

計畫編號：DOH98-DC-2017

行政院衛生署疾病管制局九十八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

執行期間：98年1月1日至98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	(7)
結果	(10)
討論	(12)
參考文獻	(15)
圖表	(17)

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。以 6 個 tRNA 相關的多形性標記分析 HIV/MSM 及 HIV 匿篩者族群之痢疾阿米巴，發現 Type I 及 Type III 最多；而 Type I 所造成肝膿瘍及腹瀉的人數最多。與外國籍族群之基因型別做流行病學比較，發現近兩年印尼外勞痢疾阿米巴感染比例最高，具有的型別最多有 7 型，且多與國人感染型別不同。某些國人感染型別較類似日本所報告的型別，如 Type I、Type III 及 Type VIII。新設計的 Promoter-Transposon display 基因型別鑑定法可適當區分痢疾阿米巴的基因型別及具有再現性，其方便性及經濟性都較現有的分型方法高，但應用性仍有許多問題需要克服。並協助東部某精神療養院進行第二次阿米巴痢疾篩檢防治計畫，完成全院 2500 病患篩檢，Ameba ELISA 陽性 17 人(0.7%)及 PCR 陽性 5 人(0.2%)，盛行率較去年降低 10 倍。

關鍵詞：阿米巴痢疾、基因型別、分子流行病學、6 個 tRNA 相關的多形性標記、*locus* 1-2、Promoter-Transposon display 基因型別鑑定法、HIV/MSM、HIV 匿篩者

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. Six tRNA- linked STRs polymorphic markers have been used as genotyping marker to analyses clinical samples. Type I and III are most dominant types in both HIV/MSM and HIV VCT groups, where as Type I caused most ALA and diarrhea cases. To compare to foreigner groups, the Indonesian labor group was most diversion containing 7 types and was different to the types in Taiwanese group. Some Taiwanese types are most similar to the types found in Japan, like Type I, Type III and Type VIII. New designed Promoter-Transposon Display assay was suitable and reproducible for the genotyping of *Endameba histolytic* and was also convenient and cheaper than other pre-exited typing methods. A survey was conducted in a mental institution in east Taiwan to investigate the epidemiology of *E. histolytic* this year. A total of 2500 patients were screened separately. Stool ELISA showed *E. histolytica* infection in 17 cases (0.7%), among them 5 cases (0.2%) was positive for *E. histolytic* by PCR detection. The prevalent rate of *E. histolytic* was reduced 10 times than last year screening.

Keyword: *Endameba*, genotype, molecular epidemiology, *step* and *locus* 1-2, six tuna- linked STRs polymorphic markers, HIV/MSM and HIV VCT groups, Promoter-Transposon display assay

前言

阿米巴痢疾(amoebiasis)為痢疾阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*)藉糞口(fecal-oral)傳染所引起的疾病，主要寄生於腸道，大部分被感染者無症狀，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)體內所帶之蟲株為鏡檢下無法區分的 *E. dispar* 或最近才發現的 *E. moshkovskii*。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一，一般屬世界性分佈，在熱帶及亞熱帶地區發生率較高，嚴重病例及併發症也多發生於此地區，包括墨西哥、中南美洲、西非、南非、南亞及東南亞，但其中 90%的病人通常沒有症狀[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。台灣的高危感染險群主亦包括長期集體療養之精障及智障人士及男同性戀者等。

衛生署預防醫學研究所曾於民國 76-79 年間對全省 12 所精神病療養機構共 4,803 人之阿米巴痢疾進行血清學 (IHA) 檢查，發現平均陽性率近 30%，其中以東部某精神醫院之 45.39% 最高。83 年則再針對該院進行寄生蟲感染率調查，發現痢疾阿米巴鏡檢陽性率為 10.9% [6]，在積極防治後至今(98) 年痢疾阿米巴 PCR 陽性率已降至 0.1%。其他在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% [7-9]。由台大洪建清等人的研究發現男同性戀/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外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。台大洪建清等人已發現男同性戀/HIV 患者為痢疾阿米巴的高危險群[10]，但其流行病學關係還需釐清。因此，本年度計畫擬與其合作針對 HIV 匿名篩檢者(person seeking voluntary counseling and testing; VCT) *E. histolytica* 感染的危險因子進行探討，並利用基因分型評估患者之間的關係及與其他 HIV 患者基因型別的差異。也加上部分外勞及國人的 *E. histolytica* 型別，做初步的流行病學分析。

而以 SINE, LINE-like repeat 等 interspersed repeats [21] 所建立的 Transposon display (TD)基因型別分析方法，則尚未應用於基因分型。本年度計畫亦希望建立此方法，並評估未來應用的可能性。

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), 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 萃取貨保存於-20°C。萃取 DNA 的方法為將檢體以 14000 rpm 離心 5 分

鐘後取其上清液，以 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 分離 DNA。取得 DNA 之後，繼續進行 PCR 反應。

***locus 1-2* 基因型別鑑定**

根據 Zaki 和 Clark 所建立之 *locus 1-2* PCR 引子對，分別為 R1 (5'-CTG GTT AGT ATC TTC GCC TGT -3')/R2 (5'-CTT ACA CCC CCT TCT TCT ATA ATT -3')，PCR 反應為：5 μ l DNA template，0.5 μ M R1/R2，PCR buffer，200 μ M dNTP，2.5 mM MgCl₂，0.05 U/ μ l AmpliTaq[®] DNA polymerase，反應總體積為 50 μ l。反應流程為 96°C 加熱 5 分鐘後，進行 30 個循環反應每個反應為：denature 94°C，1 分鐘；annealing 60°C，1 分鐘；extension 72°C，2 分鐘，最後以 72°C，5 分鐘終止反應。反應完成後以 2% 洋菜瓊脂電泳檢測產物長度，PCR 反應產物經過純化回收後，進行 DNA 核酸序列分析。

