

計畫編號：DOH91-DC-1037

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

利用IS6110-DR_r-RFLP分型法建立南台灣地區抗藥性結核菌
分子流行病學資料監視系統

研究報告

執行機構：高雄醫學大學 醫學技術學系

計畫主持人：彭健芳

研究人員：彭健芳、姜義新、黃吉志、白秀華

執行期間： 91年2月1日至91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、計畫摘要

一、中文摘要 (1)

二、英文摘要 (4)

貳、計畫內容

一、前言 (6)

二、材料與方法 (9)

三、結果 (13)

四、討論 (15)

五、討論與建議 (16)

六、參考文獻 (17)

七、圖、表 (19)

研究報告中文摘要：

利用分子生物學分型技術，分析南台灣地區抗藥性結核桿菌 DNA 基因圖譜，建立本土性結核桿菌之分子流行病學資料庫。由於結核桿菌基因體 DNA 具有不同套數的基因 IS6110 和 DR-r，而且其存在位置會因不同的菌種而異。利用兩種限制性內切酶 *PvuII* 和 *AluI*，使之作用於菌體 DNA，經過電泳分離步驟，而產生分子量大小不同的片段呈現多樣化指紋 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 基因圖譜。再利用 IS6110 探針和 DRr 探針，以雜交反應和影像呈顯技術 (autoradiography) 得知每株結核桿菌含 IS6110 和 DRr 的套數和基因存在位置不同而表現的分子量大小片段的差異，得到 IS6110-RFLP 和 DRr-RFLP 基因圖譜特徵，由這些基因圖譜特徵的差異而將菌株歸類成不同的族群。因而建立每株結核桿菌的基因圖譜資料庫，來分析這些不同來源結核桿菌的異質性。用以說明本地區所流行的菌株之間相關性是否存在著一個活性的感染鏈。利用 IS6110-RFLP 和 DRr-RFLP 基因圖譜 特徵，說明抗藥結核菌菌株之分子流行病學。

總共 240 株的結核菌進行 IS6110-RFLP 分析以及 30 株結核菌進行 DRr-RFLP 分析。帶有 IS6110 基因片段的菌株大部分 (83.3%) 其 copy number 是在 8-16 之間。有 30 株 (12.5%) 結核菌的 copy-number 數目是在 0-3 之間，其中 copy-number 數目為 0 者有 20 株 (8.4%)。具有 copy-number 數目在 17-20 之間也有 10 株 (4.2%)。而 DRr 片段的分佈在這些 IS6110-RFLP-low-copy number 的菌株是在 DRr copy number 6-8 之間，但有 20 株的結核菌其 DRr-RFLP 的 copy number 仍然是零。所以，這 20 株的結核菌不能使用 IS6110-

RFLP 及 DRr-RFLP 來分型。在 IS6110- RFLP 的分型上， copy number 數目最多的菌株為 copy-number 11(35 株)和 copy-number 14 (35 株)，其次為 copy-number 9(25 株)和 copy-number 12(25 株)， copy-number 10 (24 株)。從這些結果，顯示我們的試驗菌株主要的分型分佈在 copy-number 8-16 之間，這說明本研究的菌株依其基因特性主要分為九大型別。另一方面在 DRr-RFLP 分型上，這些 IS6110-RFLP-low-copy number 的菌株 (10 株) 共分成三種型別。

利用 IS6110-RFLP 分型法，在 210 株的結核菌中依其基因的相關性共分為 cluster A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N 等 14 大類。大部分的菌株是屬於 cluster C (41 株)， cluster H (32 株)， cluster G (21 株)， cluster E (17 株)， cluster F (16 株)， cluster A 和 cluster L (各為 15 株)， cluster B 和 cluster M (各為 10 株)。所以從分子生物流行病學的結果，這些結核菌的基因相關性主要可分為九大類。共有 10 株結核菌進行 DRr-RFLP 分型上，主要的菌株是屬於 cluster I (5 株)。

在 IS6110-RFLP 的 cluster A 菌株 (15 株) 其基因相關性在 100-70% 之間， cluster B (10 株) 的結核菌其基因相關性在 95-75 % 之間。屬於 cluster C (41 株) 的結核菌數量最多，而且其基因相關性在 100-85% 之間，因此這些屬於 cluster C 的菌株為本地區流行的結核菌的主要標識，這些菌株值得進行其他基因相關性的分析。屬於 cluster D (5 株) 的菌株數量最少，其基因的相關性在 85-70% 之間。相同的情形也出現在 cluster I (7 株)， cluster K (7 株) 和 cluster N (6 株)，其基因相關性分別為 95-70%， 100-80% 及 100-65 % 之間。從基因的分型，這些少數族群的結核菌象徵著另外一群的感染來源，也值得我們去探討。Cluster H (32 株) 的結核菌也是

本地區流行的主流之一，其基因的相關性為 100-85% 之間。另外，cluster E (17 株)，cluster A (15 株) 及 cluster L (15 株) 的結核菌也是普遍流行的菌株。其基因的相關性分別為 100-70% 之間，100-70% 及 100-80% 之間。在 DRr-RFLP 分型上，屬於 cluster I 的基因相關性在 85% 為常見的菌株。

中文關鍵詞(至少三個)：結核菌、基因圖譜分析、分子流行病學。

Abstract:

By molecular fingerprinting, multidrug resistant *M. tuberculosis* were analyzed with IS6110-RFLP and DRr-RFLP for epidemiological investigation. Chromosomal DNA of *M. tuberculosis* was prepared and restriction digested overnight with *PvuII*. The digested fragments were separated by electrophoresis 1% agarose gels. After denaturation, DNA fragments were transferred to Hybond membrane with a vacuum transfer apparatus. Hybridization was performed with the labeled 245-bp IS6110 PCR fragment probe, the IS6110-RFLP of *M. tuberculosis* was analyzed by the number of IS6110 copy and dendrogram for illustrating relationships between *M. tuberculosis* strains from Southern Taiwan. Isolates of *M. tuberculosis* with low IS6110 copy number in the chromosome were further investigated with DRr probe for DRr-RFLP analysis. DRr-RFLP was performed with *AluI* digestion of chromosome DNA and hybridization with 36-bp DRr oligonucleotide probe.

On the basis of analysis with gene probes and biochemical tests, all 240 isolates were identified as *M. tuberculosis*. Hybridization of *PvuII*-digested chromosomal DNA with the 245-bp fragment of IS6110 resulted in IS6110-RFLP. The copy number of IS6110 in each of the isolates was determined from the number of bands hybridizing the probes. The majority, 200 of the 240 strains(86%) contained between 8 and 16 copies of IS6110. There are 30 isolates of *M. tuberculosis* with the copy number of IS6110 below 3. Twenty isolates of *M. tuberculosis* were found not to carry any IS6110 element. From the results of IS6110-FRLP patterns, *M. tuberculosis* tested in this

study were classified into 17 types of IS6110-RFLP. A majority of *M. tuberculosis* was belonging to IS6110-RFLP type 5 to 13. Therefore, the nine different types IS6110-RFLP were the major source of *M. tuberculosis* for tuberculosis in Southern Taiwan. The utilization of DRr probe allowed the differentiation of strains showing low -copy-number of IS6110 element. A total of 30 strains typed by analysis of the DRr element, 10 strains showed DRr-RFLP pattern with 3 band(one strain), 6 bands(one strain), 7 bands(6 strains), and 8 band(two strains). There are 20 strains of *M. tuberculosis* with low -copy-number of IS6110 element to be found not to carry any DRr element. These 20 strains of *M. tuberculosis* with low -copy-number of IS6110 element were necessarily investigated in advance. From the diversity of RFLP types of IS6110 for 210 isolates of *M. tuberculosis*, this yields 14 types of cluster A to N. The majority of the investigated isolates from Southern Taiwan patients belong to cluster C(19.5%), cluster H(15.2%), and cluster g(10%).

Keyword: *M. tuberculosis* ,fingerprinting ,molecular epidemiology.

