

計畫編號： DOH98-DC-2038

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

鑑定『卡介苗疫苗』分子基因型別之變異

## 研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：吳炳輝

研究人員：李政道、楊素鈴、李國銘、楊尚樺

執行期間：98 年 3 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

# 目 錄

	頁 碼
封面	(1)
目錄	(2)
中文摘要	(3)
前言	(5)
材料與方法	(8)
結果	(12)
討論與建議	(24)
參考文獻	(27)

## 中文摘要

目前卡介苗疫苗 (Bacillus Calmette- Guérin ; BCG) 是由本局疫苗中心所產製，並經由品管檢驗相關測試項目，因其卡介苗活菌數量多寡會影響接種成功與否，其中效價試驗是卡介苗的活菌數量多寡的關鍵指標。檢定卡介苗疫苗的效價試驗是將卡介苗活菌液培養於呂顏二氏 (Lowenstein-Jensen) 斜面培養基，經過 4-5 週後，取出並計算出菌落數來推算其效價。然在記錄菌落數常會觀察到卡介苗菌落會出現 2 種不同的外觀型別(morphology)，一為平滑型(smooth form)另一為粗糙型(rough form)。依據 2006 年日本 NIID (*National Institute of Infectious Diseases*) 學者 Yamamoto et al 亦發現卡介苗菌落的外觀主要有 2 種型式出現，這和我們的產製卡介苗疫苗的菌落具有一致的相符性，在 2007 年 Yamamoto 等人更進一步以 Real-time PCR 方法將此 2 種菌落予以定量。然而目前局內產製卡介苗疫苗並無此相關的研究與探討，為進一步監控疫苗基因型別的變異與其效價的關聯，本計劃將目前市售『凍結乾燥卡介苗』疫苗分別儲放於冰箱、室溫及 37°C 各一、三及六個月。在這些時間點計算出平滑型(smooth form)及粗糙型(rough form)菌落的分佈比率及其是否會影響到疫苗的力價的改變。亦嘗試建立聚合連鎖反應(PCR)技術檢測最重要的基因是否發生變異。並探討 PCR pattern 的差異是否會影響『凍結乾燥卡介苗』疫苗的力價。最後建立 Multiple PCR 方法檢測

方法卡介苗基因型別是否發生變異。藉由 Multiple PCR 方法檢測『凍結乾燥卡介苗』疫苗經不同溫度的儲存及市售的不同批次是否有基因型別的變異，並探討基因型別的變異是否會影響『凍結乾燥卡介苗』疫苗的力價。為監控疫苗及接種品質，與維護良好之疫苗品質，達到最好預防的效果，監控疫苗基因型別的變異與其效價的關聯實為必要。

## 前言

卡介苗(Bacillus Calmette- Guérin; BCG)是最早是由法國Calmette 和 Guérin從患結核性乳房炎的乳牛取到乳牛病株 (*Mycobacterium bovis*)，以含馬鈴薯片、牛膽汁和甘油組成的培養基每3 週繼代培養一次，經過13 年共 230 次的繼代培養而減毒成功的牛型結核菌活菌減毒疫苗。1921 年，BCG 以口服的方式首次使用於嬰兒身上，1923 年改用皮下接種，至1927 年更進一步採用皮內注射接種。自此之後，BCG 被廣泛地應用在預防結核病，至今全球每年約一億孩童接種卡介苗。

我國最早使用之卡介苗為液體疫苗，係由馬尼拉卡介苗製造室供應，以0.1mg/0.1ml進行皮內注射。1952年台灣省卡介苗製造室創立；1953年起經世界衛生組織認定，開始採用該室自製之液體卡介苗。當時使用之菌株為法國Pasteur Institute之old Pasteur Strain，1956年起改用new Pasteur Strain劑量一歲以下為0.05mg/0.1ml，一歲以上為0.1mg/0.1ml皮內注射。1979 年3 月改以日本 Tokyo 172 菌株製造凍結乾燥卡介苗。並於同年7 月起開始使用國產凍結乾燥卡介苗接種於嬰兒，1980 年秋季起全面改用乾燥卡介苗，劑量一律.05mg/0.1ml，皮內注射。

卡介苗可說是人類歷史上使用最多及最久的疫苗之一，但其成效在近三十年來卻備受爭議與質疑。在歐洲，其結核病盛行率在廣泛使用卡介苗之前已明顯下降，在卡介苗使用率不高的北美地區，結核病的盛行

率也呈現自然下降。而在亞洲地區廣泛應用卡介苗達數十年的國家，如印度和中國，結核病的盛行率並沒有因為卡介苗的大量使用而下降。多個大型的流行病學研究也無法證明卡介苗可以有效預防肺結核。目前比較肯定的是，卡介苗可以預防嬰幼兒的進行性初發性結核病（progressive primary tuberculosis）如結核性腦膜炎。

目前卡介苗疫苗（Bacillus Calmette- Guérin；BCG）是由本局疫苗中心所產製，並經由品管檢驗相關測試項目，因其卡介苗活菌數量多寡會影響接種成功與否，其中效價試驗是卡介苗的活菌數量多寡的關鍵指標。

檢定卡介苗疫苗的效價試驗是將卡介苗活菌液培養於呂顏二氏

（Lowenstein-Jensen）斜面培養基，經過4-5週後，取出並計算出菌落數來推算其效價。然在記錄菌落數常會觀察到卡介苗菌落會出現2種不同的外觀型別(morphology)，一為平滑型(smooth form)另一為粗糙型(rough form)。

依據2006年日本NIID (*National Institute of Infectious Diseases*)學者 Yamamoto et al亦發現卡介苗菌落的外觀主要有2種型式出現，這和我們的產製卡介苗疫苗的菌落具有一致的相符性，在2007年Yamamoto等人更進一步以Real-time PCR方法將此2種菌落予以定量。然而目前局內產製卡介苗疫苗並無此相關的研究與探討，為進一步監控疫苗基因型別的變