***STRs-containing loci* 基因型別鑑定**

所有 STRs-containing loci PCRs 的反應條件皆相同，除了每個的 annealing temperature 不同外。每一個反應含 35 個循環，其中 denaturation 溫度為 94°C 反應 30 秒、而 annealing temperature 則依照不同引子的溫度【如表一】作改變，其反應時間亦為 30 秒、而 extension 溫度為 72°C，反應時間 30 秒，以上為 35 個循環，在 PCR 最後則加入 5 分鐘 72°C 的 final extension，即完成 PCR 反應。反應完成後以 1.5% 洋菜瓊脂電泳檢測產物長

度。利用【如表一】中所有的引子而產生的 PCR 產物，一具個產物之大小不同做出統計分析，進一步訂出型別 [14,22]。

表一

<i>E. histolytica</i> -specific primers		
AL-H5	CATCTCCATTATTATCTAGATATCCT TTATTACT	57
AL-C	GGCACGAATGCTTTGATATATAA	
DA-H5 (Hsp1) ^d	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATA TGTT	50
DA-H3 (Hsp2) ^d	ATTAACAATAAAGAGGGAGGT	
NK2-H5	GAAGCGTCTTTTTACTATTAGTG	59
NK2-H3	GGCGTATTTTTAGAATAGGATAAG	
RR-H5	GCGCCTTTTTATTCAATATACTCC	57
RR-H3	GGATGAAGATATCTTCACAGGG	
S ^{TGA} D-H5	AAATCCTGCCACTGTCGTAA	58
S ^{TGA} D-H3	AATCCCCGTTGAAGAGTTCT	
SQ5	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT	55
SQ-H3	GTGGGACCACCTTTTTATACCTA	

PCR 產物之選殖及定序

為進一步分析 *srehp* 及 *locus1-2* 之基因序列，另採具 3' to 5' exonuclease 校勘活性之 Platinum[®] Pfx DNA polymerase 進行 PCR 反應，條件如下：5 μ L template DNA，0.3 μ M primer mix，1X *Pfx Amplification buffer*，1.0 mM MgSO₄，0.3 mM dNTP mixture 及 1.25 U *Pfx DNA polymerase*，反應最終體積為 50 μ L，在 94 °C 加熱 3 分鐘後，進行 35 個循環反應，每個循環包括：94 °C \times 15 秒，60 °C \times 15 秒，68 °C \times 2 分鐘。

PCR 產物之選殖使用 TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing，將上述 *srehp* 及 *locus1-2* 之增幅產物插入 pCR 4-TOPO 載體中，轉感大腸桿菌，經培養後純化其質體。以限制酵素及洋菜膠電泳確定為 *srehp* 及 *locus1-2* 之增幅產物，再進行單邊 DNA 定序，以 BLAST 程式將部份序列與 GeneBank 資料庫比對後，再進行全長定序。

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

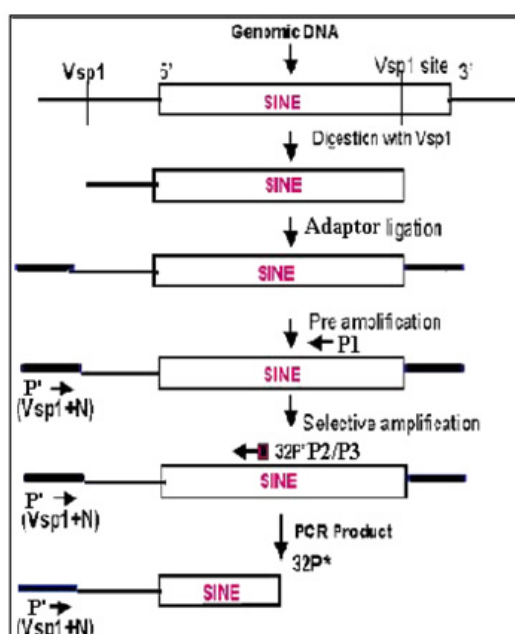
利用 P'引子和 P1 引子作 PCR 反應，反應條件如下：12 pmol 引子、1 倍 PCR Buffer、2.5 mM MgCl₂、1 倍 BSA、0.6 mM dNTP 和 1U *Tag* DNA polymerase。PCR 反應流程為：95°C 作用 5 min；其餘 30 cycles 循環為 95°C 反應 30 秒，45°C 反應 30 秒和 70°C 作用 1 分鐘，最後則單獨以 70 °C 反應 10 分鐘。PCR product 用 TE buffer 20 倍稀釋，以便進一步作選擇性 PCR 反應。

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）。

圖一



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 C 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，方法流程如圖二：

