計畫編號：DOH95-DC-2011

行政院衛生署疾病管制局九十五年度自行研究計畫

台灣地區結核病分子流行病學之研究

研 究 報 告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：周如文

協同主持人：江振源

研究人員：莊珮君、邱辰哲、勤沛儒、劉璇

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見＊

目　　錄

頁　碼

封面

目錄

壹、中英文摘要　（ 3）

貳、本文

一、前言　（ 7）

二、材料與方法　（11）

三、結果　（15）

四、討論　（17）

五、結論與建議　（19）

六、參考文獻　（20）

七、圖、表　（24）

表一、2003-2004 年花蓮縣秀林鄉結核菌群 spoligotype 基因型別 (N=138)

圖一、2003-2004 年花蓮縣秀林鄉結核菌群基因圖譜 (N=122)

圖二、2005-2006 年台北地區結核菌群主要的 spoligotype 基因型別 (N=829)

壹、摘要

研究目的 利用多種以不同基因標的 (genetic marker) 基因分型方法，瞭解臺灣不同地區結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex)株之基因型，以建立結核菌株及基因相關生物資訊系統，並進一步分析台灣不同地區之分子流行病學情況，以提供資料與臨床資訊結合，以達結核病防治之終極目標。

研究方法 主題一，是針對花蓮縣山地鄉中之秀林鄉，自 2003 至 2004 年所收集之結核菌株進行基因分型分析。主題二，是針對台北市自 2005 至 2006 年 9 月所收集之結核菌群菌株進行基因分型分析，收集包含所有新病例、再治療、肺結核、肺外結核病人分離之菌株，以電腦軟體 EXCEL 建立菌株之流病基本資料。運用菌株標準基因分型方法：間隔寡核酸分型法(Spacer oligonulecleotide typing, spoligotyping)及 IS*6110* 限制酵素片段多形性分型法(IS*6110*-restriction fragment length polymorphism, RFLP)進行菌株基因分型。分型結果以 BioNumerics® (Applied Matts, Kortrijk, Belgium)軟體第 4.601 版分析。並與結核菌群第 4 代國際 spoligotyping 資料庫(the fourth international spoligotyping database, SpolDB4)中已定義的 spoligotype 型別資料庫進行比對。

主要發現 主題一，是將 2003 至 2004 年期間共收集自花蓮縣秀林鄉結核菌株138株進行spoligotyping基因分型，其中有122株 (88.4%，122/138)有足夠且好品質之 DNA 可進行 RFLP 基因分型。Spoligotyping 結果顯示，共有 27 個 spoligotypes，在與國際 SpolDB4 進行比對後，其中有 14 個是已知的 shared type (ST) 為，13 個則為台灣地區新發現的 spoligotype。進一步利用 RFLP 基因分型之分析結果顯示，新的

spoligotype TW6、TW7、TW8、TW12 及 TW13 可歸屬於 Harrlem-like family。因此，依據兩種實驗綜合研判結果發現，2003 至 2004 年期間花蓮縣秀林鄉流行之結核菌群，以 Beijing family 佔 41.8% (51/122) 居第一位，Haarlem family 佔 39.3% (48/122) 居第二位，LAM family 佔 6.6% (8/122) 居第三位，T family 佔 4.1% (5/122) 居第四位。主題二，將 2005 至 2006 年 9 月期間收集自台北市區之 829 株結核菌群進行 spoligotyping 基因分型，也與國際 SpolDB4 進行比對。結果顯示，佔第一位為 Beijing family 佔 51.9% (430/829)，第二位為 Harrlem family 佔 11.1% (92/829)，第三位為 EAI family 佔 5.2% (43/829)，第四位為 T family 佔 4.1% (34/829)，而排名第五位 TW7 佔 2.3% (19/829)，雖未在 SpolDB4 資料庫中被定義，但其同屬於花蓮縣秀林鄉 13 個台灣地區新發現的 spoligotype 之一。

結論及建議事項 根據以上結果顯示，台灣地區山地鄉與城市流行之結核菌群型別除 Beijing family 皆為主要盛行之基因型別外，其他 spoligotype 基因型別之分布情況並不完全相同，可推測台灣地區不同地域之結核菌群分布及傳播的分子流行病學情況並不相同。若進一步利用分型鑑別力較佳之 RFLP 基因分型方法，則可更明確分析流行菌株之 clade，如能與公衛及臨床資訊結合，可作為結核病防治之重要參考依據，更有利於日後台灣地區及全球性結核菌分子流行病學之調查研究。

關鍵詞：基因分型、結核菌群、分子流行病學

Abstract

Purpose

The objective of this study is to facilitate a better understanding of the molecular genetic basis of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in different area of Taiwan. Compilation of data obtained from this study will facilitate the understanding of molecular epidemiology in Taiwan and would be essential for efficient treatment and transmission control of the disease.

Material and Methods

M. tuberculosis complex strains isolated from both an aboriginal Shioulin Township and Taipei city were collected from CDC-contract Mycobacteriology laboratories. Genotyping methods, spacer oligonucleotide typing (spoligotyping) and standard IS*6110* restriction fragment length polymorphism (RFLP) were applied in this study. The genotypes were scanned and analyzed using BioNumerics® software, version 4.601 (Applied Maths., Kortijk, Belgium). The resulted spoligotypes were compared to that included in the fourth international spoligotyping database, SpolDB4, published in 2006. The unclassified spoligotypes were further analyzed using RFLP data.