一、前言

肺結核目前仍然是台灣地區公共衛生上的重大病患之一。雖然經過 10 年的努力，結核病的死亡率已由民國 36 年的每 10 萬人口 294 人，降至民國 84 年的每 10 萬人口的 7.25 人 (1)。台灣的結核病流行雖有下降，但台灣地區雖小，地方性差異卻很大，整體而言，死亡率雖然下降，可是南部，東部地區卻還很高，遑論三地鄉 (2)。近年來，抗藥性菌株的出現，使得肺結核桿菌經由藥物的篩選而大量繁殖，進一步造成肺結病的流行 (3,4)。同時，人類免疫缺陷病變的增多，結核病患治療的延誤，讓已受感染的病患再傳染給其他的人，使結核病再度死灰復燃 (5)。衛生署早有研定結核病防治方案的草案，自民國 83 年度至 87 年度之防治策略包括下列七項：1.強化防癆工作體系。2.全面推展結核病預防發現及治療。3.加強結核病防治衛生教育。4.辦理醫事及衛生人員繼續教育。5.慢性開放性結核病人收容管理計畫。6.山地鄉肺結核病人住院治療補助計畫。7.防治機構改擴，整建計畫。但是若能瞭解結核菌的分子生物遺傳因子的特性，一定有助於流行病學的防治工作。由於肺結核疾病是一種高度傳染性疾病，要提供正確的檢驗報告給臨床醫師，包括菌株的培養與鑑定，藥物感受性試驗的結果。然而，在流行病學的控制上，需要進一步瞭解目前流行的菌株的特性，包括他們遺傳因子的分子生物學特性(6-14)。從分子生物學基因圖譜的結果，可以判定病患所感染菌株的來源及其變遷。對於切斷傳染源和預防多重抗藥性結核菌株的散佈有所助益。

分子流行病學的研究對結核菌的再度盛行和多重抗藥性菌出

現的探討是非常重要的監視工作，瞭解其感染來源和散佈的狀況，以便能有效的控制和防範結核病的流行。同時，流行病學的研究可以監測結核菌株的差異性和病患所造的病變的型態的變遷。所以，結核菌的菌株基因圖譜的分型，在流行病學上是相當重要的，因他可建立結核病病患之間的關係以及追蹤爆發性流行的來源。同時，結核菌菌株的分型有助以監測目前流行的結核菌菌株的差異性。是否為新感染的，或者是再感染的，或者為再活化的菌株。傳統的流行病學研究，配合新近開發的分子生物技術。能更清楚地瞭解造成結核菌容易傳播的因子。因此，本研究要評估更好的方法來預防結核菌的傳播。

結核菌的基因圖譜分型，被認為具特異性的。其原理是分析結核菌菌株染色體中的特定插入序列基因片段[Insertion sequence(IS)]的 IS6110 特性以及直接連續重複片段[direct repeat(DRr)]的 DRr 序列 (10,12)。這兩種基因圖譜的分析，因為容易操作，而且快速得到結果，判定較簡單。所以，我們將應用這兩種遺傳標記 (genetic marker) 來分析結核菌的遺傳特性。IS6110 基因片段在結核菌株染色體 DNA 中常以多套(multiple copies) 存在著，而且不同來源的菌種，其 IS6110 的套數 (copy number) 不一定相同而且在染色體中的位置也不相同。因此當結核菌的染色體 DNA 以特定限制內切酶 (*PvuII*) 作用成不同大小片段時，經電泳分離，再以 IS6110 探針來進行雜交反應可以發現每種的結核菌有不同的型態，而呈多樣化(restriction fragment length polymorphism, RFLP)。這種 IS6110-RFLP 的分析法的結果可當作結核菌株變異性的遺傳標記。這 IS6110 片段相當穩定地存在結核菌菌體中 (15)，而且其數目和位置則因菌株不同有所差異，導致高度的

多樣化 (polymorphism)。所以，當結核菌具不同的 IS6110-RFLP 結果時，顯示有不同的感染來源。因此，IS6110-RFLP 的分析，常被當作分子生物遺傳特性時，會發現一些菌株呈現單套 (one copy) 或者少數套數 (low-copy number) 的 IS6110 基因片段。此時，尚須使用第二個遺傳標記 (second genetic marker) 的 36 bp direct repeat (DRr) 探針來分析菌株 DR-RFLP 的特性，對結核菌株作進一步分析 (14)。這 36-bp DR-r 序列是以多套存在結核菌株 IS6110 部位的鄰近處形成一簇一簇的排列。利用 DR-r 探針可用以偵測 IS6110 的 DR-r locus 存在的多樣化的狀況，使那些屬於 Low-copy-number IS6110 的菌株得以區別。

本研究的目的是想要評估台灣地區所分離的結核桿菌菌株的基因圖譜特性的多樣性在不同地區(台南、高雄、屏東)之間是否有所差異。要探討肺結核之流行病學，利用新近開發的分子生物技術是具有特異性。整理病患之間的傳統流行病學資料再與分子生物技術分型的分子流行病學資料作一比較分析，而建立監視系統。這些本土性資料的相關性能夠提供政府機構結核疫情防治的參考。

二、材料與方法

一、 抗藥性結核菌(multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*)的來源

大約收集病患所分離出來的結核菌菌株 IS6110 有 210 株及 DRr 有 30 株為研究的材料。紀錄肺結核病患的特徵包括性別、年齡、屬於初步感染或續發性感染。菌株的來源包括台南地區、高雄地區、屏東地區。

二、 抗藥結核菌的分離和鑑定(Isolation and identification of multidrug-resistant *M. tuberculosis*)

所有菌株約分離自病患呼吸道的檢體包括痰液，呼吸道分泌物等。結核菌的培養使用 Lowenstein-Jensen 斜面培養基。結核菌的鑑定是依據菌落的特性、Niacin(+)、T₂H 抗性、Catalase(-)、Nitrate reduction(+)等傳統生化學試驗。在配合 BstEII 和 HaeIII 作用於 65Kda HSP 基因之 PCR 產物所形成之 RFLP，即 245/120/80 bp 和 160/140/70 bp 之結果來鑑定 (16,17)。抗藥性試藥則採用比例法 (Proportion method)。試驗藥物則以 isoniazid(INH)，ethambutol(EMB)，rifampin (RIF) 和 streptomycin(SM)為主 (18)。試驗菌株以具 INH-RIF 多重抗藥性的菌株為主。

三、 結核桿菌 DNA 的分離和純化 (Isolation of mycobacterial DNA)

DNA 的萃取乃參考 Van Soolingen 等人的方法加以修飾而成。首先用白金環從 L-J 斜面培養基挑取 3-5 個菌落，裝進含有 400 μ l TE Buffer(10Mm Tris-HCl PH 8.0, 1mM EDTA PH 8.0)之微量離心管(microcentrifuge tube)內，再將菌落搗碎後使成懸浮液，將懸浮液於 80 $^{\circ}$ 水浴槽內加熱 30 分鐘以殺死細菌，為破壞細胞壁，加入 50 μ l 的 lysozyme(10 mg/ml, Boehringer Mannheim, Germany)於 37 $^{\circ}$ 水浴槽內作用 1 小時後，隨即加入 70 μ l 的 10% SDS(sodium dodecyl sulphate)與 6 μ l 的 proteinase K (10mg/ml, Boehringer Mannheim, Germany)，以震盪器混合均勻後，放置 50 $^{\circ}$ 水浴槽內作用隔夜。加入 100 μ l 的 5MNaCl 並混合均勻，再加入 80 μ l 的 CTAB/NaCl 溶液(Cetyltrimethylammonium bromide/NaCl)，於 65 $^{\circ}$ 水浴槽內作用 10 分鐘。細菌的核酸以有機溶劑(酚/氯仿)萃取之後，以酒精沈澱。純化的核酸溶解在 TE Buffer(大約 1.5-2 μ g)，核酸的完整度可以由電泳分析得知，經由此法所得到的核酸均大於 25Kb。

四、 DNA 探針的製備 (Preparation of DNA probe)

使用特異的 IS6110DNA 探針來分析 Chromosomal DNA 的 RFLP 基因圖譜(9)。這個 IS6110DNA 探針是使用 IS6110 中 245bp 片段的 PCR 產物。PCR 技術的兩個 Primer; 是 INS-1:

