

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000301

行政院衛生署疾病管制局 103 年度科技研究發展計畫

分枝桿菌的快速檢測、抗藥機制及結核病流行病學整合研究

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：周如文

研究人員：黃偉倫、莊珮君、吳玫華、王亭方、高凌軍、陳冠福

執行期間：101年1月1日至103年11月15日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意\*

# 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、中英文摘要	(5)
貳、本文	
一、前言	(12)
二、材料與方法	(20)
三、結果	(26)
四、討論	(38)
五、結論與建議	(46)
六、計畫重要研究成果及具體建議	(49)
七、參考文獻	(52)
八、圖、表	

圖一	收案及檢體測試流程	(59)
圖二	Proportion of cases detected and reporting time of tests	(60)
圖三	各類事件基因型別比對結果	(61)
圖四	2005-2011 年各類事件通報數	(61)
圖五	各類事件基因型別比對結果	
圖六	2005-2011 年送驗菌株基因型別比對結果	(61)
圖七	基因型別相同個案之地區性分析	(62)
表一	740 multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates with single mutation at the <i>rpoB</i> gene and their rifabutin susceptibility	(63)
表二	Multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates with triple mutations, double mutations or deletion in the <i>rpoB</i> gene	(65)
表三	Results of <i>rpoB</i> and <i>rpoC</i> mutations of 17 multidrug-resistant tuberculosis outbreaks	(66)
表四	284 株多重抗藥性結核菌株 spoligotype 基因型分析	(67)
表五	北京與非北京株結核菌 INH 與 ETH 基因與藥物交互抗藥關聯性分析	(68)
表六	Characteristics of 188 enrolled cases and 38 Xpert MTB/RIF	

positive cases	(69)
表七 Results of Xpert MTB/RIF, smear, culture and identification of specimens from 188 enrolled cases	(72)
表八 Characteristics of enrolled cases from 3 clinical settings	(73)
表九 Characteristics of 836 MDR-TB cases, 2009-2014	(75)
表十 Genotypes of 836 MDR <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates including new and relapse cases, 2009-2014	(76)
表十一 Analysis of 291 clustered MDR <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates	(77)
表十二 Geographic distribution of 291 clustered MDR <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates	(78)

## 摘要

結核病是臺灣個案最多的傳染病也是公共衛生上嚴峻的挑戰，細菌學的研究檢驗為防治上重要關鍵之一。現有抗藥性分子檢驗運用於多重抗藥性(multidrug resistance, MDR)檢驗及結核病高危險族群的篩檢上，敏感度仍顯不足；而且已知治療藥物有交互抗藥的現象。因此，需逐步探討未明的抗藥機制及作用，藉以發展結核病防治新工具。再者，臺灣的結核病檢驗架構上，需評估及引用世界衛生組織(World Health Organization, WHO)建議的檢驗方法，供疑似結核病個案的快速檢驗。此外，藉由分子分型技術及流行病學資料分析多重抗藥結核菌基因型與結核病的傳播模式之關連性。

**計畫目的：**子計畫一，藉由結核菌抗藥相關基因等分析，進而探討如抗藥基因的突變位點與交互抗藥的關連性；子計畫二，以 Xpert MTB/RIF 商用試劑在實驗室資源不足地區及一般醫院，進行門診疑似肺結核病患被動臨床檢測及結核病盛行區之主動篩檢，以評估快速檢測之適用性；子計畫三，進行臺灣地區疑似結核病群聚事件，菌株基因比對結果的統計及疫調分析。另利用基因分型探討多重抗藥結核菌株特性及叢群情況，藉以瞭解可能的傳播模式。

**實驗方法：**包含個案檢體檢測、菌株核酸鑑定、抗藥基因分析、以基因體學分析抗藥機制；臨床檢體試驗、病人基本及細菌學資料收集等；菌株基因分型、查詢本局中央傳染病系統平台等資料，進行實驗室基因資料庫交叉比對。

**實驗結果：**子計畫一，(1)分析 800 株 MDR 結核菌株，發現有 104 (13%) 株為 rifabutin (RBT) 敏感菌株，rifampicin (RMP) 及 RBT 的交叉抗藥性為 87%。由 *rpoB* 抗藥基因定序結果得知，740 (92.5%) 株具單一突變、40 株有雙重突變、1 株有三重突變、6 株有 deletion，但仍有 13 株未偵測到任何變異。初步結果發現，所有 codons 146、513、531 以及部分 codon 526 的突變(如：CAC 變成 CGC, TAC, GAC, CAA, CCC)，會造成 RMP 及 RBT 同時產生抗藥性。相關資料可提供發展快速分子第一、二類藥物抗藥性檢測方法的設計參

考。(2)為瞭解補償性抗藥基因突變與菌株傳播的關聯性，亦分析 17 件群聚事件的 63 株 MDR 菌株及非群聚事件的 56 株代表性菌株在 *rpoA* 及 *rpoC* 基因變異的情形，群聚菌株未發現 *rpoA* 有突變但 3 非群聚菌株同時有 *ropB* S531L 及 *rpoA* 突變；但 90.4% 有 *rpoB* S531L 突變的群聚菌株在 *rpoC* 上則有數個 codons 會發生 nonsynonymous 突變。此外，非群聚菌株中 71.4% 發生 *rpoB* S531L 突變，其中有 43.3% 同時有 *rpoC* 突變 ( $p=0.0027$ )。在 *rpoC* codons 172, 433, 483 及 491 發現共通的可能補償性突變。(3) 進行 INH 及 ETH 抗藥菌株的基因突變特性分析初步發現，具 INH 高濃度抗藥的 Beijing lineage 結核菌，ETH 交互抗藥性與 *inhA* C-15T 位點的突變有顯著的相關性；而與 INH 高濃度抗藥相關的 *katG* S315T 突變，發現 ETH 抗藥性與 *katG* S315T 位點的突變，無論是與 Beijing 及 non-Beijing lineages 皆具有顯著的相關性。然而對 INH 低濃度抗藥時，ETH 抗藥性與 *inhA* C-15T 位點的突變則沒有相關性。然而，無論是對 INH 高濃度與低濃度抗藥的 non-Beijing lineage MDR 菌株中，ETH 抗藥性與 *inhA* C-15T 位點的突變皆具有顯著的相關性。子計畫二，利用 Xpert MTB/RIF 進行(1)被動個案發現部分，無結核病實驗室之埔里醫院共分析 188 名 X 光異常疑似個案，38 (20.2%) 案的痰檢體判定為結核菌陽性，其中 1 案對 RMP 具抗藥性。具結核病實驗室的其他 3 家醫院，共收 312 名臨床疑似個案中，54 (17.3%) 案的痰檢體判定為結核菌陽性，其中 5 案對 RMP 具抗藥性。(2)社區主動篩檢部分，進行(多重)結核病高盛行秀林鄉和中村主動篩檢，輔助 X 光巡檢，共完成 311 例，僅檢出 1 名本已具症狀之陽性 TB 個案。計畫三，(1) 2006-2011 年疑似結核病群聚事件計有 369 件群聚事件，1,492 名個案送驗結核菌株。送驗年度以 2010 年最多占 336 名(23.3%)，次為 2009 年 260 名(18.0%)；區域以北部送驗 741 名(49.7%)佔最多數，其次為南區 344 名(23.1%)；類別以安養護教中心共 604 名(41.9%)最多，次為醫院 275 名(19.1%)。369 件送驗群聚事件中，分子分型型別比對結果：相同者有 131 (35.5%) 件、不同者有 219 (59.4%) 件、無法比對者有 19 (5.2%) 件；以家庭類別相同者比例最高共 69.6%、次為學校 48.3%；分子分型基因型別比對結果相同比例呈現逐年減少趨勢；確定群聚病例其感染結菌株的抗藥性情形，已有登錄的一線藥物敏感試驗結果進行分析發現，對 INH 抗藥占 16.0%；造成臺灣地區結核病群聚事件的主

要結核菌株的型別為 BEIJING (47.7%)、Haarlem (20.1%)及 T(8.1%)。(2) 子計畫三，分析 2009 至 2014 年 MDR 結核病共計 836 人，含新個案 610 人及在治療個案 226 人。此 836 人中已完成 697 (83.4%)人菌株的基因分型。研究結果發現，291 (41.8%) 人可歸屬於 80 個叢群(clusters)；進一步將此 80 個基因型與 2008 至 2014 年群聚送驗菌株比對後，發現有 64 (80.0%)個為單純的 MDR 叢群，顯示 MDR 傳播的基因型似乎有別於一般的結核病群聚事件。結果亦發現，東部持續存在有特定 MDR clusters (C00041、C00009)，而在南區也有 2 個大型的 MDR 叢群(C00017、C00042) 存在。在北區與中區也有 7 個中型 (包含 4 至 8 名個案) 的 MDR 叢群存在。另也發現有 31 個小型 (包含 2 至 3 名個案) 的 MDR 叢群存在。此外，亦發現 2 個 XDR 叢群。已逐批將菌株基因型結果納入個案管理系統。

**結論與建議：**子計畫一， GenoType MTBDR*plus* 試劑除了可以用於 INH 及 RMP 抗藥性的檢測外，亦可同步用於判定 RBT 的敏感性。因此，由現行運用的分子檢驗可以快速鑑定結核菌及判定 RMP 及 RBT 的抗藥性，縮短正確用藥的等待時程，盼有助於提升治癒率。高比例的非群聚菌株在 *rpoC* 上發生突變是否與未來可能產生的群聚相關值得注意，建議加強監測此類菌株感染者之接觸者。初步實驗結果顯示 Beijing 與 non-Beijing lineage 在造成 INH 抗藥機制上可能有所不同。查尚無相關文獻佐證，擬進行 ETH 抗藥基因機制的探討。建議(1)相關基因資料亦可以提供檢驗試劑、藥物及疫苗開發時設計之參考依據，以促進生物科技產業發展。(2)目前約有 60-75% MDR-TB 為新案，藉由更細部的 MDR 優勢菌株的基因特性分析，可引導接觸者及群聚事件調查，進行更有效性防治。子計畫二，Xpert MTB/RIF 檢測方法該試劑由 WHO 推薦並已獲得衛生福利部的 IVD，對抗酸菌陽性個案及/或有結核病接觸史及 X 光異常具臨床症狀者的疑似結核病個案的早期診斷成效佳。建議可推薦為分子快速結核病診斷方法之一，可考慮納入臨床檢驗流程。子計畫三，藉由疑似群聚事件送驗結果綜合分析，提供國內結核病疑似群聚事件送驗之最終確認比率，並比較國內外不同族群之結核病群聚發生與送驗現況。相關成果期能在防疫資源有限情況下，提供作為爾後防疫政策擬定最適妥及最

有效益之人力、財力及物力分配參考。亦宜改善現有基因分型量能，發展簡易分型平台方法，進行更大規模的結核病群組之比對，才能確定感染源及傳播途徑，而非個案僅是隨機盛行菌株的感染。針對 MDR 菌株基因型有必要進行持續性時間及空間的監測，並將監測結果轉知權責組與疫調單位，並持續將結果納入結核病管理系統，搭配地理資訊系統以監測叢聚菌株的變化及確認未察覺的群聚事件，以積極防止 MDR 的可能傳播。

關鍵字：結核病、結核菌、抗藥性、分子流行病學



## Abstract

**Aim:** Tuberculosis remains a leading notifiable infectious disease in Taiwan.

Drug-resistant TB, especially multiple-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB), cause complex implications for TB control. Bacteriological diagnosis and research are important for improving the TB control strategies. In this study, we aim to find novel mechanisms of drug resistance, to evaluate a molecular rapid test, and to investigate genetic characteristics of MDR *Mycobacterium tuberculosis* and associations with MDR-TB transmission.

**Methods:** We performed conventional drug susceptibility testing on the first and second-line drugs, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *inhA* and *katG* drug-resistance genes sequencing and the Genotype MTBDR*plus* test for MDR *M. tuberculosis* isolates. The performance of the Xpert MTB/RIF test was evaluated in clinical settings and a high TB incidence region. The test was parallelly compared with routine smear, culture, identification and drug susceptibility testing. We carried out genotyping and clustering analyses for MDR *M. tuberculosis* isolated from cases reported during 2009-2014. A cluster was defined as at least 2 isolates having identical RFLP patterns and confirmed epidemiological links. Statistical analyses were performed using the Fisher's exact test.

**Results:** Subproject 1, we conducted a population-based analysis of 800 MDR *M. tuberculosis* isolates. Predominant *rpoB* mutations confer RMP resistance were at codon 531 TCG/TTG, 526 CAC/TAC and 526 CAC/GAC. We found that the cross-resistant rate between RBT and RMP was 87.0%. Of the 800 isolates, 740 (92.5%) had single mutation, 40 (5.0%) had double mutations, one had triple mutations, six had deletion, and 13 (1.6%) showed wild-type. Among isolates with single mutation in the *rpoB* gene, mutations at codons 143, 511, 516, 522 and 529 were only in RBT-susceptible ones. Interestingly, isolates with amino acid

substitution at codon 526 (H to C, L, T, N) were susceptible to RFB, while others (H to R, Y, D, Q, P) were resistant. Consequently, specific mutations of the *rpoB* gene might be used to predict drug-drug interaction to other anti-TB drugs. We observed *rpoC* compensatory mutations in 16 MDR outbreaks. We also analyzed 284 MDR *M. tuberculosis* isolates including 133 (46.8%) Beijing family and 151 (53.2%) non-Beijing genotype isolates. Of the 133 Beijing isolates, 71.4 % (95/133) of isolates were resistant to high-level isoniazid (INH), and 45.1% (60/133) of isolates were resistant to ethionamide (ETH). Non-Beijing isolates showed high- and low-level resistance to INH were respectively resistant to ETH with *inhA* C-15T ( $P < 0.005$ ) and *katG* S315T ( $P < 0.001$ ) mutations. Beijing isolates showed high-level resistance to INH were resistant to ETH with *inhA* C-15T ( $P < 0.05$ ) mutation. Beijing isolates showed low-level resistance to INH, both *inhA* C-15T ( $p = 0.492$ ) and *katG* S315T ( $P = 0.276$ ) mutations were not associated with ETH resistance. Subproject 2, a total of 500 patients was enrolled in passive case finding. Sputum specimens were collected for assessing performances of the Xpert MTB/RIF assay in outpatient services. 92 (18.4%) cases were confirmed TB cases including 6 RMP-resistant cases. For active case screening, of the 311 cases tested, only one positive TB case with clinical symptoms was found in a high MDR-TB incidence area. Subproject 3, we analyzed 369 suspected TB outbreaks involving 1,492 cases. Most of the cases were from northern (49.7%) Taiwan and majority of cases were reported from health care facilities (41.9%) and hospitals (19.1%). Of the 1,492 *M. tuberculosis* isolates with genotyping results, 35.5% had identical genotypes, 59.4% had different genotypes and 5.2% were undetermined. Clusters were found in 69.6% family and 48.3% school suspected episodes. Concordant results between genotyping and cluster identification in the EIRFMS system. Ratio of identical genotypes decreased over the years. Predominant genotypes of *M. tuberculosis* in the clustered episodes were BEIJING (47.7%), Haarlem (20.1%) and T (8.1%). We further analyzed *M. tuberculosis* isolates of 836 MDR-TB cases, including 610 new cases and 226 retreated cases from 2009 to 2014. Of the 836 MDR isolates, 697 (83.4%) were

genotyped. Results showed that 291 (41.8%) MDR cases were in 80 clusters. After comparing with outbreak strains collected from 2008 to 2014, 64 clusters were only found in MDR cases. The result suggested that strains caused MDR clustering may not be the same as those among non-MDR outbreak strains. We observed two major MDR clusters occurred continuingly in eastern Taiwan, while two large MDR clusters found in southern Taiwan. Besides, two XDR clusters were also identified.

**Conclusions and suggestions:** Subproject 1: The Genotype MTBDR*plus* test can be used not only for detecting isoniazid and RMP resistance but also RBT sensitive isolates for facilitating MDR-TB treatment. In addition, *rpoC* compensatory mutations might be useful for predicting MDR-TB transmission. Both *inhA* C-15T and *katG* S315T gene mutations could be used to predict cross resistance between INH and ETH among non-Beijing genotype MDR *M. tuberculosis* isolates. Only the *inhA* C-15T mutation could predict ETH resistance among Beijing genotype MDR isolates. Subproject 2: The Xpert MTB/RIF assay can be adopted in early TB diagnosis for patients with abnormal X-ray in outpatient services. However, a modified operation protocol is needed to resolve improper specimen collection and limitation of case selection in active case finding. Subproject 3 : Most of the clusters were notified from families, health care facilities and schools. Enhanced health management, early diagnosis, preventive therapy, infectious control were effective components for preventing tuberculosis outbreaks. Molecular epidemiological surveillance of MDR strains is needed to understand the distribution and dynamics of MDR strains and to cease the transmission.

**Keywords :** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Drug-resistance, Molecular epidemiology

## 貳、本文

### 一、前言

#### 臺灣結核病流行現況

結核病是古老的傳染病，主要是個人經由飛沫感染結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis complex*)後所致。雖然大多造成潛伏性感染，但是感染者一生當中仍有約 5-10%的機率，因為免疫系統無法有效阻止細菌增殖或殺死細菌等因素而發病。目前，結核病仍然是成年人因為感染症死亡的主因，依據世界衛生組織(World Health Organization, WHO) 2014 年年報，2013 年全球約有 9 百萬新結核病例，每年死亡人數為 150 萬【1】。臺灣地區施行結核病防治已經超過五十年，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 2013 年資料顯示，臺灣有 11,528 件確診的新結核病個案，發生率為每十萬人中有 49.4 例個案【2】。由於結核病在我國仍是一項急待解決的公共衛生問題，疾病管制局(疾管局)執行行政院 95 年 7 月 7 日院臺衛字第 0950031290 號函核定之「結核病十年減半計畫」，經過 2005-2012 發生率下降 25.1%。

#### 結核病的抗藥性及抗藥機制

多重抗藥性結核病(multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB)個案的定義為個案的結核菌株至少對 isoniazid (INH)及 rifampicin (RMP)藥物產生抗藥；超級抗藥結核病(extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)則是 MDR-TB 個案的結核菌株對任一 fluoroquinolone 類藥物及至少一種針劑類(capreomycin (CM), kanamycin (KM) and amikacin (AM))藥物產生抗藥。WHO 的資料顯示，2013 年全球 MDR-TB 新案人數達 300,000，而 2013 年佔所有新結核病患的 3.5%及再治療個案的 20.5%。此外，MDR-TB 中約有 9.0% 是 XDR-TB 個案【1】。臺灣 2012 及 2013 年各通報 140 及 129 位新診斷的 MDR-TB 個案，其中約 50%為再治療個案。疾管局為照護此些特定病患，自 2007 年起設置「MDR 醫

療照護體系(Taiwan MDR-TB Consortium, TMTC)」。在 MDR-TB 的病患，然而，早期診斷與即時治療卻是防治體系中，「Find TB」及「Cure TB」重要環節。有鑑於此，疑似個案臨床檢體快速判定及其抗藥性檢測的甚為重要。再者，目前僅對 RMP 及 OFX 有相對可靠的檢測方法，許多抗結核藥物的致病機制仍未解。

本計畫的子計畫一，將嘗試研究尚未被確認的可能抗藥性新機制。其實，結核菌的抗藥性由自發性的染色體突變(spontaneous chromosomal mutations)而造成的頻率較低( $10^{-6}$  至  $10^{-8}$ )；而且，結核菌缺少會造成多數細菌產生抗藥性的移動性基因元素(mobile genetic elements)，例如 plasmid 及 transposons。因此，基因同時突變導因於複合治療(combination therapy)上，最常使用的 3 種不同藥物的機率降為  $10^{-18}$  至  $10^{-20}$ ，理論上機幾乎不可能發生。於是，臨床上抗藥性結核菌的基因變化，主要導因為藥物供應不足、醫師處方錯誤及服藥順從性不佳等人為因素【3】。目前，部分一線及二線抗結核藥物的分子機轉以被澄清，但是仍不夠完整。MDR/XDR-TB 的 phenotype 則是因為連續累積不同藥物的不同基因所致【4】。下列表格呈現藥物與抗藥基因的對應及突變百分比。由於相對應的頻率有一定的落差，可見仍有特定的抗藥性機制尚待發現。

藥物	抗藥基因	基因功能	發生頻率(%)
Rifampin (RMF)	<i>rpoB</i>	$\beta$ -subunit of RNA polymerase	95
Isoniazid (INH)	<i>katG</i>	catalase/peroxidase	50 - 95
	<i>inhA</i>	enoyl reductase	8 - 43
	<i>ahpC</i>	alkylhydroperoxide reductase	10
Pyrazinamide (PZA)	<i>pncA</i>	pyrazinamidase/nicotinamidase	72 - 97
Ethambutol (EMB)	<i>embB</i>	<i>embCAB</i> operon: arabinosyl transferase	47 - 65
	<i>embA</i>		
	<i>embC</i>		
Streptomycin (SM)	<i>rpsL</i>	S12 ribosomal protein	52 - 59
	<i>rrs</i>	16S rRNA	8-21
	<i>gidB</i>	rRNA methyltransferase	?
Fluoroquinolones (FQs)	<i>gyrA/gyrB</i>	DNA gyrase	75 - 94
Kanamycin (KM)	<i>rrs</i>	16S rRNA	76
	<i>eis</i>	acetyltransferase	15 - 25
Amikacin (AM)	<i>rrs</i>	16S rRNA	76
Capreomycin (CAP)	<i>tlyA</i>	2'-O-methyltransferase	?