異與其效價的關聯，本計劃將目前市售『凍結乾燥卡介苗』疫苗分別儲放於冰箱、室溫及 37°C 各一、三及六個月。在這些時間點進行計算出平滑型(smooth form)及粗糙型(rough form)菌落的分佈比率是否會影響到疫苗的力價的改變。另建立Multiple PCR 聚合連鎖反應技術檢測最重要的基因是否發生變異。並探討PCR pattern的差異是否會影響『凍結乾燥卡介苗』疫苗的力價。為監控疫苗及接種品質，為維持良好之疫苗品質，達到預防的效果，監控疫苗基因型別的變異與其效價的關聯實為必要。

## 材料與方法

### (一)、『凍結乾燥卡介苗』疫苗樣本的收集並分別儲放於冰箱、室溫及 37°C

將目前市售『凍結乾燥卡介苗』疫苗分別儲放於冰箱、室溫及 37°C 各一、三及六個月。

本計劃將抽樣留存的『凍結乾燥卡介苗』疫苗，各取10支卡介苗作為本研究之疫苗樣本。

### (二)、『凍結乾燥卡介苗』平滑型(smooth form)及粗糙型(rough form)分佈比率

取5支檢體以無菌生理氯化鈉稀釋至 0.5毫克/毫升後混合均勻，再以無菌蒸餾水稀釋至  $2 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $5 \times 10^{-6}$  三種稀釋液濃度。分別以 0.1 毫升接種於呂顏二氏 (Lowenstein-Jensen) 斜面培養基 (詳見 SC-ME-0003)，前二種稀釋液濃度各接種5支，最後一種接種10支。置於溫度37°C，濕度 80 % 之恆溫恆濕培養箱 (SC-ES-0025) 培養4-5週後，取出並計算出平滑型 (smooth form)及粗糙型(rough form)的分佈比率並計算效價。記錄菌落數。



(三)、『凍結乾燥卡介苗』活菌數效價計算方式：

計算每一濃度培養 colony 的標準差，依下列公式計算。

先由所得之各菌落數算出  $\chi^2$ ，

$$\chi^2 = (nSx^2/Sx) - Sx。$$

n: 某一稀釋菌液接種之斜面數目。

Sx: 某一稀釋菌液。

Sx<sup>2</sup>: 所得之菌落液所得之菌落數平方總合。

將 P 值(Probability)設為 0.05，若 n=5， $\chi^2$  不得大於 9.5；若

n=10， $\chi^2$  不得大於 16.9；若所計算任一  $\chi^2$  大於上述數值，

則需覆試。

計算各稀釋液所得之菌落平均數，分別以  $X_1$ ， $X_2$ ， $X_3$  表

示之。適值  $\omega$  定 40。

若  $X_1 + X_2 + 2X_3 \leq 2\omega$ ，則菌落計數 =  $1/2 (X_1 + X_2 + 2X_3)$

若  $X_1 + X_2 + 2X_3 \geq 2\omega \geq X_2 + X_3$ ，則菌落計數 =  $(\omega \cdot X_1) / [2\omega + X_1 - (X_2 + 2X_3)]$

若  $X_2 + 2X_3 \geq 2\omega \geq 2X_3$ ，則菌落計數 =  $(\omega \cdot X_2) / (2\omega + X_2 + 2X_3)$

若  $2X_3 \geq 2\omega$ ，則菌落計數 =  $X_3$

所得之菌落計數乘以稀釋倍數，即為每毫升疫苗可培養出的菌落數。

#### (四) 卡介苗之 genomic DNA 之萃取與純化

取所得卡介苗溶解在 2 ml of TEST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1 M Na Cl, Triton X-100 1/200 v/v). 加入 Lysozyme (2 mg/ml) 並置於37°C for 30 min. 再以sodium dodecyl sulphate (SDS) (4%) and proteinase K (2 mg/ml).於50°C overnight將之lysis,最後以phenolchloroform-isoamylalcohol (25:24:1) 純化萃取，並復溶於含有potassium acetate (0.3 M final concentration)保存之。

#### (五) 以聚合連鎖反應(PCR)技術檢測最重要的基因RD region

(RD2, RD8, RD14, RD16)是否發生變異。

設計出卡介苗最重要的基因RD16的primers。以PCR夾出此基因片段。依照 Bedwell et al.的文獻報告 [6],Primer set RD16l and RD16r.為設計放大基因RD16：

Primers RD16F 序列 為 ATCGTTCACGGACAGCCGTAGT及

Primers RD16R 序列為TCGATCCAAGTTCAACCACG.

PCR 的反應在 20 ml of reaction mixture 含有 1 mM of each primer, 1 mM of probe, and each DNA sample or 4-fold serial diluted standard DNA (76 fg) with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, cat. 4304437). 反應步驟在50°C for 2

min. and 95°C for 10 min for enzyme活化, and 40 cycles for amplification steps at 95°C for 15秒, 以及60°C for 1 min, 將所得到的 PCR產物loading於2%的Agarose Gel中。

#### (五) DNA定序

以自動定序儀(model 3730, Applied Biosystem)雙向定序所有基因。並鑑定出變異序列。並探討DNA sequencing的差異是否會影響『凍結乾燥卡介苗』疫苗的力價。

## 結果

### (一) 『凍結乾燥卡介苗』疫苗分別儲放於冰箱、室溫及 37°C

將目前市售『凍結乾燥卡介苗』疫苗數批分別儲放於冰箱、室溫及 37°C 各一、三及六個月。在這些時間點分別進行效價試驗，檢測卡介苗疫苗的力價是否有改變。

Table 1 (A). 『凍結乾燥卡介苗』疫苗在室溫及 37°C 各儲存一個月力價的結果，力價有降低在室溫儲存下力價降低約 70% 左右；在 37°C 儲存下力價降低約 50% 左右。

Lot no/	4°C	23°C	37°C
BG039701	$2.25 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$	$1.05 \times 10^7$
BG039702	$1.8 \times 10^7$	$1.25 \times 10^7$	$0.95 \times 10^7$
BG039703	$2.8 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$
BG039704	$2.3 \times 10^7$	$1.55 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$
BG039705	$2.05 \times 10^7$	$1.45 \times 10^7$	$1.05 \times 10^7$
BG039801	$2.15 \times 10^7$	$1.55 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$
BG039802	$1.8 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$

Table 1 (B). 『凍結乾燥卡介苗』疫苗在室溫及 37°C 各儲存三個月力價的結果，力價有降低在室溫儲存下力價降低約 70% 左右；在 37°C 儲存下力價降低約 50% 左右

