

計畫編號：DOH94-DC-2028

行政院衛生署九十四年度

自行研究計畫

建立台灣地區抗藥性結核分枝桿菌菌株與基因資料庫

研究報告

執行機構： 行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人： 周如文

研究人員： 莊珮君、劉璇、勤沛儒、邱辰哲、陳盟勳、陳煌耀、張
素英、楊正大、蔡旻蓉、黃偉倫

執行期間： 九十四年一月一日至九十四年十二月三十一日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見＊＊

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	(14)
四、討論	(16)
五、結論與建議	(17)
六、參考文獻	(18)
七、圖、表	(23)

壹、摘要

研究目的利用多種以不同基因標的(genetic marker)分子分型方法，瞭解臺灣地區結核分枝桿菌之抗藥性菌株之基因型，並建立結核分枝桿菌菌株及基因相關生物資訊系統，提供基礎與臨床研究(如：開發結核菌診斷、治療及疫苗等)運用，以達結核病防治之終極目標。

研究方法從 2004 年及 2005 年台灣地區結核分枝桿菌菌株資料庫中，選取結核分枝桿菌抗藥性菌株，進行抗藥性分析，利用結核分枝桿菌菌株限制酵素片段多形性分型法(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)以及間隔寡核酸分型法(Spacer Oligonucleotide Typing, Spoligotyping)菌株分型系統，將結核分枝桿菌菌株精確分型，建立基因資料庫，與本國流病資料結合以了解結核菌抗藥性分子流行模式。

主要發現 2004 及 2005 年各收集 1,245、3,038 株具有抗藥資料之結核菌株。其中各有 971 及 1,331 株完成 spoligotyping，北京基因型分別佔 40.5% 及 41.5%。另外，僅有 613 及 466 株具有足夠量及質量佳的菌株完成 IS6110 RFLP 分子分型分析。共包含 78 株多重抗藥菌株：東部菌株 58 株、北部菌株 12 株及南部菌株 8 株，而中部則無。其中，60 株(76.9 %)的基因型為單一型態(unique type)，其餘 18 株(23.1 %)分為 7 個群組(cluster)：1 個群組含有 5 株相同型、1 個群組有 3 株相同型及 5 個群組各有 2 株相同型；除了一個 2 株的群組為北部菌株，其他群組菌株皆為東部菌株。

結論及建議事項因為菌株收集方式尚未系統化，此分析報告尚無法呈現台灣地區抗藥菌株之型別分佈情形，只可初步推估台灣地區多重抗藥菌株基本上並無大規模流傳情形發生。另外，北京基因型與多重抗藥性不具統計上之關聯性。建議需長期追蹤抗藥性菌株之分佈與變異情形，以瞭解

治療與個案管理成效。

關鍵詞：抗藥性、結核分枝桿菌菌株、基因資料庫

Abstract

Purpose

The objective of this study is to facilitate a better understanding of the molecular genetic basis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) strains in Taiwan. Compilation of data obtained from this study will facilitate the development of a rapid method for the early diagnosis of tuberculosis and identification of resistance to first-line antituberculosis drugs that are essential for efficient treatment and transmission control of the disease.

Material and Methods

A total of 1,245 and 3,038 drug-resistance *M. tuberculosis* strains were collected in 2004 and 2005, respectively from several clinical Mycobacteriology laboratories in different geographic regions of Taiwan. Both spoligotyping and standard IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis were applied in this study. Drug susceptibility testing for each isolate was performed using an indirect agar proportion method or MGIT liquid system. multidrug-resistant (MDR) tuberculosis was defined as isolates resistant to at least isoniazid and rifampin. The genotypes were scanned and analyzed using Bionumerics® software, version 2.0 (Applied Maths., Kortrijk, Belgium). A statistical analysis was performed using EpiInfo 6.04 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.).

Results

Overall, a RFLP dendrogram of 78 MDR strains revealed 60 unique genotypes and 8 clusters. Among the 2,302 drug-resistant isolates genotyped, 41.3% (950/2,302) were Beijing family genotypes.

Conclusion and Suggestions

Based on the results of IS6110 RFLP fingerprinting, the drug-resistance isolates were highly genetic diverse. The transmission of drug-resistance clones was unlikely. A long-term follow-up laboratory program is suggested for monitoring the accomplishment of the National Tuberculosis Program.