摘要介紹各抗結核藥物抗藥性機制特性:

(1) INH: 結核菌對 INH 高度敏感(MIC 0.02-0.2 $\mu$ g/ml), 並只對生長(growing)中的結核菌有效。除了已確定與抗藥相關的 *katG* 【5】及 *inhA* 【6】基因外, 近來研究初步發現與 DNA 合成有關的 DfrA 蛋白質係 NADPH-dependent dihydrofolate reductase, 以及與 mycothiol 生合成相關的 *mshA* 基因發生突變, 亦與可能與 INH 抗藥有關, 但仍待證明 【7】。由於 INH 與 ethionamide 有高度的交互抗藥性(cross resistance), 為利 MDR 個案的治療, 須由發生突變的特定基因(如 *inhA*)探討抗藥的機制 【8, 9】。

(2) RMP:具殺菌作用。其 MIC 在液態及 agar 培養基為 0.05-1 $\mu$ g/ml, 而在含蛋培養基則為 2.5-10 $\mu$ g/ml, 對生長(growing)中及靜止狀態(stationary phase)的結核菌皆有殺菌效果。因此, 在縮短治療期程上扮演關鍵性角色。已確定與 *rpoB* 基因, 約有 96% 抗藥相關性 【10】: *rpoB* 的突變與 high-level RMP 抗藥有關並與其他 rifamycins 有交差抗藥性(cross-resistance), 但是特定的突變與 low-level RMP 及 rifapentine 抗藥有關, 但在 rifabutin 及 rifalazil 藥物, 則為敏感 【11】。此外, 由於有 RMP-dependent 結核菌在 MDR-TB 及再治療個案中被發現, 因此需進一步瞭解此些 RMP-dependent 結核菌與治療失敗的關連性。(3) PZA:對在酸性環境下的 persister 結核菌具殺菌效果, 可縮短療程 【12】。MIC 為 6.25-50 $\mu$ g/ml, PZA 的低氧、無氧或弱酸性環境及有 energy inhibitors (DCCD、azide 及 rotenone)存在下, 活性會增強 【13, 14】。PZA 是 prodrug 需藉由 *pncA* 基因 encoded pyrazinamidase/nicotinamidase 轉化成 pyrazinonic acid (POA) 【15】, POA 在胞內形成後, 以 passive diffusion 及 defective efflux 方式送達細胞表面 【16】, 影響 membrane transport, 而 Fas-I 被認為是可能的 PZA 作用標的, 但未被確認 【17】。*pncA* 基因突變與 PZA 抗藥相關(72-97%), 突變十分多元且廣為分佈 【18】, 但大致上聚集在 PncA 3-17, 61-85 及 132-142 【19】。已知有些 high level PZA 抗藥菌並不具備 pyrazinamidase 活性, 可能是仍有一 undefined *pncA* regulatory 基因發生突變。*Mycobacterium bovis* 及 *Mycobacterium bovis*-BCG 對 PZA 具先天的抗藥性, 在 *pncA* 有特定的點突變(point mutation)。然而, pyrazinamidase 活性與 PZA 的 susceptibility 的關連性並不適用於先天的 PZA 抗藥結核菌; 反而可能是因為高度活化的 POA efflux 所致 【16】。新近研究證明 PZA 的殺菌作用與 ribosomal protein S1 相關, 但是仍然相信有更多的作用標的待發現。(4) EMB:此藥物與 INH、RMP 及 PZA 併用, 以防抗藥性的產生。MIC 為 0.5-2 $\mu$ g/ml, 具抑菌(bacteriostatic)功效, 只對生長(growing)中的結核菌有效,

作用在細胞壁 arabinogalactan 的生合成【20】。已知相關基因為 *embB* (encoded arabinosyl transferase)、*embA* 與 *embC*，3 個基因組成一 operon *embCAB*。一般認為 *embB* 突變與 68% EMB 抗藥相關，極少數與 *embC* 突變相關；但是，也有報導認為 *embB* 突變與 EMB 抗藥無關，卻與結核菌後續變成其它抗藥(含 MDR-TB)有關【31】。重要的是大約有 35% 的 EMB 抗藥菌株沒有 *embB* 突變，可見仍有其它機制扮演重要角色【22】。子計畫一的第一年，將分析 RMP 抗藥/rifabutin 敏感菌株的基因突變特性。

### 臺灣結核病的快速檢驗

子計畫二 將評估新結核病快速檢測方法及其運用效益。WHO 認為全世界結核病的實驗室診斷尚存嚴重缺點，例如現行的檢驗方法需要數週才能得到最終的結果，這可能導致病人在此期間內，得不到治療或接受無效的治療。可能造成病人在社區內持續傳播結核病，並可能導致 MDR-TB 的發生。

液態培養系統的使用，大幅縮短結核菌培養的時間，並可後續藉由該系統進行藥物敏感性試驗，成為抗藥性結核菌株篩選確認的方法【23】。但是從培養陽性菌株導入此藥物試驗系統，至少仍需 7-10 天才能獲得抗藥試驗結果，因此直接由檢體進行快速分子試驗，是目前的趨勢【24, 25】。快速分子抗藥試驗方法是基於對 RMP 與 INH 抗藥機制的瞭解設計而成，如：針對 RMP 抗藥基因 *rpoB* 之 81-bp hot-spot 區域定序結果，有超過 95% 對 RMP 抗藥的菌株，於此區域皆會發生基因突變【26】。目前，針對 *rpoB* 基因發展商品化線性核酸探針技術(line-probe assay)試劑組有(INNO-LiPA Rif; Innogenetics N.V., Ghent, Belgium)及針對 *rpoB* 與 *katG* 基因之商品化試劑組 (Genotype MTBDR; Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)【24, 27, 28, 29, 30】，可直接檢測陽性結核菌株及痰抹片陽性檢體。新一代之試劑組 (Genotype®MTBDRplus) 也針對除 *katG* 基因以外之 *inhA*r 基因進行設計，試圖更廣泛偵測對 INH 抗藥基因位點【31】。參考在南非所進行的大規模評估報告【32】後，WHO 於 2008 年 6 月向各國推薦此項線性核酸探針技術。由於此項技術須先經過 PCR 並非全自動化，在最終呈色判定時，須由具相當經驗之操作人員判讀，因此僅侷限於各國參考實驗室應用，無法推廣於診

間進行 point-of-care 的直接診斷。

GeneXpert MTB/RIF 檢測方法是一項分子快速診斷技術，包含偵測平台及檢測所需塑膠卡匣。其原理係設計針對 *rpoB* 基因序列上，結核菌群之專一性序列及 RMP 抗藥基因 *rpoB* 之 81-bp hot-spot 區域對應探針，可同時檢測結核菌群存在與否和 RMP 抗藥性。該方法使用即時定量 PCR 系統，於可丟棄式塑膠卡匣內建置所有必須試劑，進行全自動化細菌溶解、核酸萃取、核酸複製及 PCR 產物偵測。操作簡便，只受過很少訓練的檢驗人員就可以操作。適合應用於第一線診斷處，如診所。唯一需要人為操作的步驟，僅在將殺菌液加入痰檢體內後，移入分析卡匣進行全自動分析，檢驗可以在 2 小時內完成結果報告，只要具備痰抹片顯微鏡檢查條件的實驗室就可以應用。就安全性而言，Xpert MTB/RIF 檢測過程中，並無感染性氣膠產生【33】。2008 年 7 月至 2009 年 3 月，分別在秘魯、亞塞拜然、南非及印度進行多個中心實驗室和國際多中心的評估【34】，共進行 1,730 個疑似抗藥性或 MDR-TB 的痰檢體檢測。結果顯示 Xpert MTB/RIF 檢測方法，(1)於第一套痰檢體中檢測抹片陽性培養陽性和抹片陰性培養陽性的敏感性，分別為 98.2%和 72.5%，專一性為 99.2%；(2)對抹片陰性培養陽性的病患，當加入第二套痰進行 Xpert MTB/RIF 檢測時，敏感性增加 12.6%；(3)甚至加入第三套痰時，合併對抹片陰性培養陽性隻偵測敏感度增加到 90.2%。相較於傳統藥物感受性試驗，Xpert MTB/RIF 對 RMP 抗藥的偵測敏感性和特異性分別為 97.6%和 98.1%。

這項技術對於提高結核病患者(尤其是對 RMP 抗藥結核病患者)的早期發現，以進行即時治療，將是革新性的實驗室診斷。WHO 於 2010 年 12 月向各國推薦 GeneXpert MTB/RIF 檢測技術，運用於在結核病防治計畫中，除了可以使結核病患者受益外，結核病防治工作中的相關策略(measures)也會伴隨此項快速檢測技術予以更新，如不同地區或不同人群的診斷流程、患者的定義及報告登記等。本子計畫將以我國山地鄉之高危險族群或未有認可實驗室的縣市為試驗範圍(如南投基督教醫院)，在實驗室資源不足區域，近行成效性先導評估。另外，有鑑於山地鄉之高危險族群的定期 X 光篩檢，難免有時間受限制及居民流動率高的問題，瞭解快速檢驗運用於主動篩檢之評估。針對疑似個案的進行結核病快速檢驗，同時以現行檢驗流程進行相互比較。評估全新的



檢測方法 Cepheid GeneXpert MTB/RIF 與現行的結核病傳統檢驗方法(如:抗酸菌塗片鏡檢及培養)進行診斷能力(performance)比較評估。

### 台灣結核病群聚事件調查

台灣每年新增約 13,000 名結核病患，防治工作受到開放觀光、外勞引進、國際往來頻繁，以及病程潛伏期長，病人發現及管理不易、多重抗藥性、愛滋病併發結核病例數急遽增加等因素影響，面臨了高度挑戰與嚴峻考驗。因此，台灣近年來結核病疫情防治工作更加艱難險峻，依本局「重要或群聚事件疫調報告平台」資料顯示，2006-2010 年間，2008 年通報及確認之聚集感染事件案例最多，及本局研究檢驗中心送驗資料顯示，近幾年來台灣地區通報與送驗疑似肺結核疑似聚集感染事件案例數逐年增多，有可能是因下列原因造成結核病患開放性感染傳播，而造成疑似聚集感染事件增多：(1) 罹患肺結核或喉部結核的病患延遲診斷或沒有被診斷出來。(2) 肺結核病人沒有合適的隔離。(3) 肺結核病人沒有接受適當的抗結核菌藥物治療。

由文獻可知，開發中國家或結核病高發生率（75-500 人/10<sup>6</sup> 人）地區之結核病流行或聚集事件發生，主要為社區內之交互感染或家庭聚集感染造成，並且與貧窮、飲酒及接觸頻率等相關【35,36】。而在先進國家或低發生率（<10 人/10<sup>6</sup> 人）地區，結核病聚集感染事件則大多發生在學校、療養院、監獄及避難所等人口密集區域【36,37,38】。另有研究顯示結核病接觸者之發病率（>700 人/10<sup>6</sup> 人）是一般族群的 100 倍【39】；而若家庭聚集感染事件之指標個案為痰陽之肺結核病患，則其家庭接觸者感染結核病之機會為痰陰者之 4-6 倍【35】；另醫療照護人員也被認為是感染結核病之高危險群【40】。此外，亦有學者認為先進國家結核病之再浮現，乃因大眾運輸交通發達，造成非預期性的接觸結核病患機會增加，而使得結核病快速散播。反觀國內結核病崛起的問題歸因於民眾普遍缺乏警覺、病人掌握不易、治療中斷的比例過高及多重抗藥問題日趨嚴重等，倘若政府衛生機關未能開創前瞻性介入作為與積極的防治政策，則結核病十年減半目標達成恐將遙遙無期。

子計畫三分析 2006 至 2010 年間，送驗疾病管制署分枝桿菌實驗室之疑似結核病群聚感染事件菌株比對結果，依事件發生地點為家庭、安養護教中心、醫院、學校、

監獄及其他（無法歸屬於前 5 類者）等 6 大類別，逐年比較各類別菌株基因型別比對結果之差異性，並與本署「重要或群聚事件疫調報告平台」通報事件平台等資料進行交叉比對，及進行國內外相關文獻探討，以瞭解國內外不同族群之結核病群聚感染發生情形與差異，提供不同類別之結核病疑似群聚事件採取介入預防措施建議。

### 臺灣結核病分子流行病學

結核菌分子分型的技術，包括 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)、spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)、mycobacterial interspersed repetitive units-variable numbers of tandem repeats (MIRU-VNTR) typing 等方法可用來分析結核菌的基因型別，目前已廣泛被應用於結核菌的基因型分析與流行病學的調查【41】。

利用 spoligotyping 基因分型的方法分析台灣 2003 至 2006 年的結核菌株，主要盛行之基因型依序為 Beijing (39.3%)、Haarlem (15.8%)、East-African-Indian (EAI) (11.2%)、ill-defined T (9.7%)、Latin American and Mediterranean (LAM) (1.2%) families。根據本實驗室 2004 年的研究，針對 421 株結核菌株發現 44.4% 為 Beijing family，同時合併抗藥性分析，發現 Beijing family 與 isoniazid 及 ethambutol 的抗藥性有顯著的相關性。同時並發現 Beijing family 在 24 歲以下及 65 歲以上的年齡層分布較多。推測 Beijing family 在台灣已存在許久，且仍在年輕族群中持續傳播【42】。

已知臺灣山地鄉結核病的感染率高於其他地區。為瞭解結核病盛行率最高的山地鄉-秀林鄉之分子流行病學，收集 2003 至 2004 年秀林鄉共計 138 株結核菌進行分析。在 138 株菌中，共可分為 27 種 spoligotype 基因型。其中，14 種 (51.9%) spoligotype 基因型可對應於國際 SpolDB4 資料庫，另 13 種為未曾被報導過的 spoligotypes 基因型。根據 spoligotype 及 RFLP 分析，13 種新的 spoligotypes 基因型 (命名為 TW1 至 13) 中，有 5 種 (TW6、7、8、12 及 13)，可歸類為 Haarlem-like spoligotype。因此整體而言，在秀林鄉主要盛行之結核菌株基因型為 Haarlem 及 Haarlem-like family (佔 39.1%)、Beijing family (佔 38.4%) 及 (LAM) 型 (佔 5.8%)。特別的是在秀林鄉未發現遠東亞洲地

區及臺灣盛行之 EAI family 【43】。因此由以上研究可發現，在臺灣不同的區域結核菌的基因型仍有地域上分布的差異。

根據文獻，可發現近年有顯著的研究是利用 single nucleotide polymorphism (SNP)、large sequence polymorphism (LSP)、whole genome sequencing 的方法，用以瞭解不同空間、不同時間、不同環境等差異下，結核菌株的基因特性與演化分析【44,45】。本實驗室亦利用基因定序的方法，進行 4 個細胞壁生物合成相關的基因-antigen 85 complex (*fbpA*, *fbpB*, *fbpC*) 及 mannosyltransferase (*pimB*) 序列分析。選取 70 株臺灣具代表性及基因型多樣性之結核菌株，包括屬於 EAI、Beijing、Central-Asian (CAS)、Bovis 及另一個包含 LAM、Haarlem 及 T family 的不同世系 (lineages)。結果發現 12 個新的 SNPs，並用於演化樹分析。利用這些新發現的 SNPs 所建立的演化樹結果，可明確的將結核菌主要世系鑑別分群。此外也證明於國際 SpolDB4 資料庫中尚未被歸類的 spoligotype 基因型 ST523，應屬於 early ancestral Beijing 次世系 (sublineage)。這些新發現的世系專一性 SNPs 將是結核菌的分子流行病學及演化研究重要的基因標誌【46】。根據文獻，在越南、南非、前蘇聯等國家發現多重抗藥結核菌與 Beijing family 具有顯著的相關性【47,48,49】。文獻指出，推測 Beijing family 具有較強的毒性(virulence)可能與其傳播力較強有關【50】。然不同的研究亦顯示高發生率地區或低發生率地區抗藥性結核菌的傳播模式亦不盡相同【51-57】。多重抗藥性的產生除了與抗藥相關基因突變的 fitness cost 有關，菌株本身的基因型、宿主的免疫機制等亦會有重要的影響【58,59】。多重抗藥結核菌株的傳播有可能是 primary 多重抗藥菌株的直接傳播，或是先由非抗藥性菌株傳播爾後才 acquired 抗藥性。為了瞭解台灣多重抗藥菌株的傳播模式，針對 2008 年起多重抗藥結核病新案患者之菌株進行基因型別分析，同時與同年非新案之多重抗藥菌株及結核病群體中非多重抗藥菌株之基因型別進行比對，以瞭解多重抗藥結核病新案之可能傳染途徑。將建置結核菌基因型別資料納入法傳系統機制，及評估運用地理資訊系統(GIS)探討 MDR 及群聚個案發生的空間及時間性。

## 二、材料與方法

### (一) 子計畫一

#### 1. 結核菌株

收集臨床上培養於 Löwenstein-Jensen or MGIT<sup>®</sup> 培養基分離確認之結核菌，含多重及超級抗藥性菌株等。

#### 2. 抗藥性試驗(Drug susceptibility testing): 7H10 及 7H11 瓊脂平板法藥物試驗

(1) 藥物濃度：一線藥: INH 0.2 µg/ml 及二線藥: Ethionamide (EA) 10.0 µg/ml。

(2) 菌液調製：原則上，以 L-J 培養基培養出之新鮮初代結核菌做為測試菌，於負壓實驗室中調製 MaFarland 1.0 測試菌液。配製 1:100 ( $10^{-2}$ )及 1:10000 ( $10^{-4}$ ) 稀釋菌液接種量需固定，以免影響測試結果。

(3) 測試方式：(a)接種 三滴(0.1mL)之 1:100 稀釋菌液入瓊脂培養盤。(b)接種三滴(0.1mL)之 1:10000 稀釋菌液入瓊脂培養盤。(c)接種完成之瓊脂培養盤，置於室溫中，直到接種菌液吸入瓊脂中（亦即點變乾）。(d)將平板分別封入 CO<sub>2</sub> 可通透的塑膠袋中，並於 37°C 恆溫培養箱中靜置培養。

(4) 結果判讀：每四分格生長量記錄如下：>500 菌落 4+、200-500 菌落 3+、100-200 菌落 2+、50-100 菌落 1+及<50 菌落則記錄實際菌落數。

(a)兩組對照組中至少一組應可計數的菌落數(至少50個)，否則結果無效。(b)若對照組已長3+或4+，而含藥的四分格沒有長，則可以報告此藥是susceptible。最後判讀的時間在培養後3星期。如果對照組在3星期仍未長，則再培養3星期，加長至6 星期培養時間。當對照組有長足夠量時，只能報告有效的藥。