Results

A total of 138 strains were analyzed by spoligotyping, and 122 (88.4%, 122/138) had enough amount of DNA for RFLP genotyping. Of 27 spoligotypes identified, 14 (51.9%, 14/27) spoligotype patterns were identified in SpolDB4 and 13 spoligotype patterns were newly found in Taiwan. The unclassified spoligotypes were further analyzed using RFLP data. The most frequently found was the Beijing family (41.8%, 51/122), followed by Haarlem family (39.3%, 48/122), LAM family (6.6%, 8/122)

and T family (4.1%, 5/122). On the other hand, a total of 829 strains reported from Taipei city were analyzed by spoligotyping. The most frequently found was the Beijing family (51.9%, 430/829), followed by Haarlem family (11.1%, 92/829), EAI family (5.2%, 43/829), T family (4.1%, 34/829) and TW7, a newly found family, (2.3%, 19/829) which is one of the 13 newly found spoligotype patterns in Shioulin Township.

Conclusion and Suggestions

Based on genotyping results of *M. tuberculosis* complex strains isolated from the aboriginal Shioulin Township and Taipei City, the major spoligotype is Beijing family. However, the unique one is LAM family and EAI family in the Shioulin Township and Taipei City, respectively. The active transmission of *M. tuberculosis* clones seemed to be different in these two areas in Taiwan. Combined with results of high discriminative genotyping method, clinical and epidemiology data, a long-term follow-up study would give more information for tuberculosis control.

Key Words: genotyping, *Mycobacterium tuberculosis*, molecular epidemiology

貳、本文

一、前言

結核病是古老的傳染病，主要是個人經由飛沫感染結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) 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 10-20%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，全球每年死亡人數為 2 至 3 百萬 (WHO, 1999)。台灣地區施行全國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，雖然如此每年仍有許多新的病例產生。根據民國九十三年資料顯示，台灣有 24,161 件通報及 17,142 件確診的結核病個案，當年有 957 例死亡個案，發生率為每十萬人中有 75.7 例個案。但是，原住民族群結核病發生率則為每十萬人中有 272.2 例個案，其中秀林鄉結核病發生率更是高達每十萬人中有 647.3 例。結核病現今在台灣仍是一項急待解決的公共衛生問題。目前，秀林鄉主要結核菌之盛行及分佈仍未不清楚。因此接觸者之追蹤及動態傳播狀況並不明確。再者，台北市共有 1450 確定結核病例，每十萬人中有 55.24 例，約佔 10%年度確診個案數。

北京型(Beijing family genotypes)結核菌名稱，起因於 1995 年大陸北京地區 86%結核菌被鑑定出屬於同一型別而命名(Qian, 1999)。後經證實，香港、馬來西亞、越南、蒙古地區、泰國及南韓病人亦大部份因感染此型結核菌而致病；然而此型卻鮮見於芬蘭及印度等地區。一般認為當北京型結核菌株導入並流傳於新族群時，極有可能成為優勢之流行菌株。在越南的研究顯示，北京型結核菌與年輕族群相關，且推論是新進傳播之主要菌型。北京型結核菌並經德國、古巴、愛沙尼亞、蘇聯及南非之相關研究證

實與抗藥性結核菌傳播有關。美國方面也證實，W株結核菌亦屬於北京型並且具高度抗藥性。因此，需要長期監測瞭解台灣地區北京株或其他主要結核菌盛行情形，以規劃更有效率之防治策略。

已知北京型結核菌在全球造成許多大規模流行及抗藥性等問題。本實驗室曾展開調查以瞭解北京型結核菌在台灣地區盛行現狀 (Jou, 2005)。於是隨機由北、中、南及東部四區醫院，收集共 421 株 2002 年臨床分離之結核菌株，利用間隔寡核酸分型方法 (spacer oligonucleotide typing, spoligotyping) 進行北京型分析。本調查共分析出 113 種型別，其中有 28 (24.8%) 型為群組 (cluster)。187 (44.4%) 株為北京型，其中 172 (40.9%) 株為純北京株及 15 (3.6%) 株為類北京株 (Beijing-like)。若依地域分析北京型盛行情形顯示：北部地區佔 51.6%；東區地區佔 46.2%；中部地區佔 31.6%；而南部地區僅佔 28.0%。就年齡層分析，小於 24 歲群組因北京型結核菌致病比例最高 (61.5%)，依次為大於 65 歲群組 (46.8%)，最低者為介於 45 至 54 歲群組 (34.%)。多變相分析結果顯示，地域及年齡與北京型感染具統計上顯著性差異。就抗藥性而言，北京型菌株 (46.4%) 比非北京型 (34.3%) 產生抗藥比例較高，主要因為北京型對 ethambutol 及 isoniazid 較易產生抗藥性。依據以上證據推論，北京型結核菌在台灣應存在已久並造成新近傳播 (recent transmission)。

若由細菌學的角度來探討，抗藥性菌株之基因多樣性(genetic diversity)，可能與某些宿主因素及與不同地理區域所分離結核菌株品系之演化有關。若針對疾病管制局目前已收集之台灣地區抗藥性結核菌株，分析其基因突變機率及多型性，可推斷菌株演化關聯性和傳染動態。結果發