Key Words: Drug resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, genomic database

貳、本文

一、前言

結核病(Tuberculosis, TB)是由分枝桿菌所引發的一種傳染性疾病，通常的感染是表現在肺部，但是它的確會侵害人體所有組織，病原體是結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)，可經由咳嗽飛沫傳播 (Small, 1994)。此疾病可以藥物治療，早期之診斷治療可降低發病率及死亡率，只是療程常需達 6-12 個月，病人之合作度是關鍵。人類通常以由減毒之牛型結核桿菌製成之卡介苗(BCG)疫苗來預防肺結核。在西方已開發國家中，一般認為愛滋病(AIDS)流行的結果是造成 TB 再爆發流行主因 (Sepkowitz, 1995)。結核病的臨床症狀為持續性咳嗽、痰中帶有血絲、胸部疼痛、疲勞、食慾不振、體重減輕、虛弱等。結核病檢驗的方式有很多種，胸部 X 光比較不具特異性，但是對肺結核還算敏感 (50-60%)。結核病主要分為肺結核和非肺部的結核，前者又可分為可培養出桿菌之開放性與無培養出桿菌之封閉性肺結核。封閉性肺結核的病人大約是開放性肺結核病人的 2-3 倍。

現今全世界有二千萬個患者，每年增加八百萬個新病例，並造成每年兩百萬人死亡(WHO, 1999)。尤其在最近五年內，在已開發國家中發生的病例急劇上昇，使得 TB 不再侷限於未開發及開發中國家的專利，更演變成為全球的問題。結核病在我國仍是一項急待解決的公共衛生問題。雖然結核病已陪伴人類幾千年，但一直要到二十世紀 40 年代第一個抗結核藥物 streptomycin (SM)出現後，人類才開始能有效治療並控制結核病。隨著抗結核藥物的陸續發明，合併多種藥物的內科治療已成為近五十年來人類對抗結核病的主流；尤其 Rifampin (RMP)合併 Isoniazid (INH)的優異療效於 70 年代被証實之後，少於一年的短期化學治療更躍為標準治癒結核病的方式。多重抗藥性結核病(Multidrug Resistance-TB, MDR-TB)是結核病治療失

敗的重要因素之一，加上近幾年來愛滋病的推波助瀾，其影響結核病防治的角色日益突顯，而如何預防並克服 MDR-TB 已成為全球公共衛生的急切課題。一般皆認為病人服藥的順從性不理想與具抗藥性的結核病人日益增多是造成治療失敗的兩大因素。其中，導致結核病 primary 或 acquired 抗藥性是人為因素居多，主要為處方錯誤、藥物供應不規律、藥物品質不良及病例管理不佳、服藥期不足及選擇性服藥等。

依據前慢性病防治局於 1997-1998 年調查台灣地區治療結核病藥物抗藥性之結果顯示，近 10 年來原發性抗藥所佔比例有增多趨勢，佔 12.3% 高於全球平均值；續發性抗藥為 67%，亦高於全球平均值甚多。而結核菌對抗結核藥物產生抗藥性的主要原因，是由於染色體上的一些抗藥基因產生突變所致，特別是在接受不適當或不完全的藥物治療之病患身上，容易有突變菌株的出現。預防抗藥菌株之進一步散佈，亦是公共衛生上之一重大課題。抗藥性監測計畫為國家 TB 方案(National TB Program)成效評估必要工具。要降低結核病之發生率，除了必須要能監督患者接受抗結核藥物治療完整的療程，以預防其復發並傳染給他人。另外，亦必須藉由菌株分型的工作，以了解其散佈情形與傳播途徑，以便採取適當措施，預防其進一步擴散造成感染。要能夠達到快速追查感染新結核病患者菌株來源之目的，必須有一套結核菌之基因與流行病學資料庫，透過比對及搜尋的方式，從資料庫中找出與過去所有菌株之關聯性。因此本計畫目的，擬由分子基因層次，深入剖析臺灣地區抗藥性結核分枝桿菌之特性即發生率，並建立資料庫供流行病學追蹤研究用。

資料庫中亦將包含其它分子分方法（RFLP 及 spoligotyping）結果。基本上，RFLP 是利用幾乎所有 *M. tuberculosis* 皆含多個 IS-6110 片段之特性（Groenen, 1993），在取得檢體經 decontamination 後，進行菌體培養，抽取 DNA 後以限制酵素定點反應。依照各結核菌型中 IS-6110 於 chromosome