Lot no.	4°C	23°C	37°C
BG039701	$1.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$0.8 \times 10^7$
BG039702	$1.5 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$0.5 \times 10^7$
BG039703	$1.6 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$0.6 \times 10^7$
BG039704	$1.9 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$0.8 \times 10^7$
BG039705	$1.5 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$
BG039801	$1.6 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
BG039802	$1.5 \times 10^7$	$0.6 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$

Table 1 (C). 『凍結乾燥卡介苗』疫苗在室溫及 37°C 各儲存六個月力價的結果，力價有降低在室溫儲存下力價降低約 50% 左右；在 37°C 儲存下力價降低約 40% 左右

Lot no.	4°C	23°C	37°C
BG039701	$1.1 \times 10^7$	$0.6 \times 10^7$	$0.3 \times 10^7$
BG039702	$0.6 \times 10^7$	$0.3 \times 10^7$	$0.2 \times 10^7$
BG039703	$0.7 \times 10^7$	$0.3 \times 10^7$	$0.3 \times 10^7$
BG039704	$0.9 \times 10^7$	$0.6 \times 10^7$	$0.4 \times 10^7$
BG039705	$0.6 \times 10^7$	$0.3 \times 10^7$	$0.2 \times 10^7$
BG039801	$0.8 \times 10^7$	$0.5 \times 10^7$	$0.5 \times 10^7$
BG039802	$0.6 \times 10^7$	$0.4 \times 10^7$	$0.3 \times 10^7$

(二) 將『凍結乾燥卡介苗』疫苗培養在呂顏二氏斜面培養基上

將『凍結乾燥卡介苗』疫苗培養在呂顏二氏斜面培養基上，經過4週記錄菌數，並計算出平滑型(smooth form)及粗糙型(rough form)菌落的分佈比率。經過4週記錄菌數，並計算出平滑型(smooth form)及粗糙型(rough form)的分佈比率並計算效價。發現絕大多數菌落是以平滑型(smooth form)為主。

Table 2. (A) 『凍結乾燥卡介苗』疫苗在室溫及 37°C 各儲存一個月後，發現絕大多數菌落是以平滑型(smooth form)表現出，所佔比率約 85% 以上。

	S-colonies(%)			R-colonies(%)		
	4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
BG039701	100	86.96	100	0	13.04	0
BG039702	89	100	100	11	0	0
BG039703	98	91	93	2	9	7
BG039704	99	100	100	1	0	0
BG039705	98	100	100	2	0	0
BG039801	96	83	95	4	17	5
BG039802	99	87	82	1	13	18

Table 2 (B) 『凍結乾燥卡介苗』疫苗在室溫及 37°C 各儲存三個月後，發現絕大多數菌落是以平滑型(smooth form)表現出，所佔比率約 70% 以上。

	S-colonies(%)			R-colonies(%)		
	4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
BG039701	86	100	85	14	0	15
BG039702	73	80	92	27	20	8
BG039703	75	85	84	25	15	16
BG039704	70	82	100	30	18	0
BG039705	83	81	100	17	19	0
BG039801	95	75	82	5	25	18

BG039802	93	98	92	7	2	8
----------	----	----	----	---	---	---

Table 2 (C) 『凍結乾燥卡介苗』疫苗在室溫及 37°C 各儲存六個月後，發現絕大多數菌落是以平滑型(smooth form)表現出，所佔比率約 80% 以上。

	S-colonies(%)			R-colonies(%)		
	4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
BG039701	90.6	84	100	9.4	16	0
BG039702	87	100	100	13	0	0
BG039703	89	88	92	11	12	8
BG039704	89	91	92	11	9	8
BG039705	100	71	80	0	29	20
BG039801	90.6	64	100	9.4	36	0
BG039802	87	100	100	13	0	0

(三) 以Qiagen Genomic Tips 500/G kit萃取在室溫及 37°C各儲存一個月後卡介苗之 genomic DNA，已完成建立聚合連鎖反應(PCR)技術檢測最重要的基因16 RD region，觀測是否發生變異。結果發現平滑型(smooth form) 菌落的16 RD基因片段比粗糙型(rough form)菌落的16 RD短。

Fig1 (A). 在室溫及 37°C各儲存一個月後，發現平滑型(smooth form) 菌落的16 RD基因片段比粗糙型(rough form)菌落的16 RD短。

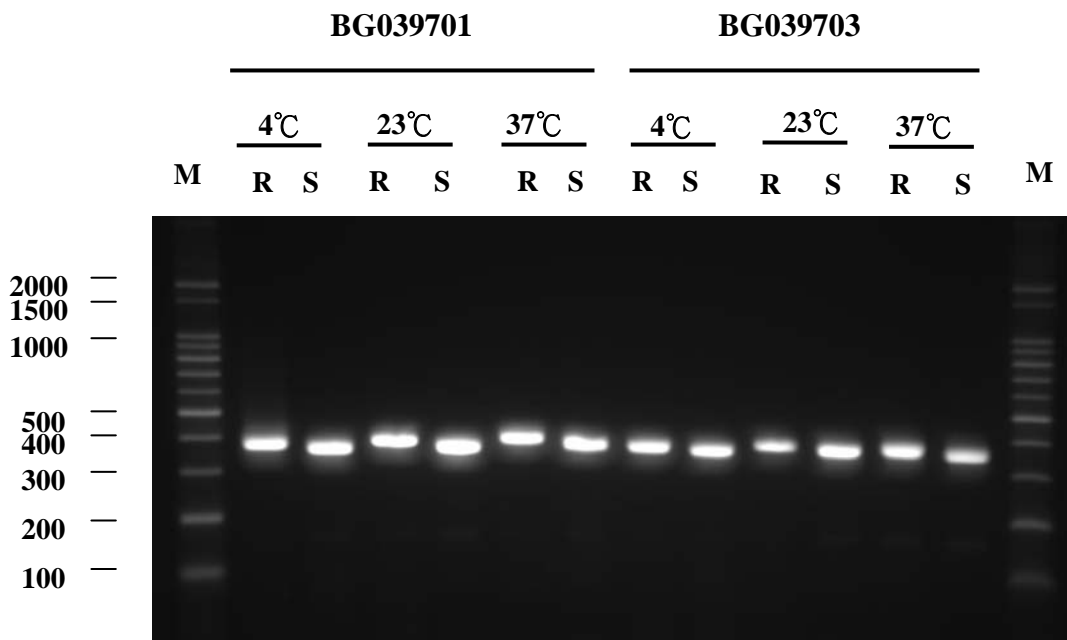


Fig1 (B). 在室溫及 37°C各儲存三個月後，發現平滑型(smooth form) 菌落的16 RD基因片段比粗糙型(rough form)菌落的16 RD短。

