTTTG

### 14. 生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)的培養及PCR檢測<sup>41</sup>

*Mycoplasma genitalium* 的 loci 中選出 *mgpB* 基因當作偵測的標的。經 PCR 反應放大至 275bp 的片段大小

MgPa1: TGA AAC CTT AAC CCC TTG G

MgPa3: AGG GGT TTT CCA TTT TTG C

或參酌德國 Joergen Jensen 博士 2004 年發展的 real-time PCR 方法，針對的是 *mgpA* 基因。

### 15. 梅毒(*Treponema pallidum*)的血清學檢測

檢查梅毒抗體，檢驗最少體積需求為 500µl，檢體可能為血清或腦脊髓液，檢驗項目包括全抗體 EIA (Total antibody Enzyme Immunoassay, Syphilis EIA), IgM 抗體 EIA (不包括腦脊髓液 CSF 檢體) 及 TPPA (Treponemal Pallidum Particle Agglutination), RPR (Rapid Plasma Reagin)。遇到有矛盾或不一致結果時再加做 Inno-Lia (Inno-Lia Syphilis Score, INNOGENETICS, Gent, Belgium)。

### 16. 梅毒(*Treponema pallidum*)的PCR檢測<sup>33</sup>

以 47kDa 的 lipoprotein 當作偵測的標的。經 PCR 反應放大至 260bp 的片段大小 TPF: CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA

TPR: GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT

或針對 DNA polymerase A 基因。引子序列為 TP Pol For GGTAGA AGGGAG GGCTAGTA, TP Pol Rev CTAAGATCTCTATTTTCT ATAGGTATGG, 探針序列為 FAM-ACACAGCACTCGTCTTCA ACTCC-BHQ1。反應條件為 95°C, 10min, 1cycle; 接著為 50cycles 的 95°C, 30sec, 60°C 及 30sec 及 72°C, 30sec。

### 17. Seegene 多重性病病原分子檢測

本實驗所採取的方法為多重專一性引子針對同一檢體檢測尿液裡是否含有以下六種性病病原體：Trichomonas vaginalis (TV), Mycoplasma hominis (MH), Mycoplasma genitalium (MG), Chlamydia trachomatis (CT), Neisseria gonorrhoeae (NG) and Ureaplasma urealyticum (UU)。結果可從 2% 的瓊膠依分子量大小作確認。

### 三、結果：

#### 1. 歷年淋病病例之人口學分析

台灣 2000 年至 2009 年淋病、HIV 及梅毒通報病例逐月趨勢呈現如圖一。淋病與 HIV 及梅毒通報病例逐年趨勢之間似乎沒有相關性，然而在梅毒與 HIV 的通報病例數似乎有相同的趨勢，如梅毒在 2005 年的 7 月達到該年的高峰，HIV 的病例也在該區段中達到高峰。淋病由 2000 年 7 月緩步上升於 2003 年 10 月達高峰，隨後又下降，於 2006 年 1 月則呈持平的趨勢。2003 年底至 2004 年中似乎曾有病例增多情形，2008 年台灣新增 1629 病例，盛行率約每十萬人 7.1 人，病例數似乎有上升的趨勢。統計 2000-2008 年台灣各地理區淋病盛行率分佈，以台北區最高，約每十萬人 3.6~16 人，北區次之，其次依序為南區、東區、高屏區及中區。

淋病病例月份分析方面，並無特別明顯季節性聚集現象，在夏天通報比例有開始增高的現象，在秋、冬二季病例數會達到高峰(圖二)。

累計 2000-2009 年共 13,026 病例中，男性為 11,757 例，女性為 1,269 例，粗男女比為 9.3:1。感染的男女性別比由 2000 年的 4:1 攀升至 2008 年的 11.5:1，2009 年稍降為 8.4:1 (圖三)。

從資料中也發現，感染年齡層在 20-29 歲為最高，在男性及女性的比率分別佔 46%及 37%。同時利用歷年各年齡層感染的比例進行回歸統計，值得注意的是在男性的 15-19 歲年齡層病例有明顯逐年升高的趨勢 ( $R^2 = 0.87$ ) (圖四 A)。在女性方面則無類似發現(圖四 B)。

#### 2. 歷年由台灣各醫療院所收集菌株之情形

本年度持續與台灣各醫療院所合作，進行淋菌菌株的收集，參與醫療院所計有 31 家，共收集 385 株淋菌，歷年詳細數量與地區見表一。97 年以前以台北市立聯合醫院昆明院區為主要收集菌株的來源，97 年以後擴大至全台灣各醫療院所收集，目前仍以北部地區所收集到的菌株為最多，以台北縣市為最大宗，其次為南部與中部，東部則無醫院參與。

### 3. 淋菌菌株之人口學分析

累計從2006年4月到2009年10月從全台灣各醫療院所醫院中總共收集到827株的臨床分離株，病患基本資料列於表二。感染淋病的病患年齡範圍從14至84歲，取其中位數年齡為30歲，並發現在20至39歲的年齡層為感染淋病主要族群，在歷年感染的比率約佔66.7%~74.4%，另外，在15-19歲青少年族群也佔3.8%~8.1%，而97年與98年間分別各有一例個案年齡為14歲。從性別分析，所收集的菌株主要仍來自於男性，男/女比約10:1。

### 4. 利用MAST分型探討國內淋菌之分子流行病學

在本研究中利用NG-MAST的分型方法，針對歷年(2006~2009)的淋菌分離株進行基因分型比對，總共分型出305種基因型(sequence type)，其中有210種ST只有一個分離菌株為代表，而其他95種ST分別有2至69株分離菌株為代表。目前發現台灣地區有12種主要的基因型，其中的ST421出現比率最高其次為ST419、ST547、ST2194、ST2175、ST2178、ST225、ST2180、ST2179、ST835、ST2253與ST2282(圖五)。將已知性向資料與型別作分析後發現，感染ST547、ST2180、ST835、與ST2253主要型別的病人發現大都以男同性戀為主(表三)。這四個以男同性戀為主的型別也有較高的HIV ( $p < 0.001$ )及梅毒共同感染率。而相對來說，屬於ST421、ST419、ST2178、ST2194與ST225的菌株主要是從異性戀的病人上分離到。

來自女性的淋菌菌株僅23株，已知資料的21株中並無發現HIV或梅毒共同感染的情形。在這21株當中，有6株隸屬於主要型別(菌株數 $\geq 10$ 株)，5株為異性戀好發的型別：ST419 ( $n=2$ )、ST2178 ( $n=2$ )與ST421 ( $n=1$ )，而值得注意的是，有1株為男同性戀常見的型別(ST2180)，此外有5株為單一旦特有型別，其餘菌株的型別則在男性也有發現，且以異性戀為主。

### 5. 淋菌針對不同抗生素的藥物敏感性分析

本研究利用 penicillin、ciprofloxacin、cefixime、cefepodoxime、ceftriaxone 5

種不同的抗生素紙錠針對 825 株臨床分離株檢測抗藥性，並列於表四。整體來看，台灣淋菌菌株對於 penicillin 與 ciprofloxacin 的抗藥性比率仍分別高達為 65.3%與 90.3%。而針對頭孢菌素類抗生素 cefixime 與 cefpodoxime 的抗藥性比率分別為 7.8%與 11.1%，所有菌株對與 ceftriaxone 則皆為感受性 (data not shown)。而分北、中、南地理區監測抗藥性趨勢，各地對於 penicillin 與 ciprofloxacin 的抗藥性無較大差異，然而今年在南部與中部卻各自分離到 1 至 7 株對於 cefixime 與 cefpodoxime 有抗藥性的菌株，而北部地區的菌株對於 cefixime 與 cefpodoxime 分別有 8.5%與 11.7%的抗藥性，可見具有對於頭孢菌素類抗生素的抗藥性菌株雖以北部地區為主，在中、南部仍有持續監控之必要。

從 2006 年 4 月到 2009 年間抗藥性變遷。其中發現 2009 年的淋菌對於 penicillin 的抗藥性比率仍然有 64.0%，而對於 ciprofloxacin 的抗藥性也超過 9 成以上(93.5%)，因此以上兩種抗生素已不建議使用於治療淋病。其中取兩種國內常用的頭孢菌素類的抗生素進行測試也發現，對於口服用抗生素 cefixime 的抗藥性從 2006 年的 7.7%上升至 2007 年的 17.8%，而在 2008 與 2009 年間有小幅降低至 3.9%；對於 cefpodoxime 也是相似的趨勢(5.5%)，如圖六所列。

## 6. 具抗藥性淋菌的基因型分析

進一步利用NG-MAST去分析具抗藥性淋菌菌株的基因型 (表五)。本研究中發現有除了ST547型別以外，多數菌株對於penicillin與ciprofloxacin 的抗藥性至少分別為28.6-100%與71.4-100%。ST547則分別僅3.0%與6.1%的菌株對於penicillin與ciprofloxacin具抗藥性。

另外發現分子型別屬於ST835、ST2180、ST2253與ST3084等4種基因型的菌株除了對於penicillin (72.2%~100%)與ciprofloxacin (100%)抗藥性比率甚高外，發現其針對於 cefixime (53.3%~83.3%) 與 cefpodoxime (73.3%~92.9%)亦較其他型別的菌株顯著具抗藥性。然而，從isolates<6的型別中發現，也有一定比率的菌株對於cefixime與cefpodoxime分別有5.8%與8.4%的抗藥性。

## 7. 分析2006-2009年基因型別消長分布

本研究發現ST547、ST2180、ST835、與ST2253為感染男同性戀為主的重要型別，同時也是對於cefixime與cefpodoxime的較具抗藥性的主要型別。其中，ST547於2006~2009年間均持續存在，然而其數量有持續減少的趨勢。ST835自2006年崛起，於2007年達最高峰，在2008年與2009年間卻持續減少。同時ST2180也在2006年才出現，2007年大量出現，至2008年持續為當年主要型別之一，然而於2009也已消失。值得注意的是，2008~2009年常見之抗藥型別已轉變為ST2253與ST3084，其數量雖較少，但已取代先前常見的型別，仍須持續追蹤。進行基因的相似性比對分析後發現，ST835與ST2253、ST2180、ST3084類源上十分近似，進一步分析基因變異位點後發現ST835與ST2253差異僅在porin基因上一個base pair的替換(340 G→A)，在胺基酸序列上造成天冬胺酸(Asp, D)變為天冬醯胺(Asn, N)，其支鏈特性由酸性變為疏水性；而ST835與ST2180差異則在porin基因上三個base pair的刪除(deletion) (353→△G, 354→△T, 355→△A)，在胺基酸序列上缺少一個絲胺酸(Ser, S)；ST835與ST3084差異則在porin基因上一個base pair的替換(340 G→A)，且同時六個base pair的刪除(deletion) (353→△C, 354→△T, 355→△T, 356→△A, 357→△T, 358→△A)，在胺基酸序列上少蘇胺酸(Thr, T)與酪胺酸(Tyr, Y)。另外，新發現ST3080相關的型別(ST3082、ST3444、ST3459、ST3528)的崛起，其類緣上與目前常見型別截然不同，具有多處胺基酸位點的刪除與取代(圖七)，是否為新引入的型別需要加以確認追蹤。