之不同數目及位置等性質，利用 gel electrophoresis 及 western-blotting 技術配合電腦分析軟體進行影像圖譜數位化後 (Meyer, 1996)，以分析軟體如 Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 常態化處理，並將單一菌株之 DNA 圖譜當成單件資料儲存，將圖譜資料配合菌株之流病資料，即為菌株之身分資料，資料庫於是建立。然而，此法因牽涉菌體培養，相當耗時且步驟繁瑣。自 1990 年起，快速 DNA 指紋分型檢驗法先後在不同實驗室發展著，Isogen Bioscience B.V.更推出 Spoligotyping 檢驗套組。其原理為：結核菌之 chromosomal locus 中之”direct repeat”(DR)部位具 spacer DNA 多態現象，可做為菌體分型之依據 (Hermans, 1991)。此法與 RFLP 同樣可利用 unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering (Sneath, 1973) 或 neighbor-joining 方法 (Saitou, 1987)，常態化圖譜後，採用 Dice Index 分析相似性 (計算誤差容忍度為 3.0%)，將具相似 IS-6110 圖譜之結核桿菌分類並以樹狀圖 (dendrogram) 標示，並與菌株之流病資料連結，做成可供比對型式之數位化資料與資料庫。Spoligotyping 是標準分型方法之輔助技術，用於將低套數 IS6110 之菌株分型。

完整的分枝桿菌菌株分型工作必須能夠合併數種不同的分型技術結果，方能達到精確地將菌株分型之目的。目前，本結核分枝桿菌實驗室已著手進行 RFLP 與 spoligotyping 方法的建立與基因資料庫之設立。本計畫擬完整化基因資料庫之基本資料，也藉此瞭解臺灣地區分枝桿菌之抗藥性盛行率及抗藥菌株之基因型。本計畫總目標：除了標準化菌株鑑定與分型操作流程、標準化設備與軟體，培養多元化技術 (微生物、分子生物、流病統計分析及電腦系統等) 人才及建立結核桿菌指紋資料庫外，最重要的是可對台灣地區結核病相關研究建立基本背景資訊，例如：地域特性、地區流行菌株之基因型多樣性、菌株來源 (本土或外來)、菌株傳染途徑、菌株感染族群 (population) 結構、菌株之演化 (Sreevatsan, 1997) 等。由病原

體之多樣性配合流病資料，可供疾病防治策略擬定參考。

二、材料與方法

(一) 材料收集及篩選

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；發病日期；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。

(二) 細菌學檢驗

1. 分離分枝桿菌

利用 L-J 固體培養基系統進行分枝桿菌分離確認後進行分子分型及菌株保存。

2. 藥物敏感性試驗

利用 MGIT 液體培養基系統 agar proportion 固體培養基方法進行結核菌藥物敏感性試驗。

(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 400 μ L 1 \times 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 50 μ L 的 10 mg/mL lysozyme，均勻混合，在 37 水浴至少 1 小時。之後加入 75 μ L 的 10% SDS/proteinase K solution，均勻混合，於 65 加熱 10 分鐘。再加入 100 μ L 的 5M NaCl 與 100 μ L 65 預熱的 CTAB/NaCl 溶液，均勻混合至溶液成乳白色後，於 65 加熱 10 分鐘。加入 750 μ L 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 °C 70%(v/v) 乙醇，輕翻轉微量離心管數次後加入 1 mL 的 -20 °C 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 20 μ L 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 \times TE 將 DNA 沉澱物溶解。吸取 100 μ L 1 \times 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 2 μ L 待測的 DNA 加上 98 μ L 1 \times 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 \times 50 \times 50=【DNA 濃度】 μ g/mL。

2. RFLP

RFLP 分型需純度較佳之 DNA，而且其分析程序之標準化將影響分析結果。目前，實驗室已完成菌株培養、熱處理及 DNA 萃取與純化步驟，並進行以特定核酸限制酶 (*Pvu* II) 切割結核桿菌基因體後可得到多條長短不一之片斷，於 0.8% 瓊脂凝膠以電泳儀將 DNA 片斷分層。再利用南方墨點法轉移至雜合膜上，續以 DIG 或 ECL 標幟之 IS-6110 核酸探針進行核酸雜合反應。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，將再以分析軟體進行菌株後續電腦分析。