5'-CGTGAGGGGCATCGAGGTGGC-3'和 INS-2: 5'-GCG TAGGCGGTCGGTGACAAA-3'。PCR 反應和標識成分如下：2mM 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 以及 0.1mM digoxigenin-11-dCTP 所得的 PCR 產物，經過純化即得。DR-r 探針是 36-bp 合成的 oligonucleotide(5'-GTCGTCAGACCCAAAACC CCGAGAGGGGAAAC-3')(11)。這段 36-bp 的 DR-r 探針則使用 DIG- 非放射性標幟來標識 (Amersham-Pharmacia Biotech, USA)。

五、 RFLP 基因圖譜的分析 (Fingerprinting by RFLP analysis)

A. 限制性內切酶作用 (Restriction analysis)

1. 所萃取的 Mycobacterial DNA 以 *PvuII*(5U/μg)作用 2-3 小時。之後，以 1% agarose 明膠進行電泳分離。經過變性作用 (denaturation) 後，將明膠中 DNA 片段轉漬於 NC 膜上，乾燥固定、備用。所得的 *PvuII* 切割片段 (*PvuII* restriction fragment) 是來分析 IS6110 之套數變異分析。
2. 另一部份的 Mycobacterial DNA 用 *AluI* 來作切割作用 1-2 小時。之後，這反應物如同上述步驟進行電泳分離、轉漬、變性、乾燥、固定、備用。所得的 *AluI* 切割片段，是當作 DRr 基因圖譜的變異分析用。

B. 雜交反應 (hybridization)

依一般使用的雜交反應步驟。分別使用 IS6110 探針與 *PvuII* 作用後片段(restriction fragment)雜交反應，而 DRr 探針則與

AluI 作用後片段 (restriction fragment) 雜交反應。

C. 菌株分型 (strain typing)

經過雜交反應和 autoradiography 之後。可得到每一菌株的 IS6110 的 copy number 和 RFLP 基因圖譜以及 DRr 的 copy number 和 RFLP 基因圖譜。所得的分枝圖 (dendrogram) 和片段圖 (banding pattern) 利用電腦分析歸類 (Bio-Gene 軟體和 Aspire C500 P4-1.8GHZ computer)。

六、 簇群的定義 (Definition of clustering)

結核桿菌經過 IS6110-RFLP 和 DRr-RFLP 基因圖譜分析後，每 2 個菌株以上可歸類為一個簇群，其定義如下 (19)：

1. 出現相同 IS6110 的套數而且具相同分子量。
2. 顯示多一個或少一個 IS6110 的片段。
3. 出現 3 個或較少的 IS6110 片段 (套數)，但分子量相同以及相同的 DR-RFLP 基因圖譜。

七、 統計分析 (Statistical analysis)

1. 病患資料的分析包括性別、年齡、居住地、地區以及其發病的特徵 (初次或續發性感染，再發性感染)。
2. 每株菌種的特性包括 IS6110-RFLP, DRr-RFLP 和抗藥性。以卡方檢定 (Chi-square test) 來分析每一個簇群的單一變相的危險因子 (Univariate risk factor) 探討病患與菌株之相關性。Odd's ratio 則以 95% CI 值計算。

三、結果

總共 240 株的結核菌進行 IS6110-RFLP 分析以及 30 株結核菌進行 DRr-RFLP 分析，其結果如 Table.1 所示。帶有 IS6110 基因片段的菌株大部分(83.3%)其 copy number 是在 8-16 之間。有 30 株(12.5%)結核菌的 copy-number 數目是在 0-3 之間，其中 copy-number 數目為 0 者有 20 株 (8.4%)。具有 copy-number 數目在 17-20 之間也有 10 株(4.2%) (Table 1, Fig.1)。而 DRr 片段的分佈在這些 IS6110-RFLP-low-copy number 的菌株是在 DRr copy number 6-8 之間，但有 20 株的結核菌其 DRr-RFLP 的 copy number 仍然是零 (Table 2, Fig.2)。所以，這 20 株的結核菌不能使用 IS6110-RFLP 及 DRr-RFLP 來分型。在 IS6110-RFLP 的分型上，copy number 數目最多的菌株為 copy-number 11 (35 株) 和 copy-number 14 (35 株)，其次為 copy-number 9 (25 株) 和 copy-number 12 (25 株)，copy-number 10 (24 株)。從這些結果，顯示我們的試驗菌株主要的分型分佈在 copy-number 8-16 之間，這說明本研究的菌株依其基因特性主要分為九大型別。另一方面在 DRr-RFLP 分型上，這些 IS6110-RFLP-low-copy number 的菌株 (10 株) 共分成三種型別。

利用 IS6110-RFLP 分型法，在 210 株的結核菌中依其基因的相關性共分為 cluster A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N 等 14 大類 (Table.3)。大部分的菌株是屬於 cluster C (41 株)，cluster H (32 株)，cluster G (21 株)，cluster E (17 株)，cluster F (16 株)，cluster A 和 cluster L (各為 15 株)，cluster B 和 cluster M (各為 10 株)。所以從分子生

物流行病學的結果，這些結核菌的基因相關性主要可分為九大類 (Fig3、4)。共有 10 株結核菌進行 DRr-RFLP 分型上，主要的菌株是屬於 cluster I (5 株) (Table 4、Fig.5)。

在 IS6110-RFLP 的 cluster A 菌株 (15 株) 其基因相關性在 100-70% 之間 (Fig.4a)，cluster B (10 株) 的結核菌其基因相關性在 95-75% 之間 (Fig.4a)。屬於 cluster C (41 株) 的結核菌數量最多，而且其基因相關性在 100-85% 之間，因此這些屬於 cluster C 的菌株為本地區流行的結核菌的主要標識，這些菌株值得進行其他基因相關性的分析 (Fig.4b)。屬於 cluster D (5 株) 的菌株數量最少，其基因的相關性在 85-70% 之間。相同的情形也出現在 cluster I (7 株)，cluster K (7 株) 和 cluster N (6 株)，其基因相關性分別為 95-70%，100-80% 及 100-65% 之間 (fig.4e,4f)。從基因的分型，這些少數族群的結核菌象徵著另外一群的感染來源，也值得我們去探討。Cluster H (32 株) 的結核菌也是本地區流行的主流之一，其基因的相關性為 100-85% 之間 (Fig.4d)。另外，cluster E (17 株)，cluster A (15 株) 及 cluster L (15 株) 的結核菌也是普遍流行的菌株 (Fig.4a,4c,4f)。其基因的相關性分別為 100-70% 之間，100-70% 及 100-80% 之間。在 DRr-RFLP 分型上，屬於 cluster I 的基因相關性在 85% 為常見的菌株 (Fig.5)。

四、討論

在本年度的計畫共分離 240 株的結核菌，這些菌株大多分離自台南地區。依據 IS6110-RFLP 的分型結果，依據基因的相關性總共分成 cluster A-N 14 個族群，其中 cluster C, cluster H 及 cluster G 的菌株佔很大的比例，這說明這三個族群是屬於本地區的流行重要菌株。對於這些菌株的來源及其感染的病患將進一步分析。但因這為一年計畫的結果，希望能有機會再繼續進行 1-3 年的分子生物流行病學調查，其結果將有值得參考的臨床意義。

從 IS6110-copy-number 的結果來分析這 240 株的結核菌，可發現絕大部分的菌株是屬於 8-16 的 IS6110-copy-number 的種類。這說明結核菌的 IS6110-type 主要是分佈在 type 5 至 type 13 之間，這九個 type 的結核菌為本地區結核病患所感染的主要來源。這些菌株的 IS6110-RFLP 的特性將進一步分析，其結果將有助於結核病的防治，若能延長 1-3 年的研究分析將可得到重要的臨床意義。

利用 DRr-RFLP 來分析那些結核菌屬於 IS6110-low-copy-number 的菌株，仍然有 20 株結核菌表現出沒有 DRr 的片段基因。所以這 20 株的結核菌為 IS6110-low-copy-number 以及 DRr-low-copy-number 的菌株，其特性將要利用其他的分子生物技術來分析才能有所結果。但依據 DRr-RFLP 的分析，我們得到 cluster I (5 株) 為主要的感染來源，但因菌株數目太少，需要更多的菌株來作分析。