## 8. 2004至2009年生殖道披衣菌基因型分佈

接續2006年的生殖道披衣菌基因型的研究，持續監控2009年生殖道披衣菌的型別變化，發現目前仍以基因型E為主要的流行型別，整體流行盛行型別依序為：為E (19.5%)、F (19.0%)、J (17.8%)、D/Da (16.1%)、G (9.2%)、K (8.0%) (表六)。而從歷年資料發現，基因型別F與J有逐年增多的趨勢。其

中有四件個案利用新研發的多重檢測微珠陣列的結果顯示有4名病人得到混合型，分別為K/E、D/F(n=2)與D/E等共三種混合的基因型。

## 9. 愛滋病個案管理及性病匿名篩檢計畫

2009年6月至2009年10月自參與「愛滋病個案管理及性病匿名篩檢計畫」自北、中、南及東部共10家醫院收集到817件尿液檢體。檢驗尿液檢體發現 *Chlamydia trachomatis* 陽性共39件(4.77%)，各為北部8件、中部5件、南部26件；*N gonorrhoeae* 陽性共2件(0.24%) 北部及中部各1件(表七)。

## 10. 多重性病病原分子檢測

隨機挑選已確定淋菌(10件)與砂眼披衣菌(2件)陽性的檢體進行多重性病病原檢測，以測試該試劑的效能。同時也加入60件淋菌與砂眼披衣菌街陰性的檢體為陰性對照組，測試結果如表八。可完全鑑定出細菌性常見之病原體，同時也可發現原本鑑定為陰性的檢體，卻另外鑑定出其他病原體，如陰道滴蟲等病原菌。另外也有15.3%的檢體含有多重病原菌的存在。

## 11. Optical mapping 全基因體分析

Optical mapping全基因體分析初步結果看來，臨床菌株與韓國發表標準菌株NCCP11945的基因差異上很小，相似度達到96%以上，但是染色體變異區塊中的基因仍然有數十種之多(圖八)，其基因序列、基因位置、調控因子等都有可能不同；Region A的部份是大片段(57K)的染色體缺失，其中基因甚多，全部都缺失應會造成菌株死亡，推測deletion region可能是發生染色體的轉位或者重組，導致基因位址有所改變，的詳細的結果推論尚待進一步的定序方能確認。Region B的部分片段較大，然而其中的基因相對Region A來說較少，但是其中具有許多細胞膜組成相關的蛋白質，亦有可能與抗藥性機制相關。

## 12. 國內及國際合作

已將抗藥性及分子型別資料回饋給參與監測貢獻菌株的醫師，並透過研討會、公開演講及論文發表等多個管道公佈國內抗藥性趨勢以協助治療準則的修訂。

與聯合醫院昆明院區實驗室人員互相派員觀摩學習，交流檢驗技術，並派員演講報告性病新知。

#### 四、討論:

近年來人類因全球化的浪槽、社會行為的改變，性觀念開放，導致免疫不全病毒(HIV)、砂眼披衣菌、淋病、梅毒等病毒或細菌性性傳染病在全球及國內有逐漸增長的趨勢。尤有甚者，這些病原的肆虐又交雜了年齡層下降、多重性病感染、毒癮、伴侶間之乒乓效應等因素，使得問題更加複雜化，值得深入探討這些病原在國內，尤其是高危險族群如：HIV感染者、男同性戀、多重性伴侶族群的分子流行病學趨勢。值得注意的是，淋菌相較於其他細菌性性傳染病來說，已發現在台灣的抗藥性問題十分嚴重，削減了治療時用藥的選擇及防治的效果，因此有其必要建立參考實驗室進行系統化抗藥性監測，俾能即時提出用藥修正指引。從先前的報告也指出，具抗藥性的淋病在MSM族群及HIV感染者有再興起的趨勢，需密切監控其在這類高危險族群中的(共同)感染情形，以防止其傳播至異性戀網絡及社區。

因此，國內重要性傳染病尤其是砂眼披衣菌、淋病、梅毒等性傳染病有必要進行長期實驗室為主的監測，建立檢驗方法及分子流行病學資料。本年度持續進行淋菌及砂眼披衣菌之檢驗及分型方法，架構國內長期淋菌實驗室監測網絡，瞭解淋菌對於頭孢菌素抗藥性之盛行率，流行病學資料及分子型別特性。鑑定高危險群並瞭解其感染及傳播方式，以協助介入措施之研擬。

近年來，淋病的通報例數在台灣有逐漸上升的趨勢，與其他已開發國家如歐洲、日本與美國的情形類似<sup>42-44</sup>。我們進行2000-2009年台灣淋菌通報病例監測資料流行病學分析，在2000年至2007年間台灣淋病由2000年7月緩步上升於2003年10月達高峰，隨後又下降，於2006年1月則呈持平的趨勢。2003年底至2004年中似乎曾有病例增多情形，為當時有一小波疫情爆發、社會風氣逐漸開放、抑或加強監測的現象仍有待探討。同時台灣於2008年新增1629病例，發生率約每十萬人7.1人，高於2007年的6.3人/十萬人<sup>45</sup>，且截至2009年10月的淋病通報

資料也發現高於 2008 年同時期的通報數，對於逐漸升高的趨勢仍須加強持續性的安全性觀念衛教措施與疾病監測。從健保資料庫與成功大學團隊針對淋病的通報資料進行分析<sup>46</sup>，雖然淋病列為第三類法定傳染病，但由於其疾病的特性，只有少數人感染後其泌尿生殖道有明顯的症狀，因此增加了疾病傳播的危險，導致實際疾病的盛行率極可能是被低估的數值。而將淋病、HIV 及梅毒等法定性傳染病的通報病例進行逐年趨勢分析發現，彼此之間似乎沒有相關性，梅毒病例遠高於淋病的現象似乎是台灣特有的。有必要修正反應梅毒實際現行感染情形。

統計 2000-2009 年台灣各地理區淋病盛行率分佈，發現病例仍以台北區為最高，約每十萬人 3.6~16 人，這也與國外研究如在紐約、倫敦等都會之趨勢相仿<sup>18</sup>，這些都會地區都有人口密集、居民國際化程度高、教育水準高、觀念較開放及同志人口較多之特性。因此，在人口密集度高的都會區更需加強衛教之宣導。盛行率分佈，台北區之後，其次依序為北區、南區、東區、高屏區及中區。分析各地區淋病發生率比例逐年趨勢顯示，北區(包括台北縣及桃竹苗)及中區有逐年增加趨勢；反之台北區及東區則逐年減少。

淋病病例月份分析方面，並無季節性聚集現象，並無特別明顯季節性聚集現象，在 8 月通報比例開始增高，10~11 月病例數達到高峰。此高峰現象，國內性病醫師推測可能與東南亞及中國大陸旅遊旺季有關。其他如是否因為淋菌微生物學上的特性，則有待進一步探討。累計 2000-2009 年共 13026 病例中，粗男女比為 9.3:1 (11,757:1,269)。

感染者男/女性別比方面由 2000 年的 4.2:1 攀升至 2008 年的 11.5:1。男女性別比的攀升推測與男同性戀間傳播增加有關。2009 年稍降為 8.4:1，可能因為男同性戀間傳播稍有遏阻，且女性方面警覺性增加，這些仍有待進一步長期監測觀察。女性性病例數遠低於男性 (通報病例 9:1；收集菌株 10:1)，可能肇因於女性於感染淋菌後，有半數以上產生不顯性感染或症狀不明顯，導致病人忽視病情或延誤就醫，其對女性健

康、生育能力與公共衛生防治將可能造成的負面效應，亦值得我們未來更需加強女性高危險族群之鑑定與追蹤，並能從中思考防範對策。

感染年齡層在20-29歲最高在男性及女性分別佔46及37%。在統計上發現，在15-19歲年齡層男性病例有明顯逐年升高的趨勢，在女性方面，則無類似之發現，可能的樣本數過少或抽樣上的誤差導致。國內青少年提早性的初體驗的現象值得警惕，學校及家長應提早落實性教育以及性向的諮詢。美國近來發現其青少年性活躍年齡層提早，媒體亦熱烈討論家長及學校有責任且應提早灌輸正確性知識及性病、懷孕等風險。

本年度(2009年)接續2008年持續進行台灣淋菌實驗室監測，收集全國385株菌株，連同2006-2008年北部與各地區收集的菌株進行抗藥性分析，發現penicillin, ciprofloxacin, cefixime, cefpodoxime及ceftriaxone之抗藥性分別為65.3%, 90.3%, 7.8%, 11.1%及0%。先前台大薛博仁醫師的研究(Hsueh et al., 2005)及本研究均指出，台灣的淋菌菌株針對於penicillin與ciprofloxacin的抗藥性已相當的高，因此頭孢菌素已成為目前治療淋病的頭號用藥。但值得注意的是，世界各國也陸續發現有一小部分的淋菌針對於頭孢菌素類的抗藥性也有逐漸上升的現象(Tapsall 2005)，另外在夏威夷與香港也發現病人使用口服用的頭孢菌素(cefixime)治療失敗的例子<sup>47,48</sup>。然而，在本研究的歷年藥敏監測結果中也發現，cefixime的抗藥性比率自從2006年的7.7%上升至2007年的17.8%，而降低至2009年的3.9%。而注射用的頭孢菌素(ceftriaxone)目前則無對其有抗藥性的淋菌出現，然而也發現共有2件淋菌針對於肌肉注射用的頭孢菌素(ceftriaxone)可定義為減少的敏感度(reduced susceptibility, 0.19ug/mL)，也對為未來可能出現對該抗生素產生抗藥性的淋菌提供一個警訊。有鑑於此，持續、密集地針對台灣地區淋菌的臨床分離株進行頭孢菌素的藥物敏感性篩選是必需的。

先前的研究發現，在2003年台灣地區分離到的淋菌針對於ciprofloxacin的抗藥性比率高達95.2%<sup>13</sup>。而我們最近發表的研究也指出，從2006年4月到2007年8月之間所分離到的菌株對於ciprofloxacin的抗藥性比率也仍有相當高。同時，世界各國在最近幾年也陸續發現對於ciprofloxacin有抗藥性的淋菌有散佈的現象，且該抗生素已逐漸失去