#### 3. 目標基因序列分析

分析 *rpoB* 基因突變的 primer sets 為: *rpoB*-F (5'-TCG GCG AGC CCA TCACGT CG-3') and *rpoB*-R (5'-GCG TAC ACC GAC AGC GAG CC-3')及分析 365-bp fragment targeting the V176F 突變 :TB-176-F (5'-CTT CTC CGG GTC GAT GTC GTT G-3') 及 TB-176-R (5'-CGC GCT TGT CGA CGT CAA ACT C-3')。 *rpoA* 及 *rpoC* 基因檢測突變的 primer sets 為 *rpoA* : 500bp *rpoA*1F (cgaggccgaaggcatcgagatc), *rpoA*1R (cgtgatccgccatgctcgaac) ; 600bp

rpoA2F (gagccggtcaccatgtacctac), rpoA2R (accgaagttgcggatgtcaagc) ; 600bp rpoA3F (actcaccgagcagctgatcgtc), rpoA3R (cgacttcagcttgccttatac) 。 *rpoC* : 600bp rpoC1F (gaatccgcaagtgtcaggatc), rpoC1R (tttgcgccggccttagttc) ; 550bp rpoC2F (tgagcggatggccacatcgag), rpoC2R (ggcgtcgtatgtcgaagttctcg) ; 550bp rpoC3F (ctggagcactttaccaagctg), rpoC3R (cagatcggaaagcacttgagc) ; 600bp rpoC4F (ctgtaccgcagggtgatcaacc), rpoC4R (ggccatctggtcaccgtcgaag) ; 550bp rpoC5F (caagagcgccaagcgcgatggtg), rpoC5R (gccgaatagctcggcctcgatc) ; 550bp rpoC6F (tgaccgggctgtactacctg), rpoC6R (aaagcggcagctggaactg) ; 600bp rpoC7F (gtgcaggcccatcatcaacg), rpoC7R (gcagtcgtgctcgcgcacgatc) ; 600bp rpoC8F (tgaaggcctggtgaccaac), rpoC8R (cgccaccctggtggaaggtg) 。 PCR 反應條件為：35 cycles 96°C 1 min; 64°C annealing 1 min; 及 72°C elongation 1 min 。 PCR 產物以 ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems, USA) 進行分析；數據利用的 using the Sequencing Analysis 5.2.0 software (Applied Biosystems, USA) 進行 assemble 及 edit 。此外，利用 FastPCR 軟體，針對其他預定分析基因設計引子做為聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 及定序使用。基因序列突變位點比對則是自 NCBI 資料庫下載 H37Rv 參考菌株 (NC\_000962) 的 *rpoB* 等基因序列，運用 Sequencher (Gene Codes Corporation, USA) 及 MEGA4 軟體，將測試菌株已完成定序的基因序列，和 H37Rv 參考菌株進行序列比對，以取得各基因突變位點的資訊。

## 5. GenoType MTBDR*plus* 快速檢測

進行 GenoType<sup>®</sup>MTBDR *plus* 檢測，原理係利用第一線藥物 RMP 及 INH 抗藥基因 *rpoB*、*katG*、*inhA*r，選擇該些抗藥性菌株基因突變位點最常發生者，設計引子對並進一步將突變基因位點合成相對應之核酸序列，鑲結於已知位置之長型纖維紙片上，利用聚合酶連鎖反應後之核酸產物，與長型纖維紙片上之核酸序列進行雜交，若有相對應之抗藥位點即可在此紙片上呈色，確認送驗檢體於是否為結核菌核酸陽性及其 RMP/INH 抗藥性。

(二) 子計畫二：運用 WHO 建議的快速分子檢測試劑(如 GeneXpert)在實驗室資源不足、一般臨床實驗室之醫院及結核病高盛行區域，進行個案檢測成效先導性評估。

#### 1. 試驗設計

(1) 試驗範圍: (a)選定南投基督教醫院，該地區 2010 年估計約有 100 個結核病新案通報；衛生福利部胸腔及彰化醫院及高醫附設醫院，為一般性醫療院所；另外(b)以花蓮縣秀林鄉為試驗範圍，該地區通報多名 MDR 個案。

(2) 試驗族群:以醫院門診病患為主要研究對象，進行 X 光異常個案(南投基督教醫院)、任何疑似 TB 個案(衛生福利部胸腔及彰化醫院及高醫附設醫院)直接痰檢體的檢測。另外以秀林鄉和中及景美村居民進行社區篩檢。

#### 2. 試驗流程

(1) IRB 申請: 向疾病管制局人體試驗倫理委員會進行 IRB 試驗申請作業。

(2) 病人選擇 (patient intake) 策略與檢體收集及 Xpert MTB/RIF 試驗:於(1)門診經臨床醫師判定為疑似結核病新案後或(2)秀林鄉居民，進行痰檢體收集。

#### 3. Xpert MTB/RIF 檢測

除高醫附設醫院每位個案檢測 2 套痰檢體外，其他研究點在收集個案第一套痰檢體後，取至少 1 mL 痰檢體加入 2 mL Xpert MTB/RIF sample reagent (1:2)。劇烈震盪 10-20 次 (或上下搖盪 10-20 次) 後於室溫靜置 15 分鐘，每隔 5 分鐘重複震盪動作，最終痰檢體將出現液化現象。將液化痰檢體加入 Xpert MTB/RIF 檢測卡匣進行分析。報告由儀器自動產出，報告方式依試劑所附說明。

#### 4. 傳統鏡檢、抹片及培養例行檢驗

第一套痰檢體除 1 mL 痰檢體取出進行 Xpert MTB/RIF 檢測外，剩餘檢體依例行檢驗流程進行消化去汙染濃縮法，再進行鏡檢抹片及培養。培養過程簡述如下：痰液以無菌滴管吸取 3-5 mL 痰液至 50 mL 離心管。加等量的無菌 NALC-NaOH (5.1.1) 液化痰液。振盪器振盪約 15-20 秒。室溫靜置 15 分鐘。加無菌 phosphate 緩衝液至 40 mL 刻度處，鎖緊蓋子。以 3,000 x g 離心 15 分鐘，將上清液倒入廢液桶。添加 2 mL phosphate 緩衝液以中和酸鹼值，準備接種。取 1 支 MGIT™960 培養管添加之 PANTA

與 OADC 混合液 0.8 mL，以無菌吸管取處理好的檢體 0.5 mL 接種，培養於 BACTEC™MGIT™960 系統。同時以無菌吸管吸取處理好的檢體 3 滴接種於 LJ 斜面培養基及 1 滴到 7H11 培養基，置入溫箱培養。培養陽性菌落染色結果為抗酸菌則可先發初步培養陽性之報告。將陽性培養基留下，做後續鑑定與抗藥用；培養第八週仍無菌落，則發培養陰性報告。

## 5. 檢體資料建檔

將以電腦軟體 EXCEL 建立病患之流行病學基本資料，包括：痰檢體收集單位、收集時間、進行 Xpert MTB/RIF 痰檢體套數、採檢與陽性培養菌株分離日期。病人辨識碼、年齡、性別、國籍；發病日期；由疾病管制署實驗室負責資料之彙集工作。

## 6. 試劑檢驗成效分析

分析敏感性(sensitivity)、特異性(specificity)、陽性預測值 (positive predictive value, PPV)及陰性預測值(negative predictive value, NPV)。檢驗報告時效性及收案治療時效性。

### (三) 子計畫三

#### 1. 群聚事件分析

分析 2006 至 2010 年間，送驗疾病管制署分枝桿菌實驗室之疑似結核病群聚感染事件菌株比對結果，依事件發生地點為家庭、安養護教中心、醫院、學校、監獄及其他（無法歸屬於前 5 類者）等 6 大類別，逐年比較各類別菌株基因型別比對結果之差異性，並與疾病管制署「重要或群聚事件疫調報告平台」通報事件平台等資料進行交叉比對，及進行國內外相關文獻探討，以瞭解國內外不同族群之結核病群聚感染發生情形與差異。

#### 2. 進行 MDR 菌株之基因分型及分析

##### (1) 「中央個案追蹤管理系統」及菌株資料比對分析

自結核病中央個案追蹤管理系統，查詢 2009 至 2014 年 11 月 7 日 MDR 結核病

新個案與在治療個案清冊及基本資料，並比對 MDR 複驗送驗菌株資料進行彙整。重新建置為 Excel 報表，並配合疫調及臨床資料，瞭解傳播途徑類別。另外，彙整比對 2008 至 2014 年送驗疑似群聚事件，以一人一株原則共分析 2,142 株菌株。比對 MDR 新個案與再治療個案菌株之基因型別外，亦與因疑似群聚所送驗之非多重抗藥結核菌株之基因型別進行比對。

## (2) IS 6110 RFLP 基因分型

以特定核酸限制酶 (Pvu II) 切割整結核桿菌基因體後可得到多條長短不一之片斷，於 0.8%瓊脂凝膠泳儀將 DNA 片斷分層。再利用南方墨點法轉移至融合膜上，續以 peroxidase 標幟之 IS 6110 核酸探針進行核酸融合反應。即可於解析與比較多態性菌株 DNA 圖譜。將影像圖譜數位化與常態化後，再以分析軟體進行菌株後續電腦分析。

## (3) spoligotyping 基因分型

依據 Kamerbeek 方法，首先將菌株以商業化套組 (Ocimum Biosolutions) 進行聚合酶連鎖反應以放大基因組中之直接重覆 (direct repeat) 片段，放大後之螢光產物與預先標定有 43 個 spacer 的探針之尼龍膜進行雜交 (hybridization)，最後使用 X 光片偵測 spacer 之有無。

## (4) MIRU-VNTR 基因分型

### (4.1) 基因位點與引子

根據 2001 年 Supply 等人發表 MIRU-VNTR 分析位點進行分析，包含 15 個位點：MIRU 4、MIRU 26、MIRU 40、MIRU 10、MIRU 16、MIRU 31、MIRU 2、MIRU 23、MIRU 39、MIRU 20、MIRU 24、MIRU 27、ETR A、ETR B、ETR C。

### (4.2) multiplex PCR 反應與條件

PCR 引子分成 5 組，每一組 PCR 引子端分別以不同螢光染劑 (FAM、HEX、TEMRA) 標示，每一 PCR 反應包含 50 to 200 ng 的 DNA、0.5 U Taq (AmpliTaq Gold, PE Applied Biosystems)、1X PCR buffer、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTPs (each) 與 0.4 μM primers (each)，PCR 反應條件為：95°C，10 min，1 cycle；95°C，1 min，59°C，1 min，72°C，



1 min 30 sec , 35 cycles ; 72 °C , 8 min , 1 cycle 。

#### (4.3) 毛細管電泳與 MIRU-VNTR 結果分析

將 PCR 產物加入 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 進行 5 倍稀釋，稀釋完之產物取 2  $\mu$ l 與 8  $\mu$ l ET-RAX 900 DNA size ladder 混合以 GE-Amersham MegaBACE 500 genetic analyzer 用 2% Metaphor 瓊膠進行分析，較長 PCR 產物之 MIRU-VNTR 位點以 Applied Biosystems 3500XL 進行分析。並根據 Supply 提供之 PCR 產物長度與相對應 repeat 數進行換算。

#### (5) 數學演算分析

RFLP、Spoligotyping 及 MIRU-VNTR 基因型的實驗資料以 BioNumerics<sup>®</sup> 4.61 版進行輸入及分析。

### 三、實驗結果

#### (一) 子計畫一

##### 1. 分析 rifampicin (RMP)抗藥而 rifabutin (RBT)敏感菌株的 *rpoB* 基因突變特性

使用的研究菌株係篩選自疾病管制署參考實驗室之結核菌株庫中，已確認的 MDR 菌株。以 1 位個案選取 1 株菌為策略，共選取 800 株以進行後續分析。後續進行傳統第一、二線藥物敏感性試驗結果分析，得知已篩選的 800 株 MDR 菌株中，有 104 (13%) 株為 RBT 敏感菌株。換句話說，臺灣 MDR 結核病個案感染菌株的 RMP 與 RBT 交互抗藥性為 87%。

在進一步執行與 RMP 抗藥相關 *rpoB* 基因的(541-bp)及 V146F (365-bp)定序分析後發現：其中有 740 (92.5%)株具單一突變、40 (5%)株有雙重突變、1 株有三重突變、6 株有 deletion，但仍有 13 株未偵測到任何變異(表一)。在 740 (92.5%)株具單一突變 MDR 結核菌中，有 68.5%在 codons 531 發生突變、16.8% 在 codon 526、5.9% 在 codon 516、3.6%在 codon 533 及 3.0%在 codon 513。此外，本研究並揭露 13 種新的變異點，包含 11 株單一突變 R143C、V144A、Q148R、S164P、D444V、E458K、T480I、A501T、R529Q、R529L、M558K 及 2 株 deletion。

然而，會產生多重突變的 MDR 菌株，僅有 1%發生於主要的 codon 531，但是卻有 70% 發生於少有的 codon 511 及 45.5% 發生於稀少的 codon 145。由於高比例的菌株會發生 codons 511 及 516 的多重突變，可能會被誤認為 RBT 敏感，須小心判讀及確認。再者，其中有 91 (12.3%)株為對 RBT 敏感的菌株，進行快速判定的探討。有趣的是，11 種單一突變 R143C、L511P、D516Y、D516V、D516F、S522L、H526C、H526L、H526T、H526N 及 R529L 僅發生在 RBT 敏感的菌株。初步結果發現，所有 codons 146、513、531 以及部分 codon 526 的突變(例如：CAC 變成 CGC、TAC、GAC、CAA 及 CCC)，會造成 RMP 及 RBT 同時產生抗藥性(表二)。而在 91 (12.3%)株為對 RBT 敏感的 MDR 菌株中，若是在 codons 511、516 及 522 發生單一突變，則可認定為對 RBT 具敏感性。

因此，有 57.2% (52/91) 的 MDR 個案可以很短時間內，即可考慮使用 RBT 進行有效治療。

## 2. *rpoA* 及 *rpoC* 基因與 MDR 群聚之關聯性探討

由於 *rpoB* 的 codons 531 的突變在 MDR 菌株中佔絕大多數，不同於一般臆測抗藥性菌株應該會受制於 fitness cost 而無法成為強勢感染菌株的看法。於瞭解與 RMP 抗藥相關的另 2 個基因 *rpoA* 及 *rpoC* 的特性，瞭解是否有補償性突變 (compensatory mutation) 作用。完成 2 個基因的全序列分析後，初步結果顯示：分析 17 件群聚事件的 63 株 MDR 菌株及非群聚事件的 56 株代表性菌株在 *rpoA* 及 *rpoC* 基因變異的情形，群聚菌株未發現 *rpoA* 有突變但 3 非群聚菌株同時有 *ropB* S531L 及 *rpoA* 突變；但 84.1% (53/63) 具 *ropB*-突變的群聚菌株及 90.4% 有 *rpoB* S531L 突變的群聚菌株在 *rpoC* 上則至少有一 nonsynonymous 突變發生。有 29.3% (5/17) 群聚事件的菌株在 *rpoC* codon 483 發生突變。此外，56 株非群聚菌株中 71.4% 發生 *rpoB* S531L 突變，其中有 43.3% 同時有 *rpoC* 突變 ( $p=0.0027$ )；且 nonsynonymous *rpoC* 突變也較多樣性。在 *rpoC* 172, 433, 483 及 491 發現共通的可能補償性突變 (表三)。

## 3. Isoniazid (INH) 及 ethionamide (ETH) 交互抗藥性之基因體探討

總共分析 284 株 MDR 菌株。先以傳統藥物敏感性測試方法，確認 INH 高濃度與低濃度抗藥性與 ETH 抗藥性；並以 GenoType MTBDRplus 方法篩檢 *inhA* C-15T 和 *katG* S315T 的突變位點，及以 spoligotyping 進行菌株型別分析。

### (1) 菌株 sublineage 分布分析

本研究所分析 284 株 MDR 結核菌，含 133 株 Beijing family 菌株及 151 株 non-Beijing 基因型菌株。經比對 spoligotype 資料庫結果，得到各 sublineage 分類資料如表一。在 non-Beijing 菌株中，包含在臺灣盛行的主要菌株型別：Harrlem 59 (39%)、EAI 24 (15.9%)、T 17 (11.3%) (表四)。

### (2) 抗藥性基因定序分析

本研究完成 INH 及 ETH 抗藥菌株的基因突變特性分析初步發現，具 INH 高濃度抗藥的 Beijing lineage 結核菌，ETH 抗藥性與 *inhA* C-15T 位點的突變有顯著的相關性；而與 INH 高濃度抗藥相關的 *katG* S315T 突變，發現 ETH 抗藥性與 *katG* S315T 位點的突變，無論是與 Beijing 及 non-Beijing lineages 皆具有顯著的相關性。然而對 INH 低濃度抗藥時，ETH 抗藥性與 *inhA* C-15T 位點的突變則沒有相關性。然而，無論是對 INH 高濃度與低濃度抗藥的 non-Beijing lineage MDR 菌株中，ETH 抗藥性與 *inhA* C-15T 位點的突變皆具有顯著的相關性 (表五)。

## (二) 子計畫二

進行 Xpert 試劑快速檢測：申請人體暨臨床試驗倫理委員會審查，於獲審查通過(編號 102007 及 103304)。試劑進口後，進行以下主動檢驗及被動篩檢評估：

### 1. 門診疑似肺結核病患快速診斷

(1) 召開工作聯繫會議：完成與研究團隊(各醫院)確認收案準則(任何 X 光異常或高風險之疑似個案)、實驗室檢驗、送驗及報告流程、個案治療與通報。

(2) 確認實驗室執行能力與品質：完成檢測設備裝機、人員訓練及認證。執行者取得證書後，通過由疾病管制署參考實驗室提供的測試組能力試驗，並持續接受每月一次的能力測試。

### (3) 收案及檢驗總結果

#### A. 埔里基督教醫院執行成果

##### (A) 細菌學檢驗結果分析

a. 2013 年 6 月 3 日開始執行。截至 2014 年 10 月 6 日止，共收 203 疑似個案，Xpert 陽性共 43 (21.2%) 案。其中，188 人有 Xpert、抗酸菌(acid-fast bacilli, AFB) 抹片染色及培養結果者列入分析(表六)。結果發現，38 人(20.2%)為 Xpert 陽

性(表六)；40人(21.3%)為培養鑑定為結核菌群陽性；44人(23.4%)為AFB抹片染色陽性(圖一)。

- b. 若以結核菌群鑑定結果為依據標準，則(a) Xpert 之 sensitivity 為 85.0% (34/40)、specificity 為 96.7% (29/30)。Chi-square test 之 p 值 $<0.0001$ 。(b) AFB 抹片染色之 sensitivity 為 82.5% (33/40)，specificity 為 76.7% (23/30)。
- c. 若以結核菌群 AFB 抹片結果分析，188 人有 144 (76.6%)人為抹片陰性，其次為 1+個案 7.4%；38 例 Xpert 陽性個案，4+個案 12 例為最高佔 31.6%，抹片陰性個案則為 7 例(18.4%) (表六)。則(a)當 AFB 為陽性時，Xpert 之 sensitivity 可達 93.6%、specificity、PPV 為 100%，NPV 為 71.4%。(b)當 AFB 為陰性時，Xpert 之 sensitivity 為 57.1%、specificity 為 95.7%、PPV 為 80%、NPV 為 88% (表七)。
- d. 若以培養結果為依據：(a) 培養陰性且 Xpert 也陰性者，共 112 位。其中，AFB 抹片陰性有 111 位，陽性者 1 位。(b)培養陰性，但 Xpert 陽性者，共 3 位。含 AFB 陰性有 2 位及陽性者 1 位。(c)培養陽性，但 Xpert 陰性者，共 32 位。含 AFB 抹片陰性有 25 位及陽性 7 位。(4)培養陽性且 Xpert 也陽性者，共 34 位。含 AFB 抹片陰性有 5 位，陽性有 29 位。

#### (B) 探討 Xpert MTB/RIF 檢測陽性結果病患的臨床表徵及細菌檢驗結果綜合分析

分析 188 人 Xpert、AFB 抹片鏡檢及培養結果者，年齡介於 15-96 歲，中位數為 65 歲；38 例 Xpert 檢測陽性者，年齡介於 15-93 歲間，中位數則降為 56 歲。Xpert 檢測陽性男性個案佔 79.9%。結核病接觸史分析，188 人中新案佔 73.4%，再治療個案 25%；38 例 Xpert 陽性個案，新案為 71.1%，其中與結核病個案有接觸史達 34.2%。

X 光檢查結果兩者均以中度無空洞最多，分別為 50%及 65.8%。個案病況診斷分析，全部個案及 Xpert 陽性個案均以咳嗽最高，分別佔 87.2%及 89.5%；其次為發燒 45.7%及 55.3%；但 Xpert 陽性個案體重減輕比例(55.3%)高於全部個案

(25%)，同樣結果易發生在夜汗(28.9% vs 10.6%)。

(C) 以細菌學檢查及收案治療時間分析

Xpert 檢測執行時效：38 例 Xpert 陽性個案進行分析，32 例(84.2%)均於門診當日完成採痰進行檢測，36 例(94.7%)在門診 2 日內完成檢測，2 例分別在門診後第 3、4 日完成取痰檢測。

陽性培養菌株鑑定時效(圖二)：35 株培養陽性報告日期範圍 5-33 天，中位數 13 天。35 株培養陽性並經 ICT 鑑定為 MTBC 報告日期範圍 9-34 天，中位數為 15 天；Xpert 陽性個案培養鑑定時間中位數則為 14 天。38 例 Xpert 陽性個案，依 Xpert 檢驗結果開始展開治療時間較菌株鑑定為 MTBC 報告時間縮短 15 天。