現，台灣地區 rifampicin (RMP) 抗藥或多重抗藥結核菌的盛行，可能較傾向於病患感染結核菌後，基因才陸續發生突變而造成抗藥性，而非透過多重抗藥結核菌直接傳播所導致(Jou R, Chen HY et al., 2005)。目前，並未有在社區出現多重抗藥結核菌株的散佈而造成大流行的報告出現。另外，由近年來結核菌分子流行病學研究發現，全球性盛行之北京株頗具流行病學重要意涵，其對社區感染、結核病再復發和多重抗藥有相當顯著的關聯性。由 2002 年結核菌分子流行病學的調查指出，台灣地區北京株盛行率為 44.4%。而北京型相對於非北京型結核菌，對於 isoniazid (INH) (33.7%, 95% CI 1.0-2.6) 及 ethambutol (EMB) (21.0%, 95% CI 1.1-3.2) 產生抗藥性之比例，具統計上顯著性差異 (Jou, 2005)。另由 2004 年進行之多重抗藥菌株分析報告中指出，有 60.5%結核菌株屬於北京型。

另外台灣山地鄉結核病盛行的情形最令人擔憂。2000 年於台灣山地鄉結核病流行病學分析發現，山地鄉結核病發生率為台灣地區的 2 至 15 倍。2001 年結核病防治年報指出，山地鄉結核病例發生在 25-49 歲青壯年期佔 45.23%，較台灣地區同年齡層的 27.21%高；而且山地鄉結核病人的 12 個月完治率僅達 50%。為瞭解台灣地區山地鄉結核菌群菌株流傳感染近況，以供本局制定結核病防治政策參酌。本研究以 2003-2004 年之山地秀林鄉結核菌培養陽性之結核病人為研究對象，將收集分離自病人之結核菌進行分析。為補強被動發現方式之不足，將配合疾病管制局 X 光例行巡檢防治策略，以加強進行花蓮縣秀林鄉山地鄉結核病病人之主動發現。疑似個案通報後即刻追蹤管理，病人儘速安排就診就醫；另外將其他醫院通報的結核病個案也追蹤管理。

1993 年，世界衛生組織有鑑於全球結核病疫情持續惡化趨勢，推出 Directly Observed Treatment Short-course (DOTS) 之全球結核病防治策略。時至 2000 年，全球僅有 27%塗片陽性新案發現率，這結果被認為擴展太慢。然而，都治計畫涵蓋率並不代表病人發現率及完治率。必須更積極主動發現病人，改進診斷技術，降低診斷與治療上的延誤，以期能快速而有效的控制結核病。反觀，台灣地區目前的結核病防治措施包含：結核病診療網、結核菌檢驗網、卡介苗預防接種、主動發現病人、疫情通報監視、個案治療管理、衛教宣導、人員訓練及研究等方面。而目前已知山地鄉結核病人的 12 個月完治率僅達 50%。目前，秀林鄉主要結核菌之盛行及分佈情形仍未不清楚。因此，結核病接觸者之追蹤及動態傳播狀況並不明確。本年度計畫，就 2003 至 2004 年間，山地秀林鄉結核病個案所分離出結核菌進行基因分型及型別之分析，以瞭解當地盛行之菌株及動態傳播 (recent transmission)之現況。在山地鄉結核病建立傳播監測機制釐清問題，以擬定防治山地鄉結核病之相關有效策略。

另外，北部地區確診個案之北京株結核菌佔 51.6%，因此亦需針對台北地區進行個案所分離出結核菌進行基因分型及型別之分析，以瞭解地域性、人口密集度及主要菌株傳播型態之調查，已供擬定都會區結核病之相關防治策略參考。

二、材料與方法

(一) 菌株及資料收集

研究族群包括正發病病人、連續發病病人，將以電腦軟體 Excel 建立菌株之流病基本資料，儘可能包括：菌株分離者與單位；採檢與菌株分離日期病人之姓名、年齡、性別、地址、國籍；其它疾病歷史及其他相關流病資料等。檢體已經過標準化程序分離，菌株收集自台灣地區醫療院所。秀林鄉部份，配合配合疾病管制局 X 光檢查，由疾病管制局協調安排 X 光車篩檢資源，進行密集性篩檢。X 光片異常之民眾先行通報並安排至醫院就診、取痰而檢體則送代檢實驗室檢驗。另外，每週進入疾病管制局通報網站，收集各醫療院所通報的山地鄉結核病患，主動聯絡確定是否收集痰檢體進行檢驗，並追蹤結核菌培養結果。透過醫院發現個案並與診治，循防疫體系通報通知疾病管制局並收集醫療院所通報結核病患之檢體積極進行驗痰工作及接觸者檢查。所有 213 個通報之新病例、再治療、肺結核、肺外結核病人中，155 個結核菌培養陽性個案。2003-2004 分離之結核菌株皆先由臨床實驗室經細菌培養及生化鑑定確認為結核分枝桿菌群。一個病人原則上只收集一株分離之結核菌。本研究共收集到秀林鄉 138 株(89%, 138/155)；另外，台北地區則由台北市衛生局協助提供新案之 829 株結核菌群菌株。