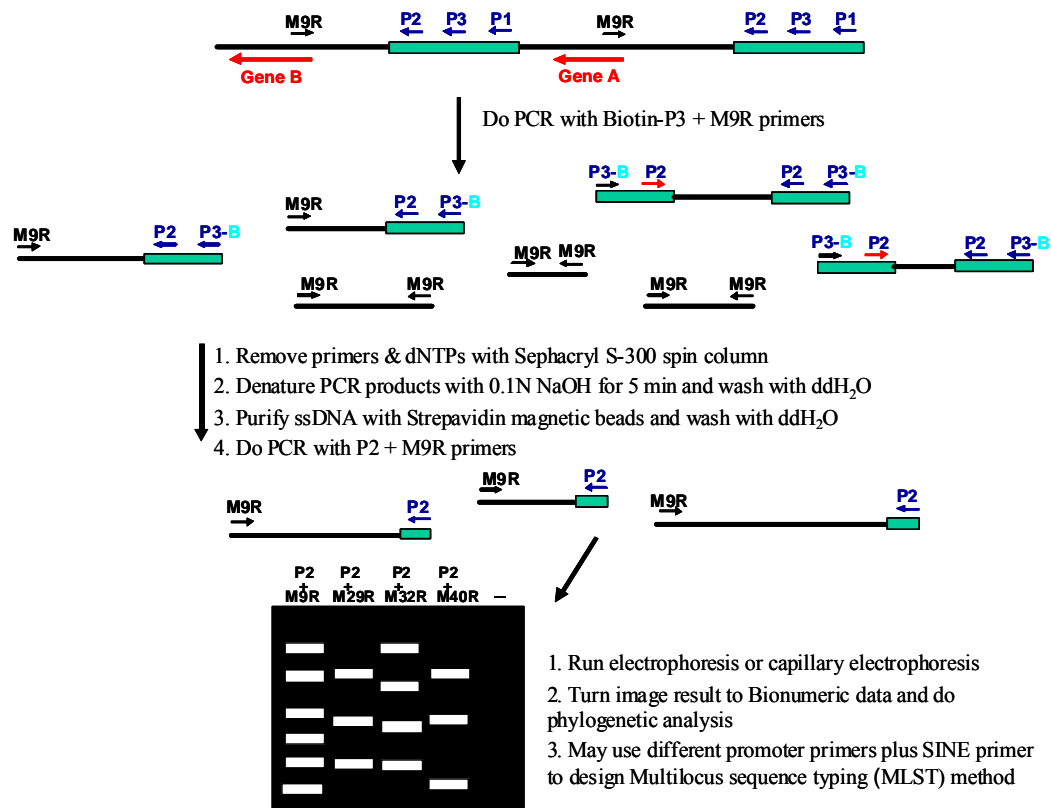
Preselective amplification

利用 biotinated SINE P3 引子和 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。

圖二、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'

Biotin-P3 Biotin-5' TTC AAA AGC ACC GTC ATA ACC A 3'

Promoter reverse primers + 5'Pvu II CAGCTG

M29R CAGCTG(G/T)(A/T)ATCTCTC(C/T)ATT(A/T)C

M32R CAGCTGT(G/C)TT(T/G)TTGTTT(A/T)ATT(G/T)

M40R CAGCTGTTTTT(A/T)AGTTCTTTTT

M9R CAGCTGGATGTTTATAAGTTCA

結果

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

依 Srivastava S 等人所述，建立 TD 基因型別分析方法。將所抽取的 Total genomic DNA 先以 *VspI* 限制酶切割，再以 T4 DNA ligase 後接上 adapters，再進行兩次 PCR 反應。然而，實驗室目前適當場所可以進行放射性物質標記之 PCR 實驗，若只是分析兩次 PCR 後之 PCR 產物，則無法在電泳後的洋菜膠上觀察到明顯的 bands，重覆數次實驗亦然，因此放棄此方法。

進而改進此 TD 基因型別分析方法成為 Promoter-Transposon display (PTD)基因型別分析方法，流程如圖?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 biotin labeled P3 SINE primer 及 M9R (M29R, M32R or M40R) promoter primer 進行 outer PCR，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，如圖三 A。而當我們換用 MLVA genotyping 用的 enzyme 及改進反應條

件後，所呈現的 DNA pattern 就大幅改進了，如圖三 B。我們重複用培養的痢疾阿米巴 DNA 進行幾次 PTD mapping 皆有好的再現性，但尚未進行病患的糞便檢體測試。

HIV 匿名篩檢者痢疾阿米巴的基因型別分析

由台大醫院洪健清醫師所提供 HIV 匿名篩檢者(person seeking voluntary counseling and testing; VCT)痢疾阿米巴感染的分析結果發現其危險因子主要為男同性戀者的年齡及口肛交行為(如表四)。在 4802 個匿名篩檢者中，只有 57 人為痢疾阿米巴血清陽性，其中有十人可得到較完整的 tRNA-linked STRs 基因型別分析資料。由於部分檢體無法將 locus RR PCR 出來進行定序分析，因此先將其移除。本研究先以 5 組 tRNA-linked STRs (locus SD, SQ, AL, NK2 及 DA) (圖四)配合 locus 1-2 進行分析。將本研究所得之定序結果與英國倫敦熱帶醫學院 Dr. Graham Clark 所提供的 tRNA-linked STRs 之 short tandem repeat 序列資料庫進行比對，每一種 locus 皆含有來自世界各國至少五種以上不同的基因型別，如圖四所示。本研究發現 locus SQ 中有新的基因型別不存於 Dr. Clark 所提供的序列資料庫，而與 NCBI 資料庫中日本的兩個型別 EH47 與 EH8 subtypes 一致。locus NK2 亦發現與日本型別一致的 J3NK 與 J4NK subtypes。而在 locus DA 中則發現

台灣特有之新型別 NEW subtype。

將本研究所發現 10 位有痢疾阿米巴感染的 HIV VCT 病患，依 5 組 tRNA-linked STRs (locus SD, SQ, AL, NK2 及 DA) 及 locus 1-2 的序列資料進行分析，可得到 Type I、Type III、Type V 及 Type VII 等四種主要型別，各有 3、3、3 及 1 人，如表五所示。若與 10 位 HIV 病患的主要型別 Type I、Type III、Type IV 及 Type VI 等四種型別，各有 6、1、2 及 1 人相較，Type I 及 Type III 是台灣最多的型別。Type IV 與 Type V 只有在 locus SD 中相差一個 repeat (15SD 及 12SD subtypes) (圖四)，是因為原為同一蟲株後因 insert or delete 一個 repeat 造成變異或是根本為兩種蟲株還需進一步研究。此結果顯示台灣 HIV 病患中的痢疾阿米巴蟲株種類較歐美等國的種類少，而與日本較類似，主要型別為 Type I 及 Type III。

國人以及外籍人士痢疾阿米巴的基因型別分析

本研究也以 3 組 tRNA-linked STRs (locus SD, SQ, 及 DA) 配合 locus 1-2 進行近兩年醫院通報痢疾阿米巴陽性病患的檢體分析，發現國人主要的型別為 Type I、Type III、Type IV、Type X 以及 Type XVI 等五種型別，其中精神養護機構病患主要為 Type I、Type IV、Type X 及 Type XVI，而 Type XVI 為台灣特有之蟲株型別(如表五)。而外籍人士的檢體結果分析發現 Type VIII