3. Spoligotyping

以 *M. Tuberculosis* H37Rv 或 *M. Bovis* 標準菌株做為 spoligotyping 之對照組。

(1) 聚合酶連鎖反應

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

(2) 核酸雜交試驗

以八連排微量試管，每管以微量吸管注入150 μ l 2 \times SSPE/0.1% SDS，注入20 μ l PCR產物，以PCR machine denature加熱。將雜交膜以250 ml、60°C之2 \times SSPE/0.1% SDS清洗再置於Miniblotter。PCR產物分別注入每條溝中，置於60°C烘箱雜交。再於60°C雜交烘箱內以250ml 2 \times SSPE/0.5% SDS溶液鐘清洗2次。

(3) 呈色及沖片

雜交膜置於雜交管內。將10 μ l Streptavidin-HRP加入10 ml 2 \times SSPE/0.5% SDS溶液混合均勻後，加入含雜交膜之雜交管中，以雜交烘箱42°C溫度反應45分鐘。反應完後以42°C 250 ml 2 \times SSPE/0.5% SDS溶液清洗兩次。之後於以250 ml 2 \times SSPE溶液清洗。倒乾清洗液後加入ECL反應試劑10 ml震盪。再置於壓片夾內，於暗房內壓片5分鐘後，進行沖片。

(四) 建立抗藥性結核菌株庫

菌株先存放於檢驗實驗室，以含 10% OADC、0.2% glycerol 之 7H9 培養基保存於-70°C 中，待分析後選擇值得保存之特定菌株，轉交疾病管制局生物材料中心進行永久保存，並提供菌株予醫療院所及學術研究單位使用。

(五) 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

自本實驗室 2004 及 2005 年所收集之菌株庫選取具有抗藥資料之結核菌株。在 2004 年所收集 7,094 菌株中，扣除非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)計 1,389 株、未生長或檢體污染之菌株 147 株，共收集 5,558 結核菌株。在 2005 年所收集 5,719 菌株中，扣除非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)1,123 株、未生長或檢體污染或 NTM 及結核菌混合之菌株 43 株，共收集 4,553 結核菌株。接著自結核菌株中，扣除外籍人士及重複送檢病人之菌株，並根據各醫院提供之藥物敏感試驗結果扣除無抗藥資料之菌株。結果 2004 及 2005 年具有抗藥資料之菌株分別為 1,245 及 3,038 株，其中至少對一種藥物有抗藥性的菌株分別為 281 及 718 株。菌株數依地域分北、中、南、東四地理區列於表一、表二。

2004 年 281 株抗藥菌株中，73 株為多重抗藥(MDR)菌株，依地理區分析以東部(46.6%)最高，其次為北部 22.2%，南部 14.5%，中部 10.7%。個別藥物部份 INH 抗藥情形以東部(70.9%)最高，其次為中部 46.7%，北部 40.7%，南部 32.9%；RMP 抗藥情形東部(54.4%)最高，其次為北部(37.0%)，南部 18.4%，中部 16.0%；SM 抗藥比率以中部較高為 61.3%，其次為北部 51.9%，東部 48.5%，南部 19.7%；EMB 抗藥情形以中部(37.3%)最高，其次為南部 71.1%，東部 18.4%，北部 0.0% (表三)。2005 年 718 株抗藥菌株中，219 株為多重抗藥(MDR)菌株，依地理區分析以東部(40.3%)最高，其次為南部 34.7%，北部 20.7%，中部 18.8%。個別藥物部份 INH 抗藥情形以東部(77.4%)最高，其次為南部 69.7%，中部 56.3%，北部 48.2%；RMP 抗藥情形南部(46.6%)最高，其次為東部(44.4%)，北部 39.4%，中部 26.6%；SM 抗藥比率以南部較高為 20.2%，其次為東部 18.5%，中部 15.6%，北部 11.4%；EMB 抗藥情形以中部(57.8%)最高，其次為北部 49.7%，南部 44.8%，東部 43.5% (表四)。多重抗藥結核菌株之抗藥性情形詳列於表五及表六。