(二) 細菌學檢驗

菌株先利用 L-J 固體培養基系統確認分枝桿菌後，進行分子分型及菌株保存。

(三) 基因體分析

1. 全基因體核糖核酸之萃取及定量

挑出至少 2 接種環(直徑約 0.5cm)的菌，放入裝有 400μL 1×TE 的離心管中滅菌;80℃加熱 30 分鐘,在室溫中冷卻。預熱 CTAB/NaCl solution 至 65℃。加入 50μL 的 10 mg/mL lysozyme，均勻混合，在 37℃水浴至少 1 小時。之後加入 75μL 的 10% SDS/proteinase K solution,均勻混合，於 65℃加熱 10 分鐘。再加入 100μL 的 5M N_aCl 與 100μL 65℃預熱的 CTAB/N_aCl 溶液，均勻混合至溶液成乳白色後，於 65℃加熱 10 分鐘。加入 750μL 的 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)，均勻混合約 10 秒。以 11,000g 離心 8 分鐘，將上清液移至另一乾淨微量離心管中。慢慢加入 0.6 倍體積的 isopropanol，輕晃，加速 DNA 沉澱下來。置於-20℃至少 30 分鐘。加入 1 mL 的-20℃70%(v/v) 乙醇，輕翻轉微量離心管數次後加入 1 mL 的-20℃ 70%(v/v)乙醇，輕翻轉微量離心管數次。以 11,000g 離心 5 分鐘後倒掉管中大部分液體，僅留下約 20μL 液體再以 11,000g 離心 1 分鐘。以微量吸管小心吸去管壁剩餘液體後，讓沉積於離心管底部的 DNA 於室溫中陰乾；檢查酒精是否完全蒸發，若尚未完全蒸發，則延長陰乾時間。最後加入 1×TE 將 DNA 沉澱物溶解。吸取 100μL 1×TE 至一乾淨的石英管中，放入分光光度計中歸零。將已歸零的石英管取出後，先以 70% 酒精沖洗，再用二次水沖洗後吸出殘餘的水分。取 2μL 待測的 DNA 加上 98μL 1×TE，均勻混合後，放入已洗淨的石英管中，放入分光光度計中測定 260nm 的吸光值。濃度的計算公式為：260nm 的吸光值×50×50＝【DNA 濃度】μg/mL。菌株收集

（二）菌株標準基因分型方法

1. IS*6110* 限制酵素片段多形性分型法 (IS*6110*-restriction fragment length polymorphism, RFLP)

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%瓊脂凝膠中以電泳方式將 DNA 片斷分層。再利用南方墨點法轉移至融合膜上，續以 DIG 標幟之 IS*6110* 核酸探針進行核酸融合反應。即可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。

2. 間隔寡核酸分型法 (Spacer oligonulecleotide typing, spoligotyping)

依據 Kamerbeek 方法，此法以 PCR 為分析原理。需由檢體中分離大約 10 ng 之基因組的 mycobacterial DNA，當 biotin 標幟之 primer 與模板 DNA 經 PCR 放大後融合至已先固定化之 43 種 spacer DNA 序列之膜上，再與 steptavidin peroxidase 作用，訊號可以任何 biotin 偵測系統紀錄。每一黑點視為一 band，不同分型菌株具不同 banding pattern。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。

(三) 資料收集：

1. 菌株流病資料電腦檔之建立

將以電腦軟體 EXCEL 建立菌株之流病基本資料：包括菌株分離者與單位；採檢與菌株分離日期病人之姓名、年齡、性別、地址；發病日期；其它疾病歷史及其他相關流病資料等(問卷範例之一如附)。由分枝桿菌實驗室負責菌株與流病資料之彙集與建檔工作，將收集菌株流病資料加以彙整之後，建置資訊交流平台，以利其掌握檢驗室之陽性檢驗資料。

2. 資料分析

RFLP 及 Spoligotyping 圖譜之影像檔以 BioNumerics® (Applied Matts, Kortrijk, Belgium)軟體第 4.601 版分析。依據核酸分子量標記 (DNA size marker) 定位法及特定菌株之定義，及利用 unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering 或 neighbor-joining 方法，常態化圖譜後，依疾管局規範編號建檔，並與菌株之流病資料連結。採用 Dice Index 分析相似性 (計算誤差容忍度為 3.0%)，將具相似圖譜之結核菌分類並以樹狀圖 (dendrogram) 標示，做成可供比對型式之數位化資料與資料庫。將所得的 spoligotypes 與世界資料庫中所包含的基因型別先進行比對。無法歸類之 spoligotypes 則進一步藉由 RFLP 型別分析以預做歸類。Spoligotype 基因型則與 2006 年公佈之國際 SpolDB4 進行比對。

(四) 資料庫建置

疾管局分枝桿菌實驗室將建置病人流病資料、菌株庫及以 BioNumerics®為主之基因資料庫聯結系統。

三、結果

在 213 個結核病通報案例中，有 155 個 (72.8%, 155/213)為結核菌群培養陽性確定案例。而在所有 155 株中僅有 122 株(78.7%, 122/155)其 DNA 量足夠進行 RFLP 基因分型實驗；而有 138 株(89.0%, 138/155)有 spoligotyping 結果。至於，17 株沒有 spoligotyping 資料之菌株，究其原因是其中 11 株菌無法由臨床實驗室取得，而有 6 株是因為無法由臨床實驗室所提供之儲存冷凍菌液解凍再培養。