**BG039703**



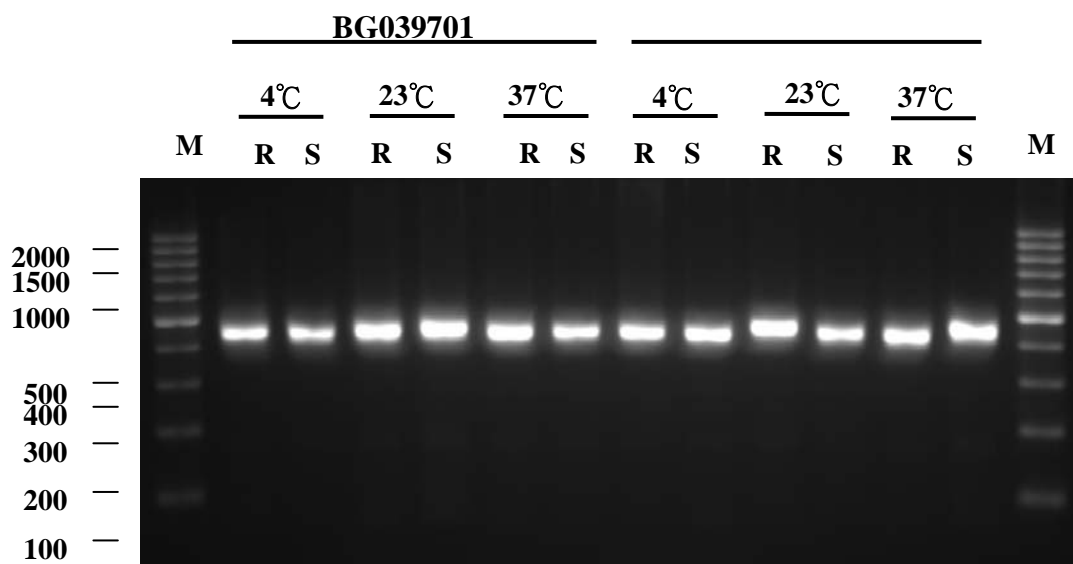
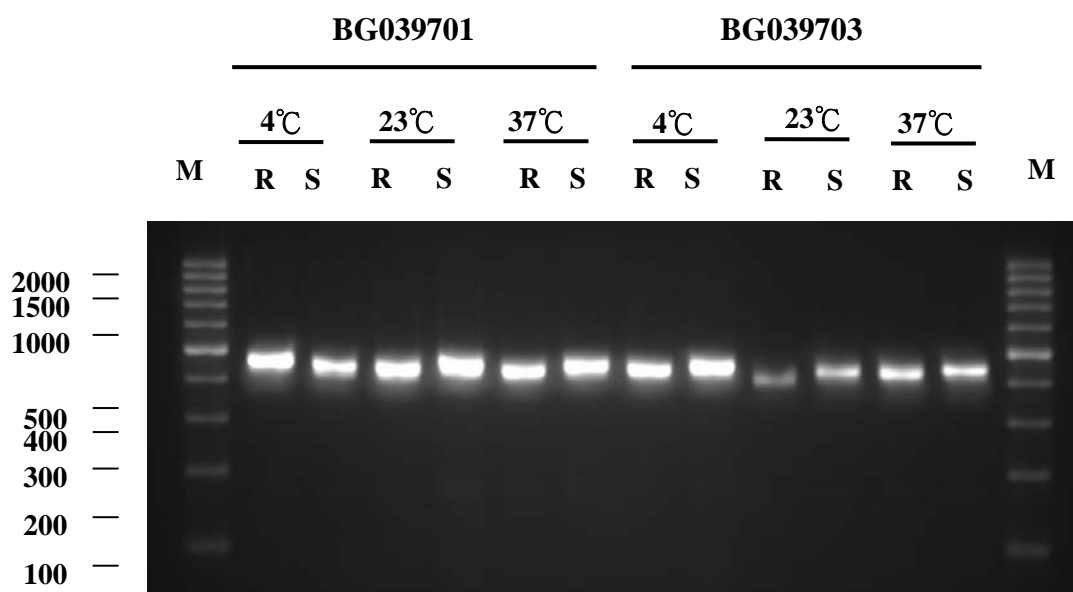


Fig 1 (C). 在室溫及 37°C 各儲存六個月後，發現平滑型(smooth form) 菌落的16 RD基因片段比粗糙型(rough form)菌落的16 RD短。



嘗試將16RD region 的片段對限制酵素做分析比對，結果發現粗糙型(rough form)菌落的16 RD內對HpyCH4 III有一個specific restriction site.然平滑型(smooth form)菌落 的16 RD基因片段卻無此特性，因此再以HpyCH4 III限制酵素對16 RD基因片段做分析。

Fig 2 (A). 在室溫及 37°C 各儲存一個月後，發現粗糙型(rough form)的16 RD基因片段確實存在一個HpyCH4 III限制酵素的specific restriction site.而此region 是平滑型(smooth form) 菌落的16 RD所缺乏的。再次確認平滑型(smooth form)的16 RD基因片段與粗糙型(rough form)的差異性。