其治療的效果，在台灣亦然。因此，目前治療淋病的抗生素已由 floroquinone 類的抗生素轉換成使用頭孢菌素類的抗生素，成為治療淋病的第一線藥物。然而，世界各國也陸續發現有一小部分的淋菌針對於頭孢菌素的抗藥性也有逐漸上升的現象<sup>49</sup>。從先前研究中也發現，北部地區在口服用的頭孢菌素(cefixime)的抗藥性比率從 2003 年的 9% 上升至 2007 年的 16.4%<sup>50</sup>。本研究也顯示具 cefixime, cefpodoxime 的抗藥性菌株有地理上的差異性，集中在北部。然而，本年度於在中、南部地區也發現少數菌株對於頭孢菌素有抗藥性，顯示該群菌株有逐漸散佈的趨勢。值得慶幸的是目前的淋菌對於肌肉注射用的頭孢菌素仍是百分之百有效，但對未來仍可能出現對該抗生素產生抗藥性的淋菌仍須密切注意。值得高興的是 cefixime 及 cefpodoxime 的抗藥性有和緩下降的趨勢，這也反映在男同志專有型別比例變少上，顯現監測配合用藥修正及各界聯合努力下，確實發揮了效果。有鑑於此，持續、密集地針對台灣地區淋菌的臨床分離株進行頭孢菌素的藥物敏感性篩選是必需的。

由於全球化與航空器的便利，淋菌菌株也隨著人類的腳步於全球散佈，因此，使用具有高分型效能的分子分型技術去監測某些基因型的國際與國內分佈是相當重要的。NG-MAST 是本研究所採用具有高鑑別力的分型技術，可應用於鑑定感染淋病病人身上分離到的淋菌所屬之基因型，協助建立性接觸網絡，進而依據性接觸網絡進行防治。利用 NG-MAST 針對 827 菌株中已成功鑑定出 305 種基因型，發現其中 95 種基因型各有 2 到 69 株菌株所代表，因此可知道某些基因型的菌株已經在台灣散佈、流傳，並以 ST421 的菌株數最多，其次依序為 ST419、ST547、ST2194、ST2175、ST2178、ST225、ST2180、ST2179、ST835、ST2253 與 ST2282 為台灣主要流行的基因型。其中有 210 種 ST 只有一個分離菌株為代表，其原因可歸咎於不完整的性伴侶追蹤、本土新型型別崛起、國外菌株的引入。NG-MAST 也可應用於國際上淋菌分子型別的監測。整體來說，台灣流行的淋菌基因型別與其他國家比較分析之後，發現除

了 ST421、ST419、ST225、ST547、ST835 與其他少數型別(ST304、ST340、ST437、ST566、ST766、ST1412)在其他國家也有發現之外，在型別分佈的相似度上是相當低的<sup>51</sup>。且可應用於流行病學監測，英國的研究報導中指出，在男同性戀主要流行的 7 種基因型別中，ST547 為其中之一<sup>18</sup>。而我們的研究數據中也發現，屬於 ST547、ST835、ST2180 的淋菌菌株大多皆是從男同性戀病人中所發現，且具有較高的 HIV 和梅毒的共同感染率，但其數量有隨著時間有明顯的減少，可見於該群體的防治已有見效，相關型別之監控仍屬必須。而從男異性戀病人上所分離的菌株，其型別(ST421、ST419、ST2178、ST2194、ST225)與男同性戀的型別為高度相異，且此趨勢也是符合預期，各個族群會有相似的基因型別，但值得注意的是，屬於該群型別的數量有隨著時間上升的趨勢，所以未來男異性戀的防治宣導須更加加強。

便可應用 NG-MAST 的技術所得到的資訊，用於鑑別病人所感染的菌株是否屬於高危險性的基因型或處於高危險族群的性接觸網絡。利用 NG-MAST 的方法也可去了解與監測具有抗藥性的淋菌散佈與流行的情形。在英國倫敦的研究指出，近幾年有 6 種主要具有抗藥性的基因型在高危險的族群裡流行與散佈<sup>52</sup>。本研究中發現國內主要型別 ST547 不僅主要發現於 MSM 族群，其抗藥性樣式與國內抗藥性情形迥異(對 ciprofloxacin 等多種抗生素為感受性)，推測極可能是透過 MSM 高危險族群之國外接觸後引入國內，進而在該族群本土化流傳，再次印證了國際化監測之重要性。藉由在本研究中也發現所有屬於 ST2180、ST835、與 ST2253 與 ST3084 的菌株對於 penicillin 與 ciprofloxacin 皆有抗藥性，同時也是對於 cefixime 與 cefpodoxime 的較具抗藥性的主要型別，推測也是抗藥性菌株崛起的主要源頭。這些在在印證強調每一種型別的族群各有其主要流行的群體(病人性向)、不同抗藥性樣式、梅毒及 HIV 共同感染率，並代表了不同的性接觸網絡。也彰顯鑑別出不同高危險群，對於擬定防治與投藥策略及優先順序之重要性。

23 例感染淋菌的女性並無 HIV 及梅毒共同感染的情形，資料顯示來自女性的菌株型別多為零星分散型別並沒有形成網絡，僅 6 株與主要型別有關連，其他型別於男異性戀的病人也有分離到。另外發現一株對頭孢菌素 (cefixime) 具抗藥性，且為男同性戀常見的型別，推測可能為雙性戀的男性傳布導致，因此仍須針對各群體中的菌株型別進行監測。同時也有待收集更多具代表性菌株以釐清其高危險族群(男同性戀或異性戀伴侶或性工作者)及分子流行病學特性。

追蹤型別時序上的消長發現，ST547 於 2006~2009 年間均持續存在，且對多數抗生素如 penicillin, ciprofloxacin, ceftriaxone, cefixime 多呈感受性，於其他型別的特性迥異，其數量也有逐漸減少的趨勢，為何無法消滅而持續存在，值得思索其治療及流行病學病上蘊含的意義。ST835 於 2006 年崛起，而於 2007 年達最高峰，2008~2009 年間持續減少中。反之 ST2180、與 ST2253 在 2007 年出現，分別至 2008 年與 2009 年持續為各年主要型別，且於 2008 年有一新抗藥菌株 ST3084 的出現，並在 2009 年達到高峰。類源樹分析後發現，ST835 與 ST2253、ST2180、ST3084 類源上十分近似，進一步分析基因變異位點後發現 ST835 與 ST2253 差異僅在 porin 基因上一個 base pair 的替換(340 G→A)；ST835 與 ST2180 差異則在 porin 基因上三個 base pair 的刪除(deletion) (353→△G, 354→△T, 355→△A)；ST835 與 ST3084 差異則在 porin 基因上一個 base pair 的替換(340 G→A)，且同時六個 base pair 的刪除(deletion) (353→△C, 354→△T, 355→△T, 356→△A, 357→△T, 358→△A)。推測上 ST2253、ST2180 是個別獨立由 ST835 經過變異演化而來，而 ST3084 在經由 ST2253 變異演化後導致。而 ST2253 與 ST3084 相較 ST835 對於 cefixime 及 cefpodoxime 的抗藥性比率較高，且抗藥性 MIC 值較高，顯示 340 G→A 或其他位點的變異對於淋菌適應演化，亦或用藥與否而施加選汰壓力所致，值得進一步探討。

雖然生殖道披衣菌在台灣的發生率與盛行率有逐漸上升的趨勢，但

是目前在流行病學上所得到的資訊是相當有限的。所以，藉由分子分型的方式進行基因型別鑑定得到的結果，可應用於性傳染途徑中高危險族群的判定，並可及時對病人提出適當的衛教宣導、生活上的管理<sup>53</sup>。

先前我們的研究指出，台灣地區的生殖道披衣菌基因型以 E 基因型為主，其次為 D，F，J，G，K，H 與 Ba<sup>54</sup>。本年度持續追蹤國內砂眼披衣菌型別盛行率依序為 E (19.5%)、F (19.0%)、J (17.8%)、D/Da (16.1%)、G (9.2%)、K (8.0%)；E 基因型仍是最普遍的型別，然而從歷年資料發現，J 與 F 基因型為近年來增多的主要基因型。快速、正確的鑑定出台灣所主要流行的基因型，有助於分子流行病學分析，作為防治生殖道披衣菌的主要參考資料。

本年度開始協助本局三組「愛滋病個案管理及性病匿名篩檢計畫」，主要是希望能藉由 HIV、梅毒、淋菌、砂眼披衣菌的匿名篩檢，以促進高危險族群的篩檢率，以利於防治工作進行。本次針對所蒐集的 817 件尿液檢體進行檢驗，發現分別約有 4.5% 與 0.2% 的砂眼披衣菌與淋菌的陽性率，而由於大部分的個案都沒有明顯的症狀，因此，該結果也符合預期。

由於臨床上常見多種性病共同感染，HIV 感染者其他細菌性或病毒性性病感染更常見，故我們積極發展的單管多重檢測，期能應用於實際臨床檢體之檢測，較諸傳統培養及生化鑑定方法更能反映臨床感染之現況。我們過去成功發展生殖道披衣菌基因型鑑定之微珠陣列系統，並應用於 8 種砂眼披衣菌的基因型鑑定。本研究初步建立可同時檢測陰道滴蟲，人類黴漿菌，生殖道黴漿菌，生殖道披衣菌，淋菌及解尿支原體六種性病病原體的快速多重檢驗技術。初步結果顯示性病多種病原同時感染十分普遍，**明年度將持續發展多種性病的快速檢驗，並與三組業務單位合作應用於高危險族群的篩檢，希望藉由檢測出其中一種病原有助於發掘其他性病病原尤其是 HIV 的潛在感染。**

利用 Optical mapping 技術針對臨床菌株對於第三代的頭孢菌素 (cephalosporins) 抗藥性菌株進行全基因體分析，將針對已知可能的抗藥性機制相關基因，如肽聚醣(peptidoglycan)相關之組成或者酵素 (transglycosylase, pentapeptide-transferase) 等作進一步定序分析研究，其他抗藥性機制相關基因如 porin、DNA 複製相關酵素亦為可能的研究標的，期望能有所發現。

本研究顯示青少年性早熟及初次性經驗體驗提早，以及淋病可能在性活躍男同志間傳播增加值得注意。顯現青少年性教育、持續監測抗藥性趨勢、特殊菌株型別透過性接觸網絡傳播動態以及管理性活躍男同性戀，對防治淋菌及遏阻抗藥性菌株崛起的重要性。本研究發現淋菌主要及高抗藥性型別與個案特殊性傾向息息相關，因此持續整合分析篩選到的淋病個案與個案性傾向的關連性不僅有助於鑑別高危險族群的網絡，各別抗藥性及型別資料回饋醫師亦有助於醫師針對這類病患給予特別警惕、輔導、諮詢及投藥治療之參考。所有研究發現亦將提供本局三組權責疾病組，以研擬更周延的防治策略。未來仍將持續監測性病盛行率、抗藥性、分子流行病學、高危險族群的動態變化。

