

計畫編號：DOH99-DC-2020

行政院衛生署疾病管制局九十九年度科技研究發展計畫

**建立新的痢疾阿米巴基因型別分析系統應用於
高危險族群之流行病學調查**

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：嵇達德

研究人員：陳榮盛、李京倫、許世芬

執行期間：99年1月1日至99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	(2)
摘要	(3)
前言	(5)
材料與方法	(8)
結果	(16)
討論	(21)
結論與建議	(25)
計畫重要研究成果及具體建議	(25)
參考文獻	(27)
圖表	(29)

共 (37)頁

摘要

痢疾阿米巴現今仍為重要的寄生蟲傳染病，於世界各地皆可引起嚴重痢疾或侵入性疾病，每年約有 10 萬個病人死於痢疾阿米巴。但非所有的 *E. histolytica* 皆可致病，事實上約只有 1/10 的 *E. histolytica* 感染會產生臨床症狀，真正的原因尚未明瞭，但可能與所感染的菌株種類有關。研究菌株間的變異可以了解他們在遺傳學上的關聯性及在人類族群間的傳播模式。利用 6 tRNA-linked STRs 基因型別分析為基礎的親緣演化分析方法，發現不同危險族群之間菌株的型別有差異，而在臨床症狀亦與菌株型別相關，可分為三大集群，集群 A 臨床症狀較輕微，集群 B 臨床症狀輕重參半，集群 C 臨床症狀較嚴重。外勞與國人尚未發現有相互傳播之情形。台灣與日本間則有痢疾阿米巴傳播之可能，須加釐清。新發展的式毛刷採檢技術經測試為可行的技術，亦顯示其對困難檢體的採集有相當大的益處，可應用於群聚感染事件之快速檢疫防治策略。發展新的 Promoter-Transposon display 型別鑑定法可可用於痢疾阿米巴的快速分型。並協助東部某醫療院所對精神療養病患進行阿米巴痢疾篩檢防治，完成群聚感染病患篩檢，並協助其建立防治作為。

關鍵詞：阿米巴痢疾、基因型別、6 個 tRNA 相關的多形性標記、Promoter-Transposon display 型別鑑定法、親緣演化分析、集群

英文摘要

Amoebiasis still is a very important parasitic disease, which results in severe and invasive disease all over the world and causes about 100 thousands death each year. However, no all of *Entamoeba histolytica* strains could cause disease. In fact, only 10% infections could cause clinical symptom, but the mechanism is still not clear, may relate to infected strains. Study of the strain variations could reveal their genetic connection and transmission pattern among humans. Basing 6 tRNA-linked STRs polymorphic markers, we developed a new phylogenetic analysis method of *E. histolytica* strains from different risk groups. Indeed, genotypes were clearly different among different risk groups and were correlated with their clinical symptoms, and could be grouped into three big clusters, Cluster A had minor symptoms, Cluster B had variety symptoms, and Cluster C had more severe symptoms. There was no cross-transmission between Taiwanese and foreign labor was found. However, *E. histolytica* might be transmitted between Taiwanese and Japanese and needed to be clarified. A new type of brush swab was developed to improve the efficiency of stool sample collection from mental retard patients and to promote the disease control. New designed Promoter-Transposon Display assay was also developed and was suitable for the rapid typing of *Endameba histolytic*. A survey was conducted in a mental institution in east Taiwan to help the *E. histolytica* control this year.

Keyword: *Endameba*, genotype, 6 tRNA-linked STRs, risk group, Promoter-Transposon display assay, phylogenetic analysis method, cluster

前言

阿米巴痢疾(amebiasis)之病原體為痢疾阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*)可藉由糞口(fecal-oral)傳染，主要寄生於腸道，大部分的患者感染無症狀。痢疾阿米巴偶爾會伺機穿過腸道黏膜侵入身體其他器官，主要會引發下痢腸炎，嚴重者會有肝膿瘍的發生。痢疾阿米巴生活史主要有囊體(cyst)及活動體(trophozoite)兩時期。Walsh [1] 於 1981 年估計全球每年有五億人感染過阿米巴痢疾，導致十萬人死亡，故世界衛生組織將之列為重要之熱帶腸道寄生蟲傳染病。但此數據可能被高估，因為只有 *E. histolytica* 才會造成上述疾病，許多無症狀帶原者(asymptomatic carries)體內所帶蟲株在鏡檢下形態學無法與 *E. dispar* 或最近才發現的 *E. moshkovskii* 區分。直到 1978 年後，才能根據他們的生化反應、免疫學反應以及基因序列的不同，將其分為三種不同的蟲株種類，但前者有致病力而後二者無致病力的 species [2,3, 4]。

儘管如此，阿米巴感染症仍為發展中國家最重要的傳染病之一，屬世界性分佈，但在熱帶及亞熱帶地區發生率較高，嚴重病例及併發症的病例也多發生於此地區，包括墨西哥、中南美洲、西非、南非、南亞及東南亞，但其中 90% 的病人通常為無症狀感染[5]。台灣近年來自東南亞引進大量外籍勞工及外籍新娘，因此可能引入屬第二類法定傳染病的阿米巴痢

疾。台灣的高危險感染族群亦包括長期集體療養之精障及智障人士及男同性戀者等。民國 83 年東部某精神醫院的寄生蟲感染率調查，發現痢疾阿米巴鏡檢陽性率為 10.9% [6]，但在積極防治後至 98 年痢疾阿米巴 PCR 陽性率已降至 0.1%，顯示積極診斷與治療確有助於疾病的防制。其他啟智教養院的調查亦顯示，血清學陽性率約為 13.1% 到 44.1%，EIA 陽性率為 3.4%，鏡檢陽性率則為 0.001% 到 15.2%，歧異度頗大 [7-9]。台大洪建清等人研究發現男同性戀/HIV 患者亦為痢疾阿米巴的高危險群[10]，但造成流行的阿米巴菌株是由國外傳入或本土流行還需釐清。在非洲南部致病性阿米巴流行地區，*E. histolytica* 與 *E. dispar* 的感染率約為十比一，在印度及中南美洲則將近一比一，其他地區 invasive amoebiasis 則非常少見[11]。因 isoenzyme pattern 生化分析無法有效區分致病性痢疾阿米巴蟲株[12]，開發適當之基因分型標的，將有助於 *E. histolytica* 蟲株的有效分型。然而，至今有關 *E. histolytica* 菌株變異及其在疾病的重要性的資訊仍非常缺乏。如何確認哪些受感染個體將會發展出腸道內阿米巴症而非腸道外阿米巴症？同一種蟲株可以同時侵犯腸道並造成肝膿瘍嗎？在同一地區造成阿米巴痢疾傳播的蟲株是否為同一株或由多種蟲株感染？回答上述問題需要發展一些更有效及可靠的基因分型技術來檢測的 *E. histolytica* 變異性[13]。

雖然到目前國際間對 *E. histolytica* 的基因分型並無統一的標準，但

去年所評估的 6 個 tRNA 相關多形性標記(six tRNA- linked STRs polymorphic markers)基因分型法已被認為是目前最好的分型方法之一，它具有多型性及穩定性，適用於大量檢體及不同的實驗室皆可使用等優點 [14,15]。其他基因如 strain-specific gene (*ssg*) [16,17] 、serine- rich *E. histolytica* protein 基因(*SREHP*) [18] 、chitinas 基因(*chit*) [19] 、asparagine-rich *E. histolytica* antigen 基因(*ariel*) [20] 等雖曾被用於基因分型，但常因多型性不夠或有多條基因產物而無法普遍使用。因此，本年度計畫利用 6 組 tRNA 相關多形性標記基因，發展出親緣演化分析防法可用以評估患者之間的關係、國籍以及症狀與蟲株之間相關性，並可建立國際通用之型別分析模型，提供國際間流行病學比較及做為痢疾阿米巴防治之依據。

材料與方法

材料

ProSpecT[®]痢疾阿米巴微分析盤檢驗套組 (ProSpecT[®] *Entamoeba histolytica* Microplate Assay 購自 Remel (USA), Guanidine thiocyanate 購自 Amersham Pharmacia Biotech (USA), 矽藻土 (Celite[®]) 購自 Merck (Germany), AmpliTaq[®] DNA polymerase 購自 Applied Biosystems (USA), Platinum[®] Pfx DNA polymerase 及 TOPO TA Cloning Kit for sequencing 購自 Invitrogen (USA); NuSieve 3:1 agarose 購自 Cambrex (USA), Chelex[®] 購自 Bioi Rad (USA), MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III 購自 Roche (USA); 痢疾阿米巴蟲株 HM1:IMSS 購自 ATCC (USA), 限制酶 *AluI* 購自 New England BioLabs (USA), 其他藥品均為試藥級。

檢體來源

台灣地區本土精神病院(北、中、南、東部地區)收集之新鮮糞便檢體、國內阿米巴病例通報檢體(包括台灣國人及外籍勞工或外籍新娘)以及國內合作之愛滋病人與愛滋病匿篩者檢體。

檢體處理及保存

檢體處理與處理依據 Nollau 等提出之方法加以修改而得。取 0.5g 新鮮糞便含 1%之 6M guanidine thiocyanate 混合震盪均勻，室溫下 10 分鐘後，進行

DNA 萃取或保存於-20°C。萃取 DNA 的方法為利用 MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche)分離 DNA。取得 DNA 之後，繼續進行 PCR 反應。

STRs-containing loci 基因型別鑑定

利用表一的引子進行 Nested PCR 增幅痢疾阿米巴於 tRNA 含 STR 的 loci，先以 Selected tRNA primers 進行 outer region 的增幅，再以 *E. histolytica*-specific primers 增幅 inner region，共增幅六段區域。PCR 試劑使用 2X Premix(Genomics, Taiwan)，總反應體積共 25 μ l。

Nested PCR 反應條件為起始 denaturation 為 94°C 5 分鐘，denature 溫度為 94°C 進行 30 秒，anneal 溫度參照表一進行 30 秒，extention 溫度為 72°C 進行 1 分鐘，共循環 35cycle，最後再以 72°C 7 分鐘結束反應。