本研究選取具有抗藥資料結核菌株分別進行 RFLP 和 Spoligotyping 基因分型。部份菌株由於質量不夠無法進行基因分型。2004 及 2005 年，具有抗藥資料結核菌株共完成 RFLP 基因分型 613 及 466 株，其中含 2004 及 2005 年多重抗藥菌株共計 78 株(78/292, 26.7 %)(圖一)：包含東部菌株 58 株、北部菌株 12 株、南部菌株 8 株，中部則無。其中 60 株(76.9 %)的基因型為單一型態(unique type)，其餘 18 株(23.1 %)分為 7 個群組(7 clusters)：1 個群組含有 5 株相同型，1 個群組各有 3 株相同型，5 個群組各有 2 株相同型；除了一個 2 株的群組為北部菌株，其他群組菌株皆為東部菌株。2004 及 2005 年具有抗藥資料結核菌株各有 971(78.0%)(表七)、1331 株(43.8%)共完成 Spoligotyping 基因分型(表九)。人口學(性別及年齡)資料分析結果分別列於表八及表十。Spoligotyping 基因分型結果顯示 2004 及 2005 年，分別有 393 株(40.5%, 393/971)及 557 株(41.8%, 557/1331)屬於北京基因型。2004 年多重抗藥菌株、任一抗藥菌株、非抗藥菌株中分別有 53.7%、43.6%、39.6% 為北京基因型，依地理區域分析詳列於表七。2005 年多重抗藥菌株、任一抗藥菌株、非抗藥菌株中分別有 54.9%、50.0%、39.5% 為北京基因型，依地理區域分析詳列於表九。2004 年收集之北京基因型抗藥菌株與多重抗藥性無統計上之顯著差異(表七)，2005 年收集之北京基因型抗藥菌株與多重抗藥性在南部地區有統計上之顯著差異 ($p < 0.05$)(表九)。

四、討論

本研究進行 2004 及 2005 年台灣地區結核分枝桿菌抗藥性資料之收集與分析。從目前的結果顯示，由於 2004 年 5,558 株結核菌株中有較多菌株缺乏完整之藥敏試驗結果，因此僅就 1,245 株具有完整抗藥資料之菌株中完成 971 株 spoligotyping 基因分子分型，而 2005 年 4,553 株結核菌中則有 3,038 株具有完整抗藥資料，其中 1,331 株完成 spoligotyping 分析。因此，抗藥資料之完整與否會影響基因分子分型之結果分析。而從不同區域及醫院收集來的菌株，其抗藥菌株所佔的比例亦有可能有所影響，皆有可能會影響用此結果評估台灣地區結核菌的整體性抗藥情形。

本研究利用 RFLP 所分析之 78 株多重抗藥菌株中，東部即佔了 58 株，因此 RFLP 分析之結果無法代表台灣地區多重抗藥菌株型別之分布情形。東部 RFLP 完成率較高主要是因為本實驗室亦針對東部地區進行區域性研究，因限於人力無法完成台灣地區具有代表性之菌株。

許多研究指出北京株較易產生抗藥性，且推測其具有較強之致病能力。雖然，北京株最主要出現於亞洲，但卻流傳於全球，普遍推論北京株結核分枝桿菌較易突變成具有抗藥性之菌株，而且因致病力較強易爆發區域感染。本研究利用 Spoligotyping 分析 2004 年及 2005 年北京基因型與抗藥性之關聯性，結果在 2005 年之結果顯示南部地區任一抗藥或多重抗藥性與北京基因型有統計上的顯著相關，然由於 2005 年進行 spoligotyping 分析之菌株較少，而南部收集之各醫院 spoligotyping 之完成率不同，有可能會影響基因型別的分析，因此須進一步進行完整性之分析方可下結論。

五、結論與建議

抗藥性情形一直是國家結核病防治成功與否之指標，必須建立台灣地區整體性監測系統。本年度延續上年度計畫藉由完成設置必要實驗室、生物安全第三等級之核心實驗室，並建立標準化藥敏測試方法及分子基因分型方法，持續收集台灣地區之確定抗藥性菌株，建立菌株資料庫，並以 spoligotyping 及 RFLP 分析台灣多重抗藥性菌株特性，然必須同時配合完整之菌株資料，才可藉此基礎研究提供結核病防治上參考。

六、參考文獻

- Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M, Zanetti S, Fadda G: Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator tuber (MGIT) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:4440-4.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR: *InhA*, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994;263:227-30.
- Barlow REL, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM: Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39:2453-7.
- Bastian I, Protaels F: Resurgent and emerging infectious diseases. Multidrug-resistant tuberculosis. Kluwer Academic Publishers. 2000; 8:139-40.
- Bobadilla-del-Valle M: *rpoB* Gene Mutations in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by Polymerase Chain Reaction Single-Stranded Conformational Polymorphism. *Emerg. Infect Dis* 2001;7:1010-3.
- Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N: Molecular typing *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000;38:2520-4.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998;144:1189-96.