針對 2003 至 2004 年期間，共收集自花蓮縣秀林鄉 138 株結核菌群進行 spoligotyping 基因分型，其中有 122 株 (88.4%，122/138) 有足夠且好品質之 DNA 可進行 RFLP 基因分型。在 138 株之 Spoligotyping 分析結果顯示，共有 27 個 spoligotypes。在與國際 SpolDB4 進行比對後，其中有 14 個已知 shared type (ST)，13 個則為台灣地區新發現的 spoligotype。Spoligotype 之型別，分布頻率及對應之國際資料庫 ST 編號整理如表一。Spoligotype 排名如下：Beijing spoligotype ST1 pattern (35.5%, 49/138)、H3 lineage ST742 pattern (10.9%, 15/138)、LAM3 lineage ST33 (5.8%, 8/138)、H3 linage ST50 (5.8%, 5/138)。其他，還包含 ST37 (T3)、ST51 (T1)、ST53 (T1)、ST75 (H3)、ST316 (H3)、ST946 (H3)、ST250 (Beijing-like)、ST260 (Beijing)、ST54 (MANU2)及 ST684 (*M. bovis* 1)。為了分析其餘 13 個無法對應於國際 SpolDB4 資料庫之 spoligotype，乃進一步利用 RFLP 基因分型進行 clade 分析。於可進行 RFLP 分析之 122 株結核菌中，若將 clade 定義為 RFLP 基因型別具 70% 以上相似度(similarity)。則結果顯示，共發現有 9 個 clades (圖一)。其中，clade I 對照 SpolDB4 資料庫是屬於 Bovis 1 spoligotype；屬於 clade

II 及 clade III 的 spoligotype TW12、TW13 及 TW6、TW7、TW8 可推論同歸屬於 Harrlem-like family。邏輯上的演化途徑是 H3 的先驅者 ST50 有可能衍生成下游的 ST47，進而往下衍生 ST742；而 ST742 又可能往下衍生 ST316、ST946、TW7、TW6 與 TW8 (圖一)。而的確他們也都具有 6 個相同的 IS*6110* bands 與相似的 spoligotype。在 clade V 與 clade VII 中的菌株屬於 Beijing family lineage；clade VI 中，有一已知的 H3 sublineage 為 ST50；而 clade IX 主要是尚未被明確定義的 T lineage/sublineage。綜觀，在本篇研究中所有 138 株完成之 spoligotype 基因型中，在資料庫中已被定義的有 Beijing family、Haarlem、T、LAM3、Bovis 1 與 MANU2 lineages；而相反的 CAS 1、EAI、LAM (除了 LAM 3)與 X lineage 基因型，則在秀林鄉尚未被發現。因此，依據 RFLP 及 spoligotyping 結果綜合研判，2003 至 2004 年期間花蓮縣秀林鄉流行之結核菌，以 Beijing family 佔 41.8% (51/122) 居第一位，Haarlem family 佔 39.3% (48/122) 居第二位，LAM family 佔 6.6% (8/122) 居第三位，T family 佔 4.1% (5/122) 居第四位。相關流行病學問卷資料因收集不易，持續收集中，尚未能最後分析。

另外，針對 2005 至 2006 年 9 月期間，收集自台北地區 829 株結核菌群進行 spoligotyping 基因分型，並與國際 SpolDB4 資料庫進行比對。初步結果整理於表二：佔第一位為 Beijing family 佔 51.9% (430/829)，第二位為 Harrlem family 佔 11.1% (92/829)，第三位為 EAI family 佔 5.2% (43/829)，第四位為 T family 佔 4.1% (34/829)，而排名第五位(TW7，見圖二)佔 2.3% (19/829)，並未在 SpolDB4 資料庫中被定義，但同屬於秀林鄉 13 個台灣地區發現之新 spoligotype 其中的一種。

四、討論

在本實驗室先前的調查中，發現台灣地區的結核菌群菌株之基因型主要為北京型(44.4%)。而依據兩種實驗綜合研判結果發現在 TB 盛行之花蓮秀林鄉中，主要盛行之結核菌 lineages 為以 Beijing family 佔 41.8% (51/122) 居第一位，第二位為 Haarlem family 佔 39.3% (48/122)，LAM family 佔 6.6% (8/122) 居第三位，T family 佔 4.1% (5/122) 居第四位；台北地區為 Beijing family 佔 51.9% (430/829)，第二位為 Harrlem family 佔 11.1% (92/829)，第三位為 EAI family 佔 5.2% (43/829)，第四位為 T family 佔 4.1% (34/829)。這些結果顯示，特定基因型菌株似乎已在某些地區傳播很長的一段時間，而且特殊地域可能侷限結核菌群菌株的傳播。

根據 2005 報告，在台灣東部地區北京型 lineage 結核菌的盛行率約為 46.2%。因此，北京型 lineage 在花蓮秀林鄉的高盛行率是可以預期的。但是高盛行率(40.9%) Haarlem lineage 結核菌的發現卻相當令人震驚。事實上，如果此 lineage 盛行率為 40%的話，則是因為歷史性及與該基因型 active 傳播所致。可以假設：(1)在台灣 Haarlem lineage 的引進較早於北京型 lineage；(2)或是兩種 lineage 於同一個時期引進台灣，並據傳播之相當能力。檢視歷史資料(見 www.taiwandc.org)，發現前項假設較有可能成立。台灣最早是由馬來人與玻里尼西亞人所殖民，相信是玻里尼西亞人遷移史的源頭(the Express train theory, see Gray et al. 2000)。這可以解釋為何台灣會出現 Haarlem clade。而台灣近代史若追溯到西元 1590 年代，當第一艘西方船隻航行經過的時候，一位在葡萄牙船上的荷蘭航海家 Jam Huygen van Linschoten 稱台灣為 "***Ilha Formosa***"(意思是指美麗的島嶼) 之後，台灣便由荷蘭人所殖民。我們可以假設歷史上結核菌 Harrlem 基因型，是於此時期引進的，而且與這些荷蘭殖民者有關，進而傳播到其他地區。而 ST33