Table 1. The primer of 6 STRs-containing loci

Primer name	Sequence (5' to 3')	Annealing temperature
Selected tRNA primers		
A-L5	GGATCGATACCCCTCATCTCCA	64
A-L3	CGCATCTTGCGATAGCCGAG	
D-A5	CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT	56
D-A3	GCTACACCCCATTAACAAT	
N-K5	CGAACGGCTGTTAACCGTTA	55
N-K3	TTCCTAGCTCAGTCGGTAGA	
R-R5	AGCATCAGCCTTCTAAGCTG	55
R-R3	CTCCGACTGAGCTAACAAG	
S ^{TGA} -D5	CTCTGGATGCGTAGGTTCAA	58
S ^{TGA} -D3	GTATCTTCGCCTGTCACGTG	
S-Q5	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT	56
S-Q3	GAGATTCTGGTTCTTAGGACCC	

<i>E. histolytica</i> -specific primers			
AL-H5	CATCTCCATTATTATCTAGATATCCTTTATTACT	57	
AL-C	GGCACGAATGCTTTGATATATAA		
DA-H5	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT	50	
DA-H3	ATTAACAATAAAGAGGGAGGT		
NK2-H5	GAAGCGTCTTTTTTACTATTAGTG	59	
NK2-H3	GGCGTATTTTTAGAATAGGATAAG		
RR-H5	GCGCCTTTTTTATTCAATATACTCC	57	
RR-H3	GGATGAAGATATCTTCACAGGG		
S ^{TGA} D-H5	AAATCCTGCCACTGTCGTAA	58	
S ^{TGA} D-H3	AATCCCCGTTGAAGAGTTCT		
SQ5	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT	55	
SQ-H3	GTGGGACCACTTTTTTATACCTA		

PCR 產物之定序與比對

增幅出的 PCR 產物經過 2% 洋菜瓊脂電泳確認大小後進行定序分析，定序結果再與 tRNA 型別表進行 STR type 辨識。

親緣演化分析

生物資訊軟體 BioNumerics (Applied Maths, Belgium)，將 6 組 tRNA-linked STRs 相關的多形性標記基因型別進行結果分析。定序結果輸入 BioNumerics 軟體，鑑定每個區段之變異區域，變異區域分為兩個呈現型態進行探討分析，一為將變異區域以重複序列形式進行分析，一為將變異區域以鹼基序列進行分析，重複序列部份以 Pearson correlation coefficient 比較阿米巴之差異程度形成相似矩陣，鹼基序列部份先以 Fast algorithm 進行序列 alignment，再形成相似矩陣，兩部份的相似矩陣完成後平均相似矩陣得最終相似矩陣，最後的相似矩

陣以 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean(UPGMA)繪出檢體間之親緣關係 (如圖 1)。並結合每個檢體的基本流行病學資料繪出親緣演化樹狀及流病資料關係圖，評估親緣演化樹的可信度則是利用 cophenetic correlation 觀察原始資料與演算後資料之分歧程度。

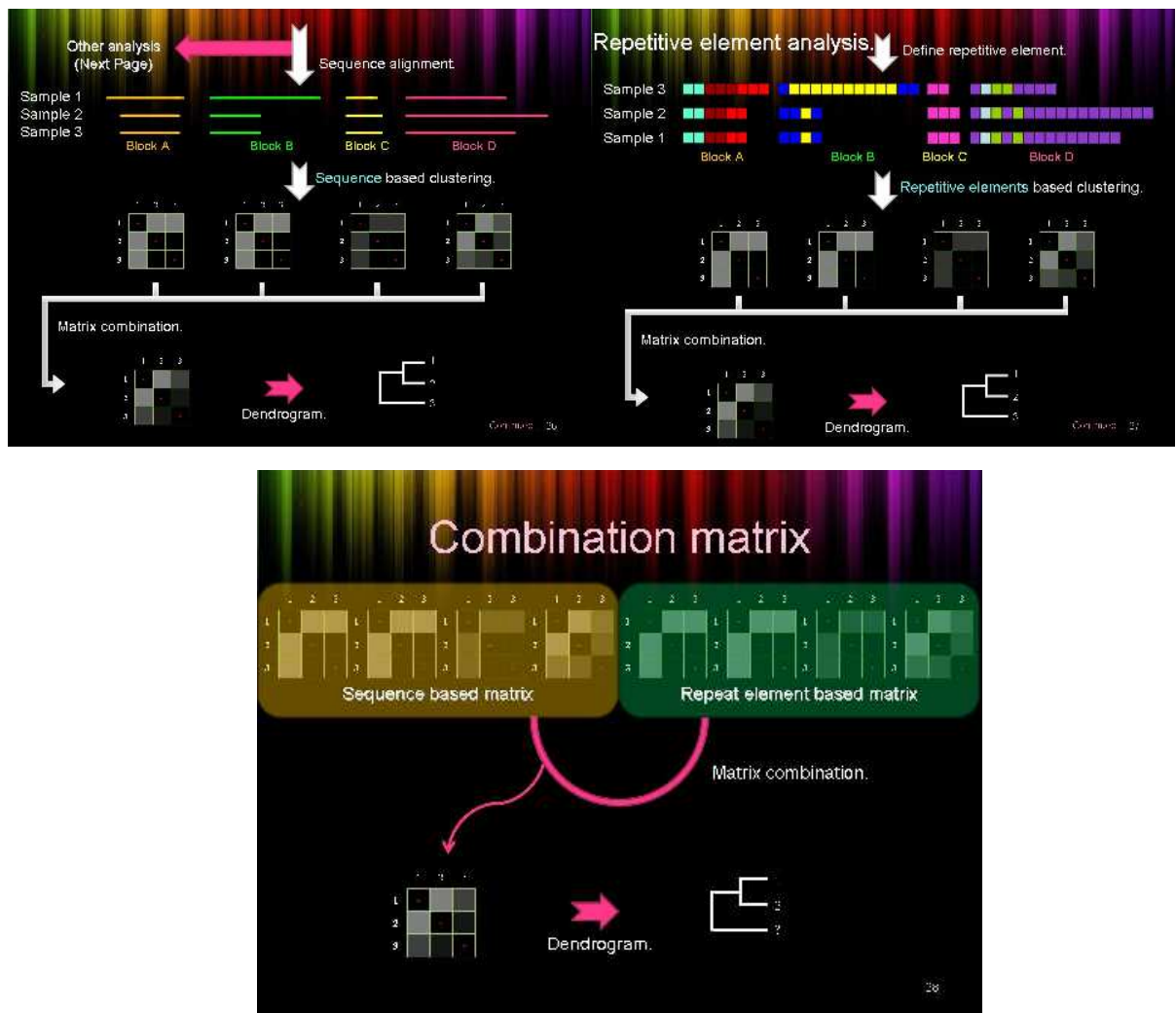


圖 1

Transposon display 基因型別鑑定法

方法依 Srivastava S 等人[23]所述，流程如圖一，並稍修改入下：

VspI 限制酶切割

將所抽取的 Total genomic DNA 作 *VspI* (濃度 5U) 於 37°C 下作用 5 小時，所得全部體積為 50 μ l。利用 Qiagen GFX kit 回收 DNA，並利用 T4 DNA ligase 連接 adapters 和 genomic DNA，之後將 ligated products 以 TE buffer 10 倍稀釋，以便進一步作 PCR 反應，所用引子如表二。

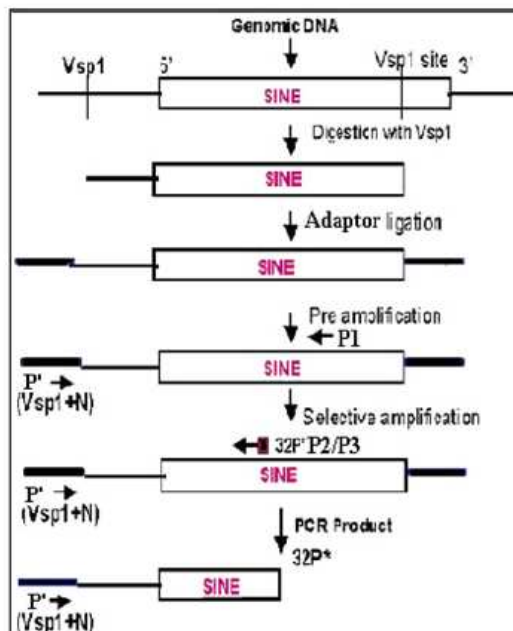
Preselective amplification

利用 P' 引子和 P1 引子作 PCR 反應，反應條件如下：12 pmol 引子、1 倍 PCR Buffer、2.5 mM MgCl₂、1 倍 BSA、0.6 mM dNTP 和 1U *Tag* DNA polymerase。PCR 反應流程為：95°C 作用 5 min；其餘 30 cycles 循環為 95°C 反應 30 秒，45°C 反應 30 秒和 70°C 作用 1 分鐘，最後則單獨以 70°C 反應 10 分鐘。PCR product 用 TE buffer 20 倍稀釋，以便進一步作選擇性 PCR 反應。

Selective amplification

先將【P2/P3】作放射性物質標記，在依下列條件進行 touch down PCR：12 pmol 引子、1 倍 PCR Buffer、2.5 mM MgCl₂、1 倍 BSA、0.6 mM dNTP 和 1U *Tag* DNA polymerase，PCR 反應流程為：95°C 作用 5 min；其餘 12 cycles 循環為 95°C 反應 30 秒，65°C 反應 30 秒和 70°C 作用 1 分鐘，於每個 PCR 循環中都降低 1°C，來作反應，後面 24 循環則以 annealing temperature 57°C 反應，最後則單獨以 70°C 反應 5 分鐘。PCR product 反應完成後以 6% polyacrylamide urea gel 電泳檢測產物長度（其中需經過轉漬過程）。

圖二



表二

Primer sequences used in transposon display

Adapter primers	
Forward	5' TAC CGC CAC ACC CAC CC 3'
Reverse	5' GGG TGG GTG TGG CGG 3'
5' PCR primer	
P'	5' GTG GGT GTG GCG GTA AT <u>C</u> 3'
3' Internal SINE1 primers	
P1	5' AGT AAT CTC TTT GTT GAA CCT A 3'
P2	5' GGG AGA GTC GAA GAATGA ATT T 3'
P3	5' TTC AAA AGC ACC GTC ATA ACC A 3'

Promoter-Transposon display 基因型別鑑定法

參考 Singh U [24]及 Srivastava S [23]等人之論文設計本實驗方法，方法流

程如圖三：

Preselective amplification

利用 SINE P3 引子和 biotinated M9R promoter 引子作 PCR 反應，反應條件如下：12 pmol 引子、1 倍 PCR Buffer、2.5 mM MgCl₂、1 倍 BSA、0.6

mM dNTP 和 1U MLVA genotyping *Tag* DNA polymerase。PCR 反應流程為：95°C 作用 5 min；其餘 30 cycles 循環為 95°C 反應 30 秒，45°C 反應 30 秒和 70°C 作用 1 分鐘，最後則單獨以 70 °C 反應 10 分鐘。Purify PCR product with Streptavidin magnetic beads and wash with ddH₂O。所用引子如表三。