本年度研究成果至少產出 3 篇 SCI 論文 (1 篇已發表，2 篇投寄中)，亦有多篇撰寫中。

## 五、計畫重要研究成果與具體建議

本年度主要研究進展有六：**第一**、分析台灣淋菌 2000-2009 年報告病例，發現病例主要集中在北部地區，於 8 月起病例略增，於 10-11 月達高峰，感染年齡層於 20-29 歲最多。值得注意的是在 15-19 歲年齡層的男性病例有明顯逐年升高的趨勢( $R^2 = 0.87$ )。感染者男/女性別比方面由 2000 年的 4.2:1 攀升至 2008 年的 11.5:1，2009 年為 8.4:1，此高性別比推測與男同性戀間傳播有關。**第二**、進行抗藥性監測分析 827 株菌株，發現 penicillin, ciprofloxacin, cefixime, cefpodoxime 及 ceftriaxone 之抗藥性分別為 65.3%, 90.3%, 7.8%, 11.1% 及 0%。個別菌株抗藥性及型別資料已回饋給貢獻菌株的醫師，並透過研討會及論文發表等多個管道公開國內抗藥性趨勢以協助治療準則的修訂。值得高興的是 cefixime 及 cefpodoxime 的抗藥性有和緩下降的趨勢，這也反映在男同志專有型別比例變少上，顯現監測配合用藥修正及各界聯合努力下，確實發揮了效果。**第三**、以 NG-MAST 分型進行淋菌分子流行病學研究，先前發現台灣淋病主要基因型為 ST547、ST2180、ST835 與 ST2253 等在男同性戀傳播的型別，這些型別且具有較高的 HIV 和梅毒的共同感染率，多數同時也是對於 cefixime 與 cefpodoxime 具抗藥性的主要型別。2009 年上述這些型別均有明顯減少；新型別 ST3084 則緩步增加。本年度開始發現異性戀為主的型別如 ST421、ST419、ST2178、ST2194 與 ST225 的竄起並逐漸超越同性戀的型別。對 Cefixime 和 cefpodoxime 的抗藥性也在這些型別開始零星出現。我們也監測到 ST3080 及其相關型別的崛起，其類緣性與國內常見型別截然不同。**第四**、2004-2009 年國內砂眼披衣菌型別盛行率依序為 E (19.5%)、F (19.0%)、J (17.8%)、D/Da (16.1%)、G (9.2%)、K (8.0%)。E 仍是最盛行的型別，但 2007 年後 F、J、D/Da 型別逐漸增加。**第五**、協助性病匿名篩檢計畫，817 件尿液中分別檢驗出 39 件(4.77%)披衣菌及 2 件淋菌(0.24%)。**第六**、建立可同時檢測陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)，人類黴漿菌(*Mycoplasma hominis*)，生殖道黴漿菌(*Mycoplasma genitalium*)，

生殖道披衣菌(*Chlamydia trachomatis*), 淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)及解尿支原體(*Ureaplasma urealyticum*)六種性病原體的快速多重檢驗技術。初步結果顯示性病多種病原同時感染十分普遍。本年度研究成果至少產出 3 篇 SCI 論文 (1 篇已發表, 2 篇投寄中), 亦有多篇撰寫中。

## 六、具體建議有十二：

本研究具體建議有十二：

1. 在同性戀網絡傳播的淋菌菌株多半為主要及特殊型別, 且有較大比例為抗頭孢菌素之多重抗藥性菌株, 感染這些菌株的患者也有較高比例的HIV及梅毒的共同感染。顯現持續監測抗藥性菌株傳播動態, 除可遏阻抗藥性菌株崛起外亦有助於發掘高危險族群性接觸網絡以及間接協助HIV的防治。
2. 讓懷疑染有性病的民眾, 可參加免費篩檢服務, 發現感染時應連同性伴侶一起治療。應不斷提醒民眾危險性行為不僅容易得性病, 接觸高危險族群網絡感染高抗藥性淋菌菌株及HIV的機率也較高。
3. 在台灣淋菌對penicillin及ciprofloxacin抗藥性均相當高, 故fluoroquinolone類藥物不再適合用於治療淋菌, 應改用頭孢菌素類抗生素。未來仍須持續監測淋病在台灣的抗藥性趨勢外, 並將藥敏趨勢持續分享給臨床醫師參考, 並透過學會、研討會及論文發表多重管道公布, 以提供用藥修正之指引。
4. 淋菌病例在15-19歲年齡層的男性病例有明顯逐年升高的趨勢, 顯示青少年尤其是男性性早熟及初次性經驗提早, 家長及學校應提早在青少年性活躍前落實性教育, 並告知性病風險。醫療機構應提供青少年及年輕男同志諮詢的管道, 對有同志傾向之青少年加強諮詢輔導。
5. 性病透過高危險特殊族群的跨國感染也值得關注, 生殖道披衣菌的

- 傳播與中國大陸的關聯性，淋病某些型別可能與國外MSM族群有關(如ST547, ST835)，尤需加強關切跨國傳播之動態。亦應讓民眾瞭解性病容易透過高危險特殊族群的跨國感染，國人赴國外旅遊時應瞭解一時行為的鬆懈可能帶來嚴重的後果。
6. 應用分型方法的應用及與國際資料比對，鑑別出不同高危險群，提供權責疾病組，以針對各別性接觸網絡，研擬更周延的防治及衛教宣導策略，提供擬定防治、衛教與投藥策略及排定防治優先順序之參考。
  7. 深入研究抗藥性及致病性機制，以瞭解抗藥性細菌之崛起及傳播，以及抗藥性基因變異及轉移之情形。
  8. 將抗藥性及型別資料回饋給送檢單位及臨床醫師，協助釐清型別與致病力及抗藥性之相關性，協助高危險群的鑑別，以及型別在療程中之變化所代表之意義，以供調整治療策略及病人衛教諮詢之參考，並持續合作建立臨床及流病資料整合資料庫。
  9. 持續追蹤整理國內砂眼披衣菌及淋菌型別盛行率，為未來疫苗參採及評估之依據。
  10. 性病有高比例的多種性病病原共同感染，檢測出其中一種病原有助於發掘其他性病病原的潛在感染。我們將持續發展應用於多種性病及其型別多重快速檢驗平台。
  11. 由疾管局主動提供鑑定及分型服務，教育訓練及技術推廣。
  12. 持續建立可國際接軌之全國性分型資料庫平台，參與國際監測，可成為國內、國際型別交流比較之參考。以實驗室監測檢驗技術及資訊進行實質國際合作，逐步建立國際合作網絡。與其他國家進行菌株及型別資料之交流，持續進行實質國際交流。持續努力提升國際SCI論文發表的質與量，分享台灣經驗，展現實力。

## 七、參考文獻References

1. Hsieh YH, Kuo MJ, Hsieh TC, et al: Underreporting and underestimation of gonorrhoea cases in the Taiwan National Gonorrhoea Notifiable Disease System in the Tainan region: evaluation by a pilot physician-based sentinel surveillance on *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Int J Infect Dis* 2009.
2. Fleming DT, Wasserheit JN: From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* 1999;75:3-17.
3. Rotchford K, Strum AW, Wilkinson D: Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital-tract secretions: systematic review and data synthesis. *Sex Transm Dis* 2000;27:243-8.
4. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH: Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:1-21.
5. Matsumoto T: Trends of sexually transmitted diseases and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31 Suppl 1:S35-S39.
6. Fox KK, del RC, Holmes KK, et al: Gonorrhoea in the HIV era: a reversal in trends among men who have sex with men. *Am J Public Health* 2001;91:959-64.
7. Centers for Disease Control DoHT: Statistics of Communicable Diseases and Surveillance Report Republic of China, 2008. Available at: <Http://Www.Cdc.Gov.Tw> Accessed November 2009 2006.
8. Hsieh YH, Kuo MJ, Hsieh TC, et al: Underreporting and underestimation of gonorrhoea cases in the Taiwan National Gonorrhoea Notifiable Disease System in the Tainan region: evaluation by a pilot physician-based sentinel surveillance on *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Int J Infect Dis* 2009.
9. Tapsall J: Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is diminishing available treatment options for gonorrhoea: some possible remedies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006;4:619-28.
10. Workowski KA, Berman SM, Douglas JM, Jr.: Emerging antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: urgent need to strengthen prevention strategies. *Ann Intern Med* 2008;148:606-13.
11. Bauer HM, Mark KE, Samuel M, et al: Prevalence of and associated risk factors for fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in California, 2000-2003. *Clin Infect Dis* 2005;41:795-803.
12. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific Region, 2005. *Commun Dis Intell* 2006;30:430-3.
13. Hsueh PR, Tseng SP, Teng LJ, et al: High prevalence of ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Northern Taiwan. *Clin Infect Dis* 2005;40:188-92.
14. Wong WW, Huang CT, Li LH, et al: Molecular Epidemiology of Gonorrhoea Identified Clonal Clusters with Distinct Susceptibilities Associated with Specific High-risk Groups. *J Clin Microbiol* 2008.
15. Newman LM, Moran JS, Workowski KA: Update on the management of gonorrhoea in adults in the United States. *Clin Infect Dis* 2007;44 Suppl 3:S84-101.
16. Wong WW, Huang CT, Li LH, et al: Molecular Epidemiology of Gonorrhoea Identified Clonal Clusters with Distinct Susceptibilities Associated with Specific High-risk Groups. *J Clin*

17. Kolader ME, Dukers NH, van der Bij AK, et al: Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Amsterdam, The Netherlands, shows distinct heterosexual and homosexual networks. *J Clin Microbiol* 2006;44:2689-97.
18. Choudhury B, Risley CL, Ghani AC, et al: Identification of individuals with gonorrhoea within sexual networks: a population-based study. *Lancet* 2006;368:139-46.
19. Wong WW, Huang CT, Li LH, et al: Molecular Epidemiology of Gonorrhea Identified Clonal Clusters with Distinct Susceptibilities Associated with Specific High-risk Groups. *J Clin Microbiol* 2008.
20. Morris SR, Knapp JS, Moore DF, et al: Using strain typing to characterise a fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* transmission network in southern California. *Sex Transm Infect* 2008;84:290-1.
21. Palmer HM, Young H: Dramatic increase in a single genotype of TRNG ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates in men who have sex with men. *Int J STD AIDS* 2006;17:254-6.
22. Gaydos CA, Theodore M, Dalesio N, et al: Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42:3041-5.
23. Ngandjio A, Clerc M, Fonkoua MC, et al: Restriction endonuclease patterns of the *omp1* gene of reference *Chlamydia trachomatis* strains and characterization of isolates from Cameroonian students. *J Med Microbiol* 2004;53:47-50.
24. Molano M, Meijer CJ, Morre SA, et al: Combination of PCR targeting the VD2 of *omp1* and reverse line blot analysis for typing of urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42:2935-9.
25. Morre SA, Rozendaal L, van V, I, et al: Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? *J Clin Microbiol* 2000;38:2292-6.
26. Lee G, Park J, Kim B, et al: *OmpA* genotyping of *Chlamydia trachomatis* from Korean female sex workers. *J Infect* 2006;52:451-4.
27. Jensen JS: *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:1-11.
28. Taylor-Robinson D: *Mycoplasma genitalium* -- an up-date. *Int J STD AIDS* 2002;13:145-51.
29. Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA, et al: Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet* 2002;359:765-6.
30. Anagnrius C, Lore B, Jensen JS: *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Transm Infect* 2005;81:458-62.
31. Hjorth SV, Bjornelius E, Lidbrink P, et al: Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. *J Clin Microbiol* 2006;44:2078-83.
32. Dylewski J, Nsanze H, Maitha G, et al: Laboratory diagnosis of *Haemophilus ducreyi*: sensitivity of culture media. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:241-5.
33. Mackay IM, Harnett G, Jeffreys N, et al: Detection and discrimination of herpes simplex viruses, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and *Calymmatobacterium* (*Klebsiella*) *granulomatis* from genital ulcers. *Clin Infect Dis* 2006;42:1431-8.
34. Cai, W., Jing, J., Irvin, B., Ohler, L., Rose, E., Shizuya, H., Kim, U. J., Simon, M.,