基因型，在台灣秀林鄉鎮出現，也可以同時藉由過去歐洲殖民史來解釋。在漢族文化引進前，台灣東部地區無庸置疑的是台灣最有機會去追溯結核菌群受歷史上與人類學上的影響，遺留下來的痕跡。再者，進一步分析 Haarlem 專一性的 SNP，如 *mutT3*、*ogt* 或是 *mgt*，則可以更進一步瞭解到歐洲與台灣的 Haarlem 菌株間的關聯性(Rad et al. 2003, Alix et al. 2006)。至於，在西元 1700 到 1900 年之間，中國大陸沿海各省移民到台灣地區的人增加，可能造成現今主要 Beijing 基因型結核菌之流行。

另外，在台北地區發現的 EAI-2-Manilla clade(5.2%)，可能已在亞太區存在已久。而最近藉由 MIRU 基因分型結果顯示，EAI2-Manilla clade (ST19)與 EAI2-Nonthaburi clade (ST89)，於物種史上有相關性，且後者有可能是前者的後代(Sola et al., 尚未發表的結果)。我們將進一步調查 EAI-2-Manilla 基因型結核菌之演化史與 “Express Train theory”的潛在關聯性，甚至與菲律賓人、泰國人與夏威夷人之間的關聯性。再者，在台北地區 829 株結核菌 spoligotyping 結果發現的 TW7(圖二)同樣在花蓮縣秀林鄉發現，此種基因型的傳播方式與是否為台灣地區特有，有待於之後的研究繼續探討。

根據以上結果顯示，台灣地區山地鄉與城市流行之結核菌群型別除 Beijing family 皆為主要盛行之基因型別外，其他 spoligotype 基因型別之分布情況並不完全相同，可推測台灣地區不同地域之結核菌群分布及傳播的分子流行病學情況並不相同。若進一步利用分型鑑別力較佳之 RFLP 基因分型方法，則可更明確分析流行菌株之 clade，如能與公衛及臨床資訊結合，可作為結核病防治之重要參考依據，更有利於日後台灣地區及全球性結核菌分子流行病學之調查研究。

五、結論與建議

SpolDB4 資料庫中發現數個主要 spoligotyping 基因型之 lineages: Beijing、Beijing-like、Central-Asian (CAS)、East-African-Indian (EAI)、Haarlem (H), Latin-American-Mediterranean (LAM), Manu、X 及 T types。其中，Beijing family、EAI 及 T lineages 在遠東(Far-East Asia)區盛行 (各約 50%、30% 及 10%)。在此次秀林鄉及台北地區結核菌群的盛行調查中，發現結核菌之群組結構(population structure)、重要基因 clades 及獨特 spoligotypes 。結果並顯示，特定基因型菌株似乎已在某些地區傳播很長的一段時間，而且特殊地域可能限制結核菌群菌株之傳播。這些資料訊息有利於日後台灣地區及全球性結核菌分子流行病學之調查研究。

結核菌群之分子流行病學研究乃結合分子生物技術及臨床流行病學資訊以進行完整之菌株流行趨勢分析，以提供實驗室資訊作為病防治之實證依據。根據本研究結果顯示，台灣地區不同地域之菌株分部仍有所差異，顯示不同的傳播及流行在各地區可能有所不同。因此，本計畫將持續利用已建立之標準化分子基因分型方法，針對已收集之台灣地區菌株建立菌株資料庫及進行分子流行病學研究，藉此基礎研究提供結核病防治上參考。

七、參考文獻

Alix E, S. Godreuil, and A. B. Blanc-Potard: Identification of a Haarlem Genotype-Specific Single Nucleotide Polymorphism in the mgtC Virulence Gene of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2006;44:2093-8.

Barnes P. F, and M. D. Cave: Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003;349:1149-56.

Brudey K, J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Prodinger, A. Gori, S. A. Al-Hajoj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Guttierez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadival, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, M. L. Ho, C. Martin, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaia, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofo-Razanamparany, T. Rasolonavalona, M. L. Rossetti, S. Rusch-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. G. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskovi, R. A. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. C. Victor, R. M. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola: Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006;6:23.

Glynn J. R, J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer, and D. van Soolingen: Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002;8:843-9.

Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JDA: Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium

tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 1993;10:1057-65.

Jou R, C. Y. Chiang, and W. L. Huang: Distribution of the Beijing family genotypes of Mycobacterium tuberculosis in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005;43:96-100.

Kamerbeek J, L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden: Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.

Kovalev S. Y, E. Y. Kamaev, M. A. Kravchenko, N. E. Kurepina, and S. N. Skorniakov: Genetic analysis of mycobacterium tuberculosis strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:746-52.

Kremer K, J. R. Glynn, T. Lillebaek, S. Niemann, N. E. Kurepina, B. N. Kreiswirth, P. J. Bifani, and D. van Soolingen: Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacterium tuberculosis on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol* 2004;42:4040-9.

Kremer K, D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martin, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. van Embden: Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18.

Mokrousov I, O. Narvskaya, T. Otten, A. Vyazovaya, E. Limeschenko, L.

Steklova, and B. Vyshnevskyi: Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in northwestern Russia. *Res Microbiol* 2002;153:629-37.

Saitou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.

Sepkowita KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D: Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Micro Rev* 1995;8:180-99.

Small PM, van Embden JDA: Molecular epidemiology of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington. *American Society for Microbiology* 1994:569-82.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS: Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci* 1997;97:9869-74.