- Garcia, L: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin- resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:1813-8.
- Goguet de la Salmonière Y, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden JDA, Gicquel B: Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997;35:2210-4.
- Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB, Shaw RJ: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997;35:647-51.
- 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.
- Hwang HY: Characterization of rifampicin -resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Med Microbiol* 2003;52:239-45.
- Kamerbeek J, Schouls L, van Agterveld M, van Soolingen D, Kolk A, Kuijper S: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R: 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.
- Laszlo A, Rahaman M, Raviglione M, Buestreo F: Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in WHO/IUATLD Supernational Laboratory Network: first round of proficiency testing. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:231-8.

- Meyer A: In: Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J, editors. New uses for new phylogenies. London: Oxford University Press; 1996. p. 322-40.
- Mokrousov I: Detection of Isoniazid- Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by a Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting *katG* codon 315 Variation. *J Clin Microbiol* 2002;40:2509-12.
- Musser, J. M. *et al.* 1996. Characterization of the Catalase-Peroxidase Gene (*katG*) and *inhA* Locus in Isoniazid- Resistant and Susceptible Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Automated DNA Sequencing: Restricted Array of Mutations Associated with Drug Resistance. *J. Infect. Dis.* 173:196-202.
- Roring S, Scott A, Brittain D: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2002;40:2126-33.
- Rusch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Feyffer GE: Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *J Clin Microbiol* 1999;37:45-8.
- Saitou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
- Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D: Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Micro Rev* 1995;8:180-99.
- Shim, T. S. *et al.* 1997. Isoniazid Resistance and the Point Mutation of Codon 463 of *katG* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *JKMS.* 12:92-98.
- Small PM, van Embden JDA: Molecular epidemiology of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: American Society for Microbiology; 1994, p. 569-82.

- Sneath PHA, Sokal RR: Numerical taxonomy: the principles and practices of classification. San Francisco (CA): W.H. Freeman & Co.; 1973.
- Sola C, Horgen L, Devallois A, Rastogi N: Combined numerical analysis based on the molecular description of *Mycobacterium tuberculosis* by four-repetitive sequence-based DNA typing sequence. *Res Microbiol* 1998;149:349-60.
- Sola C, Horgen L, Goh KS, Rastogi N: Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes. *J Clin Microbiol* 1997;35:843-6.
- Sola C, Horgen L, Maisetti J, Devallois A, Goh KS, Rastogi N: Spoligotyping followed by double-repetitive element PCR as rapid alternative to IS6110-fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1122-4.
- 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 U S A* 1997;97:9869-74.
- Telenti A. *et al.* 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 341(8846):647-650.
- Tuberculosis. The WHO? IUATLD Global project on antituberculosis drug resistance surveillance. *Weekly Epidemiological Records* 1996; 71:281-86.
- van Doorn HR: The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg-->Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *J Clin Microbiol* 2001;39:1591-4.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*

1993;31:406-9.

Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C: Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol* 2001;39:57-65.

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

Yates MD, Drobniewski FA, Wilson SM: Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002;40:712-4.

余明治醫師，慢性病防治通訊第 44 期

七、圖、表

表一、2004 年收集之抗藥性結核菌株地域分布情形分析

醫院	抗藥菌株	非抗藥菌株	總計
	數目 (%)	數目 (%)	
北部	27 (10.3)	235 (89.7)	262
中部	75 (27.9)	194 (72.1)	269
南部	76 (31.9)	162 (68.1)	238
東部	103 (21.6)	373 (78.4)	476
全部	281 (22.6)	964 (77.4)	1245