來自來台旅遊之日本人，從 Locus SQ 的部份可發現與日本之型別一致；而外勞檢體的分析發現印尼外勞蟲株的主要型別為 Type II、Type IX、Type XI、Type XII、Type XIII、Type XIV 以及 Type XV 等七種型別，其型別多樣性較為豐富且與台灣的流型株有很大的差異；菲律賓外勞的蟲株目前只分析一株，為 Type I 與國人的 Type I 相同，如表五所示。

痢疾阿米巴的基因型別與症狀之分析

在 ALA 病患中主要型別為 Type I 及 Type VI，腹瀉的病患主要型別為 Type I、Type III、Type IV、Type V 以及 Type VII 等五種型別，而無症狀的病患主要型別較廣，包含 Type I、Type II、Type III、Type V、Type IX、Type X、Type XI、Type XII、Type XIII、Type XIV、Type XV 以及 Type XVI 等十二種型別。其中 Type I 在三種症狀皆有發現，而 Type IV 及 Type V 在無症狀以及腹瀉的病患之中皆有發現 (如表五)。若以不同族群分析，發現在 HIV/MSM 族群中，Type VI 只在 ALA 病患中發現，而感染 Type III 的病患皆屬於無症狀，感染 Type IV 以及 Type VII 皆屬於腹瀉症狀的病患。但在近兩年醫院通報國人的部份，感染 Type III 的病患則有腹瀉症狀，與 HIV/MSM 族群相異，但因醫院通報國人的型別資料庫尚未齊全，且數量較少，因此需補強其型別資料庫以釐清更多相關性。在外籍人士部分，在外勞的部份皆屬於無症狀帶原，且型別具有相當的多樣性，特別是印尼外勞的結果與

國人和 HIV/MSM 族群相當迥異(如表五)。

Locus typing 基因親緣演化圖與 tRNA-linked STRs typing 綜合分析

今年共進行 HIV/MSM、國人及外籍人士三個族群之阿米巴痢疾陽性病患檢體總共 38 例基因分型分析，首先使用 *locus 1-2* 為標的進行 PCR 並定序分析。將上述 38 例 *locus 1-2* typing 的定序確定 *locus 1-2* 基因型別，並使用 Mega4 親緣演化軟體分析不同型別 Locus1-2 親緣關係分析並與國外其他基因型別阿米巴做流行病學比較，如圖五所示。本研究將以過去就常使用來區分痢疾阿米巴型別的 *locus 1-2* 作為基準，但在圖中顯示，同一個 *locus 1-2* 基因型亦有其相異之處，例如：在 *locus 1-2* type B 的裡面可發現有 Type IV 以及 Type V 兩種型別存在，其中僅在 *locus SD* 有差異，一個為 15SD subtype，另一個為 12SD subtype。*locus 1-2* type M 及 E subtypes 則可分別存於 3 種及 4 種不同的 Types，每一種 Type 中可能有一種至三種 tRNA-linked STR loci 的差異。此結果顯示在過去只以 *locus1-2* 做為型別分析標準有其缺失存在，因此必須搭配其他 tRNA-linked STR loci 才能得到更完善的型別分析結果。

台灣高危險族群阿米巴檢體的收集

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。而精智障養護機構爆發阿米巴痢疾群聚的件數則每年有所不同，屬於非常態性質，今年度已發生三次養護機構阿米巴痢疾群聚事件。今年並協助東部某精神療養院進行第二次阿米巴痢疾篩檢防治計畫，完成全院 2500 人 IHA 篩檢，共有 837 人 IHA titer >1:32，Ameba ELISA 陽性 17 人(0.7%)及 PCR 陽性 5 人(0.2%)(如表六)，已將其盛行率較去年降低 10 倍，並已將篩檢出之 5 位病患隔離治療，現已完治歸建，並請本局第六分局做後續之處置。

討論

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

TD 基因分型方法失敗，有幾種可能原因：1. Total genomic DNA 以 *VspI* 限制酶切割再接上 adapters 的過成失敗，並為真正接上 adapters，因此無法進行 PCR 反應。2. 本實驗的 PCR 產物較少，若不以放射性物質標記則無法觀察到明顯的 PCR DNA pattern。

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。雖然在我們的設計中 useful biotin labeled P3 primer 及 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，但未執行此步驟而直接進行 inner PCR。因此，在圖 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。

6 組 tRNA-linked STRs 新基因型別分析方法的建立

在目前的結果顯示，此方法與 locus 1-2 分型所遇到之問題相似，有些痢疾阿米巴 18S rDNA PCR 檢驗陽性檢體，無法以 locus 1-2 或 tRNA STR loci PCR 增幅出產物，這可能與原本檢體中所含的蟲數有著相當大的關係。我們已增加其原始 DNA 濃度或改進 PCR 反應條件以提高 PCR 效能，但結果不如預期。未來我將在原本 6 組 tRNA-linked STR locus primers 的外側再設計 outer primers 以進行 nested PCR，如此應可提高 PCR 的效能，增加其敏感度，提高分型的成功率。此方法國外已有學者證實能將大部分陽性檢體成功擴增，如此必能使基因型別資料庫更加完善，能得到更多相關的資訊，以提供防疫需求[14]。

HIV 匿名篩檢者痢疾阿米巴的基因型別分析討論

表五的 HIV 匿名篩檢者(VCT)的型別結果顯示與 HIV/MSM 病患族群中的型別較相近的，且從 locus 1-2 的基因型分析結果得知主要有四種基因型存在，台灣 HIV/MSM 族群中的痢疾阿米巴蟲株種類較歐美國家 HIV/MSM 族群中的種類少，最主要型別為 Type I 及 Type III，此結果與日本的發現相近[27, 28]。所有 locus 1-2 type D 及 G subtypes 的蟲株，在其他 tRNA-linked loci 的分型皆為同一型別無差異，屬 Type I 及 Type III；而有些 locus 1-2 type B subtype 蟲株只有在 locus SD 有一個 repeat 差異存在，為

