

## 肺結核的分子流行病學現代觀

---

林智偉 張嘉茹 杜鴻運

國家衛生研究院 臨床研究組

在過去幾個世紀，人們俗稱的肺癆，King's Evil 或尋常性肺炎等；其實都是指一種相同的疾病—肺結核。由考古學的研究證據顯示，在新石器時代的歐洲或古老埃及遺址到希臘和羅馬帝國都發現有和現在結核病症相符合的疾病。目前所發現最早有描述結核病症的文獻是在西元前 400 年；由羅馬帝國的 Claudius Galen 所撰寫的。關於這個疾病的最重大發現是在西元 1882 年，由德國科學家 Robert Koch 發現肺結核病症是由結核桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)所引起的，由於這樣的重大發現讓科學家們能夠開始研究製造合適的抗結核菌藥物去對抗這古老的病菌。截至目前為止，對抗結核分枝桿菌的化學製劑發展也已超過 50 年，但肺結核依舊是全球主要的公共衛生問題之一。有鑑於此，研發新的肺結核診斷與治療方式以及開發肺結核疫苗等，都是控制肺結核傳染的重大議題。由於，分子流行病學具有一般流行病學沒有的優點，所以我們利用分子流行病學的研究來探討肺結核疾病，讓大家可以很清楚的知道結核桿菌的流行性、致病性與演化過程。(本文譯自：Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights，並於 97 年 5 月 12 日取得作者 e-mail 授權。)

### 肺結核的流行病學

就世界衛生組織(World Health Organization; WHO)的估算，全世界大約有三分之一的國家有肺結核感染的問題。以 2000 年統計數據看來，全球約有八百萬到九百萬人感染肺結核，其中的三百萬人更因為結核病而喪命。根據科學家的統計發現，以疾病感染後的致死狀況來看，肺結核感染後所造成的致死率，目前僅次於 HIV 所造成的後天免疫缺乏症候群(AIDS)排名第二。

臨床醫學研究也顯示結核桿菌會在宿主体內自行突變成抗藥性菌株，同時，抗結核藥物的存在也會加速其自行突變的速度。就 2003 年的全球結核病患治療統計數據發現，會同時對 isoniazid(INH)與 rifampin(RIF)治療無效者(即多重抗藥性病人)約有四十五萬人。

由上面的數據我們可以清楚的知道肺結核的盛行率與治療上的困難。也讓我們更須正視這樣一個疾病的發生。

## 肺結核病症的發生途徑

由於肺結核研究的不足，歷史上相關資料也多半是一些流行病學上的數據。而針對肺結核進行的動物學方面研究或感染肺結核臨床上觀察；像這類的記載也多半在二十世紀中才開始，所以資料有限。就臨床醫學記錄來看；接觸結核桿菌的人中約有三分之一會被感染。而其中只有 10% 會產生肺結核病症。在絕大部份的受感染者中，結核桿菌都是以潛伏性感染為主，而大多數的潛伏期都會超過三個月。

肺結核是經由呼吸道傳染途徑所傳播。當結核桿菌經由呼吸道進入人體後，會在肺泡中被巨噬細胞所吞噬，進而啟動生物體內的一連串免疫反應。一般說來，這樣的免疫反應啟動即是要清除外來物的入侵。但在結核桿菌感染後約有 10% 的人啟動的免疫反應並不能清除入侵的病菌，反而還可以看到結核桿菌在免疫細胞中繼續複製、增生，同時也會讓受感染的肺部組織壞死與空泡產生。

## 分子流行病學

分子流行病學是結合了分子生物學、臨床醫學、統計學及流行病學的一門科學。簡單說來，分子流行病學是以生化與分生的角度來看基因與環境危險因子在疾病發生和散佈時所扮演的角色，更具體的說，分子流行病學就是一種用多重科學的方法來確認疾病發生、繁殖、散播之因果關係的科學。

在二十世紀以前絕大部分對於結核桿菌的分析都是以觀察菌落型態、生長速率、抗生素敏感性及噬菌體分型為主。雖然可以提供臨床治療上的依據但卻無法提供足夠的相關資料，使得肺結核流行病學的發展受到限制。直到 1980 年代中期，有科學家嘗試著用分子生物學方法整合臨床分離出來的結核桿菌。其利用分子生物學方法來做分析，讓我們可以更清楚肺結核疾病的傳播且觀察它們之間的相關性。最重要的是可以利用這樣的研究模式進而觀察結核桿菌其生物多型性 (polymorphism)、疾病發生率與基因的變異性 (diversity) 之間的關係。