醫師根據 Xpert 檢測結果開具處方治療時效(圖二)：31 例 (81.6%)均於當日完成 Xpert 檢測後開具處方治療，5 例於門診隔日獲知 Xpert 檢測結果後開具處方，2 天內達 94.7%。僅 1 例於第 13 日回診時接受治療；另 3 例於治療過程中因故死亡。

B. 部立彰化醫院、部立胸腔醫院、高雄醫學大學附設醫院 (三家醫院分別

簡稱為部彰、胸腔、高醫)醫院臨床執行成果

(A) 收案與檢測結果

部彰於 2014 年 3 月 11 日開始執行。截至 2014 年 4 月 23 日止，共收 21 疑似個案。3 個案的痰檢體經 Xpert 檢測判定為陽性。(C)胸腔醫院於 2014 年 3 月 18 日開始執行。截至 2014 年 8 月 5 日止，共收 237 疑似個案。41 個案的痰檢體經 Xpert 檢測判定為陽性。高醫於 2014 年 3 月 20 日開始執行。截至 2014 年 8 月 26 日止，共收 54 疑似個案。每例個案均進行 2 套檢體檢測，10 案的痰檢體經 Xpert 檢測判定為陽性。

(B) 醫院執行結果分析

三家醫院年齡中位數分別為 56 歲、69 歲和 66 歲，男女比皆以男性居多，皆達 80%以上。TB 接觸史以新案無接觸為主，胸腔和高醫分別為 43.9%、80%。

胸腔另外發現有 17.1%病人具接觸 TB 案例。X 光檢查胸腔醫院與高醫主要以中度無空洞為主，分別佔 26.8 %和 80%，另外胸腔分別發現有 24.4 %為嚴重有空洞以及 22 %中度有空洞的個案，說明胸腔收案病人病況可能較為嚴重。症狀與診斷部分，胸腔收案病人病徵主要以咳嗽 (97.6%)、體重減輕 (31.7%)、發燒(17.1%)和呼吸急促(12.2%)為主。高醫則以咳嗽(90%)為主，其他病人發生零星發燒、呼吸困難、體重減輕和血氧降低等症狀(表八)。

## (2) 高結核病盛行區主動篩檢

配合花蓮衛生局的社區 X-光巡迴檢查排程，執行 2 次 (多重)結核病高盛行的秀林鄉主動篩檢，輔助 X 光巡檢，共完成 311 位村民篩檢。年齡中位數為 47 歲，其中 46.9%為男性。65 例(20.9%)檢測結果為 Invalid，遂進行設備、卡匣、操作及檢體檢討，排除前 3 項問題，但是發現檢體量(篩檢對象無痰)及檢體污染(如:酒精、檳榔等)是主要造成高 Invalid 的因素。因此，主動篩檢現場的操作程序(operation protocol)，仍須與前線分局、地方衛生局及社區個管師等工作團隊進行策略性調整。此主動篩檢作業，僅檢出 1 名本已知有臨床症狀之陽性 TB 個案。

## (三) 子計畫三

### 1. 疑似結核病群聚事件進行菌株基因比對結果的統計及疫調分析

#### (1) 依送驗菌株資料分析

##### A. 送驗個案基本資料

2006年至2011年，疑似結核病群聚事件送驗1,492名結核病病例，共1,716株菌株。其中，以北部送驗741 (49.7%)名最多，其次為南區344 (23.1%)名、中區286 (19.2%)名及東區121 (8.1%)名(圖三)。刪除掉無性別資料14名後，剩餘的1,478名個案中，女性占446名 (30.2%)及男性1,032名(69.8%)；男女的比例為2.3比1。

若刪除無檢體採檢日期資料50名後，餘1,442名病例，依:(a)該送驗檢體的採檢年度分析，則以2010年送驗病例336 (23.3%)名最多，餘依序遞減為2009年260 (18.0%)

名、2011年257 (17.8%)名、2008年223 (15.5%)名、2007年218 (15.1%)名、2006年133 (9.2%)名及2005年15 (1.0%)名(註：因以檢體採檢日計，故會發生2006年初疑似群聚發生之部分送驗病例已於2005年後期採檢)；(b) 群聚事件依發生地點區分為：家庭、安養護教中心、醫院、學校、監獄及其他（無法歸屬於前5類者）等6大類別分析。結果顯示，主要送驗病例來自安養護教中心共604 (41.9%)名，餘依序遞減為醫院277 (19.2%)名、學校254 (17.6%)名、家庭174 (12.1%)名、其他123 (8.5%)名及監獄10 (0.7%)名(圖四)。

若同時刪除無年齡及無性別資料的83名個案，餘1,409病例以20歲為一年齡階層分析。結果顯示：(a) 送驗年齡層以80-99歲間的507 (36%)名最多，而此年齡層的男女比例約為4：1，次為60-79歲303 (21.5%)名，其餘年齡層送驗數約介於10-20%間；另由資料顯示，隨著年齡層增加，送驗男女的比例差異越懸殊；(b)若依群聚事件發生地點的送驗年齡層分析，安養護教中心送驗病例最多，醫院次之，學校佔第三。而安養護教中心送驗585名病例中有350 (59.8%)名年齡介於80-99歲間，主要病例來自榮民之家及老人長期照護中心等機構。醫院部分之送驗病例年齡層分布，大多類似安養教護中心類別，以80-99歲為主，共計118 (43.7%)名，主要高齡病例來自於榮民醫院、精神醫院或醫院的呼吸照護病房等單位；不過，醫院類在20-39歲年齡層之病例所佔比例，明顯相較於安養護教中心高；另外，實際醫院工作者或看護人員共計送驗50名，佔醫院類別總送驗病例的18.2%；(c)學校部分主要送驗病例年齡層在0-19歲間共122 (47.5%)名，並隨年齡層增加送驗個案遞減；若再將0-18歲年齡層細區分為≤5歲以下為幼稚園生、6-12歲為國小學齡生、13-15歲為國中學齡生、16-18歲為高中學齡生，結果顯示，國中學齡生佔送驗病例數25.0%，而絕大多數送驗病例屬於高中學齡層佔68.0%。

#### B. 依送驗群聚事件數分析

2006年至2011年間，共送驗369件疑似結核病群聚事件(重複送驗群聚事件併計於最始採檢年度)，其中以安養護教中心共145件(39.3%)最多，依序為家庭69件(18.7%)、醫院63件(17.1%)、學校60件(16.3%)、其他27件(7.3%)及監獄5件(1.4%)。另由資料顯示，



每年度之新送驗群聚事件數自2009年起逐步增加，於2010年達到高峰後，2011年明顯大幅減少。另外，2010年除家庭類別外，其他類別皆較2009年增加新送驗群聚事件。

## (2) 依實驗室分子分型型別比對結果分析

實驗室執行369件送驗群聚事件分析中，分子分型型別比對結果相同者有131件(35.5%)、不同者有119件(59.4%)、無法比對者有19件(5.2%)。以發生地來看，比對結果相同者以家庭類別之比例最高48(69.6%)件、依序為學校29(48.3%)件、其它類13(48.2%)件、醫院15(23.8%)件、安養護教中心26(17.9%)件及監獄0(0%)件最低(圖五)。

實驗室分子分型型別比對不同者，疫調平台最後判定排除為61.6%(135/219)。再者，無任何群聚送驗類別的分子分型型別比對不同，而疫調平台判定為確定之事件。若以群聚事件送驗個案採檢年度來看，分子分型基因型別比對結果相同比例呈現減少趨勢，型別不同的比例則呈現增加趨勢；相對應於年度送驗群聚數，可看出2010年之送驗群聚數明顯增加但比對結果相同者比例，並無增加(圖六)。

若將群聚大小以送驗病例數區分為：(a)小群聚事件(病例數<10名)；(b)中群聚事件( $10 \leq$ 送驗病例數<29名)；(c)大群聚事件(病例數 $\geq$ 30名)。則計有344件(93.2%)屬於小群聚事件(送驗病例945名)、22件(6.0%)屬於中群聚事件(送驗病例349名)、3件(0.8%)屬於大群聚事件(花蓮玉里榮民醫院、南澳中學及金門職場其他類各1件，送驗病例115名)，而本研究單一群聚事件最多送驗病例為金門職場疑似群聚事件之46名病例。細看各類別送驗情形，九成以上之群聚皆為小群聚事件。

再者，369件送驗群聚事件中，計有30(8.1%)件為疑似MDR群聚事件。以送驗類別分析，家庭類別送驗12件MDR病例疑似群聚事件，件數最多(占家庭類送驗17.4%)，其中10件經實驗室確認分子分型型別相同；其他類送驗MDR群聚8件次之(佔其他類送驗29.6%，為送驗比例最高類別)，比對結果計7件分子分型型別相同者，主要來自：2件疑似實驗室污染、2件為高雄地區社區MDR群聚事件及3件為花蓮MDR高危險群村落。

進一步瞭解確定群聚病例其感染結菌株的抗藥性情形，本研究將分子分型型別比對結果相同者之群聚事件病例共726名，透過本署結核病中央個管追蹤系統，調閱已

有登錄的一線藥物敏感試驗結果進行分析。結果發現，對INH抗藥率為16.0%、對RMP抗藥率為13.0%、對EMB抗藥率為6.8%及對SM抗藥率為10.9%。其中，又以家庭及其他類別之一線藥物抗藥性比例較高，此結果乃因前述家庭類別有12件MDR疑似群聚事件及其他類別有8件MDR疑似群聚事件送驗，造成INH及RMP抗藥比例較高。

造成臺灣地區結核病群聚事件的主要結核菌株的型別為BEIJING (47.7%)、Haarlem (20.1%)及T(8.1%)。細分各區群聚事件主要結核菌株之分子分型型別(圖七)。安養護教中心以BEIJING (28.1%)、EAI (21.9%)及Haarlem (21.9%)為主；醫院以BEIJING (55.6%)、Haarlem (22.2%)及T(22.2%)為主；學校則以BEIJING (42.5%)、Haarlem (35.0%)及LAM(10.0%)為主，家庭及其他類別，則分別以BEIJING型別為主要感染菌株。

疑似結核病群聚事件的調查機制及科學技術發展，日臻完備。雖然結核病係空氣傳播及發病期程不一，但能仍暨望能發展出預防方法。

2. 進行 2009 至 2014 年，MDR 結核病新個案與再治療個案感染菌株基因型別及叢聚 (cluster)分析，以找出是否有 MDR 叢聚。並與 2008 至 2014 年發生群聚的 2,142 株 (一人一株) 送驗菌株進行型別比對，以判別 MDR 菌株基因型別為獨立型別？或是與群聚菌株有所異同？以瞭解 MDR 菌株可能的傳播途徑。

#### (1) 個案確認及基本資料分析

自疾病管制署結核病中央個案追蹤管理系統查詢 2009 年至 2014 年 11 月 7 日止 MDR 結核病新案及在治療個案個案清冊。2009、2011、2012、2013、2014 年 MDR 個案分別為 179、163、156、132、126、93 人 (系統登記為 96 人，扣除 3 人為 2014 年之前個案補通報者 3 人)，總計為 849 人，有 MDR 確認菌株送驗至本實驗室可進行基因分型檢驗者分別為：175、159、153、131、126、92 株菌株，總計為 836 株 (98.5%)。以此 836 人為分析樣本，MDR 新個案合計為 **610 (73.0%)** 人，在治療個案合計為 226 (27.0%) 人。詳細人口學資料包括性別、年齡層、地理區域分布列於如表一。

836 名 MDR-TB 個案中：37 (4.4%) 人為非本國國民 (14 人為大陸人士及 23 人為外籍人士)，包含新個案 35 人、再治療個案 2 人，除 3 名新案之菌株基因型尚未分析外，其餘 34 人 MDR 菌株 (含 2 人為 XDR-TB) 皆為單一型別，且皆與 2008 至 2014 年群聚事件送驗菌株的基因型別不相同。

分析的 836 人中，20 (2.4%) 人為 XDR-TB，2009、2011、2012、2013、2014 年分別確定 7、3、3、3、3、1 人。除 2 人 (2009 及 2012 年各 1 人) 為大陸人士且菌株為單一型別外，其餘 18 人中，除 6 名 (2009 年個案) 菌株基因型尚未分析外，有 2 人為家庭群聚 (C00043)，有 3 人為社區群聚 (C00015)，有 1 人為家庭 MDR 群聚 (C00002) 但配偶為非 XDR，有 1 人 (2009 年個案) 之菌株基因型與某一 MDR (非 XDR) cluster (C00017) 相同，其餘 5 人之菌株為單一型別。

#### B. 基因分型結果分析：

836 人中由已完成 817 (97.7%) MDR 菌株的 spoligotyping 基因分型的結果得知，無論新個案或在治療個案，皆以 Beijing 型所佔比例最高，其次為 Haarlem 型，詳見表二。

2009、2011、2012、2013、2014 年有 MDR 確認菌株，送驗至本實驗室進行基因分型者各分別為 175、159、153、131、126、92 株，已完成 RFLP 及 MIRU 基因分型者分別為 88 (50.0%)、155 (97.5%)、153 (100%)、130 (99.2%)、125 (99.2%)、46 (50.0%) 株，總計為 697 (83.4%) 株。由 697 株已完成 RFLP 及 MIRU 基因分型的結果得知，有 291 (41.8%) 株為 clustered 的菌株，406 (58.2%) 株為 non-clustered 菌株。291 (41.8%) 株 clustered 的菌株分別歸屬於 80 個 clusters (每個 cluster 含 2 至 29 株)，其中最大的 cluster (C00041，29 人)，包含：16 人來自東區、4 人來自高屏區、4 人來自北區、3 人來自台北區、1 人來自中區、1 人來自南區。其次為 cluster C00017 含 13 人：11 人來自高屏區、1 人來自南區、1 人來自中區。其餘 78 個 clusters 中，有 21 個 clusters 含 4 至 9 人、有 20 個 clusters 含 3 人、有 37 個 clusters 含 2 人。

又 80 個 clusters 中，僅 8 個 clusters 為單一年份出現，且每個 cluster 只含 2 人，其餘 72 個 clusters 皆為跨年之 MDR cluster。分析 80 個 clusters 的基因型，46 (57.5%) 個為 Beijing、15 (18.8%) 個為 Haarlem、4 (5.0%) 個為 T、2 (2.5%) 個為 EAI、2 (2.5%) 個為 Manu\_ancestor、2 (2.5%) 個為 Unknown、9 (11.25%) 個為 undefined。MDR cluster 詳細資料如表三。

再將 80 個 MDR clusters 的基因型別，與 2008-2014 年送驗疑似群聚的 2,142 人之菌株基因型別進行比對，結果發現其中 64 個 MDR clusters 的基因型別並未發現有與群聚菌株相同者。而其餘 16 個 MDR clusters 的基因型別中，有 8 個 cluster 分別僅與 1 株群聚送驗菌株型別相同、1 個 cluster 與某東部 MDR 群聚事件菌株型別相同；其餘有 1 個、2 個、2 個、1 個、1 個 cluster，分別與 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個群聚送驗菌株基因型別相同。

80 個 MDR clusters 中，最大的 cluster (cluster 041) 自 2009 至 2013 年每年皆有個案出現，此 MDR cluster 包含某東部 MDR 群聚事件的菌株，該事件為起始於 2008 年之 MDR 群聚事件，個案持續發生至 2013 年。其次，第二大的 cluster (C00017) 包含 13 人，為單純的 MDR cluster，沒有發現其他群聚菌株具有相同的型別。除 1 人在彰化、1 人在嘉義外，其餘 11 人皆在高屏區。第三大的 cluster C00009 及 C00042 分別皆含 9 名個案。cluster C00009 除 1 人在台北市、1 人在宜蘭縣、1 人在花蓮市外，其餘 6 人皆在花蓮縣秀林鄉，其中 5 人並已確認為秀林鄉和中社區的群聚事件。Cluster C00042 的 9 名 MDR 個案，除 1 人在台東縣、2 人為 2013 年台南市的家庭群聚外，其餘 6 名皆為高屏區的個案。另 cluster C00056 包含 5 名 MDR 個案，其中 4 人已知為台中縣潭子鄉的 MDR 群聚事件，其餘 1 人在彰化縣。在包含 2 名 MDR 個案的 37 個 clusters 中，已知有 3 個 clusters (C00059、C000075、C00084) 為家庭群聚事件、1 個 cluster (C00080) 為花蓮縣卓溪鄉群聚事件。另外，在包含 3 至 8 名 MDR 個案的 clusters 中，已知有 5 個 clusters (C00001、C00033、C00060、C00063、C00069)，也分別包含有 1 個家庭 MDR 群聚事件。分析包含 4 至 8 名 MDR 個案的

19 個 clusters 中，發現有 7 個 clusters 的 MDR 個案有地域分布特性，包括 4 個 (C00020、C00037、C00040、C00070) 集中在台北區、3 個 (C00026、C00049、C00056) 集中在中區。分析包含 3 名 MDR 個案的 20 個 clusters 中，則有 8 個集中在特定地理區域，包含 2 名 MDR 個案的 37 個 clusters 中，則有 23 個集中在特定地理區域。詳細資料如表四。

697 株已完成基因型分析的 MDR 菌株中，有 406 (58.2%) 株為非 clustered MDR 菌株，將之與 2008-2014 年送驗疑似群聚的 2,142 人之菌株進行比對，結果發現其中 372 (91.6%) 株仍為單一型別，其餘 34 株除 1 株為 Bovis 外，分別與至少 1 個群聚事件菌株基因型相同。

#### 四、討論

##### (一) 子計畫一

Rifamycins是一種屬於ansamycin抗生素類的一個子類。Rifamycins與*rpoB*基因編碼的RNA polymerase的 $\beta$ -subunit發生作用，抑制DNA-dependent的RNA合成，對分枝桿菌是特別有殺菌力。因此，它們被用於治療結核菌、麻風桿菌及鳥分枝桿菌複合體(*Mycobacterium avaim complex*)的疾病。其中，兩個有效的rifamycin衍生物為rifampicin (RMP)及 rifabutin (RBT)，使用於結核病治療。RMP是一種抗菌劑，可阻斷易感分枝桿菌RNA的轉錄以抑制RNA的合成。RBT則是rifamycin S的半合成spiropiperidyl衍生物，與RMP有幾種常見的功能。因此，兩者之間有相當高的交叉抗藥率。無論是對RMP敏感或抗藥的結核菌株，如果其最低抑菌濃度(MICs)  $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ ，則對MIC  $\leq 1$ 微克/毫升的RBT仍具敏感性；另有文獻指出有些MIC  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 的RMP抗藥性菌株對RBT仍具敏感性。因此，RBT可能對某些MDR結核菌株仍然是有殺菌效果。已知，RBT比RMP在體外對結核菌，麻風桿菌和MAC更具約兩倍至四倍效力。而且，RBT較RMP少發生內在抗藥性。因此，若在抗結核治療中發生嚴重的RIF副作用，RBT可作為替代藥物。在台灣，RBT使用於治療HIV共同感染的結核病個案、結核病患者使用RMP有嚴重的不良反應者及MDR結核病個案。由於，RBT並非例行性臨床一線檢測藥物之一，若須取得抗藥性試驗結果須送參考實驗室進行二線藥物測試，並因現有方法須時約4周才得完成。

先前的研究顯示，具*rpoB*基因突變的RBT及RMP抗藥菌株的最低抑菌濃度的變化，取決於特定的*rpoB*基因的突變。例如：V176F(結核菌的編號)、Q513K、Q513L、Q513P、S522W、H526R、H526Y、H526D、H526Q、H526P、S531L及S531W(大腸桿菌的編號)造成RMP和RBT同時抗藥，而D516Y、D516V、S522L及H526C導致對RMP抗藥，而L511P造成對低濃度RMP產生抗藥性。然而，菌株發生H526L和L533P突變對RMP或RBT的抗藥關連性仍存在爭議。我們的結果也清楚證實11株H526L突變的RMP抗藥菌株對RBT則是敏感。從生化的角度來看，菌株對於RBT的susceptibility可能取決於在codon 526突變所產生取代的氨基酸種類，例如：histidine及asparagine

(帶電的側鏈的鹼性氨基酸)改變成 cysteine(與親水性側鏈), leucine(疏水性側鏈), threonine(與不帶電荷的側鏈)。然而,尚未能確定的 526 位氨基酸替換類別和 RBT 的敏感性間的關聯性。因此,究竟氨基酸替代類型(簡單 vs bulky,或酸性 vs 鹼性側鏈)如何影響結核菌蛋白質與藥物間相互作用,仍然未能有定論。可能的機轉是 RNA polymerase 催化反應的 allosteric 調節及  $Mg^{2+}$  的結合對 rifamycins 功能會產生干擾。據推測,簡單的氨基酸取代,可能干擾或增強極性/疏水性的蛋白質酶和 rifamycins 的相互作用;而蛋白質和藥物之間的相互作用時,導入氫鍵和改變 van der Waals 作用(interactions),對誘導抗藥性產生也可能有關鍵的影響。