五、結論與建議

在本年度的研究計畫是針對台南地區所分離的 240 株結核菌進行 DRr-RFLP 及 IS6110-RFLP 分型，我們發現有九大族群的結核菌是屬於主要的感染源，這說明在這地區的結核病患所感染的結核菌是有一定的感染鏈的關係存在。這結果顯示要防治本地區的結核病必須確實去作病患的身家調查，在配合嚴格的 DOTS 治療雙管齊下才能有效遏止結核病的蔓延。

本研究計畫的結果顯示出重要的訊息，說明結核病的感染源有很大的相關性存在。利用一年的時間來進行某一地區的分生生物流行病學去探討結核病的感染，其結果比較不容易說明在年度變化的相關性。因此，建議這類分生生物流行病學調查的研究至少 2-3 年的時間來進行，將可得到完整的資料，提供有效的結核病防治。

六、參考文獻

1. 台灣省慢性病防治局.結核病防治年報.中華民國 86 年出版.
2. 余明治.台灣的抗藥性結核.慢性病防治通訊.台灣省慢性病防治局.44:1-5,1998.
3. 張鴻仁.2000 年我們結核病死亡率能否減半?慢性病防治通訊 41:1-5,1997.
4. 甘明.民國 81 年至 85 年結核病死亡總覽.慢性病防治通訊 41:1-5,1994.
5. 余明治.多重抗藥性結核.台灣慢性病防治局.1996 慢性病防治通訊 36:1-5.
- 6.Plikaytis B.B. et al. 1994. Mutiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 32:1542-1546.
- 7.Alito A. et al. 1999.The IS6110RFLP in particular MDR-*M. tuberculosis* strain may evolve too fast for reliable use in out break investigation. J. Clin Microbiol 37:788-791.
- 8.van Soolingen D. 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherland: A nationwide study from 1993 through 1997. J Infect Dis 180:726-736.
- 9.Sola C., Horgen L., Goh K.S., et al.1997..Molecular fingerprinting of *M. tuberculosis* on a Caribbean Island with IS6110 and DRr probes.J Clini Microbiol 35:843-846.
- 10.Torrea G, et al. 1995. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive DR as a strain specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. J Clin Microbiol. 33:1899-1904.
- 11.van Embden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T. et al.1993. Strains identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recoimmendations for a strandardized methodlolgy. J Clini Microbiol 31:406-409.
- 12.Thierry D., Eisenach K.D., Crawford J.T., et al .1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis complex*. Nucleic acids 18:188.
13. Otal I., Martin C., Vincent-levy-frebrault V., et al.1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in Tuberculosis. J Clini Microbiol 29:1252-1254.
- 14.van Soolingen D., de Haas P.E.W. Hermans P.W.M., et al.1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacteium tuberculosis*. J Clini Microbiol 31:1987-1995.
- 15.Niemann S., Rusch-Gerdes S., Richter E., et al..2000. Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains in actual chains of transmission. J Clini Microbiol 38:2563-2567.

16. Baron EJ, Pealler MA, Tenover FC, Yolken RH. Mycobacteria, 1995. In: Murray PR, ed. Manual of Clinical Microbiology, Washington D.C., U.S.A., American Society for Microbiology, p:400-437.
17. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. 1993. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 31:175-178.
18. Baron EJ, Pealler MA, Tenover FC, Yolken RH. Antibacterial susceptibility test: Mycobacteria. 1995. In: Murray PR, ed. Manual of Clinical Microbiology, Washington, D.C., U.S.A.: American Society for Microbiology, p:1385-1404.
19. Strassle A., Putnik J., Weber R. et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patients in human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. J Clin Microbiol 35:374-378, 1997.

七、圖、表

Table 1. Number of IS6110 copies and IS6110-RFLP types of *M. tuberculosis* in Southern Taiwan

Copy number	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
isolates	22	3	3	2	0	0	0	0	12	24	23	32	24	9	32	20	15	4	1	3	2
Types	1	2	3	4					5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

Table 2. Number of DRr copies and strains of *M. tuberculosis* in Southern Taiwan

Copy number	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Isolates	20	0	0	1	0	0	1	6	2

Table. 3 clusters of IS6110-RFLP and strains of *M. tuberculosis* isolated in Southern Taiwan

Cluster	No. of strains isolated
A	15
B	10
C	41
D	5
E	17
F	16
G	21
H	32
I	7
J	8
K	7
L	15
M	10
N	6
Total	210

Table. 4 clusters of DRr-RFLP and strains of *M. tuberculosis* isolated in Southern Taiwan

Cluster	No. of strains isolated
I	5
II	1
III	2
IV	2
Total	10

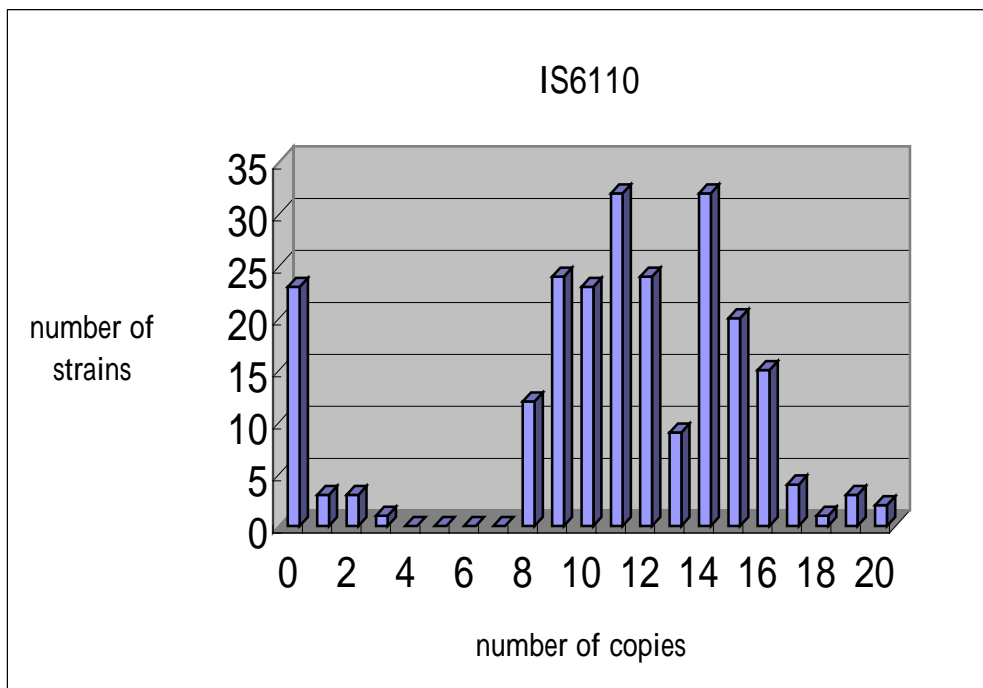


Fig. 1 Number of IS6110 copies in *M. tuberculosis* isolated from 210 patients in Southern Taiwan