## 結核分枝桿菌的基因分型：現行法

1998 年，由於結核桿菌的實驗室標準菌株 H37Rv 完成定序工作，使得肺結核的研究進入了基因體時代。隨即又有結核桿菌臨床菌株 CDC1551 和其他六個相關的結核桿菌完成定序(包括有：M. leprae, M. ulcerans, M. avium, M. avium paratuberculosis, M. smegmatis, 及 M. bovis)。而 M. microti, M. marinum, M. tuberculosis strain210 及 M. bovis(BCG)的定序工作目前也接近完成。

在比對各菌株基因裡 275-bp internal transcribed spacer (ITS)與 16rRNA、23rRNA 分離出的多型性變異區域 (highly polymorphic region)結果發現結核桿菌屬(包括：M. tuberculosis, M. bovis, M. microti, M. africanum, M. canettii, M. pinnipedii 及 M. caprae)其基因體具有高度的保留性。雖然，結核桿菌屬具有相似的基因型，但不同菌株所表現出來的顯型(phenotype)與其感染的物類均有不同。同時，各菌株間的單核苷酸多型性(single nucleotide polymorphisms; SNP)雖然只有 0.01% 到 0.03%的差異，但目前還沒有證據顯示，結核桿菌各菌株間會進行基因間水平置換(horizontal genetic transfer)的情形發生，這是和大多數微生物不同的地方。

結核桿菌屬的基因高度保留性和其他病原菌相似的地方就是在它們的單型性物種(monomorphic species)裡具有多型性基因區(polymorphic genomic regions)，這部分和真核生物極為相似；這樣基因特性是在基因體中會出現週期性重複的單節序列(monomeric sequence)，稱之為重複單位 (repeat unit)。重複單位可依其重複性不同分成兩種：一種是散置重複(interspersed repeats; IR)，另一種是不間斷重複(tandem repeats; TR)。這些重複的片段統稱為 variable-number tandem repeats (VNTR)，普遍存在於結核桿菌基因體中的調節區間或是讀碼區 (open reading frame; ORF)內。下列將介紹目前最常用於結核分枝桿菌基因分型的分子生物學技術：

### 一、IS6110

所謂的插入序列(insertion sequences; IS)通常是一段小於 2.5 kb 的移動性基因，廣泛存在於大多數細菌的基因體中。雖然 IS 片段是個移動基因，但它和轉位子(transposon) 最大的不同處在於：IS 片段僅能攜帶基因訊息，並不能像轉位子一樣進而將其攜帶的基因訊息解碼並表現(例如：表現抗藥性)。由 IS 片段所進行的轉位常會導致基因分裂並產生強烈的極化現象；進而造成插入點附近的基因改變。從演化的角度來看，對 IS 片段存在於基因中的目的至少有兩種不同的解釋：一種是說，IS 片段是爲了平衡當細菌基因體依附宿主基因後所產生的宿主傷害，另一說法則認爲 IS 片段可造成偶發性且有益助的突變，故在宿主的演化適應上扮演著重要的角色。

在不同屬的細菌中 IS 片段出現的數目是有差異的，例如：IS1 片段在大腸桿菌(*E. coli*)中重複出現 2 到 17 個，而在志賀氏菌屬(*Shigella species*)裡則會有多達 2 到 40 個重複。在西元 1990 年由 Thierry 所主導的研究發現，屬於 IS3 family 的 IS6110 (1355 bp)只出現於結核桿菌屬的菌株中。IS6110 片段中含有一 28bp 的 IR(inverted repeat)區，同時在其插入位置的末端會出現 3 到 4 bp 重複序列。IS6110 片段會隨機散佈於不同屬的結核桿菌基因體內，且數目從 0 到 26 個重複均有可能。1993 年時，van Embden 等人利用 IS6110 片段設計一個以南方墨點分析法為基礎的標準化分析方式，主要是藉由核酸內切酶(endonuclease)，PvuII 只會作用於 IS6110 單側的特性，先將結核桿菌(*M. tuberculosis*)基因體切成適當的大小後，再針對 IS6110 設計探針(probe)進行雜合反應，最後產生不同長度片段的訊號。此一方法被稱為限制片段長度多型性分析法(restriction fragment length polymorphism; RFLP)。目前我們利用這樣的分析方式並配合分析軟體，建造了一個全球性的資料庫，藉以方便比對世界各地在臨床上分離出的結核桿菌之異同。剛開始利用 IS6110 來當作流行病學調查的指標時，科學家們擔心此分析法是否具有穩定性，但在一連串的體外試驗後發現，我們發現就算經過長時間的菌體培養，利用 IS6110-RFLP 方式還是可以維持結果的一致性。其實 IS6110 轉位作用的半衰期 (half-life,  $t_{1/2}$ )平均來說為 3 到 4 年，雖然會依據其複製速率、宿主間的交互作用與感染物種的不同而有所差異，但 IS6110-RFLP 的穩定性已足夠當作觀察結核桿菌傳播的一個指標。利用 IS6110-RFLP 分析方法來鑑別結核桿菌則有幾個需要注意的事項。第一、不能單就 IS6110-RFLP 的所得的結核桿菌分型結論來直接解釋流行病學上的結果。其中還需考量該地區結核桿菌是否具有多樣性或該區域是否是疾病特有區？等問題。第二、當 IS6110 存在於基因體中的數目少於 6 個時，利用 IS6110-RFLP 方法分析的準確度就會下降很多，因為當基因體中 IS6110 數目少時我們便不能利用 IS6110-RFLP 方法有效的鑑別出其嵌入位置，結果會造成不同的基因組態但呈現相似的數據。因此，無法分別結核桿菌菌株間的差異。