15SD 及 12SD subtypes 分別存在於 HIV/MSM 族群(Type IV)及 VCT 族群 (Type V) 中，其中 Type IV 亦存在於醫院所通報的國人族群中。由於 VCT 族群中帶有 Type V 痢疾阿米巴蟲的人都有 MSM 行為存在，因此是否 Type V 跟 MSM 行為存在高度相關性，需要進一步收集更多檢體分析探討。

國人及外籍人士痢疾阿米巴的基因型別分析討論

近兩年國人及外籍人士的 Typing 結果顯示(表五)，在國人感染的痢疾阿米巴蟲型別較少，在 Mental Hospital B 的病患中發現台灣特有的種別 Type XVI，此種別在 locus 1-2 屬於 subtype SY2，與 subtype B 較為相近，只相差一個 tandem repeat；其在 locus DA 屬於 NEW subtype，與 subtype 5DA 較為相近，只差一個 tandem repeat 的位置；但在 locus SD 及 locus SQ 的 subtype 相同，如圖四。由於 locus 1-2 subtype SY2 也曾在其他精神養護機構發現，因此需追蹤此台灣特有的種別 Type XVI 是否真的在台灣的精神養護機構中流行，且多為無症狀帶原。從整體來看，Type IV 與 Type XVI 的親緣關係較為相近，且從 Mental Hospital B 過去的資料顯示，這兩個 Types 在此教養機構的流行互相有消長，但一直都是此教養機構主要的流行型別。因此，Type IV 與 Type XVI 兩種型別是否有其互相交流以及基因重組等問題存在，是值得去探討的。

由近兩年外籍人士的分型資料分析，印尼外勞的痢疾阿米巴蟲有

較多不同的基因型別，去年的研究結果也顯示印尼外勞較其他國家的外勞有較高的感染率，這個結果顯示印尼應是痢疾阿米巴較為盛行的國家，具有較高的型別多樣性，與其他例如巴西及墨西哥等國家的研究相似。而菲律賓外勞及日本人由於成功 Typing 的檢體數量較少故尚無法顯示有何關係，但已發現的型別與台灣相近。但由近兩年印尼外勞與國人的型別比較，兩個組群間之差異極大，應並未發生外勞痢疾阿米巴蟲型別傳入國人的問題，但是否與台灣地區有交流現象還需進一步研究。因此，痢疾阿米巴的型別種類應與地理區域有著相當的相關性，也可能與國家的衛生環境有著明顯的關係存在，這都是值得探討的地方，但需更多的資料來輔佐，以得到更加的科學驗證。

痢疾阿米巴的基因型別與症狀相關性討論

痢疾阿米巴蟲 Type I 在雖在 ALA、腹瀉以及無症狀病患都有感染，但 ALA、腹瀉病患的比例極高；而無症狀的病患，其主要是因為健康篩檢及 HIV VCT 篩檢所知，是否因其屬於比較前期的感染，尚未發展成腹瀉及 ALA 症狀需再加研究。因此，Type I 是否真的具有較強的毒力，還須以細胞感染試驗或者更多的病例結果統計才能驗證，本研究結果只顯示此一型別有較高的感染力。其他型別則因病例數太少，因此能需提高並患各 tRNA-linked locus PCR 的成功率，得到更多的分型結果，以利分析其間之

相關性。外勞的痢疾阿米巴感染，幾乎都是無症狀帶原，且型別與台灣較為迥異而多樣性，或許在痢疾阿米巴盛行地區，其不同型別之阿米巴互相交流機會較大，是否有毒力減弱現象存在，這是相當重要且可以探討的問題，且可以探討是否阿米巴之間會有交流的現象產生。

阿米巴痢疾高危險族群的檢體收集及病例統計

今年已協助東部某精神療養院進行第二次阿米巴痢疾篩檢防治計畫，完成全院 2500 病患篩檢，Ameba ELISA 陽性 17 人(0.7%)及 PCR 陽性 5 人(0.2%)(如表六)，盛行率較去年降低 10 倍。這可能是因為去年第一次篩檢時已將大部份的陽性病患檢出並加以隔離治療，同時因帶原者人數下降也使傳播數率減慢不易傳播。雖然此精神療養院盛行率已降至 0.2%，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。

結論與建議

1. 新設計的 Promoter-Transposon display 基因型別鑑定法可適當區分痢疾阿米巴的基因型別及具有再現性，其方便性及經濟性都較現有的分型方法高，但應用性仍有許多問題需要克服。

2. 痢疾阿米巴在不同族群確實有許多不同型別存在，且與病人之生活環境與區域有其重要相關性存在，尤其印尼外勞可發現型別具有基因多樣性，與盛行區所發現結果相近，顯示近兩年印尼外勞身上帶有之痢疾阿米巴應源自原屬國家，並非於台灣所感染，且目前是否與台灣地區有交流現象還需進一步研究。

部分國家外勞的檢出率偏高，可能是其輸出前檢驗未落實或治療未完全，所以到台灣複檢後才被驗出來，因此建議輸出國應強化輸出前檢驗，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。

了解痢疾阿米巴基因型別與症狀及危險族群間的相關性，應可協助後續的流病調查與防治。

計畫重要研究成果及具體建議

不同的危險族群確實有許多不同型別的痢疾阿米巴存在，且與病人之生活環境與區域有其重要相關性存在，尤其印尼外勞可發現型別具有基因多樣性，與盛行區所發現結果相近，顯示印尼外勞身上帶有之痢疾阿米巴應源自原屬國家，並非於台灣所感染，，且目前是否與台灣地區有交流現象還需進一步研究。新設計的 Promoter-Transposon display 基因型別鑑定法可適當區分痢疾阿米巴的基因型別及具有再現性，其方便性及經濟性都較現有的分型方法高，但應用性仍有許多問題需要克服。