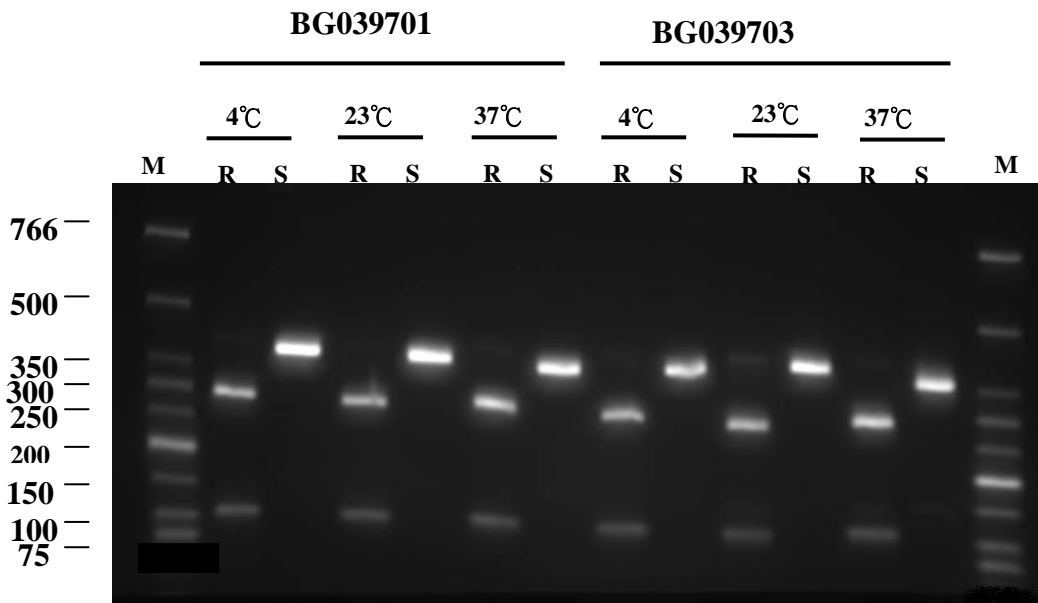


Fig 2 (B). 在室溫及 37°C 各儲存一個月後，發現粗糙型(rough form)的16 RD基因片段確實存在一個HpyCH4 III限制酵素的specific restriction site. 而此region 是平滑型(smooth form) 菌落的16 RD所缺乏的。再次確認平滑型(smooth form)的16 RD基因片段與粗糙型(rough form)的差異性。

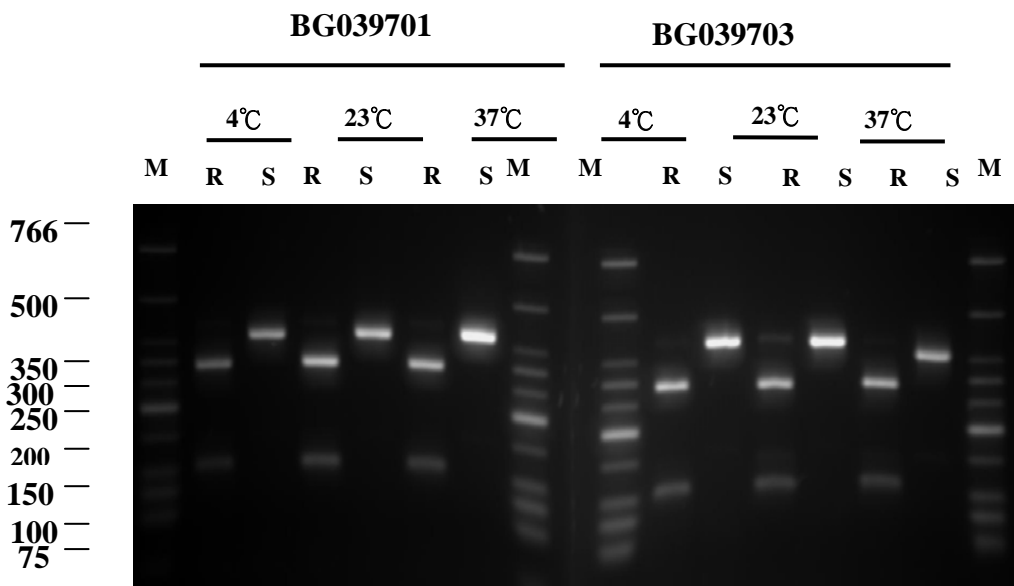
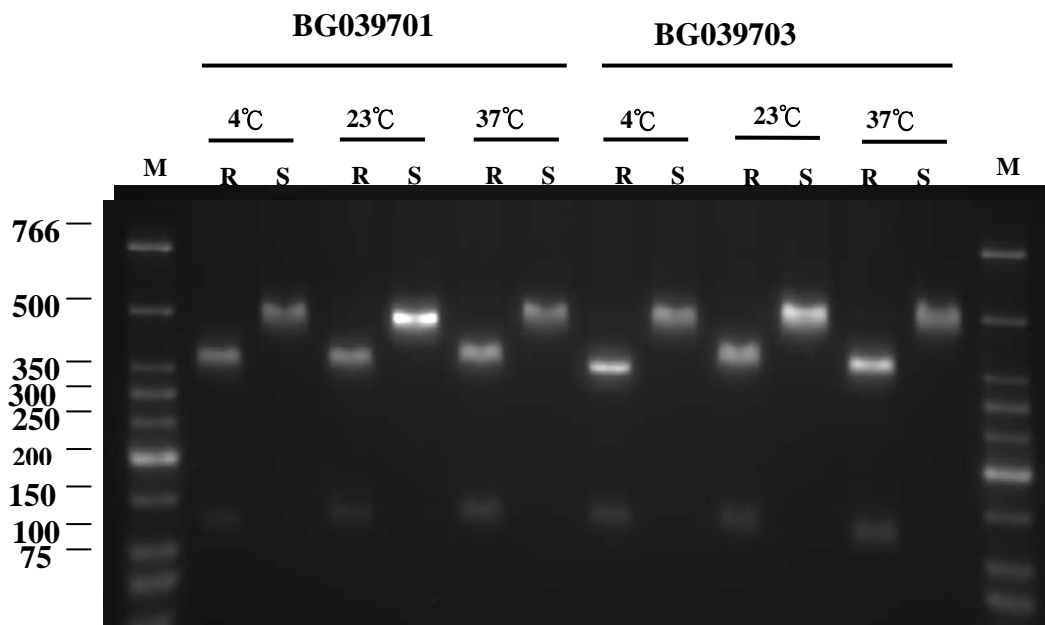


Fig 2 (C). 在室溫及 37°C 各儲存一個月後，發現粗糙型(rough form)的16 RD基因片段確實存在一個HpyCH4 III限制酵素的specific restriction site. 而此region 是平滑型(smooth form) 菌落的16 RD所缺乏的。再次確認平滑型(smooth form)的16 RD基因片段與粗糙型(rough form)的差異性。



#### (四) DNA定序

以自動定序儀系統(Perkin Elmer Cetus,ABI, Prism 377)來定序，並鑑定出其變異序列。並探討DNA sequencing的差異是否會影響『凍結乾燥卡介苗』疫苗的力價。結果：平滑型(smooth form) 菌落的16 RD基因片段比粗糙型(rough form)菌落的16 RD短22base pair。其結果符合Honda I等人在2006年所發表的文獻報導。

Fig 3. 平滑型(smooth form) 菌落的 16 RD 基因片段比粗糙型(rough form)菌落的 16 RD 短 22base pair.