## 二、PGRS

所謂的多型態 GC 重複序列分析法(polymorphic GC rich repetitive sequence; PGRS)，這是一種類似 IS6110-RFLP 的分析方式，是由 Ross 等人所提出的，主要是利用 PGRS 特異性探針(約 3.4kb 大小);再利用進行南方墨點法來呈現結果，是在 IS6110-RFLP 之後所發展出來的方法；而有別於 IS6110-RFLP 分析方法，PGRS 是不會受到 IS6110 數目太少的限制，但由於 PGRS 分析法在處理上與分析上都過於複雜，以至於無法成為標準化的分析方法。

### 三、Spacer oligonucleotide typing

Spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)是一種利用 PCR(polymerase chain reaction)為基礎的分析方法。常被用來細分結核桿菌(*M. tuberculosis*)分群的方法。在結核桿菌基因體中存在有 direct repeats(DRs)；這是一個由 36bp 重複所組成的特殊重複區域。在這些 DRs 之間會有 35bp 長度的特殊間隔序列(spacer sequence)存在。而 spoligotyping 就是針對結核桿菌基因體中的 43 個間隔序列進行偵測。先在轉漬膜上點上這 43 個間隔序列的寡核?酸(oligonucleotide)，之後再利用經過標定的引子針對 DRs 區域進行 PCR 反應，所得到的產物與轉漬膜進行雜合反應後再利用化學冷光作呈色，此法所得的實驗數據再現性高且容易與不同的實驗室間的結果進行比對，與 IS6110-RFLP 方法差異最大的地方在於其對樣品(DNA)的需求量不多且純度要求也不高。目前，已經建構了有一國際性的 spoligotyping 資料庫-SpolDB 4；其中包含有來自全世界的 1,939 筆不同結核桿菌 spoligotyping 結果。提供臨床或研究人員比對之用。

對同源基因的重組(homologous recombination)或是 IS6110 的嵌入均會造成 DRs 區域間基因序列產生改變，而 spoligotyping 分析方式則可以藉由觀察某些間隔序列(spacer sequence)的出現或消失細分出不同的結核桿菌。雖然 spoligotyping 分析法是目前肺結核分子流行病學研究中一個強而有力的分析方法，但一般來說它的結果解析度仍不及 IS6110-RFLP 所做的分析，我們發現不同的結核桿菌菌株常會具有相同的 spoligotyping 分析結果，例如：就結核桿菌 W 型北京株(W-Beijing)來說它們都具有缺乏 1734 的間隔序列的特性，基於這樣特性 spoligotyping 分析法或許就可以當作是辨識結核桿菌 W 型北京株最快且有效的方法。但所得結果卻也無法用於辨別感染菌株的地方性(例如：無法分別出俄羅斯、中國、南非的結核桿菌 W 型北京株)。所以就無法進一步針對肺結核傳播方面提供資訊。

### 四、VNTR and MIRU analysis

所謂的變異性重複序列分析法(variable number of tandem repeats；VNTR)是根據，在結核桿菌基因體中所存在的一些不同長短的多型性重複基因位點(loci)所設計分析方法。其原理是利用在不同的結核桿菌菌株中，會出現有不同數目的重複序列，進而用 PCR 方式放大那些欲分析的基因位點，這是一種比 IS6110-RFLP 分析方法更簡單且快速的分析方式。另外有一種類似的分析方式叫做結核桿菌散置重複單位分析法(*Mycobacterium interspersed repetitive units*; MIRU)。大致也是利用上述的原理，只是所選用的基因位點數目來的比 VNTR 更多罷了。在 1998 年 Frothingham 和 Meeker-O'Connell 找出結核桿菌內的 5 個主要的多型性隨機重複序