部分國家外勞的檢出率偏高，可能是其輸出前檢驗未落實或治療未完全，所以到台灣複檢後才被驗出來，因此建議輸出國應強化輸出前檢驗，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1、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, Ehrenkauf GM, Singh U. Identification of putative transcriptional regulatory networks in *Entamoeba histolytica* using Bayesian inference. *Nucleic Acids Res*. (2007). 35(7):2141-2152.23. 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.
 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 Thammalerd, and T Nozaki. Geographic Diversity among Genotypes of *Entamoeba histolytica* Field Isolates. *J Clin Microbiol*. 2003. 41: 3748–3756

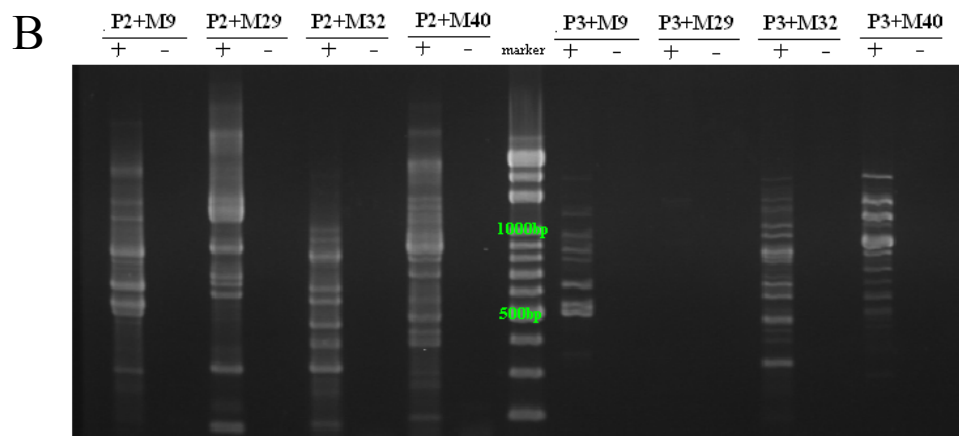
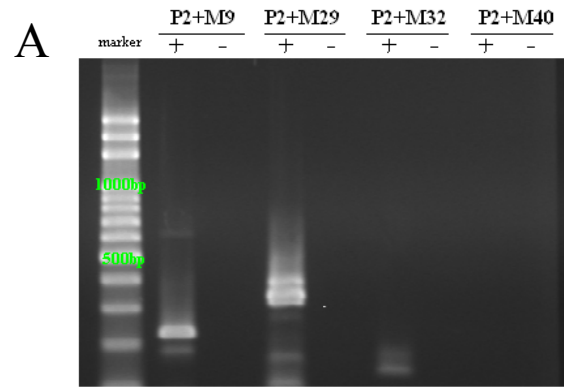


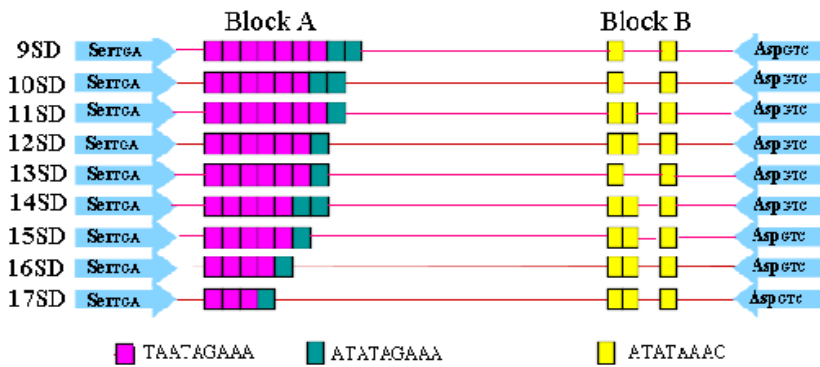
Figure 3. The results of Promoter-Transposon display assay.

Table 4. Characteristics of 57 case subjects with amoebiasis by serologies and 228 controls without amoebiasis.

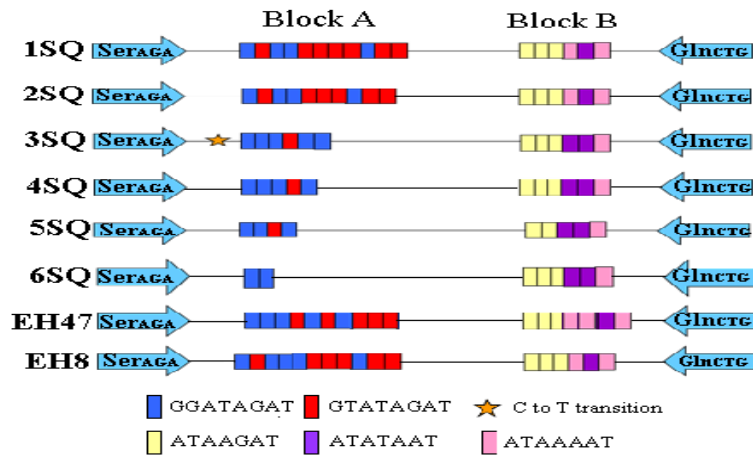
Variable	Case (n=57)	Control (N=228)	Statistics P=
Age, mean (range), yr	34.5 (21-55)	30.5 (19-65)	0.001
Male sex, N (%)	55 (96.5)	199 (87.3)	0.05
Men who have sex with men	51 (89.5)	116 (50.9)	<0.0001
Married	6 (10.5)	34 (14.9)	0.06
Education achievement \geq bachelor degree	31 (54.4)	162 (71.1)	0.01
Sexual partner >1	51 (89.5)	207 (90.8)	0.8
Use of illicit drug	6 (10.5)	16 (7.0)	0.4
Previous history of STD,	7 (12.3)	22 (9.6)	0.62
Oral-anal sex	29 (50.9)	36 (15.8)	<0.0001
Oral-genital sex	48 (84.2)	157 (68.9)	0.02
Receptive or insertive anal sex	41 (71.9)	82 (36.0)	<0.0001
VDRL \geq 4	5 (8.8)	6 (2.6)	0.04
HIV infection by ELISA	10 (17.5)	8 (3.5)	<0.0001
Use of condom in oral sex on \geq 75% of the occasions	1 (1.8)	23 (10.1)	0.01
Use of condom in anal sex on \geq 75% of the occasions	22 (38.6)	42 (18.4)	0.5