- Anantharaman, T., Mishra, B., and Schwartz, D. C. High-resolution restriction maps of bacterial artificial chromosomes constructed by optical mapping<sup>6</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95[7]. 1998. 1931.  
Ref Type: Map
35. Latreille, P., Norton, S., Goldman, B. S., Henkhaus, J., Miller, N., Barbazuk, B., Bode, H. B., Darby, C., Du, Z., Forst, S., Gaudriault, S., Goodner, B., Goodrich-Blair, H., and Slater, S. Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing<sup>3</sup>. *BMC Genomics* 8. 2007.  
Ref Type: Map
36. Chen, Q., Savarino, S. J., and Venkatesan, M. M. Subtractive hybridization and optical mapping of the enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 chromosome: isolation of unique sequences and demonstration of significant similarity to the chromosome of *E. coli* K-124. *Microbiology* 152[Pt 4]. 2006.  
Ref Type: Map
37. Shukla, S. K., Kislow, J., Briska, A., Henkhaus, J., and Dykes, C. Optical mapping reveals a large genetic inversion between two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains<sup>1</sup>. *J Bacteriol* 191[18]. 2009.  
Ref Type: Map
38. Hsu MC, Tsai PY, Chen KT, et al: Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens in Taiwan. *J Med Microbiol* 2006;55:301-8.
39. Huang CT, Wong WW, Li LH, et al: Genotyping of *Chlamydia trachomatis* by microsphere suspension array. *J Clin Microbiol* 2008;46:1126-8.
40. Martin IM, Ison CA, Aanensen DM, et al: Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004;189:1497-505.
41. Dutro SM, Hebb JK, Garin CA, et al: Development and performance of a microwell-plate-based polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma genitalium*. *Sex Transm Dis* 2003;30:756-63.
42. Fenton KA, Lowndes CM: Recent trends in the epidemiology of sexually transmitted infections in the European Union. *Sex Transm Infect* 2004;80:255-63.
43. Matsumoto T: Trends of sexually transmitted diseases and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31 Suppl 1:S35-S39.
44. Phipps W, Stanley H, Kohn R, et al: Syphilis, chlamydia, and gonorrhea screening in HIV-infected patients in primary care, San Francisco, California, 2003. *AIDS Patient Care STDS* 2005;19:495-8.
45. Centers for Disease Control DOH Taiwan: Statistics of Communicable Diseases and Surveillance Report Republic of China, 2007. 2008.
46. Hsieh YH, Kuo MJ, Hsieh TC, et al: Underreporting and underestimation of gonorrhea cases in the Taiwan National Gonorrhea Notifiable Disease System in the Tainan region: evaluation by a pilot physician-based sentinel surveillance on *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Int J Infect Dis* 2009.
47. Wang SA, Lee MV, O'Connor N, et al: Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to cefixime-Hawaii, 2001. *Clin Infect Dis* 2003;37:849-52.
48. Lo JY, Ho KM, Leung AO, et al: Cefixime resistance and treatment failure of *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3564-7.
49. Tapsall JW: Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl

4:S263-S268.

50. Wong WW, Huang CT, Li LH, et al: Molecular Epidemiology of Gonorrhea Identified Clonal Clusters with Distinct Susceptibilities Associated with Specific High-risk Groups. *J Clin Microbiol* 2008.
51. Palmer HM, Young H, Martin IM, et al: The epidemiology of ciprofloxacin resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland 2002: a comparison of phenotypic and genotypic analysis. *Sex Transm Infect* 2005;81:403-7.
52. Ison CA, Easmon CS: Changes in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolated in London. *J Med Microbiol* 1989;30:239-44.
53. Pathela P, Blank S, Schillinger JA: Lymphogranuloma venereum: old pathogen, new story. *Curr Infect Dis Rep* 2007;9:143-50.
54. Hsu MC, Tsai PY, Chen KT, et al: Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens in Taiwan. *J Med Microbiol* 2006;55:301-8.

## 八、圖、表

表一、2006~2009 年實驗室監測全台灣淋菌菌株來源

地區		2006	2007	2008	2009	總計
北 (N=712)	基隆市	0	0	0	8	8
	台北市	78	136	120	137	471
	台北縣	0	4	11	101	116
	桃園縣	0	11	29	40	80
	新竹市	0	5	9	2	16
	新竹縣	0	0	1	19	20
中 (N=42)	台中市	0	0	11	0	11
	台中縣	0	0	0	4	4
	彰化縣	0	0	2	0	2
	雲林縣	0	0	4	21	25
南 (N=74)	嘉義縣	0	0	1	4	5
	台南縣	0	0	17	28	45
	台南市	0	0	0	4	4
	高雄市	0	0	3	17	20
	總計	78	156	208	385	827

表二、感染淋病病人之基本資料

基本資料	2006	2007	2008	2009
病人數	78	156	208	385
性別				
男	75 (96.2)	145 (92.9)	196 (94.2)	330 (85.7)
女	3 (3.8)	11 (7.1)	10 (4.8)	48 (12.5)
未知性別			2 (1.0)	7 (1.8)
年齡層				
<15	0	0	1 (0.5)	1 (0.3)
15-19	3 (3.8)	8 (8.2)	17 (8.1)	25 (6.5)
20-24	10 (12.8)	20 (16.3)	34 (16.3)	66 (17.1)
25-29	16 (20.5)	39 (25.5)	53 (25.4)	99 (25.7)
30-34	13 (16.7)	33 (16.3)	34 (16.3)	69 (17.9)
35-39	13 (16.7)	24 (15.9)	33 (15.8)	42 (10.9)
40-44	9 (11.5)	13 (5.3)	11 (5.3)	23 (6.0)
45-49	4 (5.1)	6 (3.4)	7 (3.3)	13 (3.4)
50-54	5 (6.4)	2 (1.9)	4 (1.9)	10 (2.6)
55-59	2 (2.6)	6 (1.9)	4 (1.9)	7 (1.8)
60-64	1 (1.3)	0 (1.9)	4 (1.9)	5 (1.3)
>65	2 (2.6)	5 (1.0)	2 (1.0)	9 (2.3)
未知年齡	0	0	4 (1.9)	16 (4.2)

表三、台灣淋菌基因型別之基本資料

分子型別	All	ST547	ST2180	ST835	ST2253	ST421	ST419	ST2178	ST2194	ST225	Other STs
菌株數	391	29	16	13	11	15	13	11	11	10	262
性向											
異性戀	240 (61.4)	6 (20.7)	5 (31.3)	5 (38.5)	0	15 (100)	11 (84.6)	10 (90.9)	11	8 (80.0)	169 (64.5)
男同性戀/雙性戀	142 (36.3)	23 (79.3)	11 (68.7)	8 (61.5)	11 (100)	0	0	1 (9.1)		2 (20.0)	86 (32.8)
未知性向	9 (2.3)	0	0	0	0	0	2 (15.4)	0	11 (100)	0	7 (2.7)
共同感染的疾病									0		
HIV	57 (14.6)	8 (27.6)	9 (56.3)	6 (46.2)	4 (36.4)	0	0	0	0	0	30 (11.5)
梅毒	38 (9.7)	9 (31.0)	3 (18.8)	4 (30.8)	0	1 (6.67)	0	0		0	21 (8.0)
HIV+梅毒	21 (5.4)	4 (13.8)	3 (18.8)	2 (15.4)	0	0	0	0	0	0	12 (4.6)

(other STs 為所有<10 菌株數的型別)

表四、淋菌菌株抗藥性及全國各地抗藥性分佈情形

Antibiotics	Antibiotics susceptibility											
	All (N=825)			北 (N=709)			中 (N=42)			南 (N=74)		
	S(%)	I (%)	R (%)	S(%)	I (%)	R (%)	S(%)	I (%)	R (%)	S(%)	I (%)	R (%)
Penicillin	4 (0.5)	282 (34.2)	539 (65.3)	4 (0.6)	237 (33.4)	468 (66.0)	0	18 (42.9)	24 (57.1)	0	27 (36.5)	47 (63.5)
Cefixime	761 (92.2)	0	64 (7.8)	649 (91.5)	0	60 (8.5)	41 (97.6)	0	1 (2.4)	71 (95.9)	0	3 (4.1)
Cefpodoxime	733 (88.9)	0	92 (11.1)	628 (88.6)	0	83 (11.7)	40 (95.2)	0	2 (4.8)	67 (90.5)	0	7 (9.5)
Ciprofloxacin	50 (6.1)	30 (3.6)	745 (90.3)	44 (6.2)	28 (4.0)	637 (89.8)	2 (4.8)	0	40 (95.2)	4 (5.4)	2 (2.7)	68 (91.9)

表五、不同型別的淋菌菌株之抗藥性監測 (N=826)

No (%) of isolates with resistance to antibiotics					
Sequence Type	All	Penicillin	Cefixime	Cefpodoxime	Ciprofloxacin
ST421	69	44 (63.8)	0	1 (1.4)	68 (98.6)
ST419	39	32 (82.1)	0	0	38 (97.4)
ST547	33	1 (3.0)	0	1 (3.0)	2 (6.1)
ST2194	25	16 (64.0)	1 (4.0)	3 (12.0)	24 (96.0)
ST2175	22	19 (86.4)	0	0	20 (90.9)
ST2178	21	21 (100)	1 (4.8)	0	21 (100)
ST225	20	19 (95.0)	0	1 (5.0)	20 (100)
ST2179	17	16 (94.1)	0	0	17 (100)
ST2282	10	5 (50.0)	0	1 (10.0)	9 (90.0)
ST1971	8	5 (62.5)	0	1 (12.5)	8 (100)
ST2148	8	6 (75.0)	0	0	8 (100)
ST3389	8	6 (75.0)	0	0	8 (100)
ST270	7	5 (71.4)	0	0	5 (71.4)
ST2149	7	6 (85.7)	0	0	7 (100)
ST2400	7	2 (28.6)	0	1 (14.3)	7 (100)
ST3684	7	4 (57.1)	0	0	7 (100)
ST2180	18	13 (72.2)	11 (61.1)	14 (77.8)	18 (100)
ST835	15	11 (73.3)	8 (53.3)	11 (73.3)	15 (100)
ST2253	14	12 (85.7)	11 (78.6)	13 (92.9)	14 (100)
ST3084	6	6 (100)	5 (83.3)	5 (82.3)	6 (100)
Isolates <6	465	291 (62.6)	27 (5.8)	39 (8.4)	422 (90.8)