表二、2005 年收集之抗藥性結核菌株地域分布情形分析

醫院	抗藥菌株	非抗藥菌株	總計
	數目 (%)	數目 (%)	
北部	193 (19.6)	793 (80.4)	986
中部	64 (19.8)	259 (80.2)	323
南部	337 (28.6)	842 (71.4)	1179
東部	124 (22.5)	426 (77.5)	550
全部	718 (23.6)	2320 (76.4)	3038

表三、2004 年收集之台灣地區複合抗藥性結核菌菌株之抗藥性情形

	Drug Resistance				
	INH ¹	RMP ²	SM ³	EMB ⁴	MDR ⁵
	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)
Northern (n=27)	11 (40.7)	10 (37.0)	14 (51.9)	0 (0.0)	6 (22.2)
Central (n=75)	35 (46.7)	12 (16.0)	46 (61.3)	28 (37.3)	8 (10.7)
Southern (n=76)	25 (32.9)	14 (18.4)	15 (19.7)	54 (71.1)	11 (14.5)
Eastern (n=103)	73 (70.9)	56 (54.4)	50 (48.5)	19 (18.4)	48 (46.6)
Total (n=281)	144 (51.2)	92 (32.7)	125 (44.5)	101 (35.9)	73 (26.0)

¹INH: Isoniazid. ²RMP: Rifampin. ³SM: Streptomycin. ⁴EMB: Ethambutol.

⁵MDR: Multiple Drug Resistance, Resistance to at least Isoniazid and Rifampin

表四、2005 年收集之台灣地區複合抗藥性結核菌菌株之抗藥性情形

	Drug Resistance				
	INH ¹	RMP ²	SM ³	EMB ⁴	MDR ⁵
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Northern (n=193)	93 (48.2)	76 (39.4)	22 (11.4)	96 (49.7)	40 (20.7)
Central (n=64)	36 (56.3)	17 (26.6)	10 (15.6)	37 (57.8)	12 (18.8)
Southern (n=337)	235 (69.7)	157 (46.6)	68 (20.2)	151 (44.8)	117 (34.7)
Eastern (n=124)	96 (77.4)	55 (44.4)	23 (18.5)	54 (43.5)	50 (40.3)
Total (n=718)	460 (64.1)	305 (42.5)	123 (17.1)	338 (47.1)	219 (30.5)

表五、2004 年 73 株複合多重抗藥結核菌株之抗藥性情形

INH ¹	RMP ²	SM ³	EMB ⁴	No. of strains (%)
R**	R	R	R	18 (24.7)
R	R	S*	R	16 (21.9)
R	R	R	S	9 (12.3)
R	R	S	S	30 (41.1)

¹INH: Isoniazid. ²RMP: Rifampin. ³SM: Streptomycin. ⁴EMB: Ethambutol.

*:S: Susceptible. **:R: Resistant.

表六、2005 年 219 株複合多重抗藥結核菌株之抗藥性情形

INH ¹	RMP ²	SM ³	EMB ⁴	No. of strains (%)
R**	R	R	R	53 (24.2)
R	R	S*	R	28 (12.8)
R	R	R	S	40 (18.3)
R	R	S	S	78 (35.6)
R	R	R	N/A	20 (9.1)

¹INH: Isoniazid. ²RMP: Rifampin. ³SM: Streptomycin. ⁴EMB: Ethambutol.

*:S: Susceptible. **:R: Resistant.

表七、2004 年結核菌株北京基因型與抗藥性之關聯性

Spoligotyping

	Drug Resistant No (%)	Susceptible No (%)	Total
Northern	254 (97.0)	8 (3.0)	262
Central	91 (33.8)	178 (66.2)	269
Southern	203 (85.3)	35 (14.7)	238
Eastern	423 (88.9)	53 (11.1)	476
Total	971 (78.0)	274 (22.0)	1,245