Supply P, S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht: Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001;39:3563-71.

van Embden J. D, M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and et al: Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-9.

van Soolingen D, L. Qian, P. E. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H. Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, and J. D. van Embden:

Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995;33:3234-8.

Victor, T. C., P. E. de Haas, A. M. Jordaan, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. van Soolingen, P. D. van Helden, and R. Warren: Molecular characteristics and global spread of Mycobacterium tuberculosis with a western cape F11 genotype. *J Clin Microbiol* 2004;42:769-72.

Victor T. C, A. van Rie, A. M. Jordaan, M. Richardson, G. D. van Der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, and R. Warren: Sequence polymorphism in the rrs gene of Mycobacterium tuberculosis is deeply rooted within an evolutionary clade and is not associated with streptomycin resistance. *J Clin Microbiol* 2001;39:4184-6.

Warren R. M, E. M. Streicher, S. L. Sampson, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. Nguyen, M. A. Behr, T. C. Victor, and P. D. van Helden: Microevolution of the direct repeat region of Mycobacterium tuberculosis: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol* 2002;40:4457-65.

Meyer A: In: Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J, editors. New uses for new phylogenies. London: *Oxford University Press* 1996: 322-40.

WHO, The world health report 1999, Geneva: *WHO* 1999:110.

Yu M. C, K. J. Bai, J. H. Chang, and C. N. Lee: Tuberculosis incidence and mortality in aboriginal areas of Taiwan, 1997-2001. *J Formos Med Assoc* 2004;103:817-23.

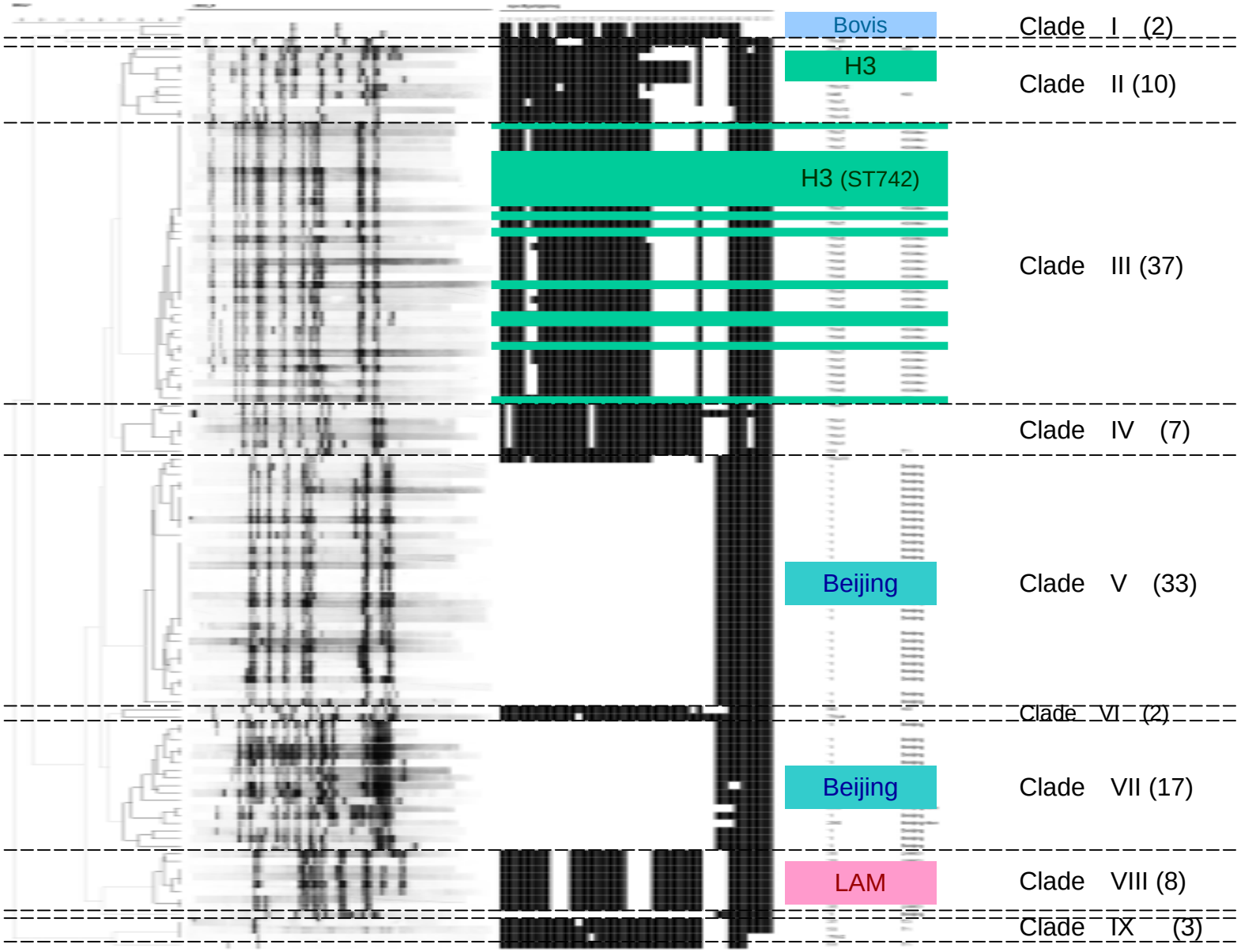
七、圖、表

表一、2003-2004 年花蓮縣秀林鄉結核分枝桿菌 spoligotype 基因型別 (N=138)