表六、2004 至 2009 年間台灣常見之生殖道披衣菌型別

CT Type	Total	2004	2005	2006	2007	2008	2009
B	6 (3.4)	2 (4.0)	0	4 (13.3)	0	0	0
D	28 (16.1)	6 (12.0)	14 (25.0)	3 (10.3)	3 (18.8)	2 (9.1)	4 (26.7)
E	34 (19.5)	10 (20.0)	14 (25.0)	7 (23.3)	3 (18.8)	0	2 (13.3)
F	33 (19.0)	7 (14.0)	9 (16.1)	4 (13.3)	6 (37.5)	7 (31.8)	3 (20.0)
G	16 (9.2)	5 (10.0)	6 (10.7)	2 (6.7)	0	3 (13.6)	1 (6.7)
H	5 (2.9)	4 (8.0)	1 (1.8)	0	0	0	0
I	3 (1.7)	0	0	2 (6.7)	0	1 (4.5)	0
J	31 (17.8)	8 (16.0)	8 (14.3)	5 (16.7)	2 (12.5)	8 (36.4)	3 (20.0)
K	14 (8.0)	8 (16.0)	4 (7.1)	2 (6.7)	0	0	2 (13.3)
M	4 (2.3)	0	0	1 (3.3)	2 (12.5)	1 (4.5)	0
總計	174 (100)	50 (100)	56 (100)	30 (100)	16 (100)	22 (100)	15 (100)

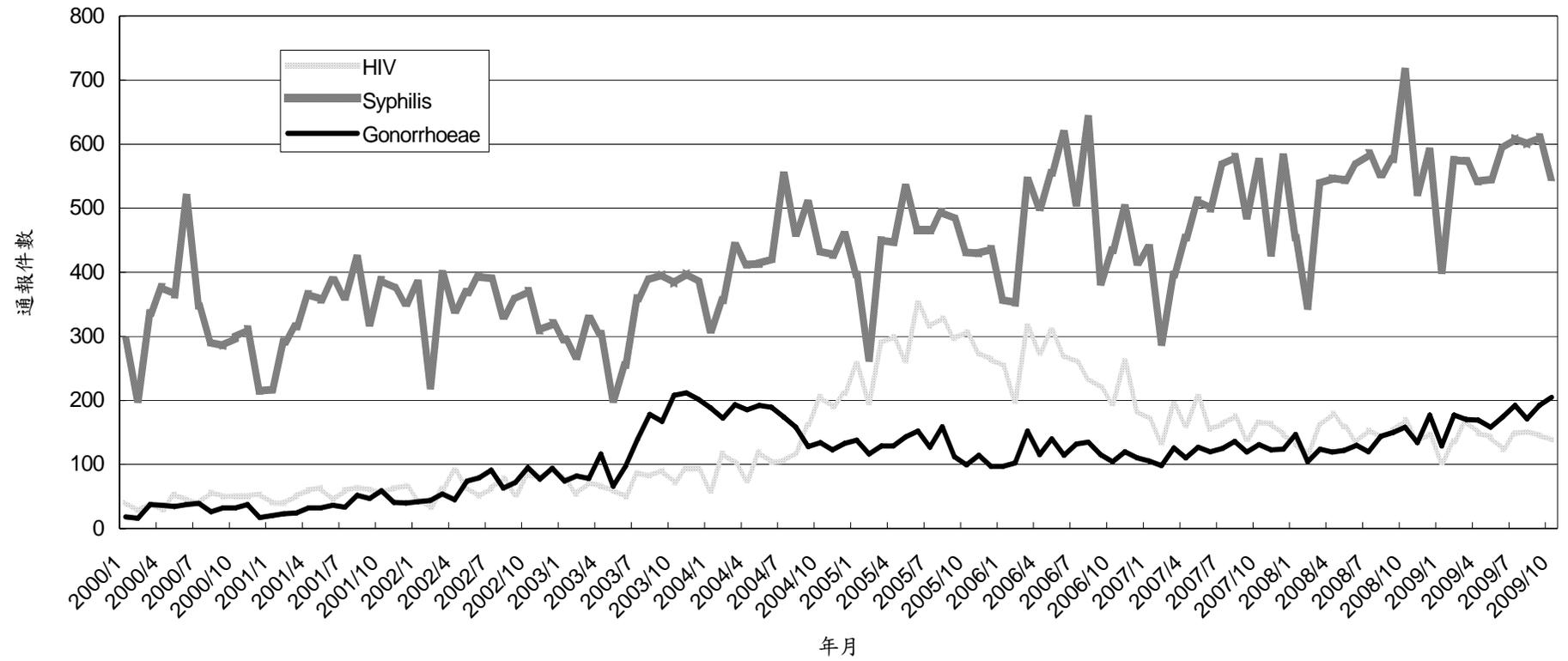
<sup>a</sup>有 4 名病人得到混合型，分別為 K/E、D/F(2 件)與 D/E 等共三種混合的基因型。

表七、以 ABBOTT m2000rt 即時定量聚合酶鏈式反應方法檢測

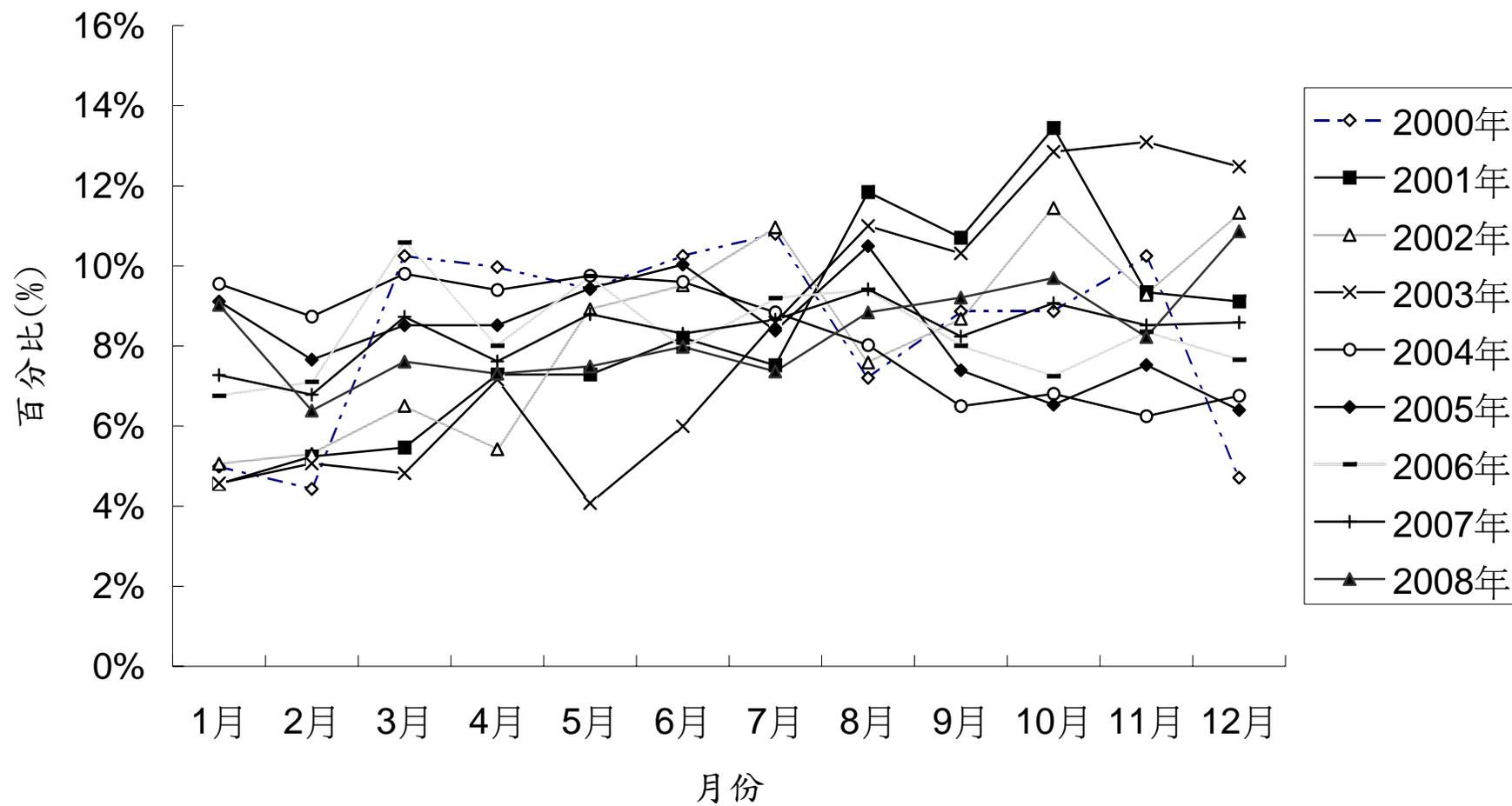
*C. trachomatis* 及 *N. gonorrhoeae*

醫院區域	檢體件數	<i>C. trachomatis</i> 陽性件數	<i>N. gonorrhoeae</i> 陽性件數
北部	223	8 (3.43 %)	1 (0.43 %)
中部	123	5 (4.07 %)	1 (0.81 %)
南部	460	26 (5.65 %)	0
東部	1	0	0
總計	817	39 (4.77 %)	2 (0.24 %)