列(MPTR; A 到 E)和 6 個外在隨機重複序列(ETR; A 到 F)。利用這 11 個基因位點而發展成 VNTR 分析方式。而在 2000 年時 Supply 等人結合之前大家的發現，提出了 41 種不同的基因位點存在於 H37Rv、CDC1551 和 AF2122/97 的菌株之中，也就是所謂的 MIRU 分析方法。在 MIRU 之中有 12 個基因位點常被選作為基因分型的代表位，和 VNTR 分析法相同，我們會依照重複序列出現的數目不同給予該基因位點一個數字代碼。而分析時就不同的菌株即會得到不同的分型代碼，利用這樣的方式將可以將結核桿菌加以區分。

MIRU-VNTR 的解析能力會隨著所分析的基因位點數目增加而提升，若與 IS6110-RFLP 分型方法相比的話，就得視分析菌株內其含有的 IS6110 序列數目而定。以分析 12 個基因位點的條件來看，當 IS6110 嵌入基因體中的數目較少時，MIRU-VNTR 的分型能力會比 IS6110-RFLP 的效果好，但若 IS6110 嵌入基因體中的數目多時，MIRU-VNTR 的分型效果就不如 IS6110-RFLP。但是若利用 MIRU-VNTR 分析方法再配合 spoligotyping 的結果來做菌種的辨別那就會與 IS6110-RFLP 的分型辨識度相似了。MIRU-VNTR 目前已被用於許多的分子流行病學的研究上，除了可以用來解釋微生物的系統發生(phylogenetic)外，還可用來判定疾病的散播方式。

## 五、SNP

根據結核桿菌基因體分析結果；我們不難發現其基因體中的 DNA 具有很高保留性(conserved)，這也意味著結核桿菌的基因是具有多型變異性(polymorphism)，可以作為研究人員探討結核桿菌各菌株間種系發生(phylogenetic)關聯性的重要指標。不管它是所謂的非同義單核?酸多型性(nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms; nsSNP)或是同義單核?酸多型性(synonymous single-nucleotide polymorphisms; sSNP)均可用來回答不同的生化問題。

一般而言，非同義單核?酸多型性是因為生物體內部或外在環境的篩選壓力進而造成的氨基酸改變，以結核桿菌產生抗藥性過程為例，發現其基因體上的抗藥性基因會藉由單點突變、複製或缺失來造成表現型的改變。相對而言，同義單核?酸多型性並不會造成氨基酸變異或蛋白質功能改變，而發生在結構基因或是家務基因(housekeeping gene)的同義單核?酸多型性則可以當作結核桿菌基因飄變(genetic drift)和演化關係的依據。SNP 的分析方法可以用於同一個操作平台上並獲得數個基因多型性變異的資訊，這些資訊可以當作是系統發生判定、抗藥性、毒性或是流行病學的參考指標。



## 六、Genomic deletion analysis

除了上述的 SNP 分析法外，長序列多型性分析法(large-sequence polymorphisms; LSP)也是一種利用與 H37Rv、CDC1551 做比較的基因分型方式。LSP 的形成主要是經由基因刪除和基因重組而並非基因進行平行轉移，也由於這樣的變化並不是經由基因的平行轉移所致，所以基因的改變為一種不可逆過程並且結果會具有獨特性。比較臨床上所得的菌株與實驗室標準菌株 H37Rv 比較結果，有高達 4.2% 基因是可經由這樣的方式而消失。2002 年 Brosch 等人的研究發現，通常結核桿菌基因發生消失並不是獨立事件，而是其成功的演化。因為一旦原始菌株發生缺失，也會遺留給後代菌株，基於這樣的特性，基因消失可以當作是分辨同源品系與菌株演化的特殊標誌。就以 TbD1 基因(結核桿菌特異性缺失基因 1)為例，這是可以拿來判定新舊菌株的基因，所有的現代結核桿菌菌株並不具此基因，但古老的結核桿菌菌株卻均保留此一基因。LSP 其實不是在所有的基因位點都會發生的，其發生位置是有所謂的熱區“hot spots”，即特別容易發生基因的缺失的區域，正因 LSP 有這樣的特性讓我們更方便來利用這些熱區比較出各不同結核桿菌基因體的差異性。因此，對於結核桿菌的基因分型與鑑定親緣關係來說，LSP 分析法都是個有力的工具。