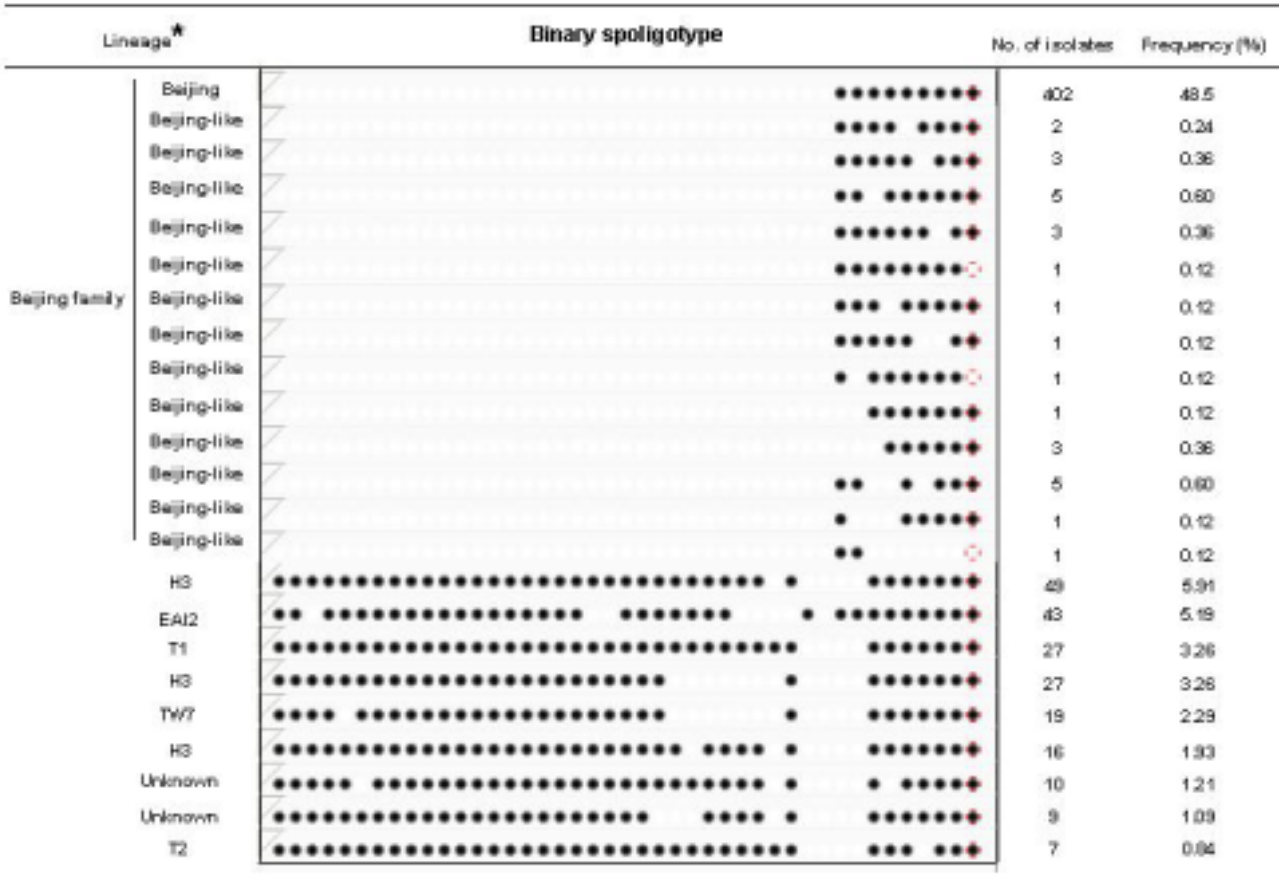
No.	ST No.	Lineage*	Binary spoligotype	No. of isolates	Frequency (%)
1	53	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	3	2.17
2	50	H3	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	5	3.62
3	75	H3	■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	1	0.72
4	37	T3	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1	0.72
5	54	MANU2	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■	1	0.72
6	N1	Unkown	■□■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	8	5.80
7	51	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□□□□□	1	0.72
8	N2	Unkown	■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□□□□□	1	0.72
9	N3	Unkown	■□■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1	0.72
10	N4	Unkown	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1	0.72
11	N5	Unkown	■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1	0.72
12	33	LAM3	■■■■■■■■□□□■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	8	5.80
13	N6	Unkown	■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	13	9.42
14	N7	Unkown	■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	12	8.70
15	N8	Unkown	■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	1	0.72
16	316	H3	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■□■■■	2	1.45
17	742	H3	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	15	10.87
18	N9	Unkown	■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	1	0.72
19	N10	Unkown	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□■■■■■■■■■	1	0.72
20	N11	Unkown	■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□■■■■■■■■■	1	0.72
21	946	H3	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	2	1.45
22	N12	Unkown	■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■□■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	1	0.72
23	N13	Unkown	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□■■■■■■■	2	1.45
24	684	Bovis1	■■□■■□■■□■■■■■■□■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□	2	1.45
25	1	Beijing	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■	49	35.51
26	260	Beijing	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■□□■■■■■	1	0.72
27	250	Beijing-like	□□■■■■■	3	2.17

* spoligotype was assigned according the fourth international spoligotyping database.

圖一、2004-2005 年花蓮縣秀林鄉結核分枝桿菌基因圖譜 (N=122)



圖二、2005-2006 年台北地區結核菌主要的 spoligotype 基因型別 (N=829)



* spoligotype was assigned according the fourth international spoligotyping database.