		Beijing family genotype (n=393)	Non-Beijing genotype (n=578)	Crude OR	95% CI.
Northern (n=254)	非抗藥	96 (42.3)	131 (57.7)	1	
	任一抗藥	13 (48.1)	14 (51.9)	1.27	0.53, 3.02
	多重抗藥	2 (33.3)	4 (66.7)	0.68	0.08, 4.44
Central (n=91)	非抗藥	19 (30.2)	44 (69.8)	1	
	任一抗藥	11 (39.3)	17 (60.7)	1.50	0.53, 4.19
	多重抗藥	0 (0.0)	1 (100.0)	0.0	0.0, 42.92
Southern (n=203)	非抗藥	50 (35.2)	92 (64.8)	1	
	任一抗藥	23 (37.7)	38 (62.3)	1.11	0.57, 2.17
	多重抗藥	4 (50.0)	4 (50.0)	1.84	0.37, 9.24
Eastern (n=423)	非抗藥	139 (41.5)	196 (58.5)	1	
	任一抗藥	42 (47.7)	46 (52.3)	1.29	0.78, 2.12
	多重抗藥	23 (59.0)	16 (41.0)	2.03	0.99, 4.19
Total (n=971)	非抗藥	304 (39.6)	463 (60.4)	1	
	任一抗藥	89 (43.6)	115 (56.4)	1.18	0.85, 1.63
	多重抗藥	29 (53.7)	25 (46.3)	1.77	0.98, 3.18

表八、2004 年 spoligotyped 971 株有抗藥資料菌株之性別年齡分布

	抗藥菌株	非抗藥菌株	總計
	數目 (%)	數目 (%)	
	204(100)	767(100)	971
性別			
男	148 (72.5)	513 (66.9)	661
女	53 (26.0)	214 (27.9)	267
無資料	3 (1.5)	40 (5.2)	43
年齡			
≤24	15 (7.4)	55 (7.2)	70
25~34	17 (8.3)	70 (9.1)	87
35~44	32 (15.7)	102 (13.3)	134
45~54	27 (13.2)	106 (13.8)	133
55~64	21 (10.3)	104 (13.6)	125
≥65	89 (43.6)	300 (39.1)	389
無資料	3 (1.5)	30 (3.9)	33

表九、2005 年結核菌株北京基因型與抗藥性之關聯性

Spoligotyping data

	Yes N (%)	No N (%)	Total
Northern	372 (37.7)	614 (62.3)	986
Central	133 (41.2)	190 (58.8)	323
Southern	440 (37.3)	739 (62.7)	1179
Eastern	386 (70.2)	164 (29.8)	550
Total	1331 (43.8)	1707 (56.2)	3038

		Beijing family genotype(n=557)	Non-Beijing genotype(n=774)	Crude OR	95% CI.
Northern	非抗藥	123 (44.6)	153 (55.4)	1	
	任一抗藥	43 (44.8)	53 (55.2)	1.01	0.62, 1.65
	多重抗藥	19 (48.7)	20 (51.3)	1.18	0.57, 2.43
Central	非抗藥	43 (41.7)	60 (58.3)	1	
	任一抗藥	12 (40.0)	18 (60.0)	0.93	0.37, 2.30
	多重抗藥	4 (44.4)	5 (55.6)	1.12	0.23, 5.18
Southern	非抗藥	128 (37.1)	217 (62.9)	1	
	任一抗藥	58 (61.1)	37 (38.9)	2.66*	1.62, 4.35
	多重抗藥	23 (62.2)	14 (37.8)	2.79*	1.32, 5.94
Eastern	非抗藥	112 (36.7)	193 (63.3)	1	
	任一抗藥	38 (46.9)	43 (53.1)	1.52	0.90, 2.57
	多重抗藥	16 (57.1)	12 (42.9)	2.30	0.99, 5.39
Total	非抗藥	406 (39.5)	623 (60.5)	1	
	任一抗藥	151 (50.0)	151 (50.0)	1.53	1.18, 2.00
	多重抗藥	62 (54.9)	51 (45.1)	1.87	1.24, 2.81

*p value < 0.05

表十、2005 年 spoligotyped 1331 株有抗藥資料菌株之性別年齡分布

	抗藥菌株	非抗藥菌株	總計
	數目 (%)	數目 (%)	
	302 (100)	1029 (100)	1331
性別			
男	214 (70.9)	742 (72.1)	956
女	75 (24.8)	267 (26.0)	342
無資料	13 (4.3)	20 (1.9)	33
年齡			
≤24	12 (4.0)	67 (6.5)	79
25~34	32 (10.6)	78 (7.6)	110
35~44	45 (14.9)	127 (12.4)	172
45~54	46 (15.2)	111 (10.8)	157
55~64	42 (13.9)	143 (13.9)	185
≥65	110 (36.4)	482 (46.8)	592
無資料	15 (5.0)	21 (2.0)	36