## 七、Identification of strain-specific markers for rapid diagnosis

倘若我們可以找出菌株特有的基因標誌時便可以快速的鑑定出是否為肺結核傳染。這對於處理多發性抗藥肺結核菌株來說是一大利機。而這些特有的基因標誌主要是利用與 IS6110 的基因多型性比較分析所得，可以是特殊序列、特殊重複、SNP 與特別抗藥性基因等。1998 年 Kurepina 等人，成功的利用在 IS6110 複製起始點(origin of chromosome replication;oriC)有特殊的嵌入位做為標記，來分辨結核桿菌 W 型北京株(W-Beijing strain)。而 Plikaytis 等人也利用 multiplex PCR 方法找到了曾在紐約爆發的多重抗藥性(Multi-drug resistance; MDR)結核桿菌菌株；其在 NTF 基因內均有兩段 IS6110 嵌入的特別基因標誌。用此可以幫助我們從事結核桿菌鑑定與分型。同時，這類的特殊的基因標誌也可以幫助我們瞭解疾病傳播的進程。

## 分子流行病學與公共衛生的關係

研究分子流行病學領域的主要目的是在調查自然環境中各細菌的差異性。例如，我們會從研究探討臨床菌株的傳染力、致病嚴重性及對各種抗肺結核病藥物的感受性等方向，來了解各菌株之間的異同。一般而言，藉由短期的分子流行病學調

查可以幫助瞭解地方性疾病的發展，若是長期的分子流行病學調查則可觀察全球性流行疾病的傳播及演化的趨勢。而對肺結核疾病來說若能利用分子流行病學的研究我們便可清楚的知道常規的肺結核控制計畫是否成功。除此之外，一個成功的分子流行病學調查還可以用以評估疾病是屬於新感染的或是再次復發的感染以及某些族群是否具有抗藥性或是有無特殊的感染途徑。而這一切的資訊皆需先經由分子生物學研究分析後才能獲得，[表一](#)是我們簡單的整理出目前針對肺結核相關研究分子生物學檢查技術在其中扮演的角色。

### 一、結核菌傳遞的動態學(Transmission dynamics)

由於肺結核的感染人口家族史及其結核桿菌演化史等資料獲得不易，故使得探討肺結核的傳遞動態(transmission dynamics)可說是極為挑戰的議題。再加上，每個個體感染肺結核的潛伏期長短不一，故很難找出其感染的時間點。舉個例子來說，目前我們發現臨床上免疫缺乏症候群的病患大多都會衍生成肺結核病患(約90%)，而當他們在發生免疫缺乏症狀前卻都不會發病。由此可知，有極大部分的肺結核感染個體並不會有症狀出現，這也更說明要掌握肺結核感染時間點是極為困難的。目前，大部分 TB 的感控計畫(尤其是開發中國家)都是以結核菌素的皮膚測試(purified protein derivative-base tuberculin skin test)及胸部 X 光(X-rays)來進行篩選及持續追蹤。根據在美國數個州的流行病學研究指出，只要偶然的接觸肺結核病患即有可能造成肺結核的傳染，因此持續的追蹤調查對於肺結核的感染控制而言是非常重要的。由於偶發的肺結核感染案例常會被傳統流行病學的統計所忽略掉，因此由這樣方式評估肺結核感染狀況會造成所謂低估的現象，但經整合後可發現其佔有一定數量，所以持續利用分子流行病學研究進而圈別出高危險族群與高感染區域是很重要的。

利用分子生物學技術來進行流行病學的研究與一般流行病學研究很相似，不過卻比較有說服力。而利用分子流行病學來分析結核桿菌的感染狀況，常需要視地區性來選用不同的分子生物學分析技術。例如：以東亞地區而言，絕大部分的結核桿菌感染都是屬於結核桿菌 W 型北京株(W-Beijing)。但若我們在分析時只用 spoligotyping 分析法，則因為所有的結核桿菌 W 型北京株其 spoligotyping 的結果表現皆相同；故會出現發生率高估現象。相對的，若我們只用 IS6110-RFLP 分析法來做分析時，會因為同源 W 型北京株的 IS6110-RFLP 分析結果會有些許差異的情況，而降低了實際的族群分布比例。故在分子流行病學分析時，對於所使用的分子生物學技術的選用是很重要的。根據 1999 年 Bifani 等研究人員在紐澤西州所進行的研究調查顯示，若利用 IS6110-RFLP 分析法，同時比對 VNTR 和 PGRS



分析法，可以將 68 個 W 型北京株再細分出族群 A(group A)與族群 B(group B)。並且由這兩個族群間的特殊基因出現情形可判定族群 A 和族群 B 具有演化的相關性。就地理環境分析