Selective amplification

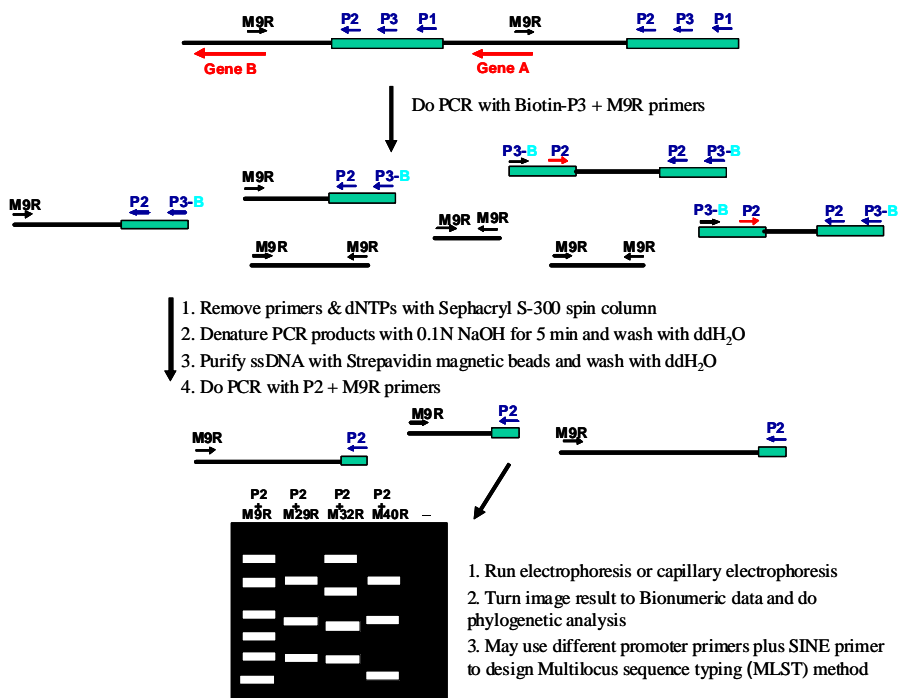
利用 SINE P2 引子和 M9R promoter 引子作 PCR 反應，在依下列條件進行 touch down PCR：12 pmol 引子、1 倍 PCR Buffer、2.5 mM MgCl₂、1 倍 BSA、0.6 mM dNTP 和 1U MLVA genotyping *Tag* DNA polymerase，PCR 反應流程為：95°C 作用 5 min；其餘 12 cycles 循環為 95°C 反應 30 秒，65°C 反應 30 秒和 70°C 作用 1 分鐘，於每個 PCR 循環中都降低 1°C，來作反應，後面 24 循環則以 annealing temperature 57°C 反應，最後則單獨以 70 °C 反應 5 分鐘。

磁珠純化

使用 Promega 的磁珠，將磁珠 shaking or vortexing，使整體混合均勻，取 5 μ l (50 μ g) 已經混勻的 beads 到 1.5 mL tube。再將 tube 置於 magnet 磁座 2 min，在 magnet 磁座上小心的吸取上清液(避免 tip 碰到 bead pellet)，從 magnet 磁座上移走 tube，再沿管壁加入 20 μ l Binding Solution，最後再緩慢的 pipetting 混勻，將 tube 置於 magnet 磁座上，再小心的吸取上清液並從 magnet 磁座上移走 tube，再沿管壁加入 20 μ l Binding Solution，最後再

緩慢的 pipetting 混勻，加入 20 μ l PCR product 置 tube 中，小心混勻避免產生泡沫，置於室溫(15-25 $^{\circ}$ C) 3 小時，roller 旋轉使均勻，再 magnet 磁座上小心的吸取上清液，使用 40 μ l Wash Solution wash 兩次，再用 H₂O 或 Tris HCL pH8.0 wash 一次，回溶至所需體積並混勻進行 inner PCR。

圖三、The flow chart of Promoter-Transposon display assay



表三、Primer sequences used in the Promoter-Transposon display

3' Internal SINE1 primers

P2 5' GGG AGA GTC GAA GAA TGA ATT T 3'
 P3 Biotin-5' TTC AAA AGC ACC GTC ATA ACC A 3'

Promoter reverse primers + 5' Pvu II CAGCTG

M29R Biotin-CAGCTG(G/T)(A/T)ATCTCTTC(C/T)ATT(A/T)C
 M32R Biotin-CAGCTG T(G/C)TT(T/G)TTGTTT(A/T)ATT(G/T)
 M40R Biotin-CAGCTG TTTTT(A/T)AGTTCTTTTT
 M9R Biotin-CAGCTGGATGTTTATAAGTTCA

結果

痢疾阿米巴病患之族群、年齡與症狀之分析

將 98 年台灣痢疾阿米巴陽性病患資料與日本學者 Dr. Nozaki 於 99 年之論文比較，發現族群比例以日本最多(41%)，外勞次之(33%)，如圖 1。依病患症狀可分為無症狀，腹瀉，肝膿瘍和其他非腹瀉或肝膿瘍症狀，其中無症狀患者為主要族群，且大多數都來自外勞病患，此結果值得深入探討。圖 2 為痢疾阿米巴病患之年齡統計圖，顯示外勞年齡集中於青壯年間，中位數為 30 歲，低於其他病患族群。國人病患最小年齡與最大年齡相差甚多，其中位數為 34 歲，與國人最小年齡接近，可見國人感染年齡層偏低；在療養院病患最小年齡與最大年齡分佈與國人相仿，但其中位數年齡層偏中間(54 歲)。由於國人的年齡層偏低，因此再以 45 歲為切割線來觀察國人感染年齡分佈，國人 ≤ 45 歲之中位數為 29 歲，比國人中位數 34 還低，表示在國人 ≤ 45 歲的分組中主要年齡分佈約為 20-30 歲；國人 >45 歲之中位數為 57 歲，接近最低年齡 48 歲，因此國人 >45 歲的分組主要年齡分佈為 50-60 歲。不同族群的症狀比例分析如圖 3，顯示教養機構及外勞病患無症狀感染的比例較高，而日本病患的症狀較嚴重，國人病患則分布較為平均。

痢疾阿米巴蟲株之親緣演化分析

親緣演化分析是以英國倫敦熱帶醫學院 Dr. Graham Clark 所建立的 6 組 tRNA-linked short tandem repeats (STRs) (locus SD, SQ, AL, NK2, RR 及 DA) 基因型別分析方法為基礎，得到每個蟲株完整的 6 組 tRNA-linked STRs 基因型別資料(圖 4)，每一種基因 locus 皆含有至少五種以上不同的基因型別，再將所有序列依材料方法所述，以 BioNumerics 軟體分析後用 UPGMA 方法畫出親緣演化樹狀圖。親緣演化分析如下圖 5 所示，不同顏色表示為不同國籍別，綠色為印尼籍、紅色為日本籍、紫色為菲律賓籍、黃色為國人、淡藍色為教養機構病患、藍色為越南籍。從圖 5 中可發現痢疾阿米巴蟲株主要分成三個集群(Cluster)，分為 A，B 和 C 三大群。圖 5a 為痢疾阿米巴病患親緣分析樹之集群 A，發現此集群主要為外勞族群，佔 57%，其次為日本、國人皆佔 16%，療養院佔約 11%。由全體療養院病患來看此集群佔 50%，共有 8 人。依照症狀區分，顯示集群 A 主要臨床症狀較輕微，以無症狀為主(76%)，而其他症狀、腹瀉佔 5%、肝膿瘍佔 14%，且症狀較嚴重之病患又可聚集在其中依個次集群，且國籍皆為國人或日本人，與外勞族群分開，且多為無症狀，此結果值得深入探討。

圖 5b 為痢疾阿米巴病患親緣分析樹之集群 B，發現此集群主要為日本族群，佔 46%，其次為外勞、國人皆佔 23%，療養院佔約 3%。此集群佔了

國人痢疾阿米巴感染族群的 50%。依照症狀區分，顯示集群 B 主要臨床症狀較集群 A 嚴重，仍以無症狀最多佔 51%，但比率較集群 A 低許多，且肝膿瘍病患(29%)及腹瀉症狀(20%)患者比例增加，有症狀與無症狀患者各佔約一半。此集群 B 中之肝膿瘍病患有 21 人，佔所有肝膿瘍病患的 47.62%，同樣腹瀉病患此集群也佔 36.84%，值得深入探討。

圖 5c 為痢疾阿米巴病患親緣分析樹之集群 C，發現此集群主要為日本族群，佔 83%，其次為國人皆佔 11%，療養院佔約 6%，無外勞。依照症狀區分，顯示集群 C 主要臨床症狀較其他兩個集群嚴重，主要症狀為腹瀉與肝膿瘍，各佔 55%與 33%，由 6 個 tRNA-linked STRs 型別亦較為相似。

Minimum spanning method 分析

將上述痢疾阿米巴 6 組 tRNA-linked STRs 基因型別資料庫以 BioNumerics 軟體，進行 Minimum spanning method 分析，產生 Minimum spanning tree，以不同顏色標示不同檢體狀態。從圖 6a 可發現右上一小分枝和中間的分枝為日本群聚，而中間的分枝同時包含部份國人檢體，左下為外勞之印尼檢體群聚。圖 6b 以不同顏色表示症狀區別，可以看到右上分枝為症狀嚴重分群，中間部份症狀嚴重之比例也較高。圖 6c 以顏色表示感染痢疾阿米巴並且為 HIV 陽性患者，可以看到中間分枝有明顯 HIV 陽性患者聚集情形，表