由本研究結果得知,臺灣 MDR 結核菌個案菌株的 RMP 與 RBT 交互抗藥性為 87%。高於土耳其的 73.1%、日本 72.7%,低於澳州 88%。此外,PMP 抗藥菌株若在 *rpoB* 基因的 codons 143、511、516、522 及 529 發生單一突變,及 codon 526 (H to C、L、T 及 N) 發生 amino acid 改變,則對 RBT 不具抗藥性。由於,目前臺灣已例行使用一種 WHO 推薦的 line-probe 分子檢驗方法,使用 GenoType MTBDR*plus* 試劑,執行快速 MDR 菌株的複驗、MDR 高危險群的痰檢體篩檢及特殊需求個案的快速判定等。由於 GenoType MTBDR*plus* 試劑的設計涵括部份本研究的發現,於是 **GenoType MTBDR*plus*** 試劑除了可以用於 INH 及 RMP 抗藥性的檢測外,亦可同步用於判定 RBT 的敏感性。因此,由現行運用的分子檢驗可以快速鑑定結核菌及判定 RMP 及 RBT 的抗藥性,縮短正確用藥的等待時程,盼有助於提升治癒率。

*rpoA* 及 *rpoC* 基因分別 encode RNA polymerase 的  $\alpha$  及  $\beta'$  subunits。依據 RpoA、RpoB 及 RpoC 的交互作用,推測 RMP 抗藥結核菌株如果在 *rpoA* 及 *rpoC* 基因發生 nonsynonymous 突變,會有補償性效果。補償性效果僅在臨床經過治療所分離的結核菌株中發現,而實驗室繼代造成(derived)的菌株則無此特性。根據 Comas 等人經由分析 *E. coli* 的 RNA polymerase 三級結構,證明該等補償性突變集中發生在  $\alpha$  及  $\beta'$  subunits 的介面,因而可能影響 subunits 交互的作用。本計畫因經費有限,已先初步分析臺灣分析 17 件群聚事件的 63 株 MDR 菌株及非群聚事件的 56 株代表性菌株在 *rpoA* 及 *rpoC*

基因變異的情形，群聚菌株未發現 *rpoA* 有突變但 3 非群聚菌株同時有 *ropB* S531L 及 *rpoA* 突變；但 84.1% (53/63) 具 *ropB*-突變的群聚菌株及 90.4% 有 *rpoB* S531L 突變的群聚菌株在 *rpoC* 上則至少有一 nonsynonymous 突變發生。有 29.3% (5/17) 群聚事件的菌株在 *rpoC* codon 483 發生突變。此外，56 株非群聚菌株中 71.4% 發生 *rpoB* S531L 突變，其中有 43.3% 同時有 *rpoC* 突變 ( $p=0.0027$ )；且 nonsynonymous *rpoC* 突變也較多樣性。在 *rpoC* 172, 433, 483 及 491 發現共通的可能補償性突變。證明 *rpoC* 基因有補償性突變且發生的 codon 很多元。綜合分析發現僅有 1 件 MDR 群聚事件，其菌株係在 *ropB* 的突變非發生在主要且常見的 codon 531，因而並不具有 *rpoC* 基因補償性突變。總之，目前在新確認的 MDR-TB 個案中，約有 60-75% 為新案，且無法確認感染源的情況下，也尚無 MDR-TB 預防性治療策略時，由瞭解更細部的 MDR-TB 菌株，由其是已發生群聚的菌株之基因特性分析，可引導接觸者及群聚事件調查，進行更有效性防治。

另透過分析 284 株 MDR 結核菌株，發現 *inhA* C-15T 發生突變時，INH 與 ETH 具有交互抗藥現象。此現象可由 INH 與 ETH 結構相似及作用目標相同解釋，也提供可能可以透過與 INH 突變顯著相關之 *inhA* C-15T，來預測 ETH 抗藥之可行性。相較於其他過去研究所選用的 LAM 等不同的品系，及在 France、United States, Russia, Brazil 等不同地區所蒐集之菌株。與本研究分析的在亞洲具有高發生率 Beijing 型菌株，在 INH 與 ETH 交互抗藥的現象尚未被報導；亦選擇在臺灣盛行的 non-Beijing 菌株，含 H 及 H3 (39.1%)、EAI2-Manila (14.6%)。本分析發現，不同基因型結核菌株在 INH 與 ETH 之交互抗藥機轉雖有共通性及亦有差異，直接以藥物單向推論可能較不合適 (表五)，需進一步進行 ETH 的相關抗藥基因的分析後，交叉應證。

## (二) 子計畫二

世界衛生組織於 2010 年 12 月建議使用新一代的核酸快速檢測試劑 Xpert MTB/RIF，該試劑不僅其對抹片陽性、培養陽性檢體有 98-100% 高敏



感度，同時也對抹片陰性、培養陽性檢體具 72-75% 檢測成效。本計畫以在臺灣實驗室資源不足區域及尚未有認可實驗室的縣市(例如：南投)、山地鄉之高危險族群(秀林鄉村民)及一般具臨床結核病實驗室之醫療機構為試驗範圍，直接在地區醫院實驗室進行成效性先導評估。針對門診疑似個案的進行結核病快速檢驗，同時與現行檢驗流程進行相互比較。評估全新的檢測方法 Xpert MTB/RIF 與現行的結核病傳統檢驗方法(如：抗酸菌抹片鏡檢及細菌培養)，進行診斷能力(performance)的時效性比較評估。

2011 年起 Xpert 全球市場需求激增，Xpert MTB/RIF 模組由 2010 年第 4 季 42 個模組累計增加至 2013 年第 1 季 6,181 個模組，檢測試劑 Xpert MTB/RIF 每劑使用量由 2010 年第 4 季 40,790 個卡匣累計增加至 2013 年第 1 季 2,315,380 個卡匣。單以 2013 年第 1 季計算，全世界 Xpert MTB/RIF 卡匣使用量較 2010 年第 4 季增加 10.4 倍。本計畫由於試劑供貨因素，於 2013 年 6 月 3 日始正式開始，同時計畫首次於地區型醫院執行，相關實驗室操作人員並未具例行分子生物檢測經驗；並在部彰、胸腔及高醫進行評估。為確保實驗室執行能力與品質，於完成設備裝機、人員訓練及認證後，疾病管制署實驗室寄送盲樣檢體，進行實驗室能力試驗評估，評估結果皆符合標準。

埔里基督教醫院每年約通報新案 100 例，依推估需以一年時間檢測 700 位懷疑 TB 痰液檢體，可檢出 35 位新案確診個案，即執行 20 例個案可檢測出 1 例確診個案。實際執行至 2014 年 10，收案條件先以門診進行個案篩選，之後由門診醫師開立 Xpert MTB/RIF 檢測需求，合計實際收案分析的 188 例中，其中 38 例的痰檢體經 Xpert MTB/RIF 檢測判定為結核菌陽性，1 案對 rifampicin 具抗藥性。檢出結核菌陽性結果高達 22%，即每 4-5 例個案即可檢測出 1 例結核病確診個案。由 38 例 Xpert MTB/RIF 陽性結果分析，有 **34.2% (13 例)曾接觸結核病患者**。Xpert MTB/RIF 檢測陽性病患門診時，絕大多數具結核病病徵，如咳嗽、體重減輕、發燒及夜汗等。**據此，可假設此地區疑似結核病的門診患者，若具結核病相關病徵且有接觸史，搭配七分篩檢法，則可推測**

為結核病高度疑似個案；若能導入 Xpert MTB/RIF 檢測，則可快速確診及治療。

就結核菌培養結果分析，雖有 3 例培養結果為陰性但 Xpert MTB/RIF 為陽性結果，其中 2 例為抹片陰性，X 光檢查分別為中度無空洞及中度有空洞；1 例為抹片 1+，X 光檢查分別為中度無空洞。就 Xpert MTB/RIF 檢測結果為 2 例 MTB detected Very Low 及 1 例 MTB detected Low，發現核酸陽性 Ct 值結果，與抗酸菌抹片鏡檢結果相符。推測培養陰性結果，可能係菌量過少，導致菌體於痰液中分佈不均有關，或培養時取樣不均所致。另外，30 例抗酸菌抹片陰性而培養陽性檢體，最終經免疫檢測法(ICT)鑑定確認為結核菌結果共 7 例。雖僅 4 例經 Xpert MTB/RIF 檢出，敏感度為 57.1%，但由於樣品數少，尚無法確切評估抹片陰性培養陽性的敏感度。但就 36 例抹片陽性且培養陽性檢體，Xpert MTB/RIF 能快速檢測出結核菌，敏感度為 93.6%。因此，就抹片陽性檢體而言，Xpert MTB/RIF 顯示高敏感度及高準確性。

本計畫使用 Xpert MTB/RIF，與現行的結核病傳統檢驗方法，如：抗酸菌抹片鏡檢及培養，進行診斷能力(performance)的時效性平行比較。由於該地區醫院所有門診病患送驗痰檢體，皆須轉送至本署合約代檢實驗室進行抹片、培養及鑑定。因此，抹片報告會較門診後延遲約 12 小時。所以，就臨床醫師獲知檢驗結果的時效而言，有高度助益。相較於培養陽性並經鑑定為結核菌，Xpert MTB/RIF 之檢測平均提早 15 天。除 3 例個案於治療過程中因故死亡外，94.7%個案均能在看診後 2 日內，開始接受抗結核藥物治療。

至於對於高結核病盛行區主動篩檢，有高達 30.1%檢測結果為 Invalid，由於檢體採集不良率高及檢測對象的限制，田野操作策略與實施方法仍需進一步修正及確認，適用性尚無定論。

### (三) 子計畫三

群聚事件調查的目的是為了找到何者為結核病傳播的高風險環境，因此需要增加

監測，結核病教育和提高警覺性，以及加強感染控制，以減少延遲診斷造成結核菌的傳播。而在群聚事件的調查中也須偵測是否有潛在、尚未被診斷的活動性結核病個案，並且對於具高發病風險的接觸者提供結核病篩檢與潛伏感染診斷和治療。在每次群聚事件的調查中，也有可提供政策與防治措施檢討的機會。

臺灣每年新通報的結核病個案，大於65歲者占50%以上。而疑似群聚事件的送驗類別，以安養護教中心最多而醫院次之。送驗年齡層以80-99歲間的507 (36%)名最多，次為60-79歲303 (21.5%)名。相關的日常健康監測，及是否採用12劑的isoniazid及rifapentine潛伏感染預防用藥？而醫院工作者或看護人員佔醫院類別，總送驗病例的18.2%，該些醫療院所的院內感染措施及空調設施是否得宜？皆是擬定可能的預防策略需思考的部分。

送驗群聚事件中，分子分型型別比對結果：相同者有35.2%件，以家庭類別相同者比例最高共69.6%、次為學校48.3%。學校的疑似群聚事件中，大多屬於高中及大學學齡層。分子分型基因型別比對結果相同比例，呈現逐年減少趨勢。顯示公衛端的積極作為，但是由於現階段仍無法執行universal的分子分型，可能錯失傳播鏈。由266 (72.1%)件為1年內採檢送驗之群聚事件、54件(14.6%)為跨1年及17件(4.6%)為跨2年，顯示目前的群聚事件調查以近期傳播(recent transmission)為主。

確定群聚病例其感染結菌株的抗藥性情形，已有登錄的一線藥物敏感試驗結果進行分析發現，對INH抗藥占16.0%，是否會影響現有潛伏感染策略，可以進一步探討；此外，造成台灣地區結核病群聚事件的主要結核菌株的型別為BEIJING (47.7%)、Haarlem (20.1%)及T (8.1%)，與臺灣一般的結核病盛行菌株BEIJING、Haarlem及EAI，略有不同。但與先前的流行病學監測結果，BEIJING為造成新近感染主要菌株相同。

群聚事件造成結核病的防治工作相當的負擔，藉由本研究分析以瞭解近年來事件的特性，得以修定更有效率的防治作為及資源分配，如：加強學校防治宣導、七分篩檢法等，及密集機構及醫療院所的感控措施等。此外，跨部會、機構及單位的溝通合作，才得防範群聚事件的發生頻率。

子計畫另一目的，乃希望藉由持續性對MDR結核菌株進行基因型別追蹤分析，以瞭

解臺灣MDR菌株的傳播特性，做為MDR-TB防治策略的參考。本子計畫同時進行前瞻性與追溯性分析，根據中央個案追蹤管理系統查詢MDR新案與重開名冊，時序往前追溯自2009年至2014年11月7日止，完成697個MDR-TB新個案與再治療個案菌株基因型別比對分析。研究結果發現，291 (41.8%) 人可歸屬於80個clusters，且將此80個基因型與2008至2014年群聚送驗菌株比對後，發現有64 (80.0%) 個為單純的MDR-TB clusters，顯示造成MDR-TB傳播的結核菌，似乎有別於一般的結核病群聚事件。

本研究發現有一 XDR-TB cluster (cluster 015, Beijing 型)，共包含 3 人且具有地緣關係。此菌株基因型分析結果，也提供本署中區管制中心進行進一步疫調及後續追蹤。而另一個 2012 年 XDR-TB 新案，則是與另一 2013 年再治療的 MDR-TB 個案屬相同 cluster (cluster 002, Haarlem 型)，此 XDR-TB 病人亦為夫妻間的家庭 MDR 群聚，但是妻並非為 XDR-TB。由以上分析結果，XDR-TB 是否為直接傳染或是先為 MDR-TB 傳染再因治療等其他因素導致 XDR-TB 產生，需進一步確認。因此，加強 MDR-TB 管理，含快速診斷、接觸者追蹤、有效治療等，可改善變成 XDR-TB 的問題。

隨著拉長研究期間及菌株數的增加，MDR-TB clusters 數目也持續增加，顯示持續菌株基因型的分析確實有助於 MDR 菌株傳播分析的探討。本研究亦發現某些 MDR-TB clusters 可能具有地域分布特性。包括最大的 cluster (C00041) 已知與某東部 MDR-TB 群聚事件的菌株基因型相同，該事件為起始於 2008 年的群聚事件。其次，第二大包含 13 名個案的 cluster (C00017) 為單純的 MDR-TB cluster，有 11 人皆在高屏區。第三大的 cluster C00009 及 C00042 分別皆含 9 名個案，皆各別有 6 名個案集中在花蓮縣秀林鄉及高屏區。另外在其餘的 MDR-TB clusters 中，也發現有 38 個 clusters 有地緣關係。本研究之菌株基因型結果，也逐批上傳至中央個案追蹤管理系統，提供各公共衛生管轄單位進一步進行深入疫調，以釐清 MDR-TB 的傳染源。

針對 2009 起至目前為止發現的 80 個 MDR-TB clusters 中，有 37 (46.3%) 個 clusters 僅含 2 株菌株，20 (25.0%) 個 clusters 僅含 3 株菌株，且 MDR-TB cluster 基因型無明顯

與群聚非 MDR 菌株基因型相同。非 clustered MDR 菌株基因型也以單一型別居多，推測 MDR 菌株基因型與非 MDR-TB 群聚菌株基因型並不相似。隨著研究時間及菌株數的增加，因同時進行追溯性分析，可逐年發現有些原本為單一型別的菌株轉變成 clustered 菌株，顯示持續追蹤 MDR 菌株基因型有其必要性。而由於僅限於與群聚事件送驗菌株比對，對於 MDR-TB 新個案發生的原因仍需持續進行歷年 MDR 基因型別監測及母群體菌株監測比對，才能協助找出 MDR 發生與傳播原因。697 株已完成基因型分析的 MDR 菌株中，仍有 372 (53.4%) 株屬於單一基因型別，因此，真正的感染源似乎尚未能確認。新一代的基因分型技術，已利用全基因序列 (whole genome sequencing) 分析，已證明可解決現有基因分型方法 convergence 的盲點，期可更快速找出傳染源頭以有效的阻絕傳播。

## 五、結論與建議

### (一) 子計畫一

臺灣 MDR 結核病個案感染菌株的 RMP 與 RBT 交互抗藥性為 87%。RBT 是有效的 MDR 及 HIV 複合感染結核病個案的有效藥物，已得之相關分子基因資料可提供發展快速分子第一、二藥物抗藥性檢測方法的設計參考。此外，藉由 *rpoC* 基因的補償突變的檢測，可導入更系統性的接觸者追蹤策略。透過分析 284 株 MDR 結核菌株，發現 *inhA* C-15T 發生突變時，INH 與 ETH 具有交互抗藥現象。此現象可由 INH 與 ETH 結構相似及作用目標相同解釋，也提供可能可以透過與 INH 突變顯著相關之 *inhA* C-15T，來預測 ETH 抗藥之可行性。相較於其他過去研究所選用的 LAM 等不同的品系，及在 France、United States, Russia, Brazil 等不同地區所蒐集之菌株。與本研究分析的在亞洲具有高發生率 Beijing 型菌株，在 INH 與 ETH 交互抗藥的現象尚未被報導；亦選擇在臺灣盛行的 non-Beijing 菌株，含 H 及 H3 (39.1%)、EAI2-Manila (14.6%)。本分析發現，不同基因型結核菌株在 INH 與 ETH 之交互抗藥機轉雖有共通性及亦有差異，直接以藥物單向推論可能並不合適，需進一步進行 ETH 的相關抗藥基因的分析後，交叉應證。

### (二) 子計畫二

Xpert MTB/RIF 檢測方法是一項分子快速診斷技術，該方法使用即時定量 PCR 系統，於可丟棄式塑膠卡匣內建置所有必須試劑，進行全自動化細菌溶解、核酸萃取、核酸複製及 PCR 產物偵測。操作簡便，只受過很少訓練的檢驗人員就可以操作。抹片陽性檢體進行 Xpert MTB/RIF 檢測，敏感度、特異性、陽性預測值及陰性預測值各為 93.6%、100%、100%、71.4%。抹片陰性檢體進行 Xpert MTB/RIF 檢測，敏感度、特異性、陽性預測值及陰性預測值分別為 57.1%、95.7%、80%及 88%。適合應用於第一線診斷處，Xpert 檢測方法對 X 光異常結核病個案的早期診斷，成效佳可考慮納入臨床檢驗流程，疑似結核病的門診患者，若具結核病相關病徵且有接觸史，則可推測為結核病高度疑似個案進行 Xpert MTB/RIF 檢測。相較於培養陽性並經鑑定為結核菌，Xpert

MTB/RIF 之檢測平均可提早 15 天。缺乏 TB 實驗室資源之醫院，無須等待外送檢體之報告，臨床上 2 天內 TB 收治用藥人數可達 94.7%。預期可提高療效及降低 TB 傳播。反觀，在主動個案發現上，由於檢體採集不良率高及檢測對象的限制，田野操作策略及方式，仍需進一步修正及確認適用性。

### (三) 子計畫三

結核病群聚事件的發生，往往需要公共衛生投入大量的人力和資源進行接觸者檢查，以阻斷傳染鏈減少個案的發生。本研究藉由 2006 - 2011 年疑似群聚事件的特性分析和調查結果。提供衛生單位人員瞭解結核病群聚事件發生場域及發生率，及群聚個案 INH 的抗藥情形等，以做為結核病群聚事件的防治策略參考。此外，雖然疑似結核病群聚事件的調查機制及科學技術發展，日臻完備。但是結核病係由空氣傳播及發病期程不一，仍然暨望能發展出預防或預警的方法，尤其是針對老年安養中心及學校的疑似群聚事件，建議採取健康管理及必要的預防性治療。

針對 2009 至 2014 年 MDR 結核菌株進行時序性的基因型別分析結果顯示，MDR-TB 的傳播可能具有空間上與時間上的傳播特性。由分析結果發現，在 80 個 clusters 中，有 64 個為 unique 的 MDR-TB clusters (共 202 株，29.0%, 202/697)，即未與 2008 至 2014 年群聚送驗菌株基因型相同，顯示 MDR 傳播菌株的基因特性可能有所不同。另 16 個 clusters (共 89 株，12.8%, 89/697) 與群聚送驗菌株有相同的基因型。其餘 406 株則為 non-clustered MDR 菌株，其中有 372 株 (53.4%, 372/697) 雖經與群聚送驗菌株比對後，仍為單一型別。

值得注意的是，東部持續存在有特定 MDR-TB clusters (C00041、C00009)，而在南區也有 2 個大型的 MDR-TB clusters (C00017、C00042) 存在。在北區與中區也有 7 個中型 (包含 4 至 8 名個案) 的 MDR-TB clusters 存在。另也發現有 31 個小型 (包含 2 至 3 名個案) 的 MDR-TB clusters 存在，必須積極追蹤及進行疫調以找出傳染源。因此，針對 MDR 菌株基因型有必要進行持續性監測，並將監測結果轉知 TB 防治相關單位，以