看來，族群 A 感染只出現於美國本土出生的居民身上，並且為近期的感染，而族群 B 出現在非美國本土出生的東亞移民身上並且符合為再活化(reactive)感染的特性。上述研究說明了一個極為重要事情，那就是若能將感染人口研究的結果配合傳統肺結核管控的臨床報告一併分析時，就可以幫助鑑別先前未被確認或是爆發的感染事件。直到現在，科學家都認為在肺結核低發生率的國家，例如美國，其肺結核的感染群突發絕大是因為內源性再活化(endogenous reactivation)所造成的。但根據舊金山、紐約、荷蘭及丹麥人口的流行病學調查結果顯示，內源性再活化而造成肺結核感染群突發所佔的比例僅 35%-45%，大部分的病例還是由近期的感染(recent transmission)所引起的。在肺結核發生率較低的地區，使用分子學進行菌株分群的結果可能同義於流行病學上的分型結果，但在高肺結核發生率地區，由於疾病的傳播速率快、傳播途徑多，因此分子學分群的結果並不能代表當區流行病學的分型結果。要正確的評估肺結核的發生是由於近期的感染或是內源性的活化而造成的需要參考許多因素，包括：肺結核每年傳染的速率、選用於分析的分子生物學方法、肺結核的感控程序、被感染的族群大小、年齡、移民史、人口的感受性以及檢體採樣策略等，都是必須考慮的因素。因此若在常規的流行病學調查中配合上述的參考因子做評估，可以更加洞悉特定的區域或族群中疾病的傳播動態。

## 二、藥物抗藥性的分子基礎研究

隨著對結核桿菌研究的日漸深入，在過去的十年間，我們發現了許多第一線及第二線抗結核藥物的藥物標的及其作用機制(如表二所列)。就如同我們之前談到的，結核桿菌獲得抗藥性基因的方式，通常是藉由基因體上的 nsSNP、基因消失或是特殊基因位嵌入而造成。這與一般微生物是藉由基因的水平轉移而獲得抗藥性基因模式不同。同時，這樣特殊的抗藥性基因獲得模式也使得結核桿菌能更快的獲得抗藥性基因進而抵抗藥物。有鑑於此，抗結核藥物的研發則更需分子流行病學調查的結果來加以輔助，因為分子流行病學的研究議題內包含了有：探討基因

體特殊突變與基因體特殊突變後其菌株的外在顯型是否有改變。故利用分子流行病學的研究結果我們才可釐清這些與抗藥性相關的因子。1996 年 Bifani 等人針對 90 年代當時在紐約地區所爆發的多重抗藥性肺結核感染研究發現，針對當時分離出具有 INH、RIF、ethambutol(EMB)、streptomycin (STR)、pyrazinamide(PZA)及

kanamycin(KAN)抗藥性肺結核菌株的 357 個病人進行研究，發現其中有 50 個病人的菌株檢體再進行基因型分析後，均呈現有相同的基因體多型性變異 (polymorphism)。這也代表在疾病的散播之前病人體內已經有抗藥性的基因的存在。因此，抗藥性的分子流行病學研究也必須要針對病人是否帶有先天抗藥性進行評估。

### 三、結核病的復發

所謂的” Recurrent TB” 在臨床上的意義即為原本已治癒的肺結核再次復發。一般說來肺結核的爆發可能有兩種情況；一是最近接受外源性(exogenous)新的結核桿菌的感染，另一則可能是內源性(endogenous)的結核桿菌再次活化。根據近十年來的研究發現，外源性再感染(exogenous reinfection)和復發型的再活化最大差別在於是否可以分離到不同種的結核桿菌菌株。早在 1970 年代 Romeyn 的研究就指出，在肺結核高度感染區中會有絕大部份的機會是外源性再感染。隨後 1972 年時 Canetti 也利用流行病學的概念呼應了這樣的一個說法。Canetti 在 1962 年到 1970 年間，針對法國 60 歲以上的人口進行藥物抗性的研究發現 7.8% 的 60 歲以上人口對於抗結核藥物具有抗性。原因推論為 30 年前肺結核在該境內的感染率高達 90%，幾乎當時所有的人都曾經感染過肺結核。因此驗證了抗藥性的獲得是藉由外因性因素的說法。然而，長久以來科學家們也都認為絕大多數肺結核會一再復發的原因，是因為早已感染進宿主的結核桿菌原本呈現休眠狀態，因為某些原因再次被活化所造成。若要區分復發型的肺結核感染是由於外源性再感染 (exogenous reinfection)或是內源性再活化 (endogenous reactivation)所造成的，則必須要進一步探討該區域內結核分枝桿菌傳播的活躍程度、可能感染途徑、環境及宿主的感受性等流行病學相關的問題才能夠做有效的區分。利用分子生物學的技術來分析數據評估肺結核，不僅可以用來推斷肺結核病患是否為外源性再感染，而且也可以提供研究肺結核在免疫缺乏或免疫不全症候群患者中感染意義的研究平台。