示這些患者帶有的痢疾阿米巴可能有某些相似性。

痢疾阿米巴 Transposon display (TD)基因型別分析方法的建立與改進以及初步成果

去年已發現 Srivastava S 等人所述之 TD 基因型別分析方法，無法用於臨床檢體中阿米巴蟲株之分型。現已改進此方法成為 Promoter-Transposon display (PTD)基因型別分析方法，流程如上述圖二所示。由於痢疾阿米巴的基因組已於 2005 年完全解碼，各 coding region 間非常接近，non-coding region 一般非常短，而各基因 promoter 中常含有特定之 DNA 序列[24]，加上 SINE transposons 可 random 插入基因組中約 450-500 copies，因此建立 SINE 到特定 promoter DNA 序列的 PCR 就可以建立如 PFGE 般之 finger print，以進行基因型別分析。先以 P3 SINE primer 及 biotin labeled M9R (M29R, M32R or M40R) promoter primer 進行 outer PCR，進行磁珠純化後，再以 P2 primer 及 M9R (M29R, M32R or M40R) primer 進行 inner PCR。由於剛開始進行實驗實是用一般的 Taq DNA polymerase，因此所得知 DNA pattern 常相當模糊，PCR 片段亦偏短，如圖 7A。而當我們換用 multiplex PCR 用的 Taq DNA polymerase 及改進反應條件後，所呈現的 DNA pattern 就大幅改進了，如圖 7B。我們重複用培養的痢疾阿米巴 DNA 進行幾次 PTD mapping 皆有很好的再現性。

建立發群聚感染事件之快速有效檢疫防治策略與檢體收集

台灣造成痢疾阿米巴的感染的高危險群有外籍勞工，精智障教養機構院生、疫區返國者、男同性戀/HIV 患者及偏遠地區住民[25,26]。精智障教養機構之住民因集體生活及異常行為，為阿米巴感染症除外籍勞工外最主要的高危險群。近幾年的資料顯示痢疾阿米巴的檢體及通報病例的數量皆有增加，不論國人或者外勞都有明顯增加趨勢。然而台灣痢疾阿米巴群聚感染事件主要發生在教養院或精神療養機構，因機構內之病患多無行為能力，在採檢時常有留便困難，無法儘速完成全院篩檢。因此，我們改進傳統採樣方法，發展出新的毛刷式肛門採檢棒。經與傳統的棉棒式肛門採檢棒比較後，發現兩種不同採檢棒有著顯著性差異，新型毛刷採檢棒比傳統棉棒沾附較多的糞便量，如圖 8 所示。再利用陽性與陰性的糞便檢體進行兩種採檢棒取樣後進行 ELISA 檢測敏感度的比較，結果發現新式毛刷採檢棒對陽性檢體之採檢效果與呈現皆優於傳統棉棒採檢結果(圖 9)，而陰性檢體的比較兩者結果相同。此新式採檢技術對於建立群聚感染事件之快速有效檢疫方法與檢體收集將有相當的幫助。

討論

痢疾阿米巴蟲株之親緣演化分析

痢疾阿米巴蟲株之親緣分析樹可顯示三個主要集群(Cluster)。集群 A 之次集群 I (圖 5aI) 中有 4 位病患的 6 個 tRNA-linked STRs 的型別相同，與另 2 位病患型別較為相似，其臨床症狀屬於較為嚴重，且國籍皆為台灣及日本，是否有毒力較強之蟲株存於此 A-I 次集群及台日之間是否有蟲株流行，則需再加探討。此外，其他次集群中的痢疾阿米巴病患其症狀皆較為輕微，以無症狀為主。集群 A 有兩組各兩個的療養院病患之蟲株，其型別兩兩相似，且從流病資料上證實其為同一療養院病患，故認為是群聚感染事件。過去許多學者認為台灣與日本流行之痢疾阿米巴型別應較為相近，本研究亦顯示台灣與日本之間的型別確實較接近，可能是地理較接近及交流亦較其他國家頻繁，易有相互傳播之可能。因痢疾阿米巴多經糞口傳染，台灣近年來引入大量外勞，增加國人與外勞接觸交流的機會，因此擔心痢疾阿米巴會經由外勞傳給國人，本研究雖發現有少數幾個外勞型別會與國人群集，但型別卻不一樣，因資料庫尚未完全，無法證實國人與外勞有相互傳播之現象，但卻發現台灣與日本間確有痢疾阿米巴交流之可能。集群 A 之次集群 II 中來自於台灣南部某教養院的 TW098121 和 TW098123 與來自日本岡山地區某療養院的 JP_KU14 型別非常相似，是否有痢疾阿米巴在相同及不同國家之療養機構間交流之可能性，值得深入探討。亦發現在印尼外勞的痢疾阿米巴型別有些與 NCBI 資料庫中不同，屬於新型別且較為多樣性與去年結果相符。

集群 B (圖 5B) 中主要的族群為日本族群，台灣與日本最接近，菲律賓亦較相近，是否因為這三個國家地理較接近而有較接近的型別演化須加探討。在台灣痢疾阿米巴的 tRNA-linked STRs Locus AL 及 NK 中可發現新

的 genotype，而印尼蟲株中 Locus AL 及 NK 的新 genotype 更多，但與國人的新型別不同，例如 4AL 與 ALNEW1 以及 ALNEW2 皆只相差一個相同的 repeat element，然而 DANEW5 與 15DA 較相似但與 5DA 以及 6DA 較不相同，如圖 10。本研究方法比起先前表列的方法，更容易得到此結果。若依症狀區分，集群 B 中有症狀以及無症狀比例各佔約一半，此集群病人的臨床症狀上差異較多，在某些次集群其臨床症狀較為嚴重。

集群 C (圖 5C) 中主要的族群為日本族群，且此集群無外勞的蟲株存在，皆來自台灣及日本，尤其在次集群 I 中顯示台灣與日本型別最接近，此結果與集群 A 及 B 的結果相同，符合台灣與日本蟲株型別較相近的推測。若依症狀區分，集群 C 的症狀多較為嚴重，肝膿瘍的比例很高。是否顯示此群集中的蟲株有較強毒力，值得深入探討，但此發現仍可提供醫生臨床用藥上的參考。此三個群集中集群 A 主要的臨床症狀較輕微，集群 B 症狀為輕重參半，而集群 C 的症狀較為嚴重。

在集群 B 之次集群 II (圖 5BII) 中台灣有兩位 HIV 陽性患者痢疾阿米巴基因型別與一位台灣 MSM 病患及一位日本 MSM 病患完全相同，也與另一位日本 MSM 病患相似，顯示痢疾阿米巴有在特定族群中傳播的現象。推測在 HIV 族群尤其是 MSM 族群中可能有較高之傳播可能性，且與先前推測國人與日本人有著高度親密交流的推論相似，且此蟲株其臨床症狀上有較高的致病性，是值得關注的。

國人及外勞間痢疾阿米巴的基因型別分析討論

從親緣演化分析圖 (圖 5)，可發現國人以及外勞之間其型別親緣關係較遠，此於去年本研究所得結果相似，且以印尼籍外勞的型別分析以及親

緣演化樹狀圖，可發現印尼籍外勞的阿米巴型別差異性較大且本身具有基因多樣性，此結果可能與印尼當地國家型態與生活習性有關，印尼為多島嶼國家且交通較為不便，故可能發展出較多不同基因型態之痢疾阿米巴，但可觀察得到其臨床症狀皆較為輕微，幾乎大部分都屬於無症狀帶原者，顯示即有可能這些阿米巴蟲株為當地印尼本地流行之蟲株，故此一結果值得外勞境管機構注意，但仍須與印尼等其他國家當地機關合作，了解是否在當地流行蟲株即為這些蟲株，以釐清是否為境外移入等問題，進一步朝向境外防疫，國際合作的目標邁進。

阿米巴痢疾高危險族群的檢體收集及病例統計

今年已協助東部某醫院進行阿米巴痢疾篩檢，完成 152 病患篩檢，Ameba ELISA 陽性 6 人(3.94%)及 PCR 陽性 4 人(2.63%)。但該院總住院人數高達近千人，因此與該院討論防治計畫並建置疑似病患隔離措施與防治作為。根據先前本實驗研究在東部另一家大型精神療養機構之經驗，提供該院建置全院篩檢防治計畫依據。此醫院後續進行全院 ELISA 篩檢後，目前以較少群聚發生，但仍不可掉以輕心後續的防治工作，以免功虧一匱。此有賴醫院同仁對病患的悉心照顧，分局同仁提供的的諮商與督導。我們也會加以配合後續的檢驗工作，並提供專業的建議，也希望未來可以與醫院合作找到可能的傳染途徑，以提供其他精神療養院所的阿米巴痢疾防治。

痢疾阿米巴 Transposon display (TD)基因型別分析方法的建立與改進

我們所改進的 PTD 基因分型方法已可得到適當的 DNA pattern 及再現性，如圖 1B。因此選擇適當的 MLVA genotyping enzyme 及改進反應條件

是非常重要的。我們的設計中改用 P3 primer 及 biotin labeled M9R (M29R, M32R or M40R) primer 進行 outer PCR 後以 streptavidin magnetic beads 純化產物後再進行 inner PCR，如未執行此步驟而直接進行 inner PCR，結果如圖 1B 中我們仍可見到一些淡淡模糊的 bands，若要應用於糞便檢體就必須執行此步驟，將 outer PCR 中剩餘的 genomic DNA 及 primers 移除，以免影響 inner PCR 的結果。由於此方法不需要如 tRNA STRs 方法要進行 6 次 STR locus PCRs 及後續的基因定序與 STR 分析，或再以 restriction enzyme 切割，所使用的檢體量亦較少，在跑完 PCR 電泳後即可以 Bionumerics 等軟體進行 phylogenetic analysis 並建立 pattern database。因此不失是一個可以再加發展的分型方法，未來將與 tRNA STRs 分型方法的結果比較。

發群聚感染事件之快速有效檢疫防治策略

實驗室所發展的新式毛刷採檢技術經測試為可行的技術，亦顯示其對困難檢體的採集有相當大的益處，並可減少採檢時間、避免檢體的汙染與其他易遭遇困難之問題（如：排便困難或留便不易等），故將進行更近一步的臨床合作計畫，進行臨床實驗，分析結果，以期能將此技術應用在群聚感染以及採檢困難之問題上，建立更有效率之檢驗流程與策略。