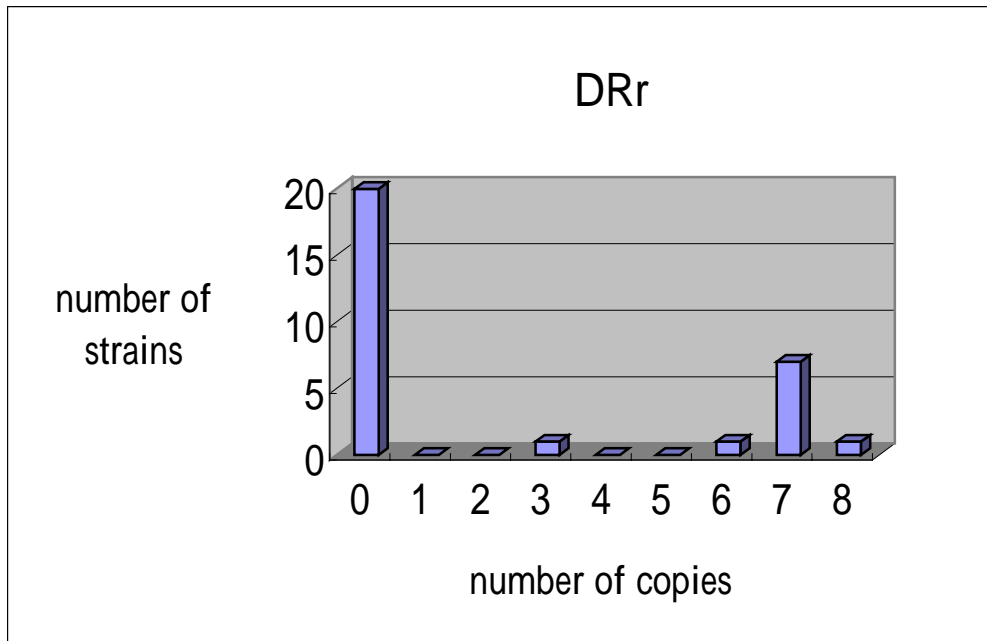


Fig. 2 Number of DRr copies in *M. tuberculosis* isolated from 30 patients in Southern Taiwan

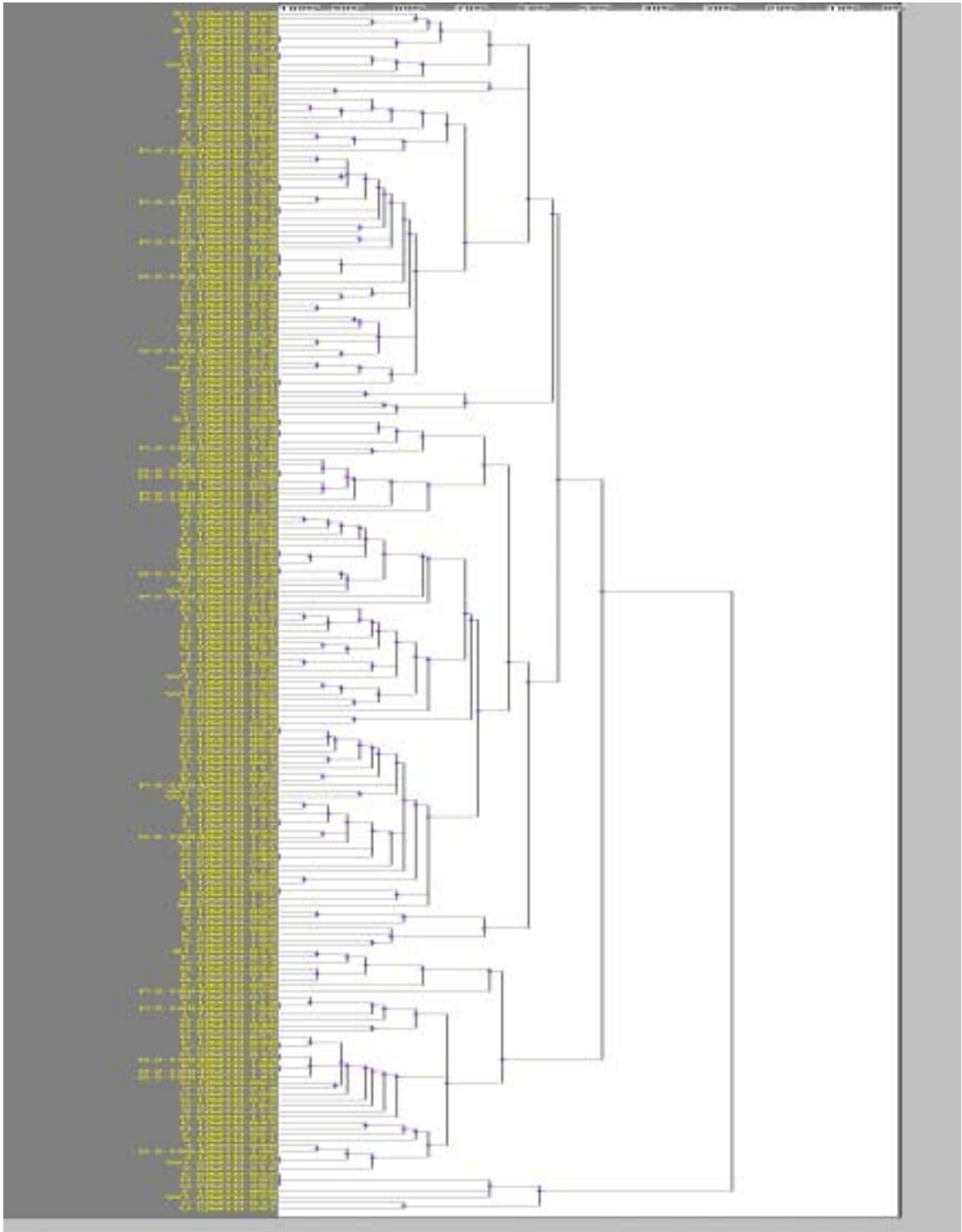


Fig. 3 Dendrogram illustrating relationships by IS6110-RFLP between *M.tuberculosis* strains from Southern Taiwan.

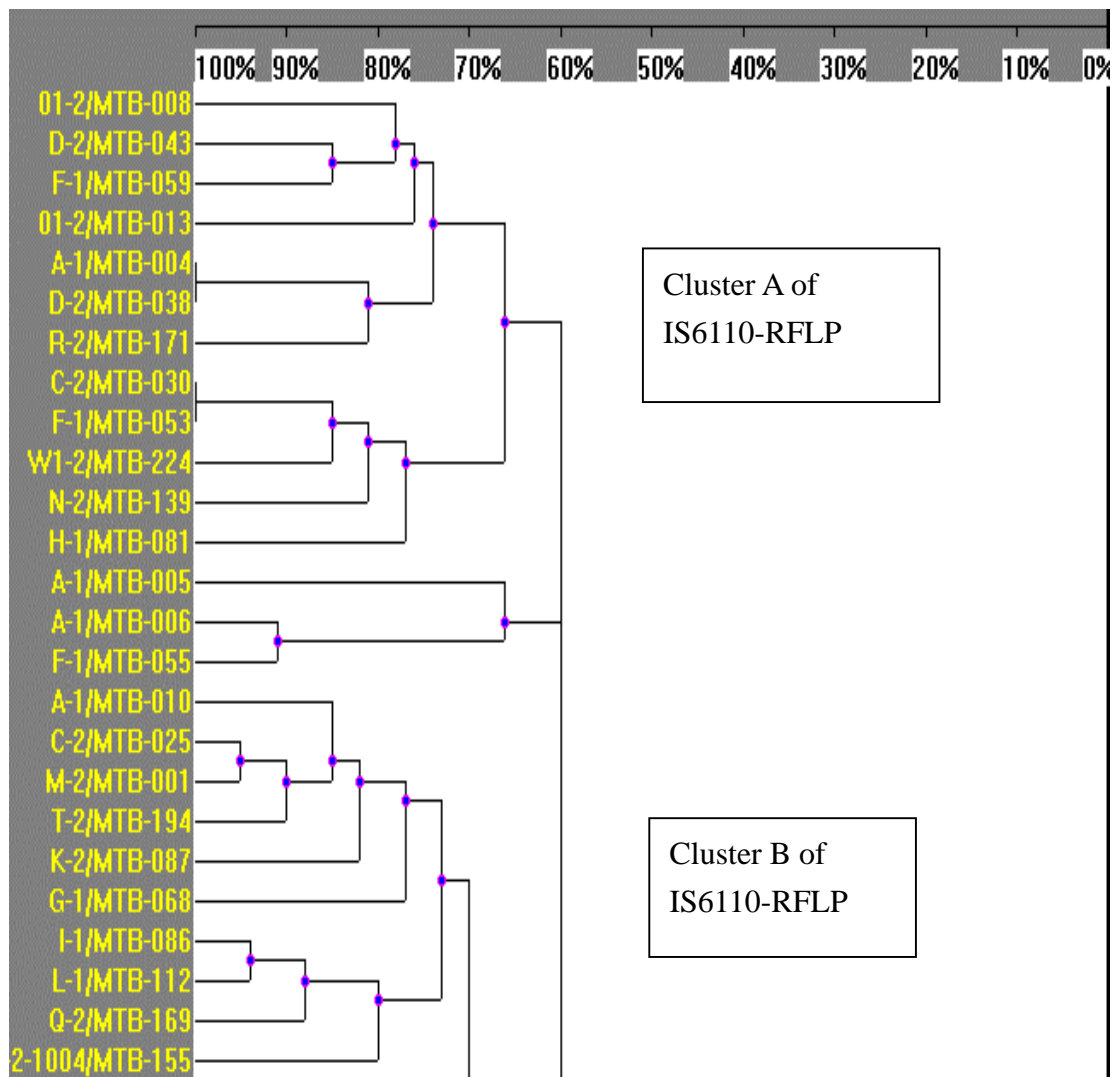


Fig.4a Clusters A and B of dendrogram illustrating relationships by IS6110-RFLP between *M.tuberculosis* strains from Southern Taiwan