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
BG039701-4R      -----ACTTA-GTAA
BG039701-4S      -----GGGGTTCGTATT--CGGCCAA--GGACCA-CTGA
BG039701-23R     -----GGCGTGGTCGTA--TTCGGCAC--AGGACCA-CTGG
BG039701-23S     -----AGAAGGATCGTC--TTCGGCAC--AGGACCAACTGG
BG039701-37R     -----GGCTGAT----CGTC--TTCGGCAC--AGGACCAACTGG
BG039701-37S     -----AACAGGT----CGTC--TTCGGCAC--AGGACCAACTGG
RD16-PCR_product CTCGATCCAAGGTCAACCACGGGCTGGTGTTCGTCACCTTCGGCACCAAGGACCAACTGG
                                                                * *
BG039701-4R      TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCACGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCCGAGGCGC
BG039701-4S      TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCAC-----TCCGAGGCGC
BG039701-23R     TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCACGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCCGAGGCGC
BG039701-23S     TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCAC-----TCCGAGGCGC
BG039701-37R     TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCACGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCCGAGGCGC
BG039701-37S     TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCAC-----TCCGAGGCGC
RD16-PCR_product TTGGGGCCGTGCTCGATCACCTGGGCACGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCCGAGGCGC
*****
BG039701-4R      CCGCTGACATCATCGAACGGGCTCTCGACCGACATGGGCGGGTCTTAGCCCGGGCACTGC
BG039701-4S      CCGCTGACATCATCGAACGGGCTCTCGACCGACATGGGCGGGTCTTAGCCCGGGCACTGC
BG039701-23R     CCGCTGACATCATCGAACGGGCTCTCGACCGACATGGGCGGGTCTTAGCCCGGGCACTGC
BG039701-23S     CCGCTGACATCATCGAACGGGCTCTCGACCGACATGGGCGGGTCTTAGCCCGGGCACTGC
BG039701-37R     CCGCTGACATCATCGAACGGGCTCTCGACCGACATGGGCGGGTCTTAGCCCGGGCACTGC
BG039701-37S     CCGCTGACATCATCGAACGGGCTCTCGACCGACATGGGCGGGTCTTAGCCCGGGCACTGC
RD16-PCR_product CCGCTGACATCATCGAACGGGCTCTCGACCGACATGGGCGGGTCTTAGCCCGGGCACTGC
*****
```

BG039701-4R TGGACGGATATCCCGTGGGCCAGCTGCAACAGCGATTTCCCAATGTTGCGGAGCTGCTCG  
BG039701-4S TGGACGGATATCCCGTGGGCCAGCTGCAACAGCGATTTCCCAATGTTGCGGAGCTGCTCG  
BG039701-23R TGGACGGATATCCCGTGGGCCAGCTGCAACAGCGATTTCCCAATGTTGCGGAGCTGCTCG  
BG039701-23S TGGACGGATATCCCGTGGGCCAGCTGCAACAGCGATTTCCCAATGTTGCGGAGCTGCTCG  
BG039701-37R TGGACGGATATCCCGTGGGCCAGCTGCAACAGCGATTTCCCAATGTTGCGGAGCTGCTCG  
BG039701-37S TGGACGGATATCCCGTGGGCCAGCTGCAACAGCGATTTCCCAATGTTGCGGAGCTGCTCG  
RD16-PCR\_product TGGACGGATATCCCGTGGGCCAGCTGCAACAGCGATTTCCCAATGTTGCGGAGCTGCTCG

\*\*\*\*\*

BG039701-4R ACGCGGTACGGCCTCGCTACGACAGCGACTTGGGCGCGGGCTGGCGGTCGCGCACGCCC  
BG039701-4S ACGCGGTACGGCCTCGCTACGACAGCGACTTGGGCGCGGGCTGGCGGTCGCGCACGCCC  