結論與建議

1. 本年度研究已發展 tRNA-linked STRs 基因型別分析為基礎的親緣演化分析方法，應用於痢疾阿米巴蟲株的親緣分析，以了解型別與臨床症狀、國籍或區域性上的相關性。
2. 痢疾阿米巴在不同危險族群確有許多不同型別存在，外勞與國人尚未發現有相互傳播之情形。台灣與日本間則有痢疾阿米巴傳播之可能，須加釐清。
3. 由親緣演化樹可發現三大集群再搭配臨床症狀資料分析，發現此三大集群床症狀存有差異，須加釐清是否型別與毒力之間是否有相關性。
4. 新的 Promoter-Transposon display 基因型別鑑定法可用於痢疾阿米巴的快速分型，但廣泛的應用性仍有許多問題需要克服，期能應用疑似群聚感染事件之初步分析。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 本年度研究已發展痢疾阿米巴 tRNA-linked STRs 基因型別分析為基礎的親緣演化分析方法，建立親緣演化樹狀分析圖，並可利用此模型可解釋更多有關痢疾阿米巴型別與臨床症狀、國籍或區域性上的相關性，故希望以此模型與國際合作建立全球痢疾阿米巴型別分析，達到國際監控的最終目的。

2. 痢疾阿米巴在不同危險族群確實有許多不同型別存在，尤其印尼外勞發現型別具有基因多樣性，但與國人尚未發現有傳播之情形。台灣與日本間則有痢疾阿米巴傳播之可能，須加釐清。

3. 由親緣演化樹可發現三大集群再搭配臨床症狀資料分析，發現此三大集群床症狀存有差異，集群 A 臨床症狀較輕微，集群 B 臨床症狀輕重參半，集群 C 臨床症狀較嚴重。這是相當值得深入探討的問題，須加釐清是否型別與毒力之間是否有相關性存在。

4. 新的 Promoter-Transposon display 基因型別鑑定法可用於痢疾阿米巴的快速分型，但廣泛的應用性仍有許多問題需要克服，期能應用疑似群聚感染事件之初步分析。

我們發現部分國家外勞的檢出率仍有偏高的現象，利用親緣演化分析後發現並非台灣本地之國人流行蟲株，故判斷可能是其輸出前檢驗未落實或治療未完全。因此建議輸出國應強化輸出前檢驗，當輸入國內時建議採用敏感度較高之 ELISA 方法檢測，並對我國外勞健檢醫院進行抽樣查核及盲測，以確保檢驗的品質。

參考文獻

1. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis.* Mar-Apr 1986;8(2):228-238.
2. Dimond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol.* May-Jun 1993;40(3):340-344.
3. Anonymous. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull.* Mar 1997;18(1):13-14.
4. Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infect Genet Evol.* 2009. [Epub ahead of print]
5. Ravid JI: Amebiasis. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1453-1466
6. 翁秀貞、鄭美英、劉國輝等：台灣某精神醫院寄生蟲罹患狀況調查—特別著重於痢疾阿米巴之檢查。疫情報導，民國84年；第11卷第7期：179-183 頁。
7. 趙黛瑜、吳炳輝、陳國東：省立某教養院痢疾阿米巴感染之研究。疫情報導，民國86年；第13卷第5期：135-144 頁。
8. 江大雄、張國慧：某啟智教養院阿米巴痢疾爆發流行事件之研究。公共衛生，民國89年；第二十六卷第4期：261-270 頁。
9. 鄧洪音、蕭偉宏。台灣某啟智教養院內腸道痢疾阿米巴致病性種別分析及流行病學研究。疫情報導，民國94年；第21卷第1期：1-19 頁。
10. Hung C-C, Deng, H-Y., Hsiao, W.-H., Hsieh, S.-H., Hsiao, C.-F., Chen, M.-Y., Chang, S.-C., Su, K.-E. 2005. Invasive amebiasis is an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. *Arch. Intern. Med.* 165(4):409-15.
11. Stanley SL, Jr. Amoebiasis. *Lancet.* Mar 22 2003;361(9362):1025-1034.
12. Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978;72(5):519-521.
13. Paul J, Srivastava S, Bhattacharya S. 2007. Molecular methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in a clinical setting: an overview. *Exp Parasitol.* 116(1):35-43.
14. Ali IK, Zaki M, Clark CG. 2005. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 43(12):5842-7.
15. Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol.* 2008. 8(5):698-707.
16. Burch DJ, Li E, Reed S, Jackson TF, Stanley SL, Jr. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J Clin Microbiol.* Apr 1991;29(4):696-701.
17. Clark CG, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol.* Dec 1993;77(4):450-455.
18. Li E, Kunz-Jenkins C, Stanley SL, Jr. Isolation and characterization of genomic clones encoding a serine-rich *Entamoeba histolytica* protein. *Mol Biochem Parasitol.* Feb 1992;50(2):355-357.
19. de la Vega H, Specht CA, Semino CE, et al. Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Mol Biochem Parasitol.* Apr 1997;85(2):139-147.
20. Mai Z, Samuelson J. A new gene family (ariel) encodes asparagine-rich *Entamoeba histolytica* antigens, which resemble the amebic vaccine candidate serine-rich *E. histolytica* protein. *Infect Immun.* Jan 1998;66(1):353-355.
21. Van Dellen K, Field J, Wang Z, Loftus B, Samuelson J. LINEs and SINE-like elements of the protist *Entamoeba histolytica*. *Gene.* Sep 4 2002;297(1-2):229-239.
22. Ali, I.K. M., U. Mondal, S. Roy, R. Haque, W. A. Petri and C. G. Clark. 2007. Evidence for a Link between Parasite Genotype and Outcome of Infection with *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.*,45:

285–289.

23. Srivastava S, Bhattacharya S, Paul J. Species- and strain-specific probes derived from repetitive DNA for distinguishing *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Exp Parasitol.* (2005). 110(3):303-308.
24. Hackney JA, Ehrenkafer GM, Singh U. Identification of putative transcriptional regulatory networks in *Entamoeba histolytica* using Bayesian inference. *Nucleic Acids Res.* (2007). 35(7):2141-2152.
25. Hung CC, Ji DD, Sun HY, Lee YT, Hsu SY, Chang SY, Wu CH, Chan YH, Hsiao CF, Liu WC, and Colebunders R: Increased Risk for *Entamoeba histolytica* Infection and Invasive Amebiasis in HIV Seropositive Men Who Have Sex with Men in Taiwan. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2008. 2(2): e175.
26. Chang SY, Sun HY, Ji DD, Lo YC, Wu CH, Wu PY, Liu WC, Hung CC, Chang SC. Cost-Effectiveness of Detection of Intestinal Amebiasis Using Serologies and Specific Amebic Antigen Assays among Persons with or without Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Clin Microbiol.* 2008. 46 (9):3077-93079.
27. Haghghi, A, S Kobayashi, T Takeuchi, G Masuda, and T Nozakil. Remarkable Genetic Polymorphism among *Entamoeba histolytica* Isolates from a Limited Geographic Area. *J Clin Microbiol.* 2002. 40:4081–4090.
28. Haghghi A, S Kobayashi, T Takeuchi, N Thammapalerd, and T Nozaki1. Geographic Diversity among Genotypes of *Entamoeba histolytica* Field Isolates. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 3748–3756