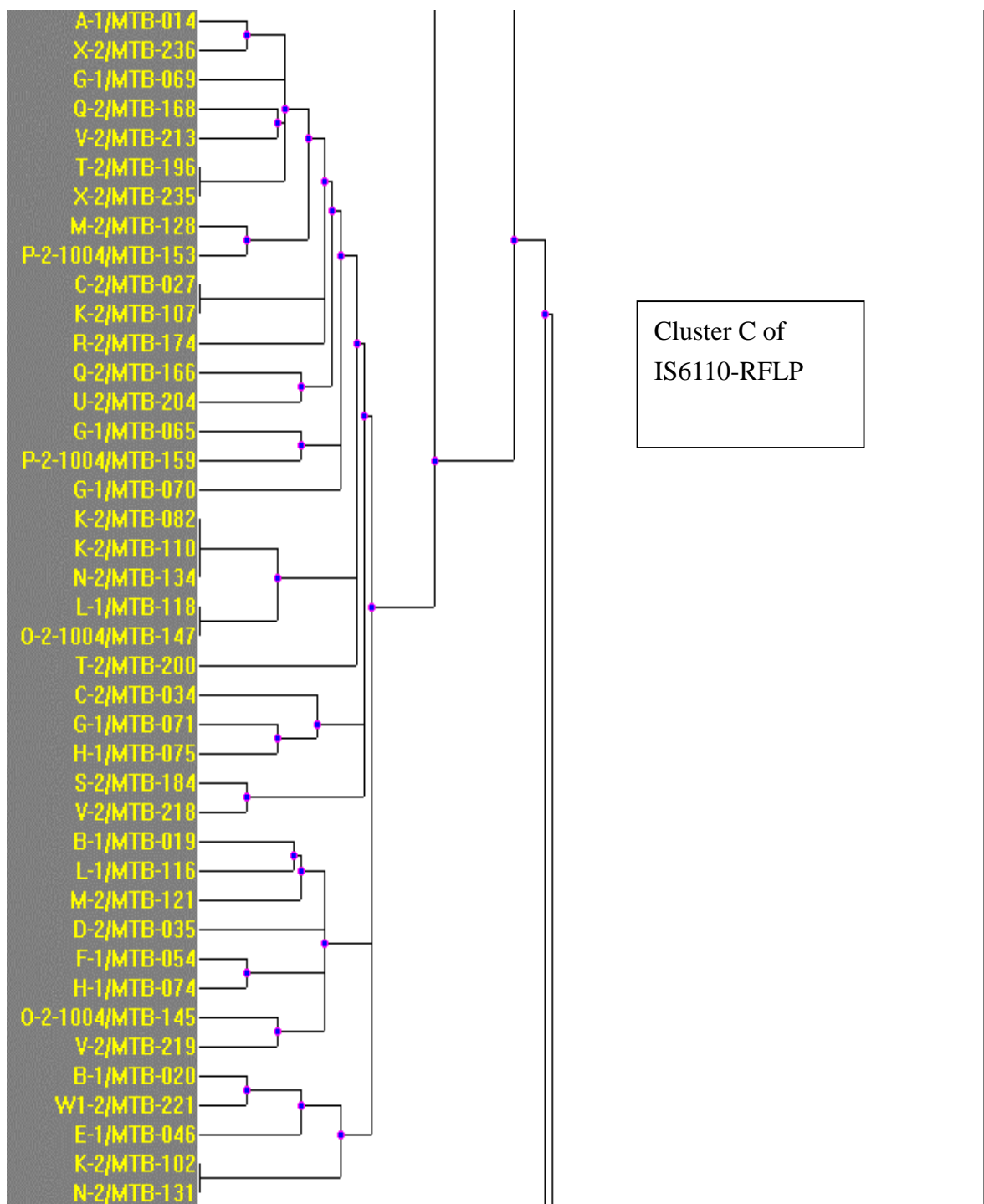


Fig. 4 b Clusters C of dendrogram illustrating relationships by IS6110-RFLP between *M.tuberculosis* strains from Southern Taiwan

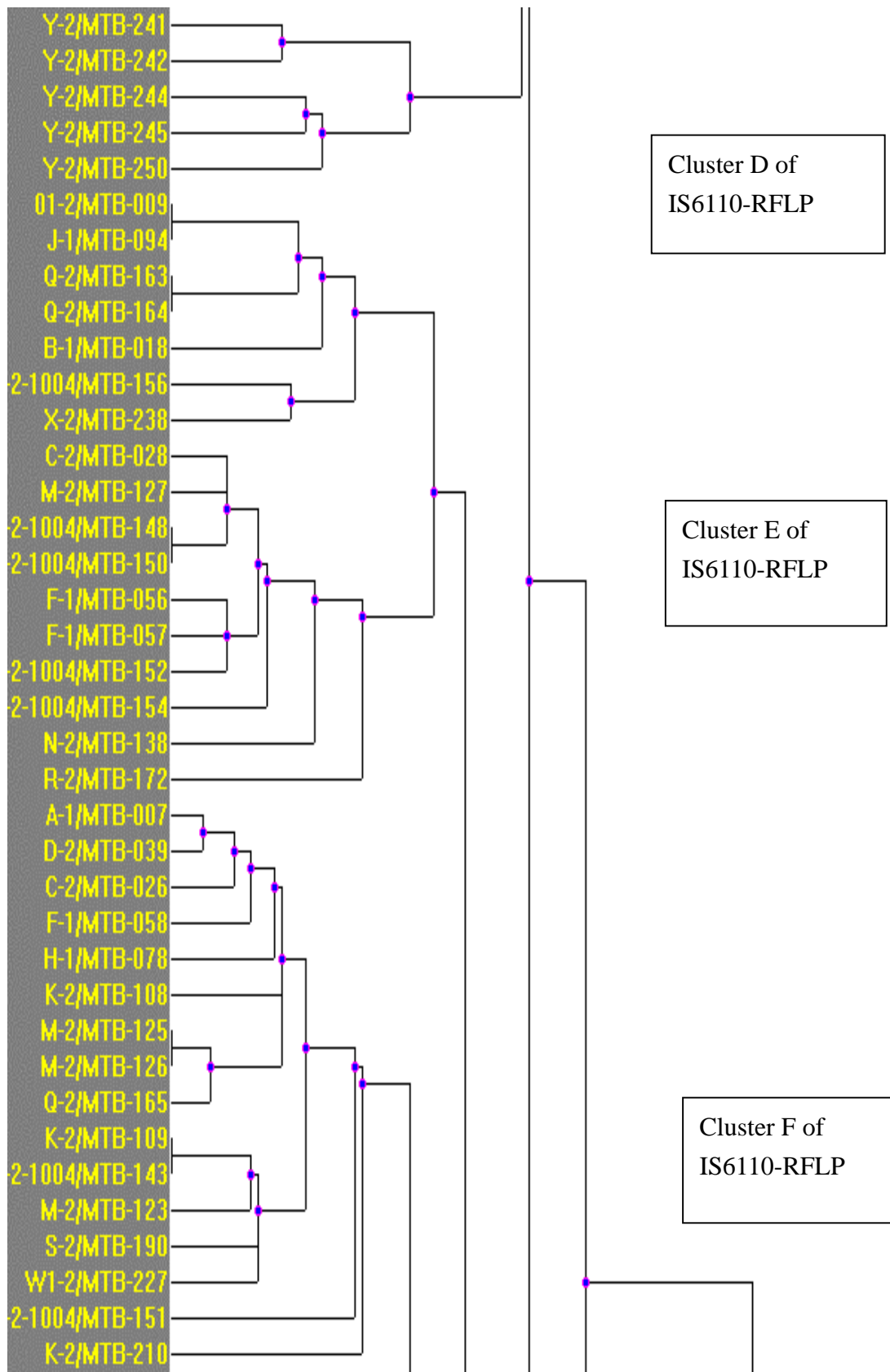


Fig. 4 c Clusters D ,E and F of dendrogram illustrating relationships by IS6110-RFLP between *M.tuberculosis* strains from Southern Taiwan