由台大醫院洪健清醫師所提供

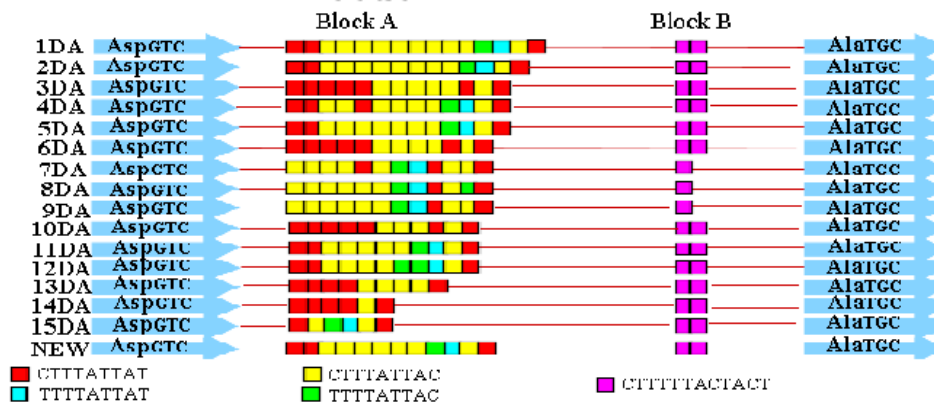
Locus SD



Locus SQ



Locus DA



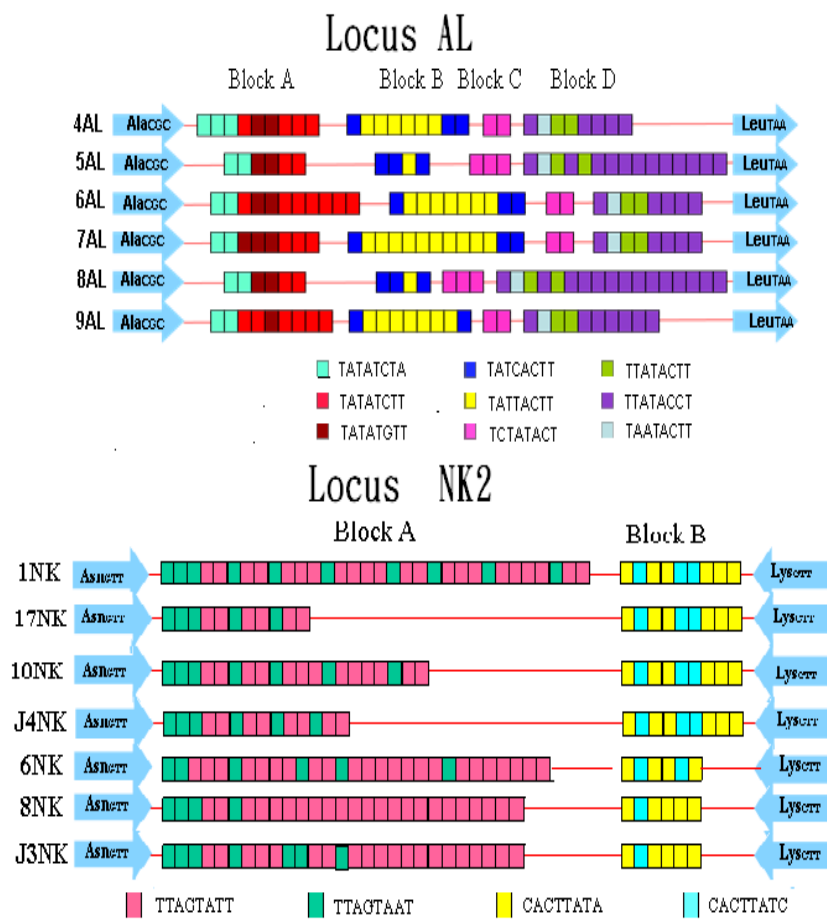


Figure 4. The subtypes of 6 tRNA-linked STR loci. Provided by Dr. G. Clark with some modification.

Table 5. Analyses of genotypes of 6 tRNA-linked STR loci among different risk groups.