積極防止 MDR-TB 傳播的可能。目前，已逐批將菌株基因型結果上傳至中央個案追蹤管理系統，未來期能搭配 GIS 以監測 cluster 的變化及確認未察覺的群聚事件。



## 六、計畫重要研究成果及具體建議

### (一) 成果

#### 子計畫一

1. 分析 800 株 MDR 菌株中，有 104 (13%)株為 rifabutin (RBT)敏感菌株。臺灣 MDR 結核病個案感染菌株的 RMP 與 RBT 交互抗藥性為 87%。結果發現，所有 codons 146、513、531 以及部分 codon 526 的突變(如：CAC 變成 CGC, TAC, GAC, CAA, CCC)，會造成 RMP 及 RBT 同時產生抗藥性。相關資料可提供發展快速分子第一、二類藥物抗藥性檢測方法的設計參考。
2. 瞭解補償性抗藥基因突變與傳播的關聯性，未發現 *rpoA* 有突變；但在 *rpoC* 上則有數個 codons 發生突變，主要有 5 個群聚發生於 codon 483、3 個群聚發生於 codon 485 及 5 個群聚發生於 codon 1140。僅有 1 件 MDR 群聚事件，其菌株係在 *ropB* 的突變非發生在主要且常見的 codon 531，因而並不具有 *rpoC* 基因補償性突變。
3. INH 及 ETH 的交互抗藥性在所對應之抗藥基因特性，北京型及非北京型多重抗藥性結核菌呈現不同結果，可供 MDR-TB 用藥尚待 ETH 抗藥資料時之初步參考。但確切關聯性由於尚無發表的資料佐證，值得進一步研究探討。

#### 子計畫二

1. 在實驗室資源不足區域，可直接在地區醫院實驗室進行人員教育訓練，並經品管測試評後直接進行 Xpert MTB/RIF 快速檢測。
2. 相較於培養陽性並經鑑定為結核菌，Xpert MTB/RIF 之檢測平均可提早 15 天，若於門診取痰直接進行送驗，當日即可獲知檢測結果，臨床端可提早開立治療處方，減少病人離開門診後傳播結核病到社區的疑慮，達到

point-of-care 的目的。

### 子計畫三

1. 基因型別比對結果相同比例呈現逐年減少趨勢；分析基因型別相同之群聚事件且其個案已有一線藥物資料者，對INH抗藥占16.0%，此外，類別中以家庭、醫院及其他類別之個案，其抗藥情形較為嚴重；造成台灣地區結核病群聚事件的主要結核菌株的型別為BEIJING (47.7%)、Haarlem (20.1%)及T(8.1%)。
2. 針對 2009 至 2014 年 MDR 菌株進行時序性的基因型別分析結果顯示，MDR 的傳播可能具有空間上與時間上的傳播特性。
3. 東部持續存在有特定 MDR clusters 菌株 (C00041、C00009)，南區也有 2 個大型的 MDR clusters (C00017、C00042) 存在。在北區與中區也有 7 個中型 (包含 4 至 8 名個案) 的 MDR clusters 存在。另也發現有 31 個小型 (包含 2 至 3 名個案) 的 MDR clusters 存在。

## (二) 具體建議

### 子計畫一

1. GenoType MTBDR*plus* 試劑除了可以用於 INH 及 RMP 抗藥性的檢測外，亦可同步用於判定 RBT 的敏感性。因此，由現行運用的分子檢驗可以快速鑑定結核菌及判定 RMP 及 RBT 的抗藥性，縮短正確用藥的等待時程，盼有助於提升治癒率。如果搭配 INH 傳統抗藥及造成感染菌株之基因型，可能可以用於 ETH 抗藥性之初判。
2. 目前在新確認的 MDR-TB 個案中，約有 60-75%為新案，且無法確認感染源的情況下，也尚無 MDR-TB 預防性治療策略時，由瞭解更細部的 DR-TB 菌株的基因特性分析，可引導接觸者及群聚事件調查，進行更有效性防治。

### 子計畫二

1. Xpert 檢測方法對有結核病接觸史及 X 光異常的疑似結核病個案的早期診斷，成效佳可考慮納入臨床檢驗流程。
2. Xpert 檢測方法對抗酸菌陽性個案，有極佳敏感度，該試劑由 WHO 推薦並已獲得衛生福利部 IVD，可推薦為分子快速結核病診斷方法之一。

### 子計畫三

1. 結核病群聚事件的發生，往往都需要公共衛生投入大量的人力和資源進行接觸者檢查，以阻斷傳染鏈減少個案的發生。雖然疑似結核病群聚事件的調查機制及科學技術發展，日臻完備。但是結核病係由空氣傳播及發病期程不一，日後仍然期望可以發展出預防或預警的方法，尤其是針對老年安養中心及學校的疑似群聚事件，建議採取健康管理及必要的預防性治療。
2. 改善現有基因分型量能，發展簡易分型平台方法，進行更大規模的結核病個案群體之比對，才能確定感染源及傳播途徑，而非僅是隨機盛行菌株的感染。
3. 針對 MDR 菌株基因型有必要進行持續性時間及空間的監測，並將監測結果轉知權責組與疫調單位，以積極防止 MDR 的可能傳播。持續將結果納入結核病管理系統，搭配 GIS 以監測 cluster 的變化及確認未察覺的群聚事件。

## 七、參考文獻

1. **World health Organization**,  
[http://www.who.int/tb/publications/2010/factsheet\\_tb\\_2010.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2010/factsheet_tb_2010.pdf)
2. Annual Report of Infectious Disease Surveillance. Taiwan Centers of Disease Control, 2011.
3. **Vareldzis, B.P., Grosser, J., de Kantor I., et al.** 1994. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World health Organization recommendations. *Tubercle. Lung. Dis.*, **75**: 1-7.
4. **Zhang, Y., Yew, W.W.**, 2009, Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In. *J. Tubercle. Lung. Dis.*, **13**: 1320-1330.
5. **Zhang, Y., Heym B., Allen, B., et al.**, 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, **358**: 591-593.
6. **Rozwarski. D. A., Grant, G. A., Barton, D. H., et al.**, 1998. Modification of the NADH of the isoniazid target (*inhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **279**: 98-102.
7. **Argrou, A., Jin, I., Siconilfi-Baez, I., et al.**, 2006, Proteome-wide profiling of isoniazid targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, **45**: 13947-13953.
8. **Glenn P. Morlock, Robert C. Cooksey, et al.**, 2003, *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 3799-3805.
9. **Diana Machado, Miguel Viveiros, et al.**, 2013, High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutation. *J Antimicrob Chemother*, **68**: 1728-1732.
10. **Telenti, A., Imboden, P., Marchesi F., et al.**, 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341:647-650.
11. **Williams, D. L., Spring I., Collins L., et al.**, 1998. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agent Chemother*, **42**: 1853-1857.
12. **Mitchison, D. A.** 1985. The action of anti-tuberculosis drugs in short course chemotherapy, *Tubercle*, **66**: 219-225.
13. **Wade, M. M., Zhang, Y.**, 2004. Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*, **53**: 769-773.

14. **Wade, M. M., Zhang, Y.,** 2006. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, **58**: 936-941.
15. **Scorpio, A., Zhang, Y.,** 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*, **2**: 662-667.
16. **Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H. et al.,** 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinamide in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol.*, **181**: 2044-2049.
17. **Boshoff, H. I., Mizrahi, V., Barry, C. E. III,** 2002, Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthesis. *J Bacteriol*, **184**: 2167-2172.
18. **Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., et al.,** 1997. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agent Chemother*, **41**: 540-543.
19. **Lematitre, N., Sougakoff, W., Truffot-Pernot, C., et al.,** 1999. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of pyrazinamidase PncA. *Antimicrob Agent Chemother*, **43**: 1761-1763.
20. **Takayama, K., Kilburn, J.,** 1999. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*, *Antimicrob Agent Chemother*, **43**: 2317-2319.
21. **Hazbon, M. H., Bobadilla del Valle, M., Gurrero, M. I., et al.,** 2005. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agent Chemother*, **49**: 3794-3802.
22. **Alcaide, F., Pfyffer G. E., Telenti, A.,** 1997. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agent Chemother*, **41**: 2270-2273.
23. **Piersimoni, C., Olivieri, L. Benacchio, and C. Scarparo.** 2006. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. *J. Clin. Microbiol.* **44**:20–28.

24. **Hillemann, D., M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter, and S. Niemann.** 2005. Use of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3699–3703.
25. **Somoskovi, A., J. Dormandy, D. Mitsani, J. Rivenburg, and M. Salfinger.** 2006. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based GenoType MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4459–4463.
26. **Telenti, A., N. Honore', C. Bernasconi, J. March, A. Ortega, H. E. Takiff, and S. T. Cole.** 1997. Genotyping assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J. Clin. Microbiol.* **35**:719–723.
27. **Bang, D., A. B. Andersen, and V. O. Thomsen.** 2006. Rapid genotypic detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2605–2608.
28. **Ma'kinen, J., H. J. Marttila, M. Marjamaki, M. K. Viljanen, and H. Soini.** 2006. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:350–352.
29. **Miotto, P., F. Piana, V. Penati, F. Canducci, G. B. Migliori, and D. M. Cirillo.** 2006. Use of GenoType MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2485–2491.
30. **Traore, H., A. van Deun, I. C. Shamputa, L. Rigouts, and F. Portaels.** 2006. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4384–4388.

31. **Hillemann, D., Sabine R-G, and E. Richter.** 2007. Evaluation of the Genotype MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2635–2640.
32. **Barnard, M., H. Albert, G. Coetzee, R. O'Brien, and M. E. Bosman.** 2008. Rapid molecular screening for multidrug resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**:787-792.
33. **Banada PP, Sivasubramani SK, Blakemore R, Boehme C, Perkins MD, Fennelly K, and Alland D.** 2010. Containment of bioaerosol infection risk by the Xpert MTB/RIF assay and its applicability to point-of-care settings. *J Clin Microbiol.* 48:3551-7.
34. **Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, Gler MT, Blakemore R, Worodria W, Gray C, Huang L, Caceres T, Mehdiyev R, Raymond L, Whitelaw A, Sagadevan K, Alexander H, Albert H, Cobelens F, Cox H, Alland D, Perkins MD.** 2011. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet.* 30:1495-505.
35. **Long R, Akwar H, Baikie M, Case C, Ellis E, Elwood K, Gaskell D, Graham B, Hemsley C, Hoepfner V and others.** 2007. Housing conditions that serve as risk factors for tuberculosis infection and disease. An Advisory Committee Statement(ACS). *Can Commun Dis Rep* 33(ACS-9):1-13.
36. **Narayanan S.** 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120:233-247.
37. **Diel R, Seidler A, Nienhaus A, Rusch-Gerdes S, and Niemann S.** 2005. Occupational risk of tuberculosis transmission in a low incidence area. *Respir Res* 6:35.
38. **Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, Le Pendeven C, Le Pennec MP, Mathieu D, offredo C and others.** 1998. Molecular fingerprinting of

*Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J Clin Microbiol 36: 486-492.

39. **Binkin NJ, Vernon AA, Simone PM, McCray E, Miller BI, Schieffelbein CW, and Castro KG.** 1999. Tuberculosis prevention and control activities in The United States : an overview of the organization of tuberculosis services. Int J Tuberc Lung Dis 3(8) : 663-674.
40. **Meya DB, and McAdam KP.** 2007. The TB pandemic: an old problem seeking new solutions. J Intern Med 261:309-329.
41. **Malik, A.N., Godfrey-Faussett, P.,** 2005. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. Lancet Infect. Dis. 5, 174-183.
42. **Jou, R., Chiang, C.Y., Huang, W.L.,** 2005. Distribution of the Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J. Clin. Microbiol. 43, 95-100.
43. **Chuang, P.C., Liu, H., Sola, C., Chen, Y.M., Jou, R.,** 2008. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of a high tuberculosis burden aboriginal township in Taiwan. Infect. Genet. Evol. 8, 553-557.
44. **Comas, I., Homolka, S., Niemann, S., Gagneux, S.,** 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PLoS ONE 4, e7815.
45. **Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P.M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J.C., Kremer, K., Petrov, D.A., Feldman, M.W., Gagneux, S.,** 2008. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. PLoS Biol. 6, e311.
46. **Chuang, P.C., Chen, Y.M., Chen, H.Y., Jou, R.,** 2010. Single nucleotide polymorphisms in cell wall biosynthesis-associated genes and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* lineages. Infect. Genet. Evol. 10, 459-466.

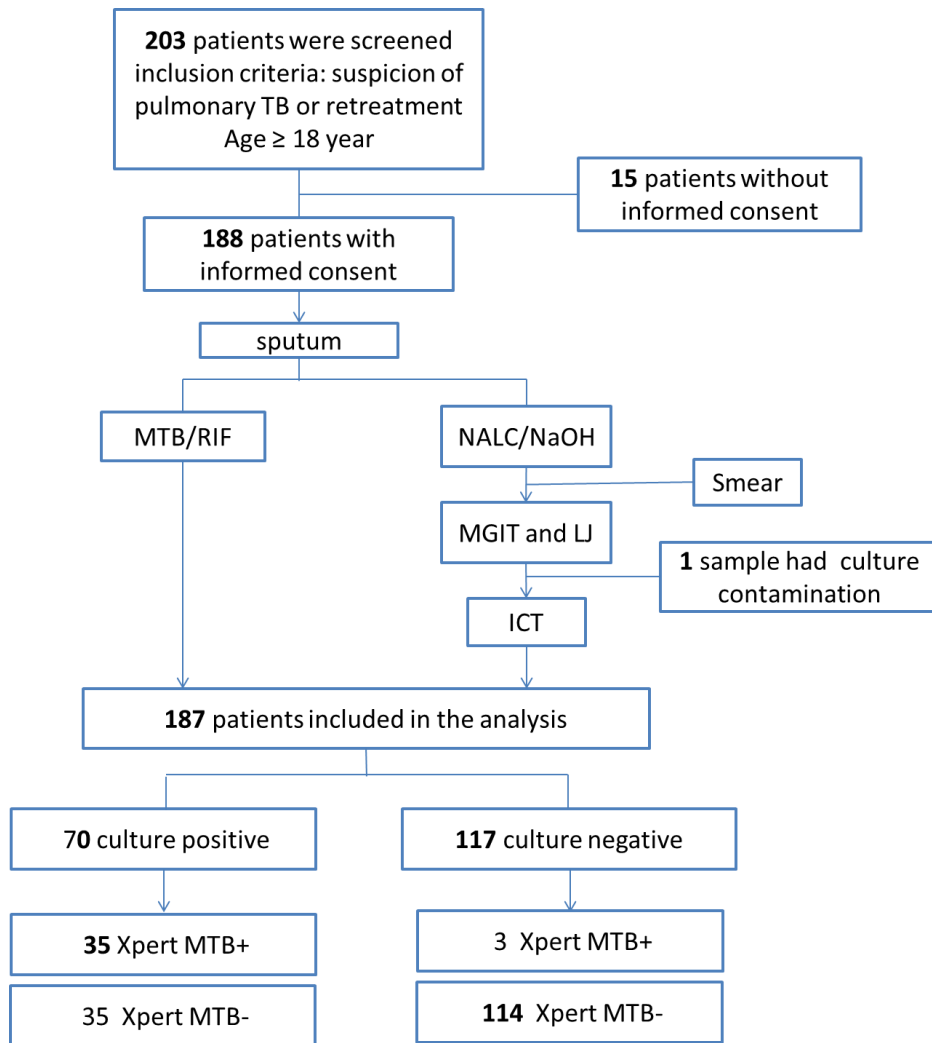


47. **Buu, T.N., Huyen, M.N., Lan, N.T., Quy, H.T., Hen, N.V., Zignol, M., Borgdorff, M.W., Cobelens, F.G, van Soolingen, D.**, 2009. The Beijing genotype is associated with young age and multidrug-resistant tuberculosis in rural Vietnam. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13, 900–906.
48. **Baranov, A.A., Mariandyshev, A.O., Mannsaker, T., Dahle, U.R, Bjune, G.A.**, 2009. Molecular epidemiology and drug resistance of widespread genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in northwestern Russia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13, 1288–1293.
49. **Mlambo, C.K., Warren, R.M., Poswa, X., Victor, T.C., Duse, A.G, Marais, E.**, 2008. Genotypic diversity of extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) in South Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 99–104.
50. **van der Spuy, GD, Kreme, K, Ndabambi, SL, Beyers, N, Dunbar, R, Marais, BJ, van Helden, PD, Warren, RM.**, 2009. Changing *Mycobacterium tuberculosis* population highlights clade-specific pathogenic characteristics. *Tuberculosis (Edinb).* 89, 120-125.
51. **Agarwal M, Gunal S, Durmaz R, Yang Z.** 2010. Integration of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing and genotyping with epidemiological data analysis to gain insight into the epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol.* 48, 3301-3305.
52. **Cohen T, Murray M, Abubakar I, Zhang Z, Sloutsky A, Arteaga F, Chalco K, Franke MF, Becerra MC.** 2011. Multiple introductions of multidrug-resistant tuberculosis into households, Lima, Peru. *Emerg Infect Dis.* 17, 969-975.
53. **Ghebremichael S, Groenheit R, Pennhag A, Koivula T, Andersson E, Bruchfeld J, Hoffner S, Romanus V, Källenius G.** 2010. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing genotype does not spread in Sweden. *PLoS One.* 5, e10893.
54. **Hu Y, Hoffner S, Jiang W, Wang W, Xu B.** 2010. Extensive transmission of isoniazid resistant *M. tuberculosis* and its association with increased multidrug-resistant TB in two

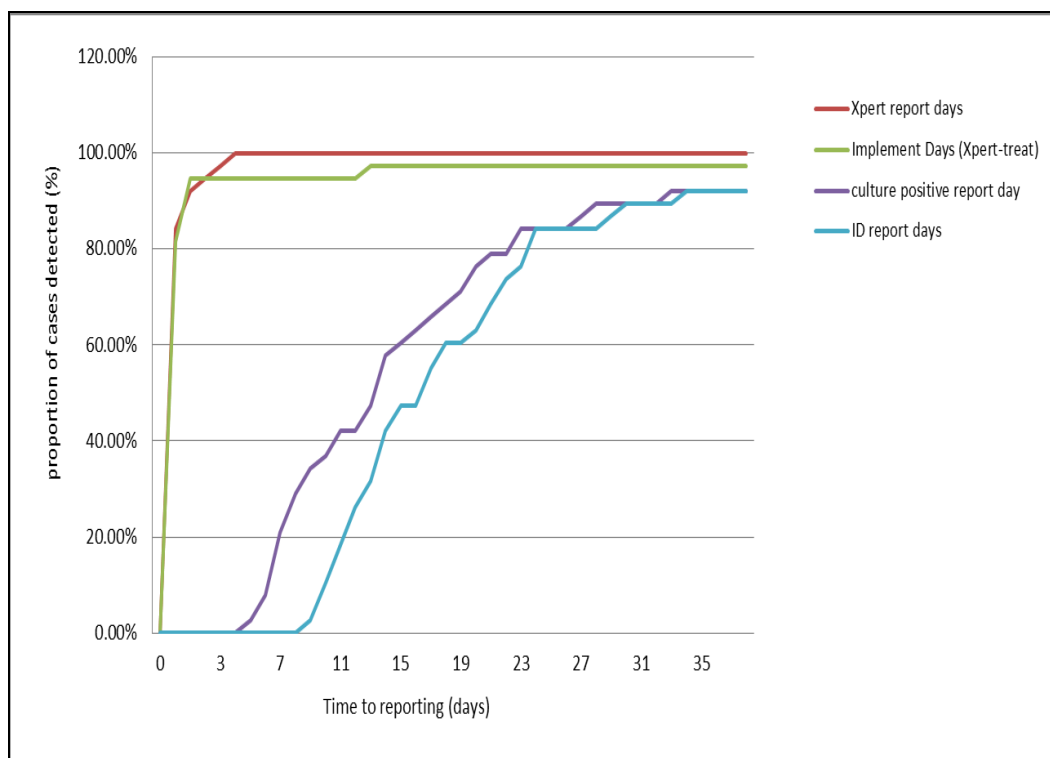
rural counties of eastern China: a molecular epidemiological study. *BMC Infect Dis.* 10, 43.