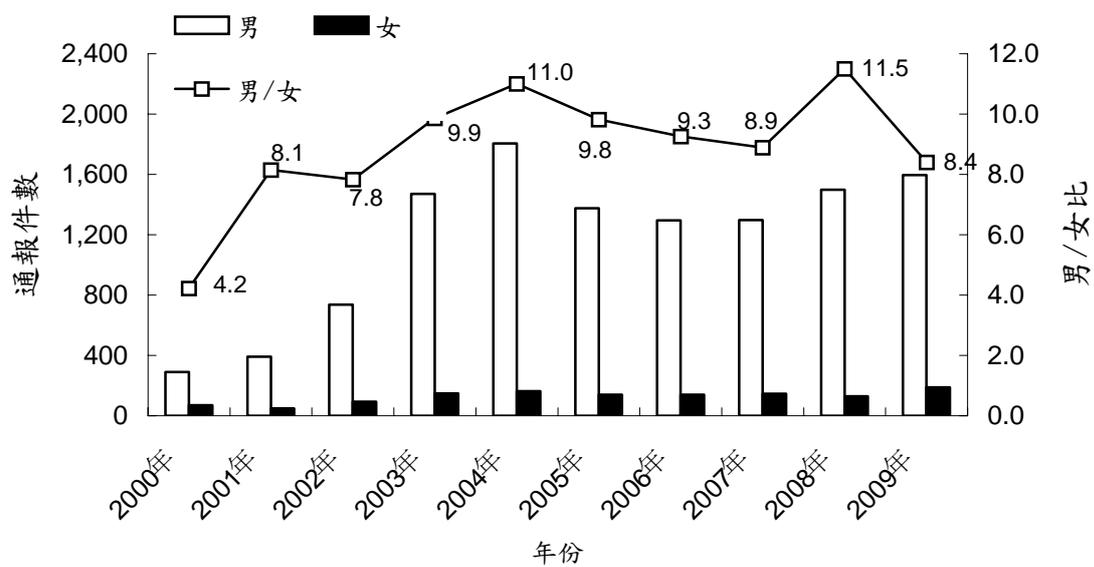
圖一、2000-2009 年淋病、HIV 及梅毒通報病例統計



圖二、2000-2008 年淋病通報月份分佈比例趨勢

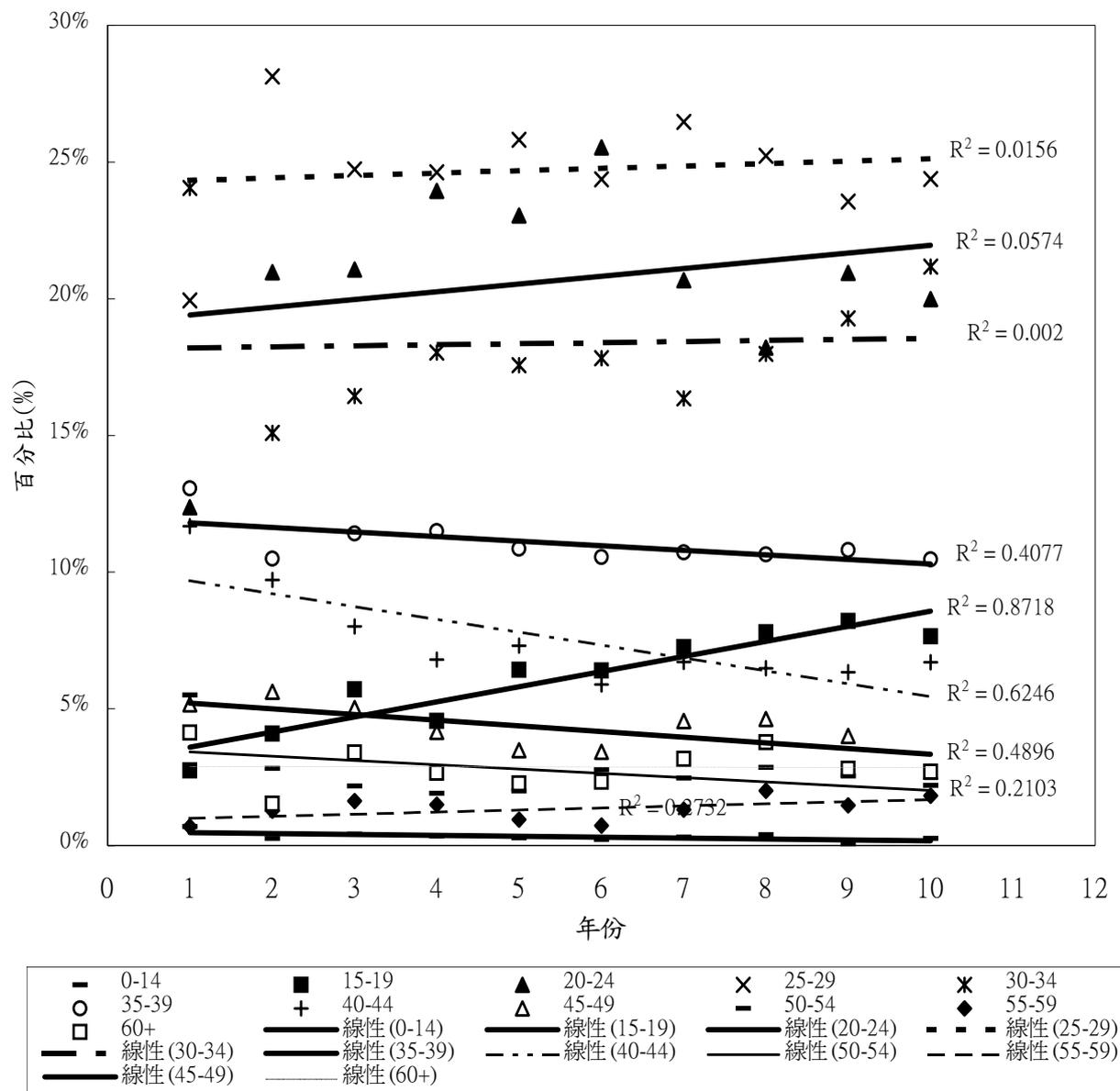


圖三、2000~2009 年台灣淋病通報病例男女分佈及性別比

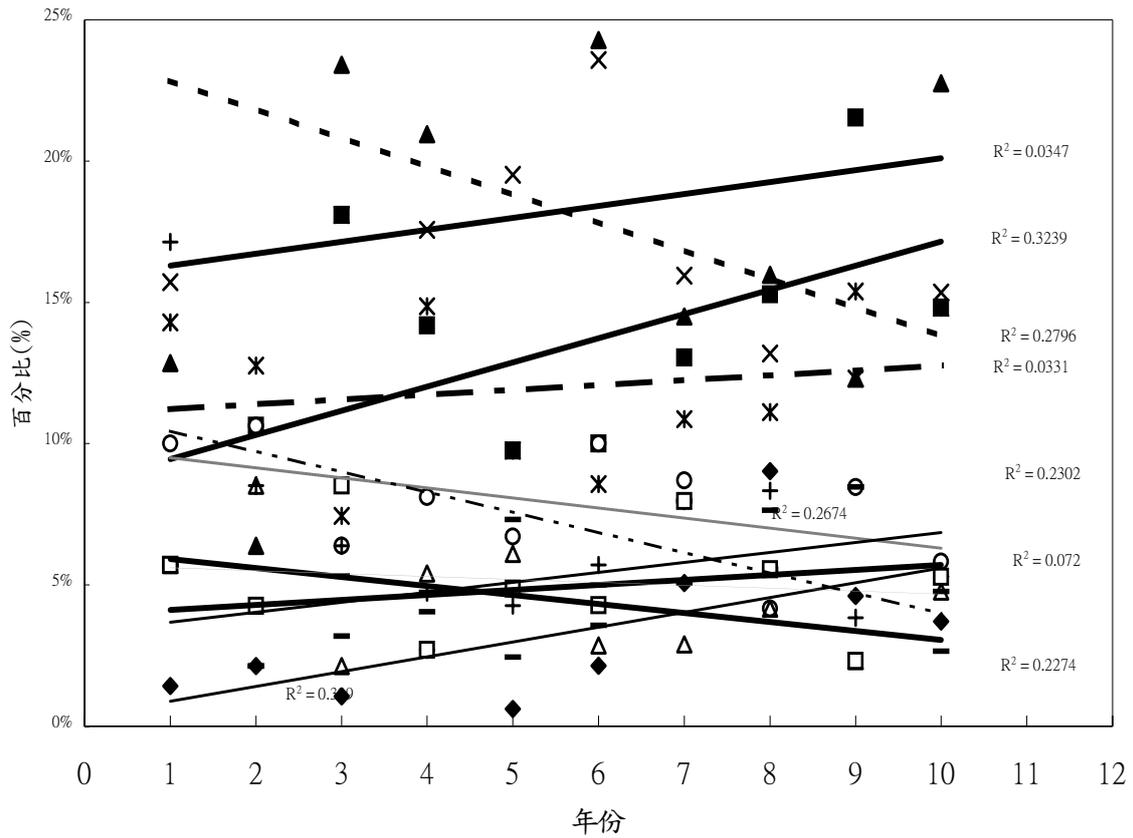


圖四、2000-2009 年淋菌病例各年齡層病例分佈趨勢 A. 男性與 B. 女性年齡層分佈

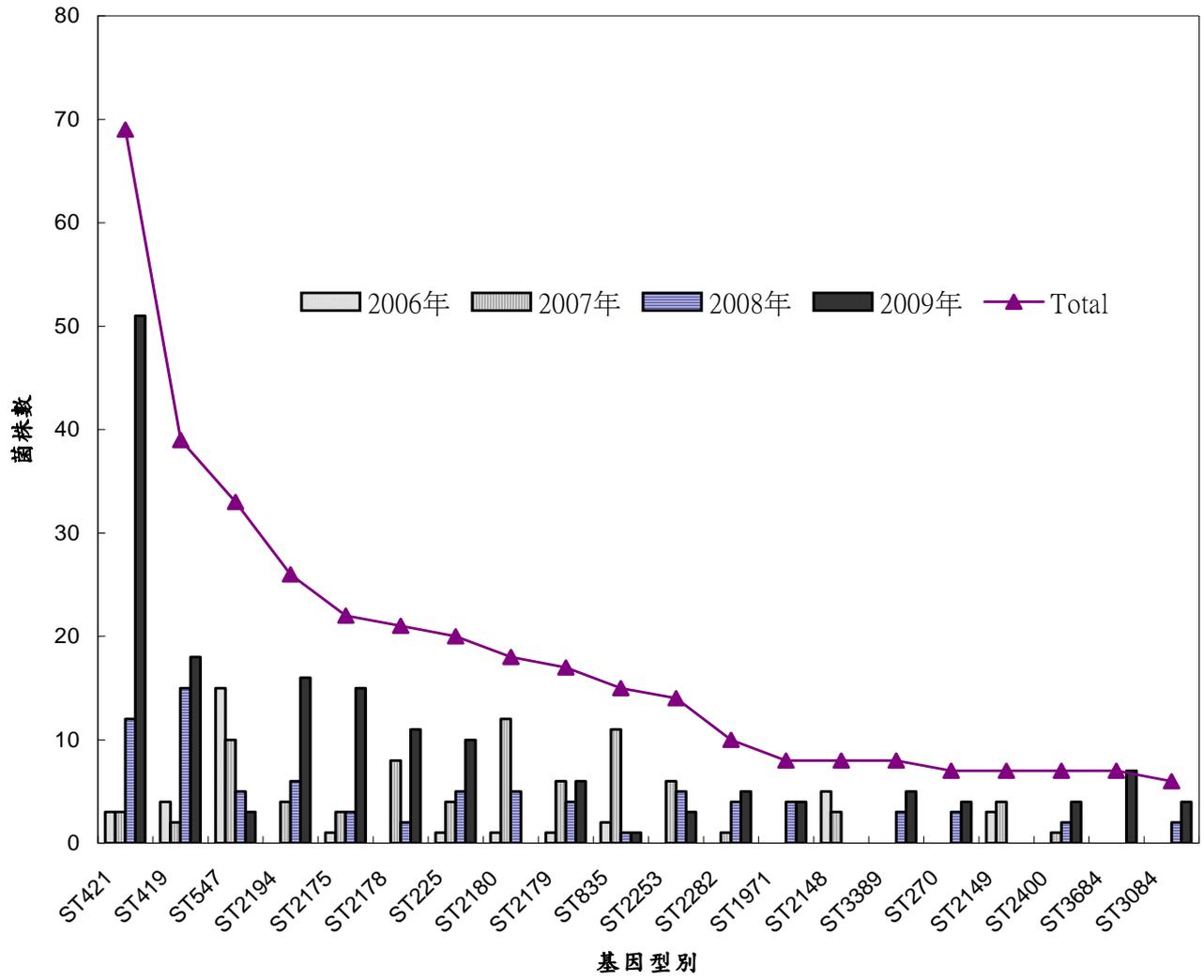
A. 男性



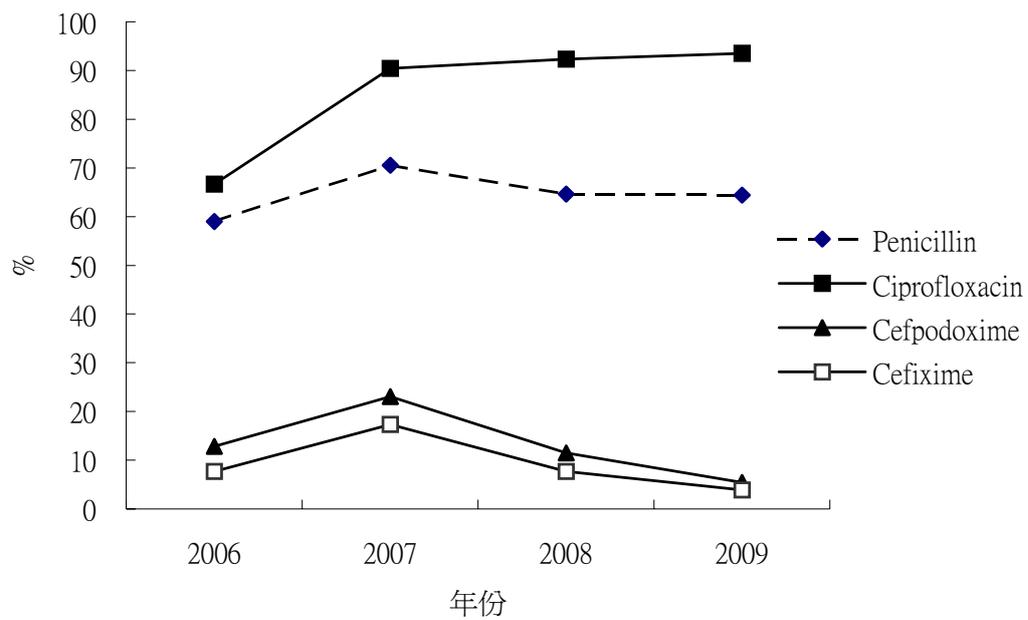
## B.女性



圖五、淋菌各型別的盛行率



圖六、歷年(2006-2009)抗藥性趨勢



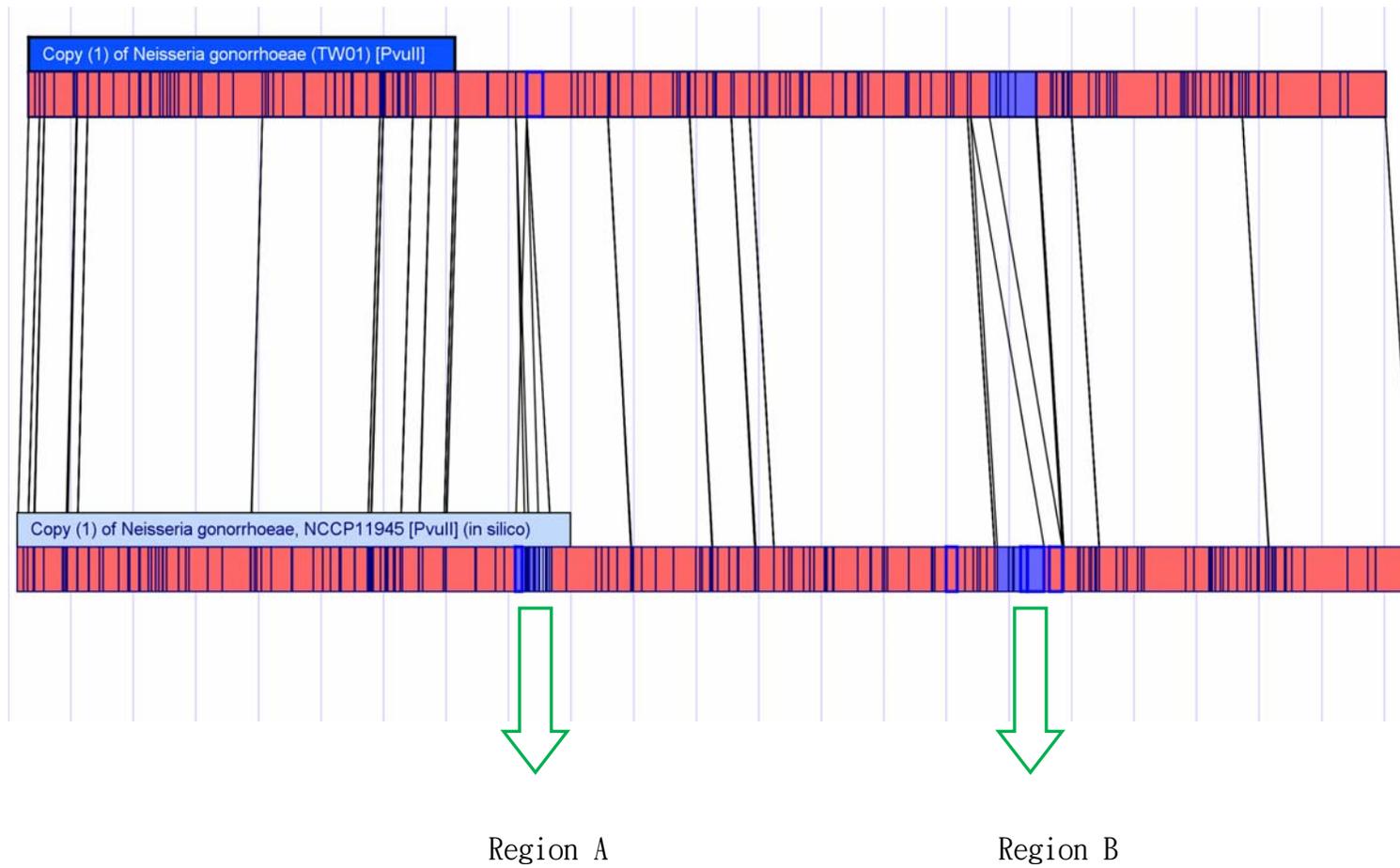
圖七、淋菌主要抗藥型別胺基酸分析

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
<b>ST3084</b>	LKGGFGTIRA	GSLNSPLKNT	KDNVNAWESG	KFTGNVLEIS	GMAKREHRYL	SVRYDSPEFA	GFSGSVQYAP	KDNSGSNGES	YHVGLNYQNS
<b>ST835</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>ST2253</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>ST2180</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>ST3080</b>	.....	.....	GSK.....	.Y..EL....	K..E.....	.A.....	.....	.....	.....R.N

	100	110	120	130	140	150	160
<b>ST3084</b>	GFFAQYAGLF	QRYGEGTKKI	EYNNQTYTYS	IPGLFVEKLQ	VHRLVGGYDN	NALYVSVAAQ	QQDAKLYGTW RAN----
<b>ST835</b>	.....	.....	...D...~~.	.....	.....	.....	...SH--
<b>ST2253</b>	.....	.....	.....--.	.....	.....	.....	...SH--
<b>ST2180</b>	.....	.....	...D...---	.....	.....	.....	...SHN-
<b>ST3080</b>	.....	.....M	.G--YS.N--	..S.....	.....	.....E..	...SHNS

圖八、光學圖譜全基因體分析抗藥性菌株(TW01)與標準菌株(*Neisseria gonorrhoeae* NCCP11945)



## 九、誌謝：

本研究僅向參與監測之醫療院所，致以最大謝意。參與之醫療院所為：台北市立聯合醫院昆明院區、台南市立醫院、行政院國軍退除役官兵輔導委員會桃園榮民醫院、行政院國軍退除役官兵輔導委員會臺中榮民總醫院、行政院衛生署立竹東醫院、行政院衛生署立桃園醫院、行政院衛生署立臺北醫院、東元綜合醫院、財團法人天主教湖口仁慈醫院、財團法人台灣基督教長老教會馬偕紀念醫院、財團法人台灣基督教長老教會馬偕紀念醫院淡水分院財團法人台灣基督教長老教會新樓醫院麻豆分院、財團法人佛教慈濟綜合醫院大林分院、財團法人佛教慈濟綜合醫院台北分院、財團法人奇美醫院、財團法人奇美醫院柳營分院、財團法人長庚紀念醫院高雄分院、財團法人長庚紀念醫院基隆分院、財團法人徐元智先生醫藥基金會附設亞東紀念醫院、財團法人振興復健醫學中心、財團法人嘉義基督教醫院、高雄市立聯合醫院、國立臺灣大學醫學院附設醫院、國立臺灣大學醫學院附設醫院雲林分院、國軍新竹地區醫院、敏盛綜合醫院、童綜合醫療社團法人童綜合醫院、臺北市立聯合醫院仁愛院區、臺北縣立醫院、臺北醫學大學、壠新醫院。