圖表

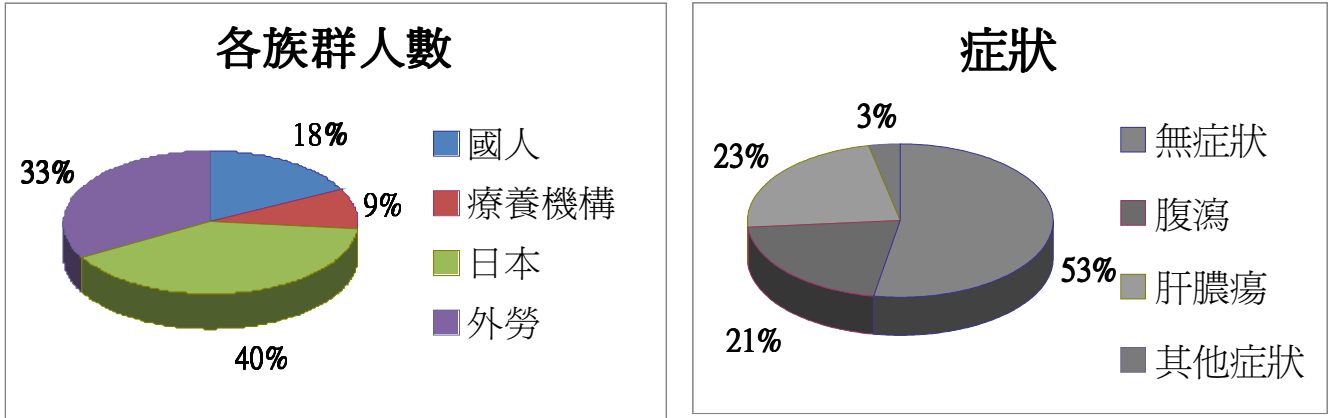


圖 1、痢疾阿米巴病患之族群與症狀分析

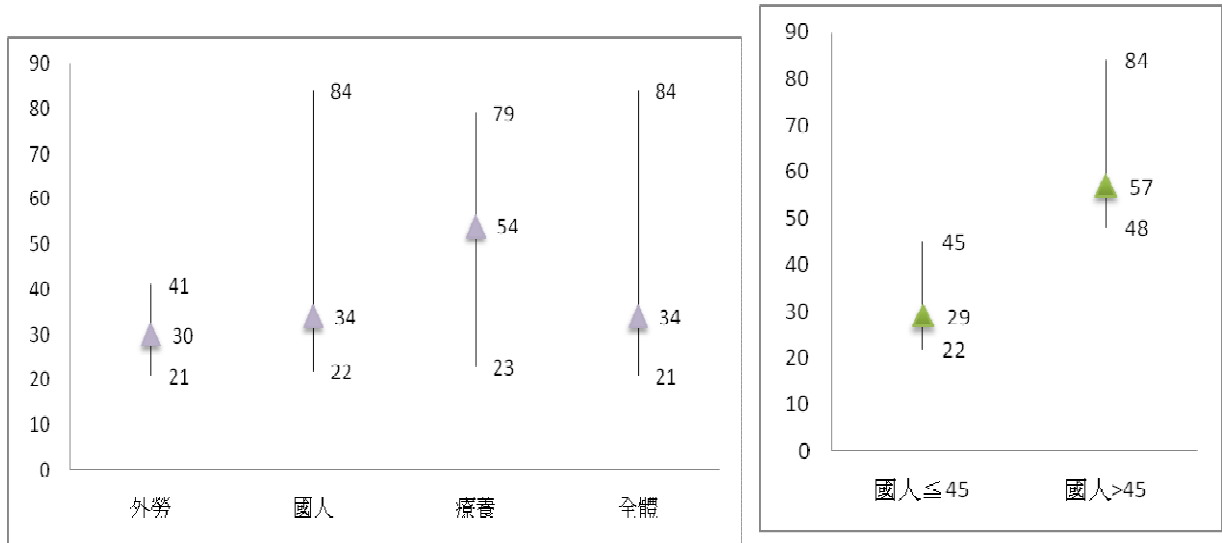


圖 2、痢疾阿米巴病患之年齡分析

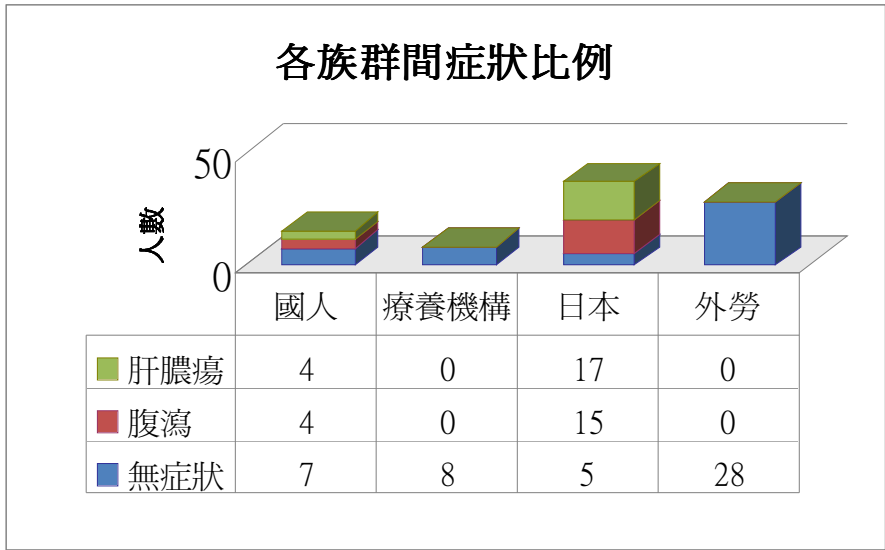
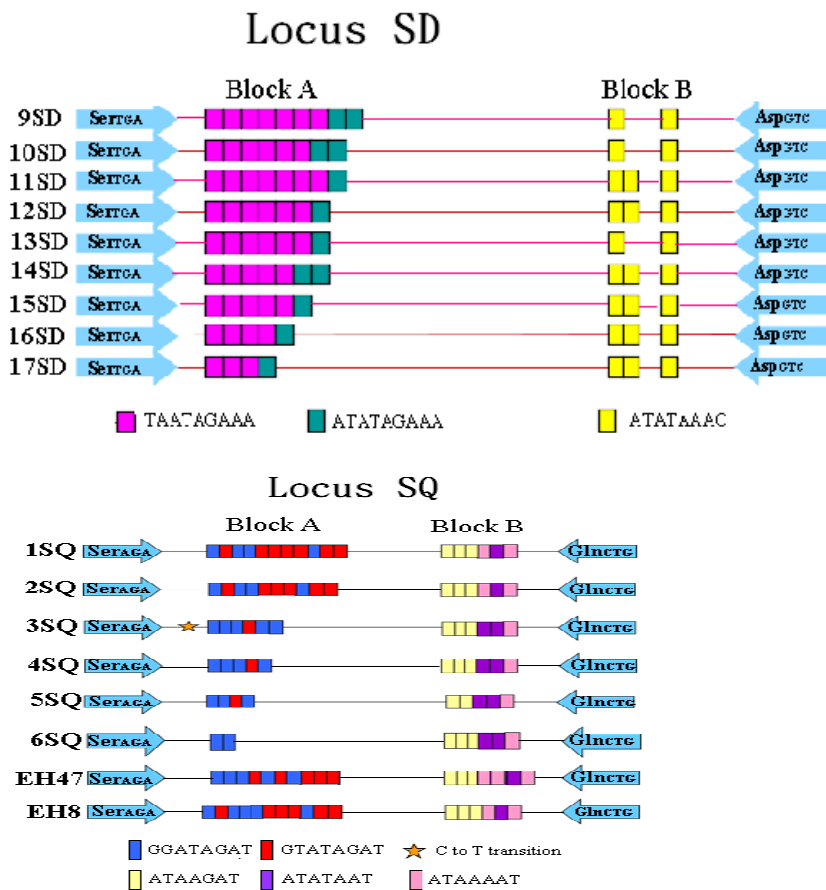


圖 3 、痢疾阿米巴各族群間之症狀比例



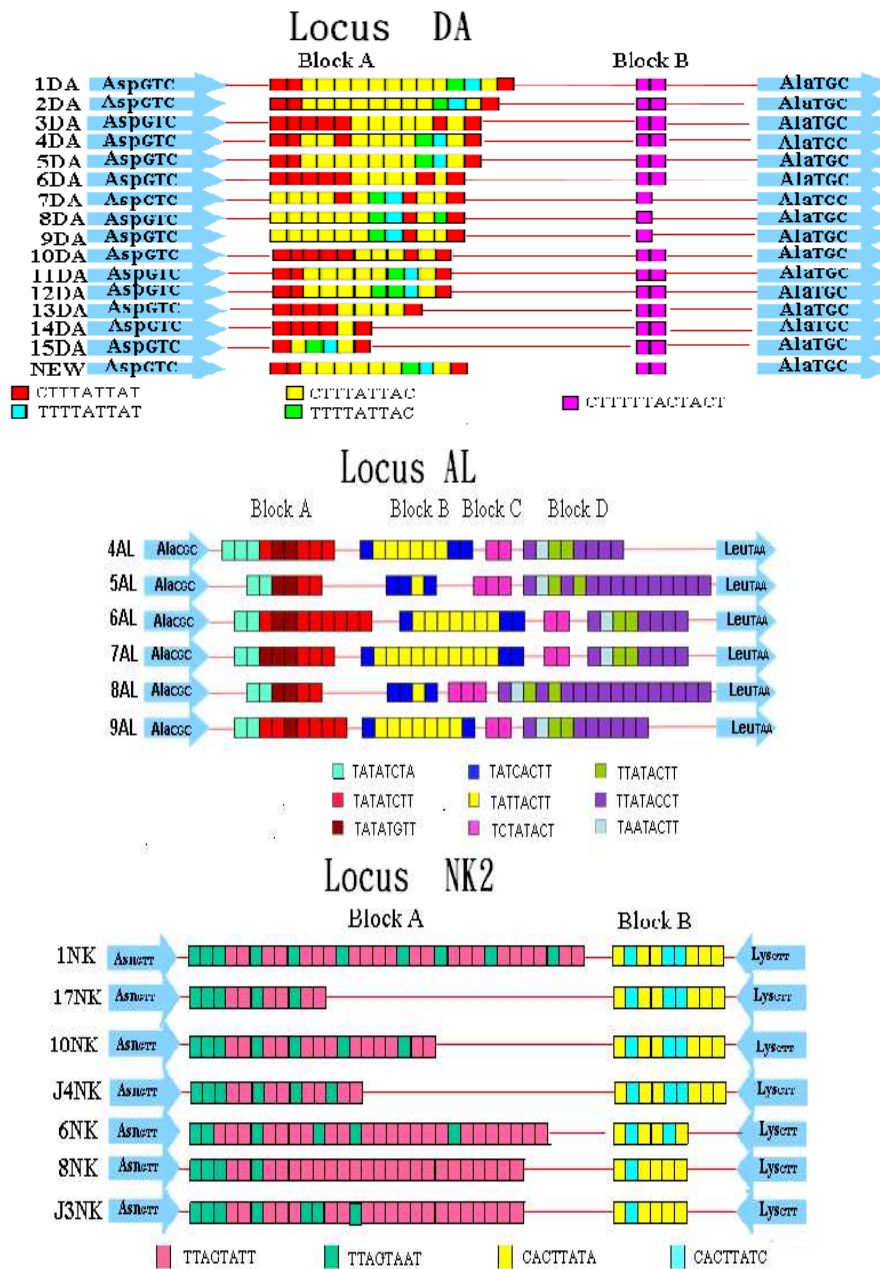


圖 4、The subtypes of 6 tRNA-linked STR loci. Provided by Dr. G. Clark with some modification.