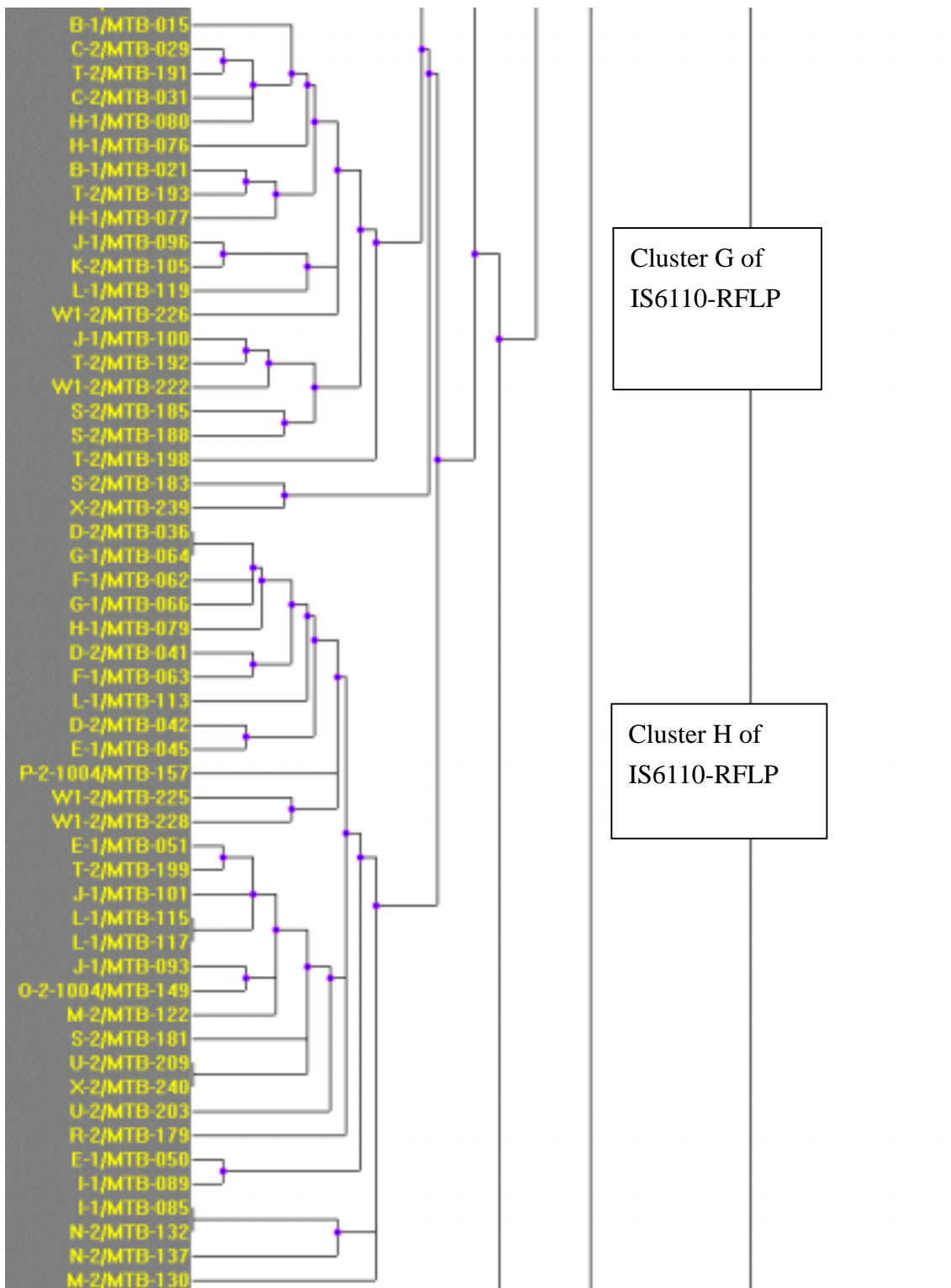


Fig. 4 d Clusters G and H of dendrogram illustrating relationships by IS6110-RFLP between *M.tuberculosis* strains from Southern Taiwan

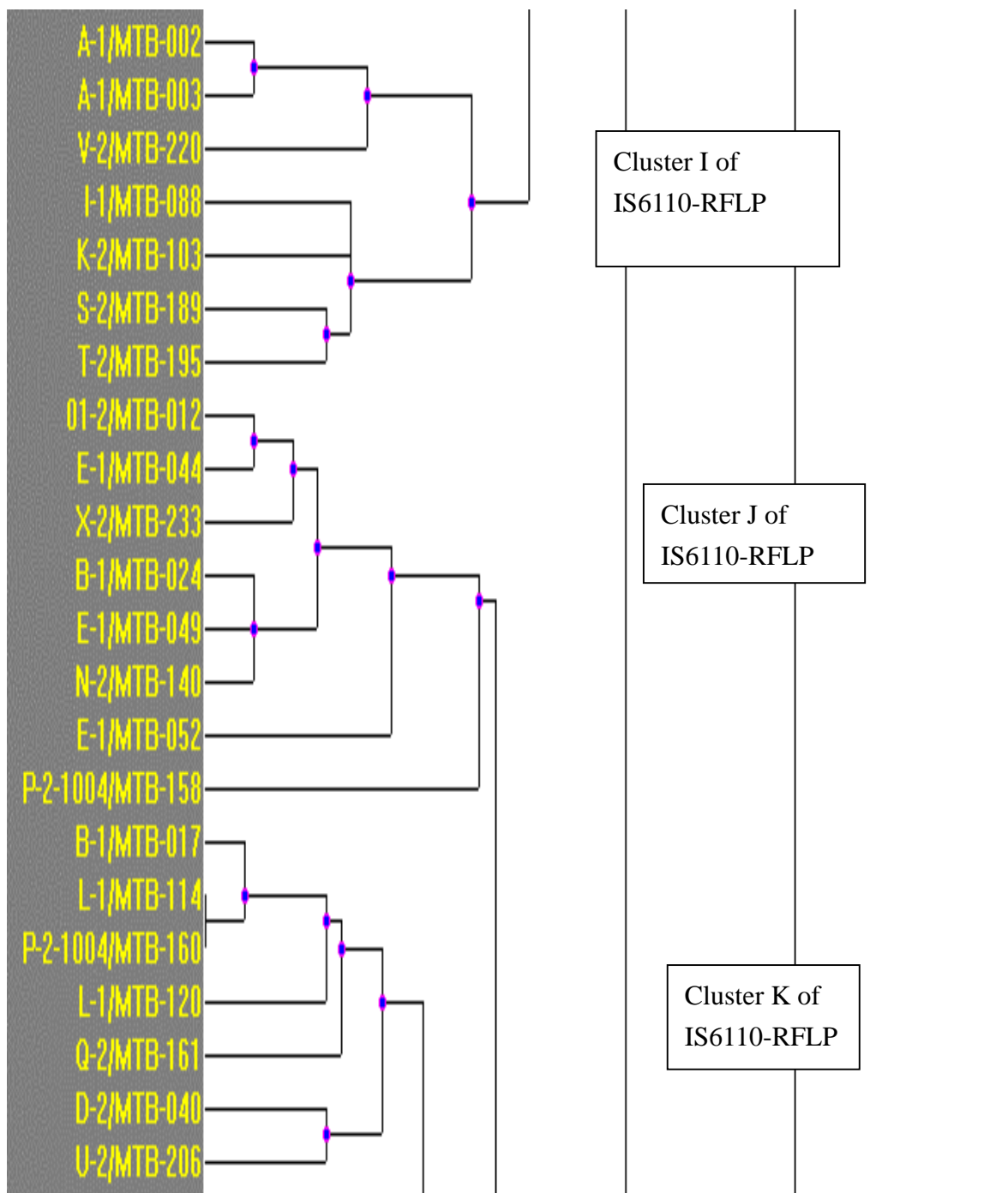


Fig. 4 e Clusters I,J and K of dendrogram illustrating relationships by IS6110-RFLP between *M.tuberculosis* strains from Southern Taiwan