## 十、附錄：本計畫產出著作發表成果

98 年(第二年)著作產出成果共有 SCI 論文三篇(一篇已發表，二篇投寄中)。

1. Chung-Ter Huang, Bor-Dong Chen, **Shu-Ying Li**\* (2008) Distribution of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic penicillin-binding protein 2 in Taiwan (in preparation).
2. Bor-Dong Chen, Chung-Ter Huang, **Shu-Ying Li**\* (2008) Epidemiology of gonorrhoea infection in Taiwan (submitting).
3. **Shu-Ying Li**\*, Wing-Wai Wong (2009) Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Taiwan. J. Form. Med. Associat. 108 (9) 681-682 (Invited News and Perspectives, Impact factor:0.640, Ranking General and Internal Medicine 83/107, 77.6%)

97 年(第一年)著作成果產出二篇 SCI 論文

1. Wing-Wai Wong, Chung-Ter Huang, Lan-Hui Li, Chien-Chou Chiang, Bor-Dong Chen, **Shu-Ying Li**\* (2008) Molecular Epidemiological Identification of *Neisseria gonorrhoeae* Clonal Clusters with Distinct Susceptibility Profiles Associated with Specific Groups at High Risk of Contracting Human Immunodeficiency Virus and Syphilis. J. Clin. Microbiol. 46(12) 3931-3934 (通訊作者, Impact factor:3.945, Ranking Microbiol. 18/91, 19.8%)(被引用 5 次).
2. Chung-Ter Huang, Wing-Wai Wong, Lan-Hui Li, Chien-Chou Chiang, Bor-Dong Chen, **Shu-Ying Li**\* (2008) Genotyping of *Chlamydia trachomatis* by Microsphere Suspension Array. J. Clin. Microbiol. 46(3)1126-1128 (Note, 通訊作者, Impact factor:3.945, Ranking Microbiol. 18/91, 19.8%)(被引用 2 次).