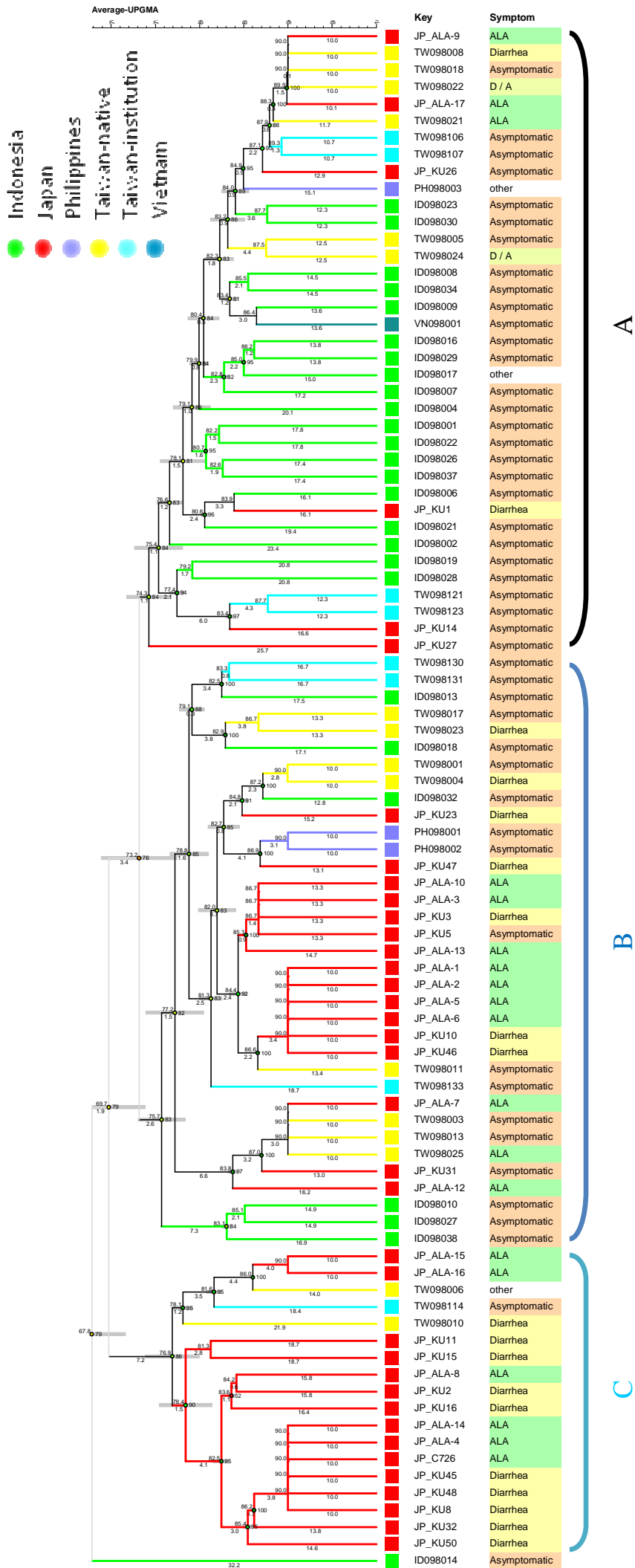


圖 5、痢疾阿米巴病患之親緣演化分析

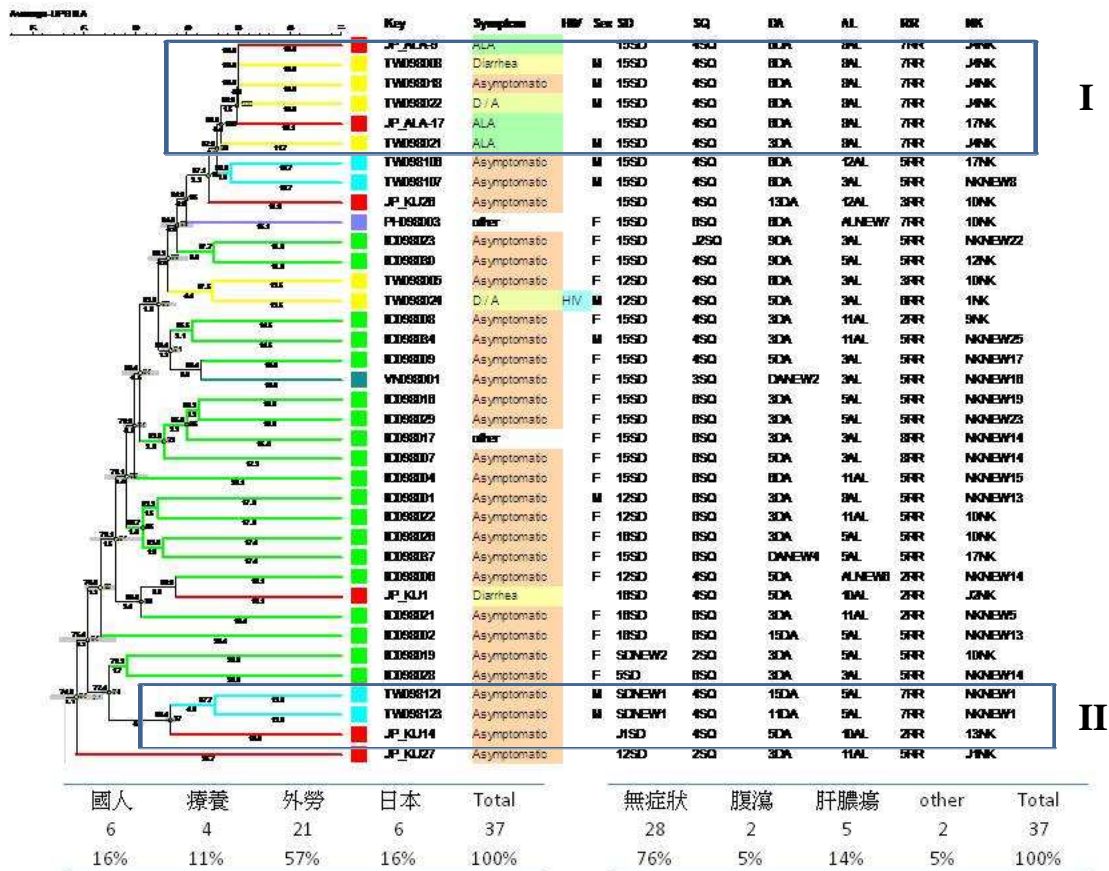


圖 5a、痢疾阿米巴病患親緣分析集群 A 之基因型別

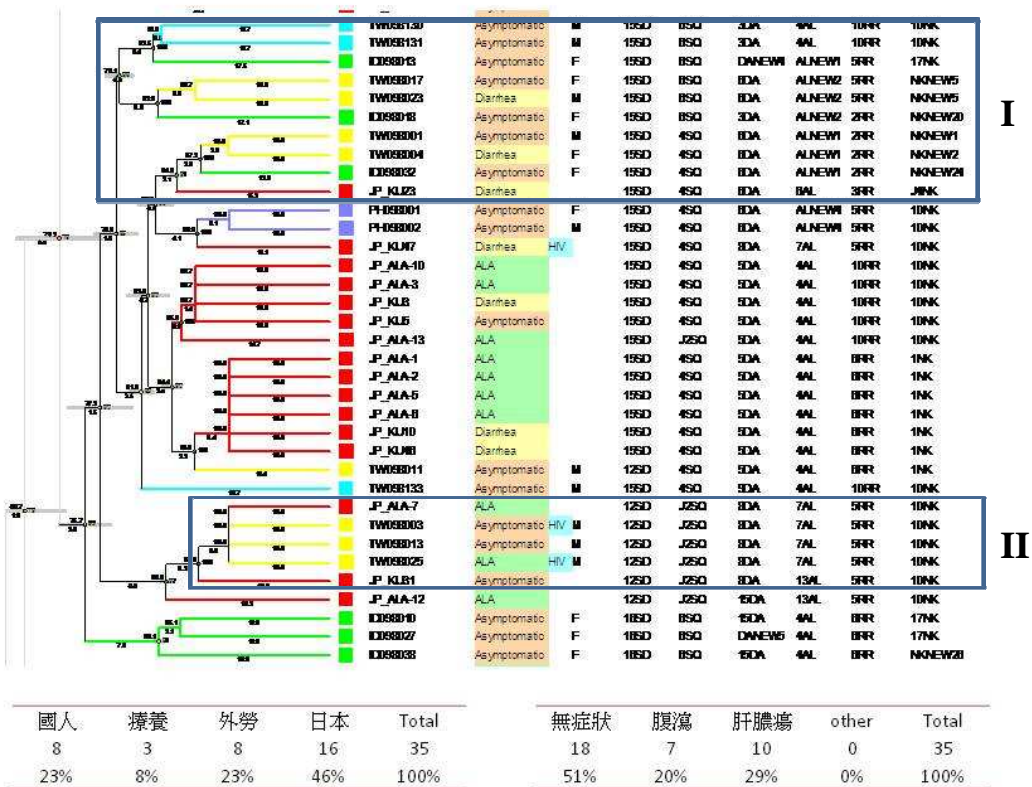


圖 5b、痢疾阿米巴病患親緣分析集群 B 之基因型別

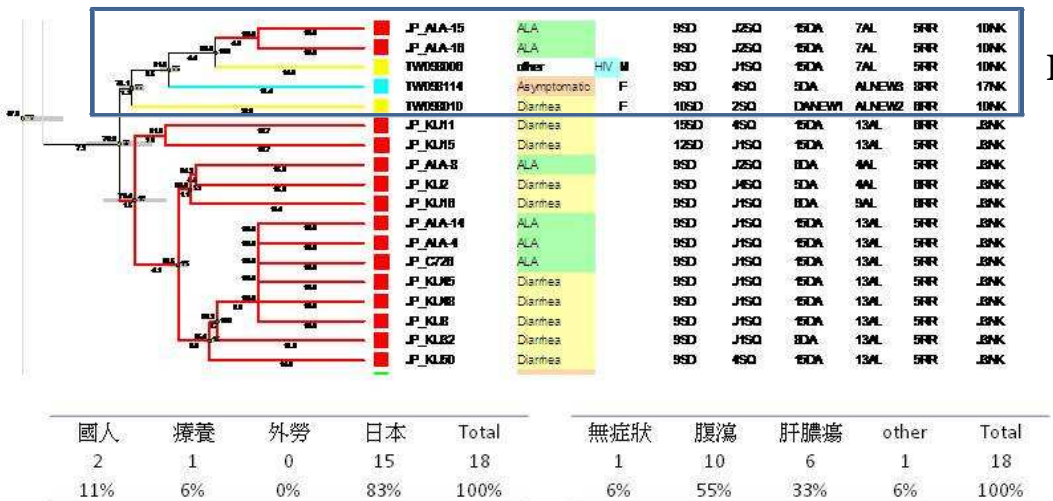


圖 5c、痢疾阿米巴病患親緣分析集群 C 之基因型別

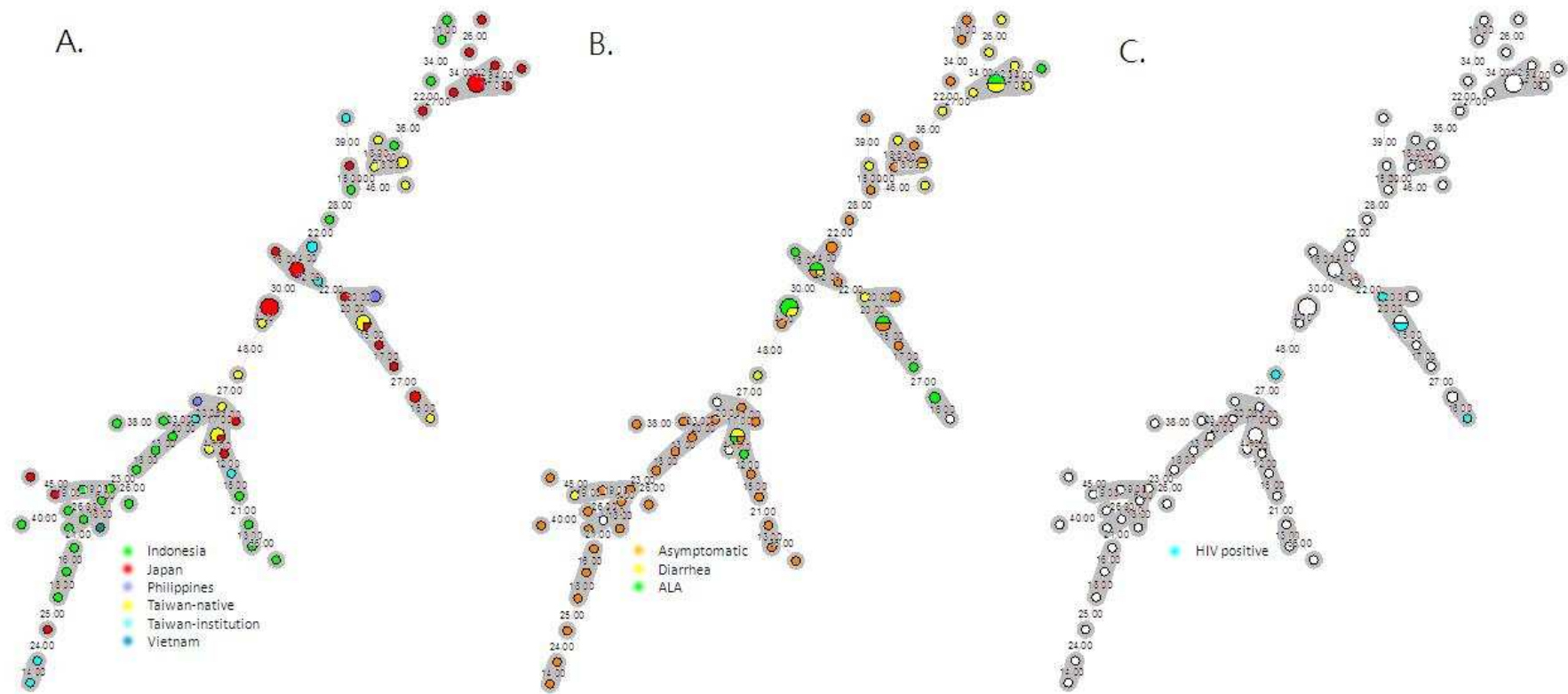


圖 6、Minimum spanning tree of *Entamoeba histolytica* strains according the 6 tRNA-linked STRs loci.