### 四、實驗室錯誤/交叉污染

結核桿菌的實驗室檢驗與判定必須要特別注意，因為錯誤的肺結核檢驗報告常會導致各個層面的影響。例如：造成在臨床上抗結核藥物的濫用、造成病患個人日常生活的限制、也會因為追蹤調查造成整個研究資源上的浪費。回顧過往，最常發生實驗室內誤判的原因在於檢體標示錯誤和檢驗分析時，儀器設備交叉污染所致，其他還有許許多多的原因。如何確定檢驗結果是否為偽陽性的反應，第一步驟就是要確定病患連續三天的痰液抹片皆用抗酸性染色(Acid-fast stain)呈陽性，若結果不一致則必須要再次確認。若在實驗室中同時間需操作多株不同的

M. tuberculosis 檢體，則需利用基因分型的方法來避免交叉污染的可能。經 Small 等人的研究發現，若在 7 天內不同病人的檢體若出現相同的 fingerprint 結果則必須再次確認。亦有研究發現，利用 DNA fingerprint 當作標誌來修正實驗室內的錯誤判讀確實可以改進實驗室錯誤率。而利用分子生物學技術所做的研究調查發現，實驗室內造成的錯誤率較之前所預期的更加頻繁。當臨床上出現有數種基因型異質性(genotypic heterogeneity)的結核桿菌時，不同檢體具有相同 fingerprint 結果的機率是非常低的，因此實驗室發生錯誤的機率也會相對減少。就以東亞出現率很高的結核桿菌 W 型北京株(W-Beijing)為例，其大部分具有相同的 spoligotyping 分析結果與很相近的 IS6110-RFLP 數據。因此就不能用 spoligotyping 分析法來當成進行實驗室交叉污染之確認的分子生物學技術。而許多臨床實驗室則會利用標準菌株 H37Rv 做為鑑識比對並進行抗結核藥物感受性試驗，以排除病人間檢體的交叉污染。歸結前言，如果要進行良好的肺結核感染控制的話，對於結核桿菌檢驗實驗室的品管要求是很重要的。就目前看來，若利用以 PCR(polymerase chain reaction)為基礎的分子生物學技術來進行結核桿菌的鑑定是最能降低錯誤率發生。

## 菌株變異對免疫及致病力的影響

根據最近的研究顯示，不同的結核桿菌臨床菌株在不同個體中會引起截然不同的免疫反應。動物實驗中亦發現各菌株具有不同的致病力與毒力。Valway 等人於 1998 年發表的研究報告指出，CDC1551 結核桿菌具有極高傳染力，同時也可以在受感染的病患身上發現有很強的皮膚試驗反應。然而當老鼠感染 CDC1551 後卻快速且大量產生細胞激素(cytokine)而得以存活更久。相對的當老鼠感染另一臨床菌株 HN878 則又是另

一種情況。當老鼠感染 HN878 時，隨即可以看到老鼠體內細胞激素分泌下降，尤其是與調控 TH2 相關的細胞激素，這樣的老鼠很快就可以分離到其肺部有大量的結核桿菌出現，進而導致死亡。若進一步用 IS6110-RFLP 分析法與 spoligotype 鑑定法進行分析後，發現 HN878 菌株與結核桿菌 W 型北京株(W-Beijing)是屬於同一個家族系統(phylogenetic; PGG1; clusterII)。同時也有研究指出，結核桿菌 W 型北京株可以在巨噬細胞(macrophage)進行快速的菌體複製，比較其他結核桿菌菌株，其速度差達 4-8 倍。就臨床上治療來說，感染有結核桿菌 W 型北京株病人會在治療早期出現短暫的發熱現象，隨著病狀進入到嚴重期，這時不論是否為結核桿菌 W 型北京株感染的病患其所出現的藥物毒性反應與抗結核藥物反應都

沒有太大差異。這也就再次說明了，不同結核桿菌菌株感染所引發宿主免疫反應是不相同的。

## 疫苗(Vaccines)

放眼全球，目前 BCG(Bacillus Calmette Guerin)還是最廣泛用來對抗結核桿菌的疫苗，但 BCG 是否能夠真正的預防肺結核感染？目前大家還是抱著懷疑的態度。回顧過去十年，科學家不斷的專研幾個肺結核研究相關主題，包括了解結核桿菌和 BCG 感染生物體後所引發的特異性免疫反應、探討結核桿菌基因體及其各蛋白功能，其實這都是為了發展出一個有效肺結核疫苗。根據目前的流行病學研究顯示，結核桿菌因其菌株的不同會有不一樣的傳染力、需要不同的預防方式和也會造成不一樣疾病危害程度。進一步探究造成上述差異的原因後發現，是因為各不同菌株感染後所引發的宿主免疫反應不一樣所致，這也解釋了肺結核疫苗研發的困難點。但科學家也確信，利用廣泛的抗結核桿菌免疫反應是目前要對抗肺結核感染最有希望的疫苗研究方向。