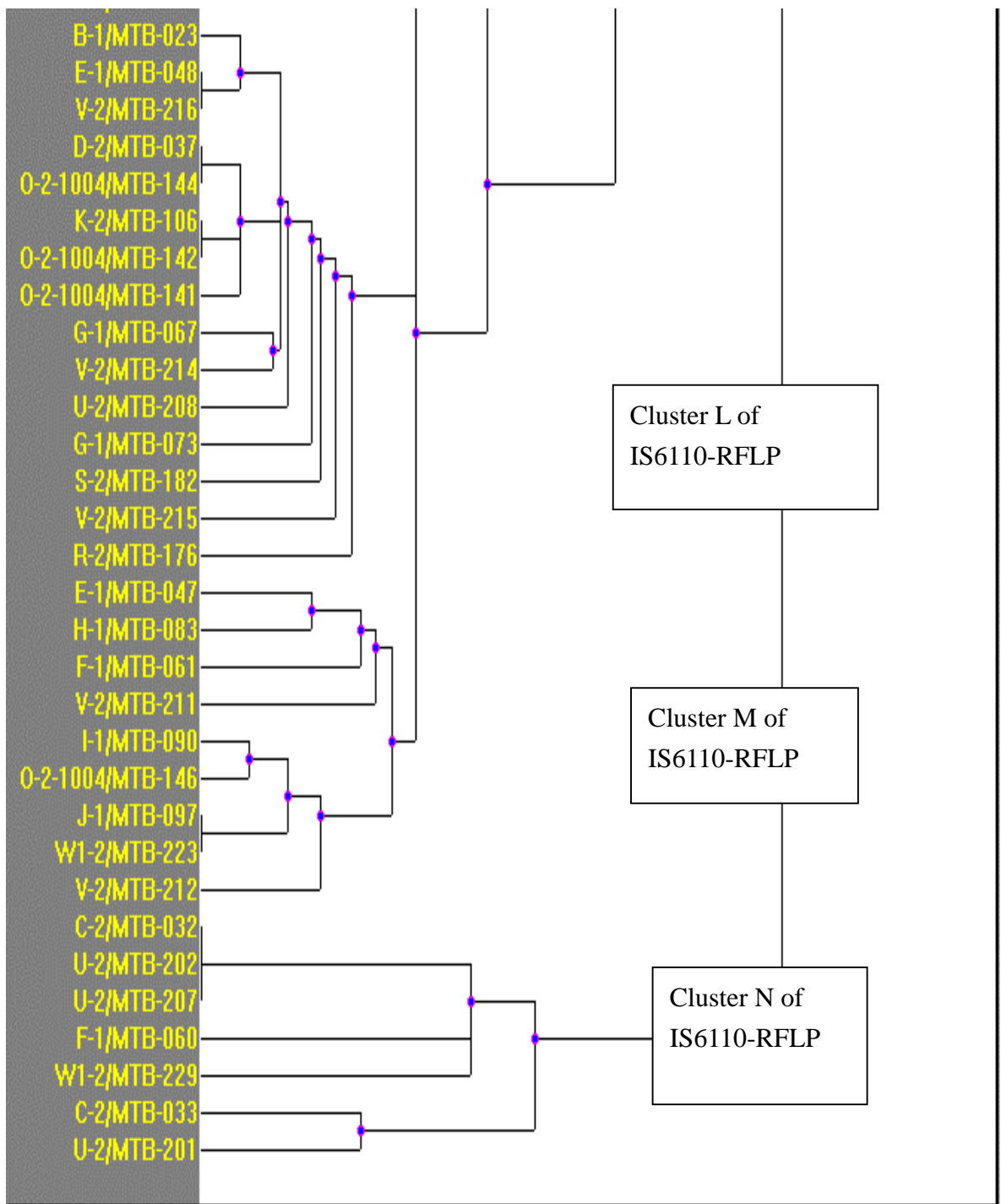


Fig. 4f . Clusters L,M and N of dendrogram illustrating relationships by IS6110-RFLP between *M.tuberculosis* strains from Southern Taiwan

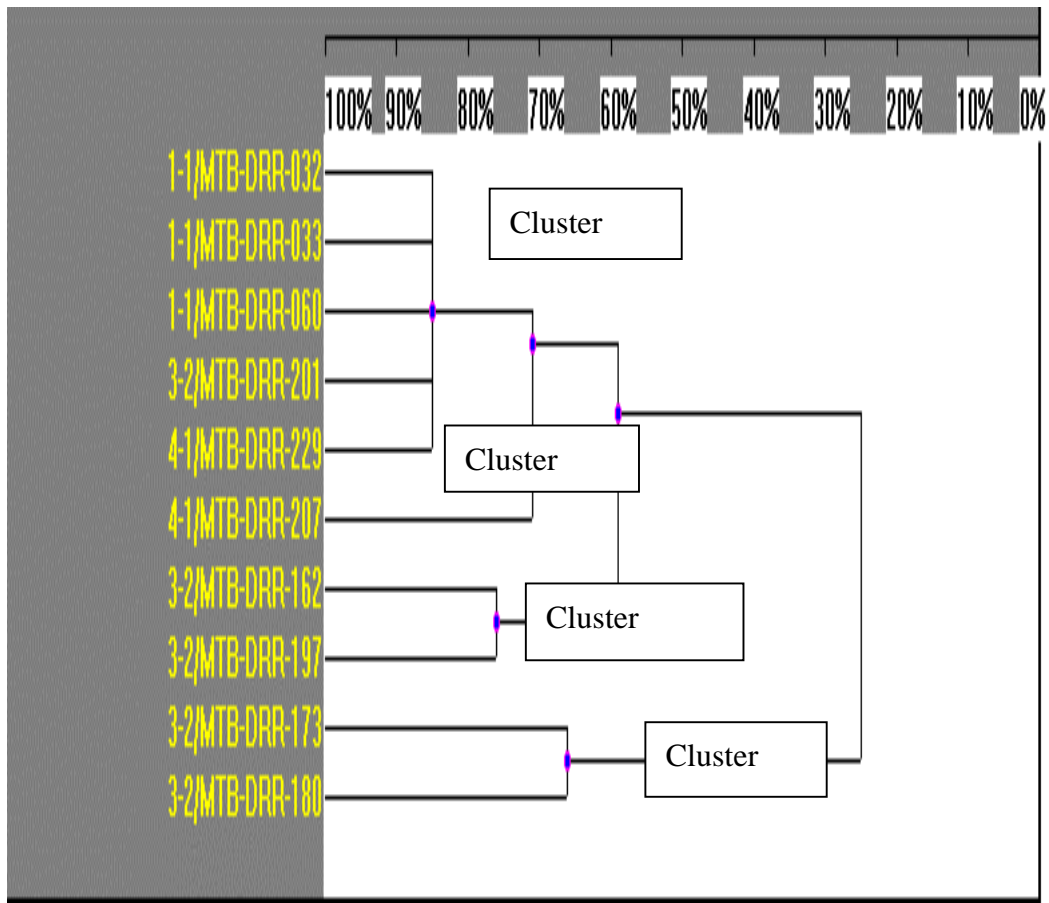


Fig.5 Dendrogram illustrating relationships by DRr-RFLP between *M.tuberculosis* strains with low copy number of IS6110-RFLP from Southern Taiwan