55. **Ioerger TR, Feng Y, Chen X, Dobos KM, Victor TC, Streicher EM, Warren RM, Gey van Pittius NC, Van Helden PD, Sacchettini JC.** 2010. The non-clonality of drug resistance in Beijing-genotype isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the Western Cape of South Africa. *BMC Genomics.* 11, 670.
56. **Metcalf JZ, Kim EY, Lin SY, Cattamanchi A, Oh P, Flood J, Hopewell PC, Kato-Maeda M.** 2010. Determinants of multidrug-resistant tuberculosis clusters, California, USA, 2004-2007. *Emerg Infect Dis.* 16, 1403-9.
57. **Niemann S, Diel R, Khechinashvili G, Gegia M, Mdivani N, Tang YW.** 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. *J Clin Microbiol.* 48, 3544-3550.
58. **Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannon BJ.** 2006. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 312, 1944-1946.
59. **Borrell S, Gagneux S.** 2009. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 13:1456-1466.

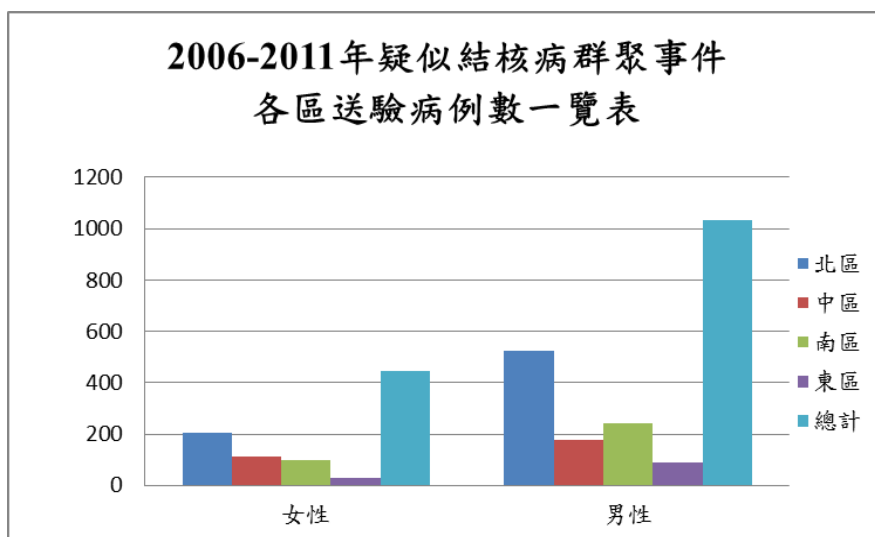
圖一 收案及檢體測試流程



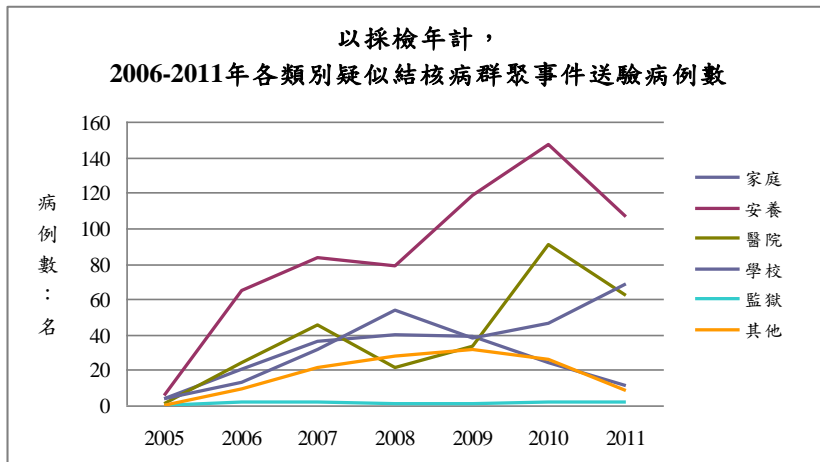
圖二 Proportion of cases detected and reporting time of tests



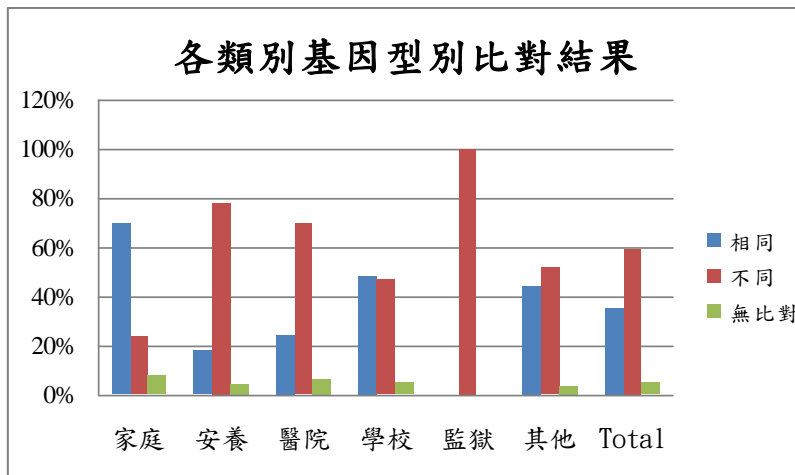
圖三



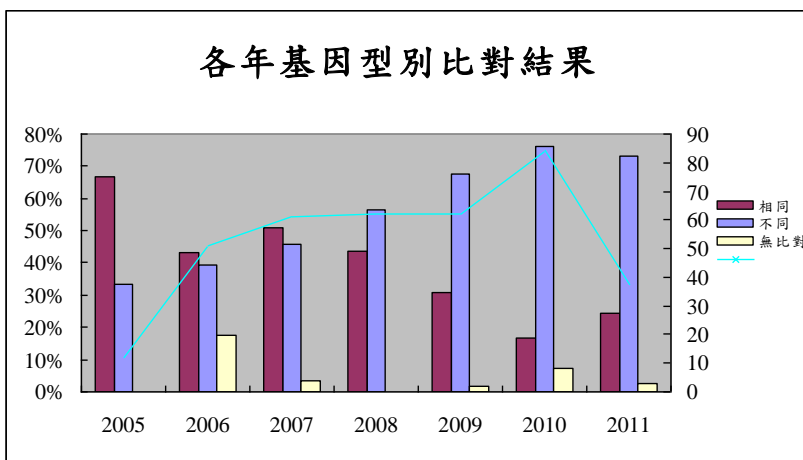
圖四 2005-2011年各類事件通報數



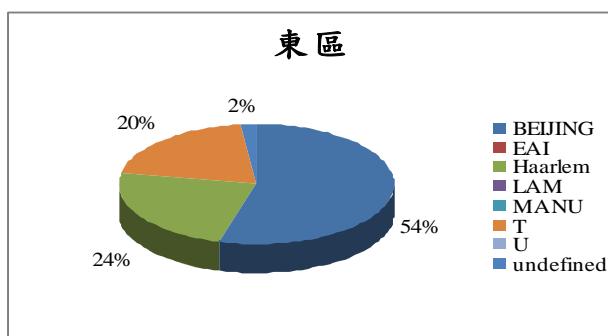
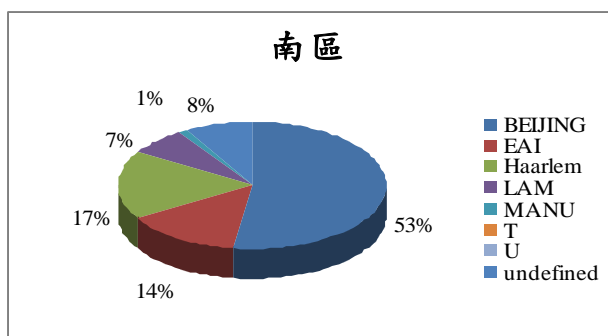
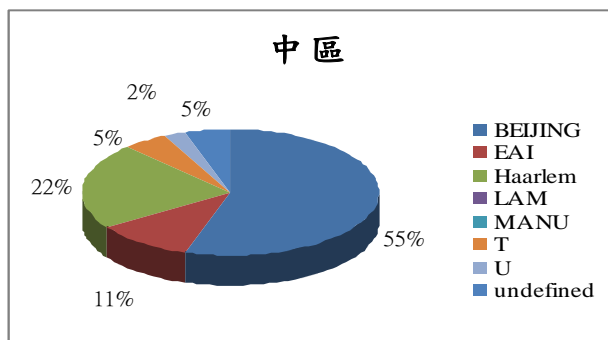
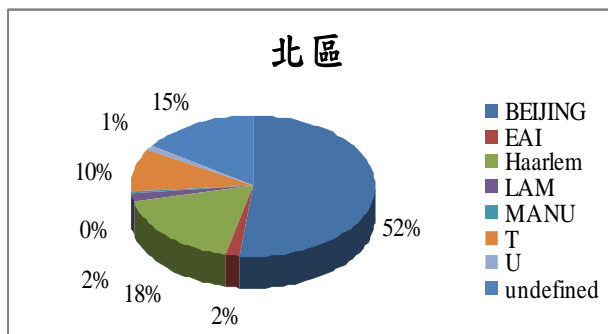
圖五各類事件基因型別比對結果



圖六 2005-2011年送驗菌株基因型別比對結果



圖七 基因型別相同個案之地區性分析



表一 740 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with single mutation at the *rpoB* gene and their rifabutin susceptibility

				Mutations conferring RFB resistance, as confirmed by the MIC assay <sup>b</sup>					
Codon/mutation	Amino acid changes	No. of isolates	No. of RFB-resistance isolates (%)	Anthony et al. (1)	Beckler et al. (3)	Cavusoglu et al. (4)	Heep et al. (12)	Yang et al. (20)	Yoshida et al. (21)
143	CGT/TGT <sup>a</sup>	R→C	1	0 (0)					
146	GTC/TTC	V→F	6	6 (100)			A	A	
511	CTG/CCG	L→P	3	0 (0)					N
513	CAA/AAA	Q→K	10	10 (100)				A	A
	CAA/CTA	Q→L	4	4 (100)	A			A	
	CAA/GAA	Q→E	1	1 (100)					
	CAA/CCA	Q→P	7	7 (100)		A			
516	GAC/TAC	D→Y	14	0 (0)		N		N	
	GAC/GTC	D→V	22	0 (0)		N		N	N
	GAC/TTC	D→F	8	0 (0)					
522	TCG/TTG	S→L	5	0 (0)	N	A (S→W)			N
526 <sup>c</sup>	CAC/CGC	H→R	18	18 (100)	A	A		A	A
	CAC/TAC	H→Y	53	53 (100)	A	A		A	A
	CAC/GAC	H→D	32	32 (100)	A	A		A	A
	CAC/CAA	H→Q	2	2 (100)					
	CAC/CCC	H→P	1	1 (100)	A			A	A
	CAC/TGC	H→C	2	0 (0)		N			N (low)

	CAC/CTC	H→L	11	0 (0)				N	A
	CAC/ACC	H→T	1	0 (0)					
	CAC/AAC	H→N	4	0 (0)					
529	CGA/CTA <sup>a</sup>	R→L	1	0 (0)				N	
531	TCG/TTG	S→L	491	491 (100)	A			A	A
	TCG/TGG	S→W	16	16 (100)	A		A	A	
533 <sup>d</sup>	CTG/CCG	L→P	27	8 (29.6)		A	N	N	A
Total			740	649 (87.7)					

<sup>a</sup> Novel mutations found in this study.

<sup>b</sup> A, represents mutations which were associated with resistance, N, represents mutations which were not associated with resistance.

<sup>c</sup> Mutations at codon 526 were divided into two groups, one was associated with RFB resistance and the other was not.

<sup>d</sup> Isolates with CTG 533CCG were partially resistant to RFB.



表二 Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with triple mutations, double mutations or deletion in the *rpoB* gene

	Mutated codons	No. of MDR isolates	No. of RFB-susceptible isolates
Triple mutations	A501T <sup>a</sup> , H526R, R529Q <sup>a</sup>	1	
Double mutations	V146A, L533P	3	
	T480I <sup>a</sup> , S531L	3	
	L533P, E562A	2	1
	D444V <sup>a</sup> , S531L	1	
	S531L, I561V	1	
	Q513E, M558K <sup>a</sup>	2	
	E458K <sup>a</sup> , Q513L	1	
	L511P, M515L	1	1
	D516Y, Q148R <sup>a</sup>	2	
	D516G, I572F	1	
	S164P <sup>a</sup> , H526N	1	
	L511P, S512G	1	
	H526N, L533P	4	
	N518S, H526P	1	
	D516Y, T525I	1	
	D516G, L533P	2	
	D516Y, L533P	1	
	D516N, H526D	2	
	D516Y, H526D	1	
	D516G, S522W	2	2
	L511 silent, H526Y	1	
	L511P, H526N	2	
	L511R, D516A	1	
	L511P, F505L	1	1
	V144A <sup>a</sup> , V146F	1	
	V146F, S164P	1	
Deletion	509-511 <sup>a</sup> (or 510-512)	2	2
	517	2	2
	9 bp at 513-516 <sup>a</sup>	1	
	518 (or 519)	1	1
Total		47	10 (21.3%)

<sup>a</sup> Novel mutations found in this study.

表三 Results of *rpoB* and *rpoC* mutations of 17 multidrug-resistant tuberculosis outbreaks

Cluster NO.	ST NO	Lineage	No. of isolates	rpoB							rpoC														
				173	513	516	526	531	533	561	172	433	468	483	485	491	525	527	698	969	1140	1252			
1	2090	H3	$\frac{1}{1}$	R→C	-	D→Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\frac{-}{A→V}$	-	$\frac{-}{V→L}$	
2	523	Manu_ancestor	3	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N→S	-	-	-	-	-	
3	1	Beijing	3	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	V→G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E→D	-
4	1	Beijing	11	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	V→G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1	Beijing	3	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1	Beijing	$\frac{1}{1}$	-	-	-	-	-	L→P	-	-	-	-	$\frac{N→S}{-}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1	Beijing	2	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	V→G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1	Beijing	3	-	-	D→Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	913	T1	2	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	-	-	-	H→Q	-	-	-	-	-	-	-	
10	742	H	$\frac{1}{1}$	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\frac{-}{L→V}$ mix	-	-	-
11	316	H3	4	-	-	-	-	S→L	-	-	-	G→S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	1	Beijing	$\frac{1}{1}$	-	-	-	-	S→L	-	I→V	-	-	-	-	-	-	$\frac{-}{I→V}$	-	-	-	-	-	-	-	-
13	19	EAI2-Manila	3	-	-	-	-	S→L	-	-	A→V	-	-	V→A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1	Beijing	2	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	-	D→Y	-	-	-	-	-	-	-	-	E→D	-
15	1	Beijing	2	-	-	-	H→N	-	L→P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E→D	-
16	1	Beijing	15	-	-	-	-	S→L	-	-	-	-	-	-	D→Y	-	-	-	-	-	-	-	-	E→D	-
17	1	Beijing	2	-	Q→P	-	-	-	-	-	-	-	-	V→A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表四 284 株多重抗藥性結核菌株 spoligotype 基因型分析

Spoligotype	No. of isolates (%)
Beijing family	133 (100)
Beijing	123 (92.5)
Beijing-like	10 (7.5)
Non-Beijing	151 (100)
EAI2	1 (0.7)
EAI2-Manila	22 (14.6)
EAI4-VNM	1 (0.7)
H	21 (13.9)
H3	38 (25.2)
LAM6	2 (1.3)
LAM9	1 (0.7)
Manu_ancestor	6 (4.0)
Manu2	1 (0.7)
T	2 (1.3)
T1	6 (4.0)
T2	9 (6.0)
Undefined*	32 (21.2)
Unknown**	9 (6.0)

\*undefined: same spoligotype, no assigned shared type

\*\*unknown: no spoligtype assigned

表五 北京與非北京株結核菌 INH 與 ETH 基因與藥物交互抗藥關聯性分析

Genotype	INH (L/H)*	ETH	<i>inhA</i> (C-15T)		p-value	<i>katG</i> (S315T)		p-value
			mutation	wild-type		mutation	wild-type	
Beijing family (n=133)	RR	R	9	27	<b>0.0277</b>	20	16	0.2757
	RR	S	4	55		40	19	
	RS	R	16	8	0.4924	0	24	
	RS	S	7	7		0	14	
Non-Beijing (n=151)	RR	R	19	13	<b>0.0001</b>	8	24	<b>0.0004</b>
	RR	S	4	79		52	31	
	RS	R	16	2	<b>0.0045</b>	0	18	

表六 Characteristics of 188 enrolled cases and 38 Xpert MTB/RIF positive cases

Characteristics	Case enrolled (n= 188)	Xpert/MTB positive (n= 38)
<b>Patient characteristics</b>		
Median age (yr [range])	65 (15-96)	56 (15-93)
No. of males (%)	123 (65.4)	30 (78.9)
<b>TB history</b>		
New cases	138 (73.4)	27 (71.1)
No. of contact TB case (%)	38 (20.2)	13 (34.2)
No. of no contact TB case (%)	22 (11.7)	1 (2.6)
No. of unknown (%)	78 (41.5)	13 (34.2)
Retreatment cases	47 (25.0)	5 (13.2)
Other	3 (1.6)	
<b>AFB smear grade (no. [%])</b>		
Negative	144 (76.6)	7 (18.4)
Scanty	6 (3.2)	1 (2.6)
1+	14 (7.4)	9 (23.7)
2+	4 (2.1)	3 (7.9)
3+	8 (4.3)	6 (15.8)
4+	12 (6.4)	12 (31.6)
<b>Days to MTBC positive culture (no.</b>		

[%])

NA	123 (65.4)	3 (7.9)
7-14	31 (16.5)	22 (57.9)
15-21	16 (8.5)	8 (21.1)
>21	18 (9.6)	5 (13.2)
Median days [range]	15 (5-47)	14 (36.8)

### Extent of disease on chest radiograph

(no. [%])

NA	25 (13.3)	
Minimal	44 (23.4)	4 (10.5)
Moderate / no cavitation	94 (50.0)	25 (65.8)
Moderate / cavitation	5 (2.7)	1 (2.6)
Severe / no cavitation	12 (6.4)	4 (10.5)
Severe / cavitation	8 (4.3)	4 (10.5)

### Symptoms and signs (no. [%])

Cough	164 (87.2)	34 (89.5)
Fever	86 (45.7)	21 (55.3)
Weight loss	47 (25.0)	21 (55.3)
Night sweats	20 (10.6)	11 (28.9)
Anorexia	26 (13.8)	9 (23.7)
Respiratory distress	29 (15.4)	3 (7.9)
Mechanical ventilation	5 (2.7)	2 (5.3)
Tachypnea	19 (10.1)	3 (7.9)

Hypoxemia	1 (9.9)	1 (2.6)
Hemoptysis	11 (5.9)	0 (0.0)
Shortness of breath	6 (3.2)	0 (0.0)

---

表七 Results of Xpert MTB/RIF, smear, culture and identification of 188\* enrolled cases

AFB Smear (No.)	Xpert results	Culture result (No.)		culture positive and ICT result (No.)		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
		positive	negative	MTBC	Non-MTBC				
		Positive (38)	positive	29	1				
	negative and error	7	1	2	5				
Negative (143)	positive	5	2	4	1	57.1%	95.7%	80.0%	88.0%
	negative and error	25	111	3	22				
Scanty (6)	positive	1	0	1	0				
	negative	3	2	1	2				

\* 1 had culture contamination



表八 Characteristics of enrolled cases from 3 clinical settings

Hospital	胸腔 (N= 237)	高醫 (n= 54)	部彰 (n= 21)
Characteristics	Xpert positive (n=41)	Xpert positive (n=10)	Xpert positive (n=3)
<b>Patient characteristics</b>			
Median age (yr [range])	56 (20-90)	69 (23-89)	66 (43-79)
No. of males (%)	33 (80.5)	8 (80.0)	3 (100.0)
<b>TB history</b>			
New cases	31 (75.6)	9 (90.0)	1 (33.3)
No. of contact TB case (%)	7 (17.1)	0 (0.0)	1 (33.3)
No. of no contact TB case (%)	18 (43.9)	8 (80.0)	0 (0.0)
No. of unknown (%)	6 (14.6)	1 (10.0)	0 (0.0)
Retreatment cases	6 (14.6)	1 (10.0)	1 (33.3)
Other	2 (4.9)	0 (0.0)	1 (33.3)
NA	2 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>AFB smear grade (no. [%])</b>			
NA	20 (48.8)	0 (0.0)	1 (33.3)
Negative	6 (14.6)	4 (40.0)	0 (0.0)
Scanty	4 (9.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
1+	2 (4.9)	2 (20.0)	0 (0.0)
2+	5 (12.2)	2 (20.0)	0 (0.0)
3+	2 (4.9)	1 (10.0)	0 (0.0)
4+	2 (4.9)	1 (10.0)	2 (66.7)
<b>Days to MTBC positive culture (no. [%])</b>			
7-14	0 (0.0)	1 (10.0)	2 (66.7)
15-21	2 (4.9)	3 (30.0)	0 (0.0)
>21	2 (4.9)	3 (30.0)	0 (0.0)
Median days [range]	29.5 ( 15-57)	17 (11-24)	12(11-13)
NA	37 (90.2)	3 (30.0)	1 (33.3)
<b>Extent of disease on chest radiograph (no. [%])</b>			
NA	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Minimal	7 (17.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Moderate / no cavitation	11 (26.8)	8 (80.0)	2 (66.7)
Moderate / cavitation	9 (22.0)	2 (20.0)	1 (33.3)