Type	Symptoms	Group	Genotypes						Case number
			Locus 1-2	S-D	S-Q	D-A	A-L	N-K2	
I	ALA	HIV	D	15SD	4SQ	6DA	8AL	J4NK	4
VI	ALA	HIV	E	12SD	EH47	15DA	7AL	10NK	1
VII	Diarrhea	VCT	E	12SD	EH47	15DA	4AL	J3NK	1
I	Diarrhea	HIV ; VCT	D	15SD	4SQ	6DA	8AL	J4NK	2 ; 1
IV	Diarrhea	HIV	B	15SD	4SQ	5DA	4AL	1NK	2
V	Diarrhea	VCT	B	12SD	4SQ	5DA	4AL	1NK	1
V	Asymptomatic	VCT	B	12SD	4SQ	5DA	4AL	1NK	2
I	Asymptomatic	VCT	D	15SD	4SQ	6DA	8AL	J4NK	2
III	Asymptomatic	HIV ; VCT	G	11SD	EH47	8DA	7AL	10NK	1 ; 3
I	Diarrhea	Taiwanese	D	15SD	4SQ	6DA	NA	NA	1
III	Diarrhea	Taiwanese	G	11SD	EH47	8DA	NA	NA	1
X	Asymptomatic	Mental Hospital A	F	15SD	4SQ	13DA	NA	NA	1
IV	Asymptomatic	Mental Hospital B	B	15SD	4SQ	5DA	NA	NA	2
XVI	Asymptomatic	Mental Hospital B	SY2	15SD	4SQ	NEW	NA	NA	2
I	Asymptomatic	Mental Hospital B	D	15SD	4SQ	6DA	NA	NA	1
VIII	Diarrhea	Japanese	E	9SD	EH8	15DA	NA	NA	1
II	Asymptomatic	Indonesian	D	15SD	6SQ	NA	NA	NA	1
I	Asymptomatic	Filipino	D	15SD	4SQ	6DA	NA	NA	1
XIII	Asymptomatic	Indonesian	M	12SD	4SQ	9DA	NA	NA	2
XIV	Asymptomatic	Indonesian	M	16SD	6SQ	15DA	NA	NA	1
XV	Asymptomatic	Indonesian	M	16SD	2SQ	9DA	NA	NA	1
IX	Asymptomatic	Indonesian	E	16SD	2SQ	15DA	NA	NA	1
XI	Asymptomatic	Indonesian	C	12SD	4SQ	9DA	NA	NA	1
XII	Asymptomatic	Indonesian	C	12SD	2SQ	3DA	NA	NA	1

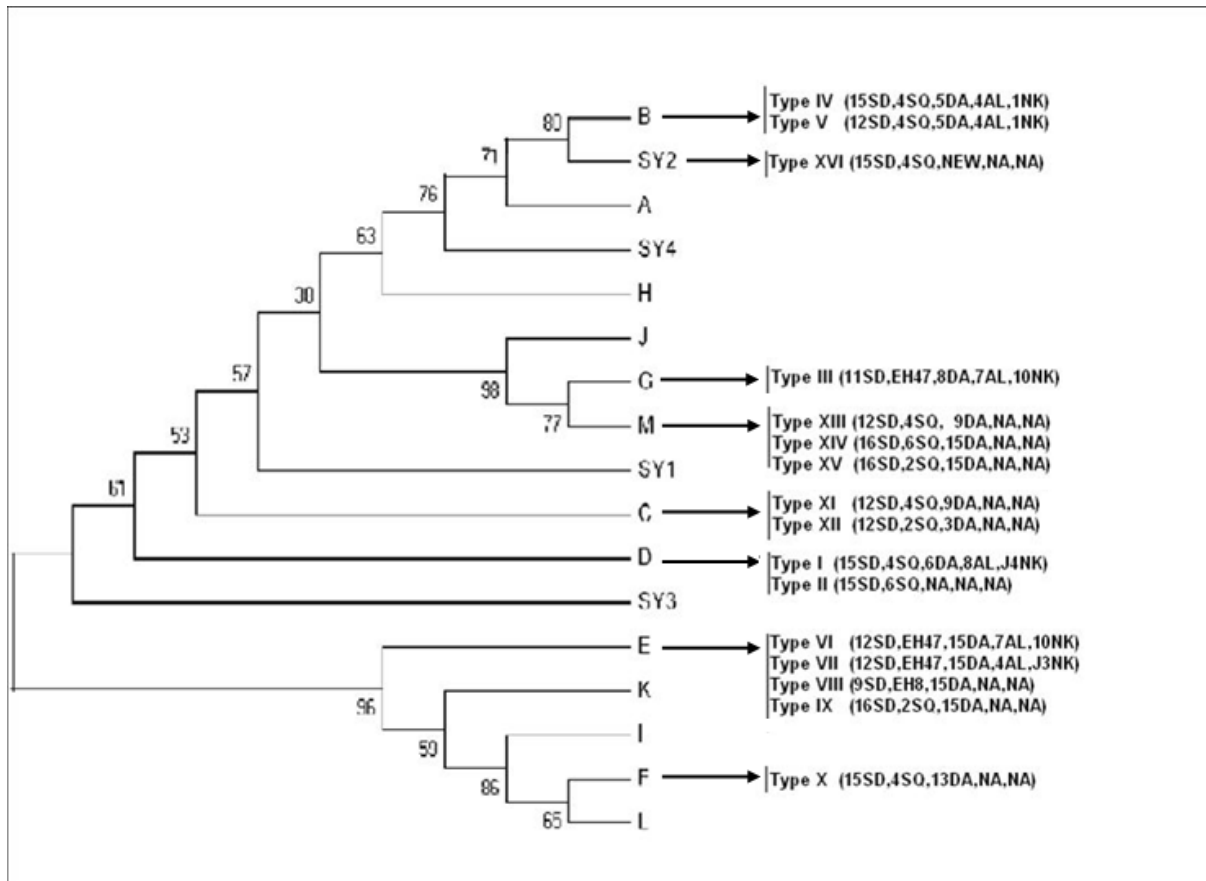


Figure 5. Comparison of locus 1-2 typing to 6 tRNA-linked STR locus typing.

Table 6. Comparison of the amebiasis screening results by different methods.

Year	Case No.	IHA \geq 32	ELISA (+) (%)	PCR result		
				<i>E. histolytica</i> (%)	<i>E. dispar</i>	<i>E.h/E.d Mix</i>
2003	1976	-	80 (4.0%)	41 (2.1%)	3	2
2004	983	-	34 (3.5%)	28 (2.8%)	0	0
2005	2627	-	44 (1.7%)	32 (1.2%)	2	1
2008	2432	826	61 (2.4%)	59 (2.4%)	6	0
2009	2500	837	17 (0.7%)	5 (0.2%)	1	0