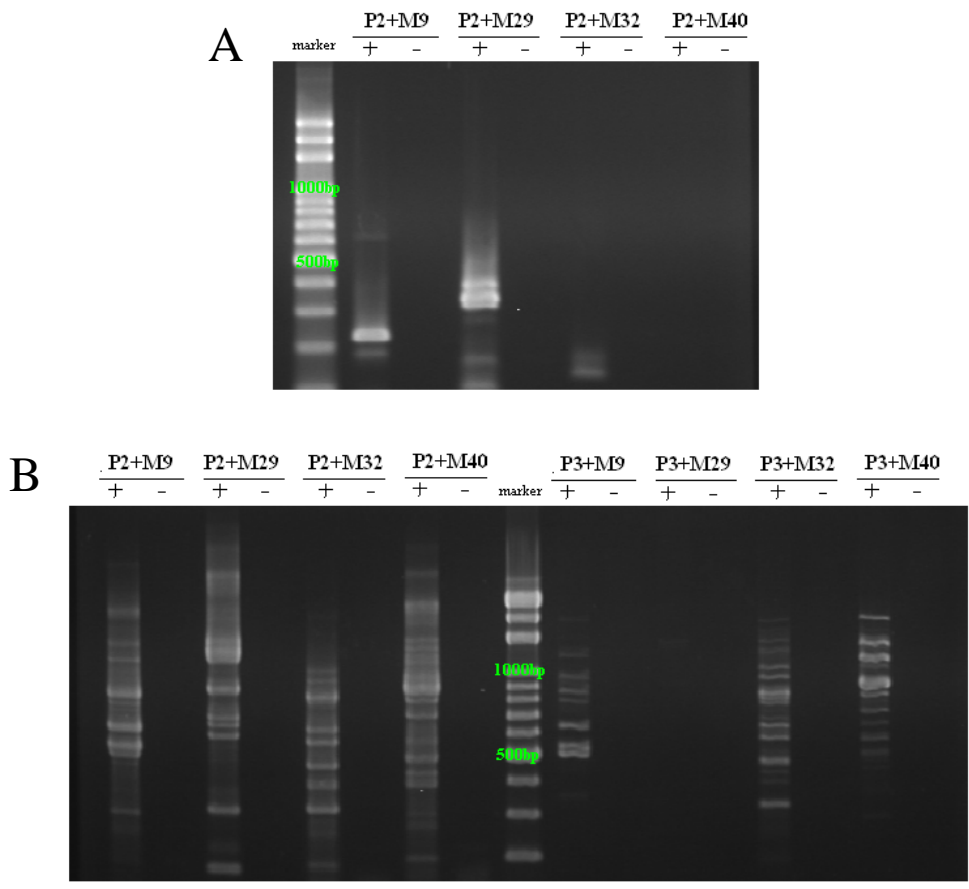


圖 7、. The results of Promoter-Transposon display assay.

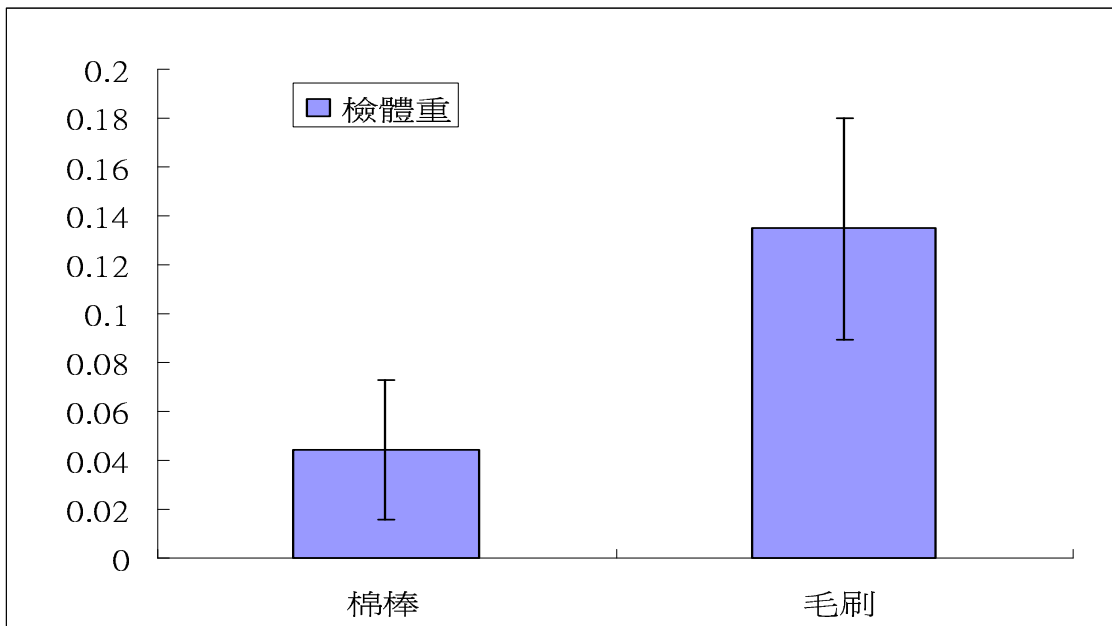


圖 8、毛刷與棉棒採檢測質量試結果圖

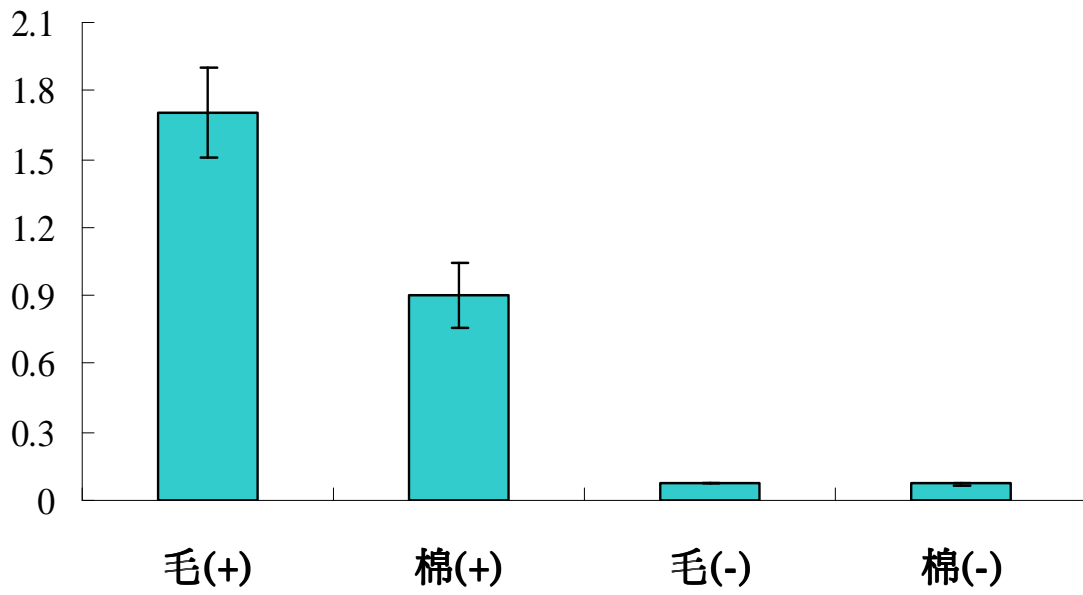


圖 9、毛刷與棉棒採 ELISA 測試陽性與陰性結果

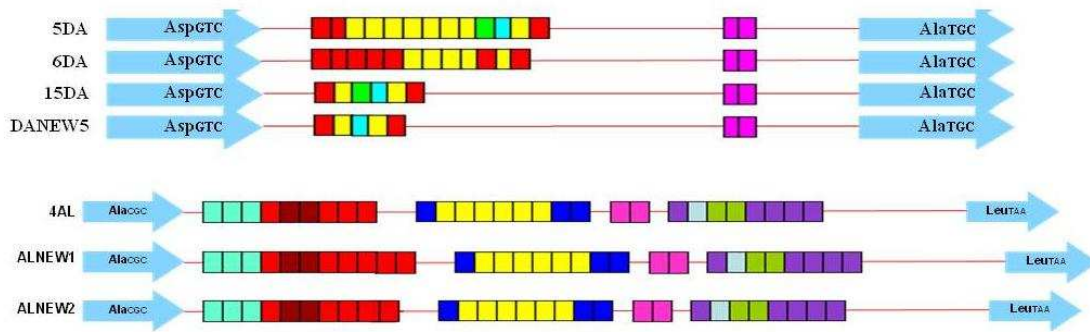


圖 10、New genotypes in tRNA-linked STRs Locus NK and AL.