Severe / no cavitation	4 (9.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
Severe / cavitation	10 (24.4)	0 (0.0)	0 (0.0)

**Symptoms and signs (no. [%])**

Cough	40 (97.6)	9 (90.0)	1 (33.3)
Fever	7 (17.1)	2 (20.0)	1 (33.3)
Weight loss	13 (31.7)	1 (10.0)	0 (0.0)
Night sweats	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Anorexia	1 (2.4)	1 (10.0)	0 (0.0)
Respiratory distress	4 (9.8)	2 (20.0)	0 (0.0)
Mechanical ventilation	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Tachypnea	5 (12.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
Hypoxemia	0 (0.0)	1 (10.0)	0 (0.0)
Hemoptysis	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Shortness of breath	2 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)

---

表九 Characteristics of 836 MDR cases, 2009-2014

年份	2009	2010	2011	2012	2013	2014 (1/1-11/7)	總計
<b>個案數</b>	<b>175</b>	<b>159</b>	<b>153</b>	<b>131</b>	<b>126</b>	<b>92</b>	<b>836</b>
新案	117 ( 66.9% )	111 ( 69.8% )	109 ( 71.2% )	101 ( 77.1% )	97 ( 77.0% )	75 ( 81.5% )	610 ( 73.0% )
重開	58 ( 33.1% )	48 ( 30.2% )	44 ( 28.8% )	30 ( 22.9% )	29 ( 23.0% )	17 ( 18.5% )	226 ( 27.0% )
<b>性別</b>							
<b>新案</b>	<b>117</b>	<b>111</b>	<b>109</b>	<b>101</b>	<b>97</b>	<b>75</b>	<b>610</b>
男	77 ( 65.8% )	78 ( 70.3% )	79 ( 72.5% )	70 ( 69.3% )	74 ( 76.3% )	52 ( 69.3% )	430 ( 70.5% )
女	40 ( 34.2% )	33 ( 29.7% )	30 ( 27.5% )	31 ( 30.7% )	23 ( 23.7% )	23 ( 30.7% )	180 ( 29.5% )
<b>重開</b>	<b>58</b>	<b>48</b>	<b>44</b>	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>17</b>	<b>226</b>
男	40 ( 69.0% )	34 ( 70.8% )	31 ( 70.5% )	26 ( 86.7% )	19 ( 65.5% )	13 ( 76.5% )	163 ( 72.1% )
女	18 ( 31.0% )	14 ( 29.2% )	13 ( 29.5% )	4 ( 13.3% )	10 ( 34.5% )	4 ( 23.5% )	63 ( 27.9% )
<b>年齡層</b>							
<b>新案</b>	<b>117</b>	<b>111</b>	<b>109</b>	<b>101</b>	<b>97</b>	<b>75</b>	<b>610</b>
<=24	5 ( 4.3% )	1 ( 0.9% )	4 ( 3.7% )	5 ( 5.0% )	4 ( 4.1% )	3 ( 4.0% )	22 ( 3.6% )
25-34	16 ( 13.7% )	10 ( 9.0% )	8 ( 7.3% )	13 ( 12.9% )	15 ( 15.5% )	5 ( 6.7% )	67 ( 11.0% )
35-44	13 ( 11.1% )	12 ( 10.8% )	15 ( 13.8% )	13 ( 12.9% )	9 ( 9.3% )	3 ( 4.0% )	65 ( 10.7% )
45-54	17 ( 14.5% )	19 ( 17.1% )	16 ( 14.7% )	21 ( 20.8% )	21 ( 21.6% )	11 ( 14.7% )	105 ( 17.2% )
55-64	28 ( 23.9% )	19 ( 17.1% )	28 ( 25.7% )	16 ( 15.8% )	23 ( 23.7% )	24 ( 32.0% )	138 ( 22.6% )
>=65	38 ( 32.5% )	50 ( 45.0% )	38 ( 34.9% )	33 ( 32.7% )	25 ( 25.8% )	29 ( 38.7% )	213 ( 34.9% )
<b>重開</b>	<b>58</b>	<b>48</b>	<b>44</b>	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>17</b>	<b>226</b>
<=24	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	1 ( 3.4% )	0 ( 0.0% )	1 ( 0.4% )
25-34	3 ( 5.2% )	2 ( 4.2% )	3 ( 6.8% )	5 ( 16.7% )	0 ( 0.0% )	2 ( 11.8% )	15 ( 6.6% )
35-44	9 ( 15.5% )	7 ( 14.6% )	6 ( 13.6% )	3 ( 10.0% )	5 ( 17.2% )	2 ( 11.8% )	32 ( 14.2% )
45-54	5 ( 8.6% )	9 ( 18.8% )	8 ( 18.2% )	5 ( 16.7% )	7 ( 24.1% )	3 ( 17.6% )	37 ( 16.4% )
55-64	10 ( 17.2% )	10 ( 20.8% )	12 ( 27.3% )	6 ( 20.0% )	9 ( 31.0% )	2 ( 11.8% )	49 ( 21.7% )
>=65	31 ( 53.4% )	20 ( 41.7% )	15 ( 34.1% )	11 ( 36.7% )	7 ( 24.1% )	8 ( 47.1% )	92 ( 40.7% )
<b>地理區域</b>							
<b>新案</b>	<b>117</b>	<b>111</b>	<b>109</b>	<b>101</b>	<b>97</b>	<b>75</b>	<b>610</b>
台北區	34 ( 29.1% )	29 ( 26.1% )	26 ( 23.9% )	29 ( 28.7% )	26 ( 26.8% )	26 ( 34.7% )	170 ( 27.9% )
北區	8 ( 6.8% )	10 ( 9.0% )	14 ( 12.8% )	10 ( 9.9% )	12 ( 12.4% )	7 ( 9.3% )	61 ( 10.0% )
中區	30 ( 25.6% )	26 ( 23.4% )	21 ( 19.3% )	21 ( 20.8% )	14 ( 14.4% )	17 ( 22.7% )	129 ( 21.1% )
東區	14 ( 12.0% )	14 ( 12.6% )	7 ( 6.4% )	11 ( 10.9% )	8 ( 8.2% )	3 ( 4.0% )	57 ( 9.3% )
南區	16 ( 13.7% )	12 ( 10.8% )	23 ( 21.1% )	12 ( 11.9% )	21 ( 21.6% )	11 ( 14.7% )	95 ( 15.6% )
高屏區	15 ( 12.8% )	20 ( 18.0% )	18 ( 16.5% )	18 ( 17.8% )	16 ( 16.5% )	11 ( 14.7% )	98 ( 16.1% )
<b>重開</b>	<b>58</b>	<b>48</b>	<b>44</b>	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>17</b>	<b>226</b>
台北區	17 ( 29.3% )	13 ( 27.1% )	14 ( 31.8% )	8 ( 26.7% )	11 ( 37.9% )	2 ( 11.8% )	65 ( 28.8% )
北區	5 ( 8.6% )	7 ( 14.6% )	2 ( 4.5% )	3 ( 10.0% )	5 ( 17.2% )	3 ( 17.6% )	25 ( 11.1% )
中區	14 ( 24.1% )	7 ( 14.6% )	10 ( 22.7% )	3 ( 10.0% )	1 ( 3.4% )	4 ( 23.5% )	39 ( 17.3% )
東區	6 ( 10.3% )	5 ( 10.4% )	0 ( 0.0% )	4 ( 13.3% )	4 ( 13.8% )	1 ( 5.9% )	20 ( 8.8% )
南區	6 ( 10.3% )	7 ( 14.6% )	8 ( 18.2% )	5 ( 16.7% )	4 ( 13.8% )	4 ( 23.5% )	34 ( 15.0% )
高屏區	10 ( 17.2% )	9 ( 18.8% )	10 ( 22.7% )	7 ( 23.3% )	4 ( 13.8% )	3 ( 17.6% )	43 ( 19.0% )

表十 Genotypes of 836 MDR isolates including new and relapse cases, 2009-2014

年份	2009	2010	2011	2012	2013	2014 (1/1-11/7)	總計
個案數	<b>175</b>	<b>159</b>	<b>153</b>	<b>131</b>	<b>126</b>	<b>92</b>	<b>836</b>
新案	117 ( 66.9% )	111 ( 69.8% )	109 ( 71.2% )	101 ( 77.1% )	97 ( 77.0% )	75 ( 81.5% )	610 ( 73.0% )
重開	58 ( 33.1% )	48 ( 30.2% )	44 ( 28.8% )	30 ( 22.9% )	29 ( 23.0% )	17 ( 18.5% )	226 ( 27.0% )
<b>Spoligotype</b>							
新案	117	111	109	101	97	75	610
Beijing	66 ( 56.4% )	51 ( 45.9% )	53 ( 48.6% )	60 ( 59.4% )	52 ( 53.6% )	33 ( 44.0% )	315 ( 51.6% )
Manu_ancestor	4 ( 3.4% )	1 ( 0.9% )	2 ( 1.8% )	2 ( 2.0% )	2 ( 2.1% )	3 ( 4.0% )	14 ( 2.3% )
Haarlem	15 ( 12.8% )	18 ( 16.2% )	20 ( 18.3% )	16 ( 15.8% )	14 ( 14.4% )	11 ( 14.7% )	94 ( 15.4% )
EAI	5 ( 4.3% )	12 ( 10.8% )	6 ( 5.5% )	6 ( 5.9% )	6 ( 6.2% )	4 ( 5.3% )	39 ( 6.4% )
T	5 ( 4.3% )	6 ( 5.4% )	8 ( 7.3% )	4 ( 4.0% )	10 ( 10.3% )	2 ( 2.7% )	35 ( 5.7% )
LAM	1 ( 0.9% )	0 ( 0.0% )	1 ( 0.9% )	1 ( 1.0% )	1 ( 1.0% )	0 ( 0.0% )	4 ( 0.7% )
Manu	1 ( 0.9% )	1 ( 0.9% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	2 ( 0.3% )
Bovis	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	1 ( 0.9% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	1 ( 0.2% )
CAS	1 ( 0.9% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	1 ( 0.2% )
Unknown	6 ( 5.1% )	5 ( 4.5% )	5 ( 4.6% )	1 ( 1.0% )	2 ( 2.1% )	2 ( 2.7% )	21 ( 3.4% )
undefined	13 ( 11.1% )	15 ( 13.5% )	10 ( 9.2% )	11 ( 10.9% )	10 ( 10.3% )	8 ( 10.7% )	67 ( 11.0% )
negative	0 ( 0.0% )	1 ( 0.9% )	1 ( 0.9% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	2 ( 0.3% )
NA	0 ( 0.0% )	1 ( 0.9% )	2 ( 1.8% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	12 ( 16.0% )	15 ( 2.5% )
重開	58	48	44	30	29	17	226
Beijing	29 ( 50.0% )	24 ( 50.0% )	14 ( 31.8% )	16 ( 53.3% )	14 ( 48.3% )	7 ( 41.2% )	104 ( 46.0% )
Manu_ancestor	3 ( 5.2% )	0 ( 0.0% )	1 ( 2.3% )	1 ( 3.3% )	2 ( 6.9% )	0 ( 0.0% )	7 ( 3.1% )
Haarlem	9 ( 15.5% )	12 ( 25.0% )	14 ( 31.8% )	5 ( 16.7% )	5 ( 17.2% )	5 ( 29.4% )	50 ( 22.1% )
EAI	3 ( 5.2% )	4 ( 8.3% )	4 ( 9.1% )	1 ( 3.3% )	4 ( 13.8% )	0 ( 0.0% )	16 ( 7.1% )
T	5 ( 8.6% )	4 ( 8.3% )	4 ( 9.1% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	2 ( 11.8% )	15 ( 6.6% )
Unknown	1 ( 1.7% )	1 ( 2.1% )	1 ( 2.3% )	2 ( 6.7% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	5 ( 2.2% )
undefined	7 ( 12.1% )	2 ( 4.2% )	6 ( 13.6% )	5 ( 16.7% )	4 ( 13.8% )	1 ( 5.9% )	25 ( 11.1% )
NA	1 ( 1.7% )	1 ( 2.1% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	2 ( 11.8% )	4 ( 1.8% )
<b>Clustering</b>							
新案	117	111	109	101	97	75	610
clustered isolate	23 ( 19.7% )	44 ( 39.6% )	51 ( 46.8% )	49 ( 48.5% )	46 ( 47.4% )	14 ( 18.7% )	227 ( 37.2% )
non-clustered isolat	30 ( 25.6% )	64 ( 57.7% )	58 ( 53.2% )	51 ( 50.5% )	51 ( 52.6% )	24 ( 32.0% )	278 ( 45.6% )
NA	64 ( 54.7% )	3 ( 2.7% )	0 ( 0.0% )	1 ( 1.0% )	0 ( 0.0% )	37 ( 49.3% )	105 ( 17.2% )
重開	58	48	44	30	29	17	226
clustered isolate	7 ( 12.1% )	14 ( 29.2% )	14 ( 31.8% )	16 ( 53.3% )	13 ( 44.8% )	2 ( 11.8% )	66 ( 29.2% )
non-clustered isolat	28 ( 48.3% )	33 ( 68.8% )	30 ( 68.2% )	14 ( 46.7% )	15 ( 51.7% )	6 ( 35.3% )	126 ( 55.8% )
NA	23 ( 39.7% )	1 ( 2.1% )	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )	1 ( 3.4% )	9 ( 52.9% )	34 ( 15.0% )

表十一 Analysis of 291 clustered MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates

TCDC Cluster No	Spoligotype	ST NO	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Size No
C00041	Beijing	1	5	8	2	8	6		29
C00017	Beijing	1	2	1	4	3	2	1	13
C00009	Haarlem	316	2	1	1	3	1	1	9
C00042	EAI	19	2	1	2	1	3		9
C00027	Beijing	1		1	1	2	3	1	8
C00069	Beijing	1	3	4			1		8
C00018	Beijing	1		2		1	2	2	7
C00033	Beijing	1			2	1	3		6
C00040	Beijing	1	1			3	2		6
C00070	Unknown	1487	2	2	2				6
C00056	Beijing	1		2	1		1	1	5
C00037	Manu ancestor	523	2		1		2		5
C00001	undefined	undefined		1	1	1	2		5
C00035	undefined	undefined			3	1	1		5
C00026	Beijing	1		1	1	1	1		4
C00020	Beijing	1		2	2				4
C00065	Beijing	250	1	1	1		1		4
C00051	Haarlem	742	1	1	1			1	4
C00045	Haarlem	742		2		1	1		4
C00049	Haarlem	50		2	1			1	4
C00011	Haarlem	50			1	2	1		4
C00006	undefined	undefined		2		1	1		4
C00034	undefined	undefined	1		2		1		4
C00014	Beijing	1				1	2		3
C00015	Beijing	1			2		1		3
C00016	Beijing	1			2	1			3
C00021	Beijing	1				2	1		3
C00023	Beijing	1			1		1	1	3
C00025	Beijing	1			1		2		3
C00028	Beijing	1			2	1			3
C00029	Beijing	1			2	1			3
C00030	Beijing	1		1	1	1			3
C00055	Beijing	1		1	1	1			3
C00057	Beijing	1				1	2		3
C00060	Beijing	1	1	1	1				3
C00062	Beijing	1	1	1	1				3
C00063	Beijing	1		1				2	3
C00067	Beijing	1		1	1	1			3
C00068	Beijing	1	1	1	1				3
C00013	Beijing	250		1		2			3
C00039	Manu ancestor	523			1	2			3
C00004	Haarlem	50			2	1			3
C00005	Haarlem	50			1	1	1		3
C00008	Beijing	1			1	1	1		2
C00031	Beijing	1			1	1			2
C00032	Beijing	1				2			2
C00043	Beijing	1				1	1		2
C00052	Beijing	1		1		1			2
C00058	Beijing	1			1		1		2
C00059	Beijing	1				1	1		2
C00061	Beijing	1		1		1			2
C00064	Beijing	1		1	1				2
C00066	Beijing	1		1		1			2
C00076	Beijing	1		1	1				2
C00077	Beijing	1	1				1		2
C00078	Beijing	1	1	1					2
C00080	Beijing	1		2					2
C00081	Beijing	1			1			1	2
C00024	Beijing	190			2				2
C00022	Beijing	941			1	1			2
C00079	Beijing	941			1			1	2
C00010	Haarlem	50			2				2
C00044	Haarlem	50		1				1	2
C00050	Haarlem	50		1	1				2
C00053	Haarlem	50		1		1			2
C00075	Haarlem	50						2	2
C00046	Haarlem	742		1		1			2
C00002	Haarlem	2090				1	1		2
C00003	Haarlem	2090				1	1		2
C00073	EAI	19			2				2
C00083	T	52	1		1				2
C00048	T	53		1		1			2
C00084	T	943	1			1			2
C00047	T	2082(TW1)		2					2
C00072	Unknown	955		1		1			2
C00007	undefined	undefined				1	1		2
C00012	undefined	undefined					2		2
C00019	undefined	undefined					2		2
C00038	undefined	undefined				2			2
C00082	undefined	undefined		1	1				2
			29	57	65	65	59	16	291

表十二 Geographic distribution of 291 clustered MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates

TCDC Cluster No	Spoligotype	台北區	北區	中區	南區	高屏區	東區	總計
C00041	Beijing	3	4	1	1	4	16	29
C00017	Beijing			1	1	11		13
C00009	Haarlem	2					7	9
C00042	EAI				2	6	1	9
C00069	Beijing	6				2		8
C00027	Beijing	5			1	1	1	8
C00018	Beijing	2		1	2	2		7
C00040	Beijing	6						6
C00070	Unknown	6						6
C00033	Beijing	5					1	6
C00056	Beijing			5				5
C00001	undefined			3	1	1		5
C00035	undefined	2			1	2		5
C00037	Manu_ancestor	5						5
C00051	Haarlem	3				1		4
C00045	Haarlem		1	1		2		4
C00006	undefined				2	2		4
C00026	Beijing			4				4
C00049	Haarlem			4				4
C00011	Haarlem	1		1	1	1		4
C00020	Beijing	4						4
C00034	undefined			1	3			4
C00065	Beijing		1			3		4
C00029	Beijing				3			3
C00057	Beijing	3						3
C00055	Beijing	2				1		3
C00004	Haarlem		1			2		3
C00062	Beijing	1	1	1				3
C00063	Beijing	1	1		2			3
C00030	Beijing	2	1					3
C00067	Beijing						3	3
C00013	Beijing					3		3
C00015	Beijing				3			3
C00060	Beijing			1	1	1		3
C00025	Beijing				2	1		3
C00023	Beijing		3					3
C00028	Beijing			3				3
C00016	Beijing	1		1	1			3
C00068	Beijing	2				1		3
C00039	Manu_ancestor	1				1	1	3
C00021	Beijing	3						3
C00014	Beijing		1				2	3
C00005	Haarlem			1	2			3
C00079	Beijing				1	1		2
C00084	T			2				2
C00003	Haarlem	1	1					2
C00046	Haarlem			2				2
C00075	Haarlem	2						2
C00047	T						2	2
C00083	T				1	1		2
C00048	T			2				2
C00010	Haarlem	2						2
C00031	Beijing					2		2
C00072	Unknown				2			2
C00050	Haarlem	1	1					2
C00077	Beijing		2					2
C00032	Beijing		1	1				2
C00081	Beijing			2				2
C00052	Beijing	1	1					2
C00064	Beijing			2				2
C00053	Haarlem	2						2
C00066	Beijing						2	2
C00007	undefined			2				2
C00002	Haarlem	1		1				2
C00024	Beijing		2					2
C00044	Haarlem	2						2
C00012	undefined				2			2
C00073	EAI					2		2
C00058	Beijing		2					2
C00076	Beijing				1	1		2
C00059	Beijing					2		2
C00078	Beijing	1		1				2
C00008	Beijing	2						2
C00080	Beijing						2	2
C00061	Beijing			2				2
C00082	undefined	1			1			2
C00038	undefined	1		1				2
C00022	Beijing	1		1				2
C00019	undefined	1	1					2
C00043	Beijing				1	1		2
		84	25	48	38	58	38	291