## 結 論

結核桿菌是一種絕對寄生的病原菌，也代表著它們不會在宿主外的環境下進行繁殖、複製。由歷史遺跡看來，遠古時代就有結核桿菌存在，因此，我們可大膽斷言結核桿菌和人類一樣已經經過數百萬年的演化發展，所以也讓現今的結核桿菌能有別於一般細菌只需要驅動少數的基因進行毒力因子合成就可以進行有效的感染、複製與傳播。由於，結核桿菌存在自然界的時間甚長，在加上其基因變異有其特殊特性(特殊重複序列、IS 片段轉位或 SNP 等)。使得我們可用分子流行病學的研究方式來進行流行病學或演化方面的調查。

利用分子生物學技術來進行流行病學的研究，不但可以驗證傳統流行病學的看法，也因其具有快速鑑定未知的感染菌株與判定內源性再感染或外源性再感染的價值。故對於管控區域性或世界性的肺結核感染提供了更全面的資訊。同時，也大大協助臨床醫學上分析、鑑定肺結核感染。希望未來也能在分子流行病學研究的幫助下，讓我們不但能更清楚結核桿菌的各種生物特性，進而利用這些資訊在抗結核藥物或肺結核疫苗的研究上，使我們能夠有效的對抗肺結核的侵害。

## 表一 目前廣泛應用分子生物學技術來進行的肺結核研究

---

Part1、在”監控結核桿菌的傳染動態”中可用分子生物學技術來：

- A. 確認疾病的爆發 (outbreak) 或傳播 (transmission) 有可能的嫌疑菌
- B. 鑑定還沒找到嫌疑菌的傳染事件
- C. 追蹤傳染的途徑
- D. 評估疾病的傳染和特定的人口或族群之間關係
- E. 評估疾病傳染中的各項危險因子

Part2、在復發的結核病患利用分子生物學技術來評估是結核桿菌的再次感染 (reinfection) 或者是結核桿菌的再活化 (reactivation)

Part3、用分子生物學技術來監測實驗室內檢驗的誤差率或交叉汙染的可能

Part4、利用分子生物學技術來測定結核桿菌在各區域的差異性

Part5、利用分子生物學技術來監控傳染中的結核桿菌其抗藥性情況

Part6、用分子生物學技術來調查由病患身上分離出的抗藥性菌株的演化狀況

Part7、分子生物學技術可用來鑑別與分析多重結核桿菌感染 (mixed infection)

Part8、可先用分子生物學技術來先行篩選未來肺結核研究方向

Part9、利用分子生物學技術來評估現行的肺結核控制計畫是否有效，例如：DOTS (direct observed therapy-short course)

Part10、利用分子生物學技術來鑑別不同菌株的傳染能力與感染速率

Part11、利用分子生物學技術可鑑定出流行中的高毒性 (hypervirulent) 菌株

Part12、利用分子生物學技術來調查結核桿菌的演化史

---



表二 抗結核藥物的藥物標的及其作用機制

抗結核藥物名稱	抗藥性基因	抗藥性基因產物	基因突變機率
Streptomycin	<i>rpsL</i>	Ribosomal protein S12	約 60%
	<i>rrs</i>	16S rRNA	小於 10%
Rifampin	<i>rpoB</i>	$\beta$ -RNA polymerase	大於 95%
Isoniazid	<i>katG</i>	Catalase-peroxidase	60%-70%
	<i>oxyR-ahpC</i>	Alkylhydroreductase	大約 20%
	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP reductase	小於 10%
	<i>kasA</i>	$\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase	小於 10%
	<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase	未知
Ethambutol	<i>embCAB</i>	Arabinosyltransferase	大約 70%
Pyrazinamide	<i>pncA</i>	Amidase	70%-100%
Ethionamide	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP reductase	小於 10%
	<i>ethA</i>	Flavoprotein-monooxygenase	未知
Kanamycin	<i>rrs</i>	16S rRNA	大約 65%
Fluoroquinolone	<i>gyrA</i>	DNA gyrase $\alpha$ subunit	大於 90%
	<i>gyrB</i>	DNA gyrase $\beta$ subunit	未知
Capreomycin	<i>tlyA</i>	rRNA methyltransferase	未知
	<i>rrs</i>	16S rRNA	未知
Para-aminosalicylic acid	<i>thyA</i>	Thymidylate synthase	未知

## 參考文獻

1. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, et al: Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev 2006;19:658-85.