BG039701-23R ACGCGGTACGGCCTCGCTACGACAGCGACTTGGGCGCGGGCTGGCGGTCGCGCACGCCC  
BG039701-23S ACGCGGTACGGCCTCGCTACGACAGCGACTTGGGCGCGGGCTGGCGGTCGCGCACGCCC  
BG039701-37R ACGCGGTACGGCCTCGCTACGACAGCGACTTGGGCGCGGGCTGGCGGTCGCGCACGCCC  
BG039701-37S ACGCGGTACGGCCTCGCTACGACAGCGACTTGGGCGCGGGCTGGCGGTCGCGCACGCCC  
RD16-PCR\_product ACGCGGTACGGCCTCGCTACGACAGCGACTTGGGCGCGGGCTGGCGGTCGCGCACGCCC

\*\*\*\*\*

BG039701-4R TTGCGCTGCAATTCGGTTGGCGGCTCTTTGCGCCATGCTGCGCTCGGCGACGGGTATCG  
BG039701-4S TTGCGCTGCAATTCGGTTGGCGGCTCTTTGCGCCATGCTGCGCTCGGCGACGGGTATCG  
BG039701-23R TTGCGCTGCAATTCGGTTGGCGGCTCTTTGCGCCATGCTGCGCTCGGCGACGGGTATCG  
BG039701-23S TTGCGCTGCAATTCGGTTGGCGGCTCTTTGCGCCATGCTGCGCTCGGCGACGGGTATCG  
BG039701-37R TTGCGCTGCAATTCGGTTGGCGGCTCTTTGCGCCATGCTGCGCTCGGCGACGGGTATCG  
BG039701-37S TTGCGCTGCAATTCGGTTGGCGGCTCTTTGCGCCATGCTGCGCTCGGCGACGGGTATCG  
RD16-PCR\_product TTGCGCTGCAATTCGGTTGGCGGCTCTTTGCGCCATGCTGCGCTCGGCGACGGGTATCG

\*\*\*\*\*

BG039701-4R ACGAGCTGACCGGTGACGAACTACGGTTGTCCGT-GAA--  
BG039701-4S ACGAGCTGACCGGTGACGAACTACGGTTGTCCGT-GA---  
BG039701-23R ACGAGCTGACCGGTGACGAACTACGGTTGTCCGT-GAACG-  
BG039701-23S ACGAGCTGACCGGTGACGAACTACGGTTGTCCGTTGAAC--  
BG039701-37R ACGAGCTGACCGGTGACGAACTACGGTTGCG-----  
BG039701-37S ACGAGCTGACCGGTGACGAACTACGGTTGCG-----  
RD16-PCR\_product ACGAGCTGACCGGTGACGAACTACGGTTGTCCGTGAACGAT

\*\*\*\*\*

(五) 建立多重性聚合連鎖反應 (Multiplex PCR) 技術檢測其它的基因RD region (RD8, RD14, RD2) 是否也發生變異。

除了RD16 region之變異，我們依據文獻報導並設計出卡介苗其它重要的基因RD region (RD2, RD8, RD14). 以Multiplex PCR夾出此基因片段，並探討multiplex PCR pattern的是否有差異。結果發現在這些RD region只有RD16 基因之變異，其它無差異。

Fig 4 (A). 在室溫及 37°C 各儲存一個月後，發現在這些 RD region 只有 RD16 基因之變異，其它無差異。

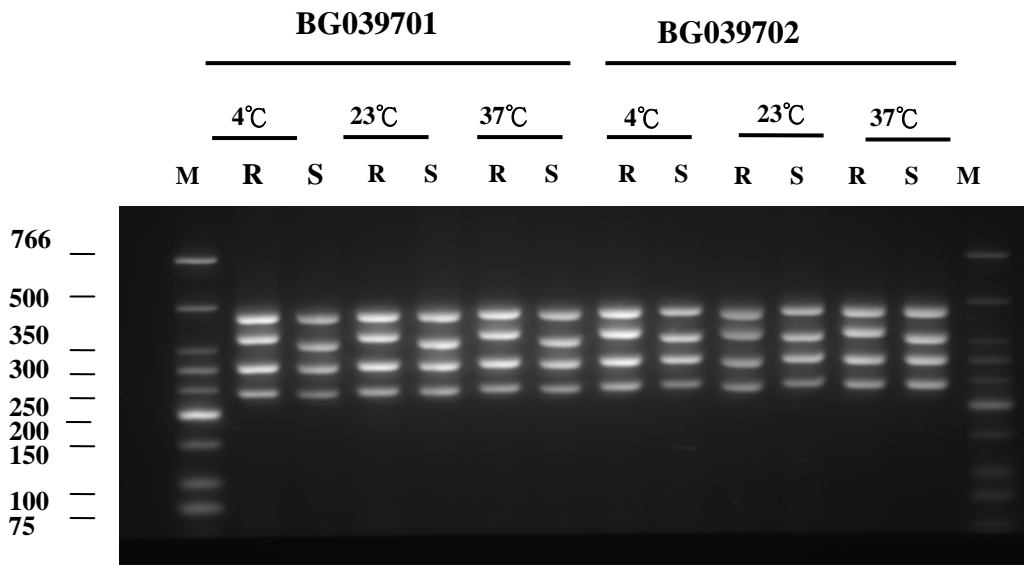


Fig 4 (B). 在室溫及 37°C 各儲存三個月後，發現在這些 RD region 只有 RD16 基因之變異，其它無差異。

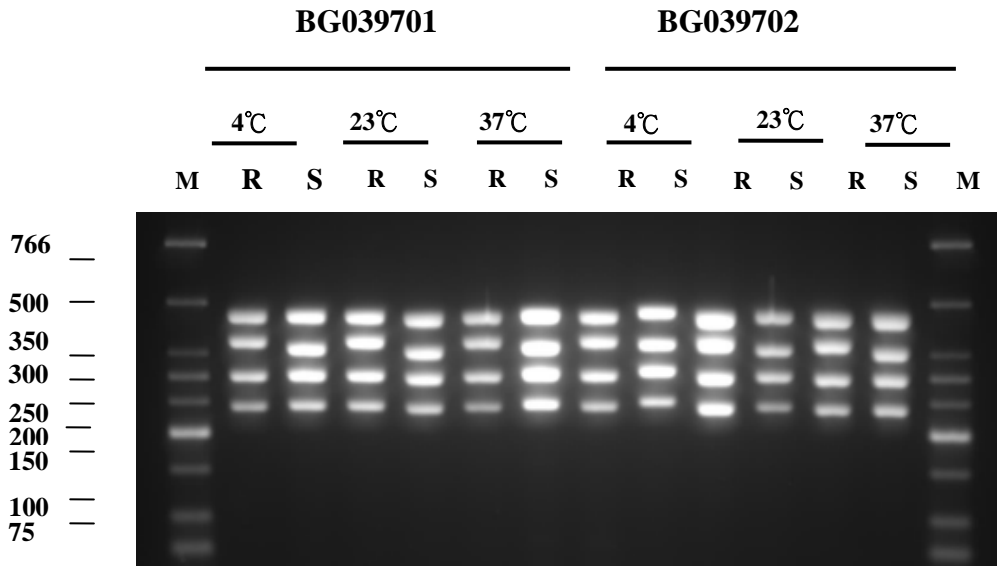
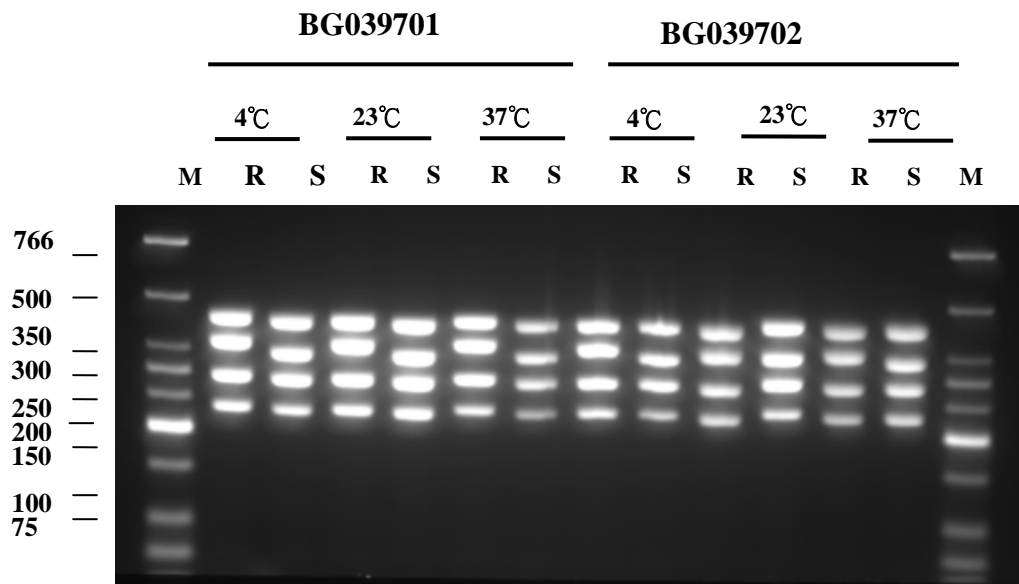


Fig 4 (C). 在室溫及 37°C 各儲存六個月後，發現在這些 RD region 只有 RD16 基因之變異，其它無差異。



## 討 論

目前卡介苗疫苗 (Bacillus Calmette- Guérin ; BCG) 經由品管檢驗相關測試，因其卡介苗活菌數量多寡會影響接種成功與否，其中效價試驗是卡介苗的活菌數量多寡的關鍵指標。依據 2006 年日本 NIID (*National Institute of Infectious Diseases*) 學者 Yamamoto et al 亦發現卡介苗菌落的外觀主要有 2 種型式出現，這和我們的產製卡介苗疫苗的菌落具有一致的相符性。為監控疫苗及接種品質，以及維護良好之疫苗品質，達到最好預防的效果，監控疫苗基因型別的變異與其效價的關聯實為必要

將『凍結乾燥卡介苗』疫苗在室溫及 37°C 各儲存一個月力價的結果，力價有降低在室溫儲存下力價降低約至 70% 左右；在 37°C 儲存下力價降低約至 50% 左右；在室溫及 37°C 各儲存三個月力價的結果，力價在室溫儲存下力價亦降低約至 70% 左右；在 37°C 儲存下力價降低仍約至 50% 左右；在室溫及 37°C 各儲存六個月力價的結果，力價在室溫儲存下力價降低到至 50% 左右；在 37°C 儲存下力價降低至 45% 左右。仍能符合 WHO 在 37°C 溫度下儲存的規格（至少保留 20% 的疫苗力價）。

另將『凍結乾燥卡介苗』疫苗培養在呂顏二氏斜面培養基上，經過 4 週記錄菌數，並計算出平滑型 (smooth form) 及粗糙型 (rough form)



菌落的分佈比率，發現在室溫及 37°C 各儲存一、三及六個月後，發現絕大多數菌落是以平滑型(smooth form)表現出，所佔比率約80%以上，其絕大多數菌落是以平滑型(smooth form)為主。

以自動定序儀系統來定序，並鑑定出其變異序列。並探討DNA sequencing的差異是否會影響『凍結乾燥卡介苗』疫苗的力價。結果平滑型菌落的16 RD基因片段比粗糙型菌落的16 RD短22base pair，其結果符合Honda I等人在2006年所發表的文獻報導。另在室溫及 37°C 各儲存一、三及六個月後，對16RD region 的片段對限制酵素做分析比對，結果粗糙型(rough form)菌落的16 RD內對HpyCH4 III有一個 specific restriction site.然平滑型(smooth form) 菌落的16 RD基因片段卻無此特性，因此再以HpyCH4 III限制酵素對16 RD基因片段做分析。

最後以多重複性聚合連鎖反應(Multiplex PCR)技術檢測其它的基因RD region (RD8, RD14, RD2) 是否也發生變異。結果在室溫及 37°C 各儲存一、三及六個月後，在這些RD region只有RD16 基因之變異，其它無差異。

終論『凍結乾燥卡介苗』疫苗經過六個月長期的儲存下，其力價有明顯的降低至 4 成；然其菌落外觀型別仍決大多為平滑型，仍佔約 8 成以上；另對其基因型別的研究顯示，長期在不同溫度（23

°C 及 37°C) 儲存下皆無任何明顯改變及差異，顯示我們的產製卡介苗疫苗具有一定品質，可達到最好預防的效果，並符合 WHO 的規範。

## 参考文献

1. Phenotypes of BCG-vaccines seed lot strains: results of an international cooperative study. *International Union against Tuberculosis. Tubercle* 1978;59:139e42.
2. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GG, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520-3.
3. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999;17:915e22.
4. Zhang Y, Wallace Jr RJ, Mazurek GH. Genetic differences between BCG substrains. *Tuber Lung Dis* 1995;76:43e50.
5. Brosch R, Gordon SV, Buchrieser C, Pym AS, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast* 2000;17:111-23.
6. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 2001;19:2146-51.
7. Honda I, Seki M, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, et al. Identification of two subpopulations of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine* 2006;24: 4969-74.
8. Yamamoto T, Phalen S, Uchida K, Umemori K, Nojima Y, Horiuchi Y, et al. Protective efficacy of BCG Tokyo 172 in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis [in Japanese]. *Kekkaku* 2000;75:379-88.
9. Milstien JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bull WHO* 1990;68:93e108.
10. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for freeze-dried BCG vaccine. *WHO Technical Rep Ser* 1979;745.
11. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for BCG-vaccine-addendum. *WHO Technical Rep Ser* 1988;771.
12. WHO Expert Committee on Biological Standardization. *WHO Technical Rep Ser*

1987;638.

13. WHO. Report. WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines. Pasteur Institute, Paris, France, 7 June; 2005.
14. Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic I, Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15-16 December 2003. *Vaccine* 2004;22:2675e80.
15. WHO. Report. WHO Consultation on the characterization of BCG vaccines. WHO, Geneva, Switzerland, 8e9 December; 2004.