

計畫編號：DOH92-DC-1053

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

建立一分枝桿菌菌株基因與流行病學資料庫以追蹤抗藥性菌株之流行情形

研究報告

執行機構：國立成功大學

計畫主持人：顏經洲

研究人員：周如文、蘇益仁、柯文謙

執行期間：92年1月1日至92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
(1) 摘要	2 - 7
中文摘要	2 - 4
英文摘要	5 - 7
(2) 本文	8 - 22
前言	8 - 11
材料與方法	12 - 16
結果	17 - 18
討論	19 - 21
結論與建議	22
(3) 參考文獻	23 - 25
(4) 圖	26 - 28
圖一	26
圖二	27
圖三	28
(5) 表	29 - 34
表一	29
表二	30 - 31
表三	32
表四	32
表五	33
表六	34
(6) 附錄	35

摘要

中文摘要

研究目的

肺結核分枝桿菌感染仍是台灣地區公共衛生上的重大課題，而抗藥性結核菌的出現是另一潛在的危機。要降低結核病之發生率所必須採取的措施之一，是做好菌株分型的工作，完整的分枝桿菌菌株分型工作必須能夠合併數種不同的分型技術結果，方能達到精確地將菌株分型之目的。目前常用的結核菌分型技術包括限制酵素切割片段多型性分型法，Spoligotyping 與 Variable-Number Tandem Repeat typing (VNTR)。VNTR 的基本原理乃根據結核菌染色體上一些具不同長短多形性之 tandem repeat 基因位點，不同菌株可能具有不同數目之 repeats。本計畫之目的，主要是要發展 VNTR 技術，同時，也藉此探討南臺灣分枝桿菌之抗藥性盛行率及抗藥菌株之基因型，以作為疾病管制局結核分枝桿菌實驗室建立之基因資料庫之基本資料。

研究方法

本計畫研究菌株包括 2002 年一月至 2003 年一月分離自成大醫院之菌株 151 株以及疾病管制局提供之其他地區醫院中心菌株 150 株。藥物敏感性試驗則使用比例法，測試之藥物為第一線抗結核用藥，包括 isoniazid、

streptomycin、 rifampin 與 ethambutol。VNTR 方面，本計畫將選用五個基因位點，ETR-A、ETR-B、ETR-C、ETR-D 與 ETR-E。利用聚合酶連鎖反應(PCR)分別將此五基因位點基因放大，電泳分析 PCR 產物大小以估計 repeat 之數目，並依照 repeat 數目，分別給予各基因位點一數字代碼，如取五個基因位點分析，每一菌株即可得到一五數字構成之分型代號，不同菌株之分型代號不同。

主要發現

利用 VNTR，在 299 株結核分枝桿菌研究菌株中，總共分出 62 型。各區域常出現的 VNTR 型有明顯差異 (圖二)，北台灣以 42435 一型最多，佔 46.0%；中台灣以 31433 一型最多，佔 36.0%，其次則為 46464 一型，佔 14.0%；南台灣以 46464、31433 與 42435 三型最多，分別佔 24.5、17.2 與 16.6%；東台灣以 31433 與 32433 兩型最多，分別佔 25.0 與 14.6%。我們對分離自成大醫院的結核菌株進行藥物敏感性試驗。在 151 菌株中，有 32 (21.2%) 菌株對任一藥物有抗藥性，其中，有 8 (5.3%) 菌株為多重抗藥菌株。相較於台灣區域醫院的數據，成大醫院多重抗藥菌株比率高於區域醫院。進一步分析成大醫院結核菌抗藥菌株抗藥表現型與 VNTR 分型關係的分析中，並未發現有特定 VNTR 分型的抗藥菌株盛行，而來自台灣區域醫院的多重抗藥性菌株資料亦有類似情況。

結論及建議事項

本研究計畫的結論及建議事項如下：(1) VNTR 為一簡單快速的肺結核分枝桿菌菌株分型之技術，可作為篩選工具或標準的限制酵素片段多型性分型法之輔助技術；(2) VNTR 技術未來改進的方向，應朝向自動化進行；(3) 臺灣結核桿菌之流行菌株，可能存在著區域性的差異，有待進一步公共衛生與流行病學的研究，將可有助於了解臺灣結核桿菌散佈的方式及結核病的防治；(4) 成大醫院的多重抗藥菌株比率高於台灣區域醫院的比率。因此，日後欲真正瞭解台灣結核菌的抗藥情形，應包含區域醫院與醫學中心的菌株，方可得到正確的數據；(5) 台灣的抗藥菌株可能主要不是因為同一菌株的擴散流行所致，而是由於不同菌株各自發展出抗藥性。至於是否多重抗藥性菌株的散佈在台灣有區域性的差異，須靠進一步研究探討。

關鍵詞：肺結核分枝桿菌；限制酵素切割片段多型性分型法；

Variable-Number Tandem Repeat typing

英文摘要

Purpose

In Taiwan, tuberculosis remains an important threat to public health, and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* is an emerging problem. One of the most important measures to control the prevalence of tuberculosis is strain typing of *M. tuberculosis*. The data of strain typing is helpful in surveillance of the disease and providing knowledge of transmission of the organism in the community. Several techniques are now rather commonly used for typing of *M. tuberculosis*, including IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, the standard method for genotyping of *M. tuberculosis*, spoligotyping, and variable-number tandem repeats (VNTR). The VNTR method is based on the fact that there are variable numbers of tandem repeats among different strains of *M. tuberculosis*. The purposes of the present project are to develop the VNTR method and to investigate susceptibilities to the first-line antituberculosis drugs in *M. tuberculosis* isolates in southern Taiwan and the genotypes of the drug-resistant isolates.

Materials and Methods

Test organisms included 151 *M. tuberculosis* isolates collected between January 2002 and January 2003 at the Department of Pathology, National Cheng Kung University Hospital, and 150 isolates provided by the Center for Disease Control, Taiwan and originally from four other medical centers in Taiwan. Five targets were selected for VNTR analysis. They were ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, and ETR-E. Polymerase chain reaction assays were performed to amplify these genes, followed by agarose gel electrophoresis to

estimate the sizes of amplicons and the numbers of tandem repeats. For each target, a number was given according to the number of tandem repeats, and a VNTR type with a five-digital number, which is derived from five numbers of tandem repeats of five targets, is given for each isolate. Susceptibility tests were performed with the proportion method. Test drugs included isoniazid, streptomycin, ethambutol, and rifampin.

Results

Among 299 isolates of *M. tuberculosis*, 62 types were obtained by VNTR. The most common VNTR types in *M. tuberculosis* isolates varied among different regions in Taiwan. VNTR type 42435 was most common (46.0%) among the isolates from northern Taiwan. The most common types among the isolates from central Taiwan were 31433 (36.0%) and 46464(14.0%). The most common types among the isolates from southern Taiwan were 46464, 31433 and 42435 types, with a prevalence rate of 24.5, 17.2, and 16.6%. The most common types among the isolates from eastern Taiwan were 31433 (25.0%) and 32433 (14.6%). *M. tuberculosis* isolates from the National Cheng University Hospital were further subjected to susceptibility tests. Among the 151 isolates, 32 (21.2%) isolates were resistant to at least one of the first-line antituberculosis drugs, and eight isolates (5.3%) were multidrug-resistant. The prevalent rate of multidrug resistance is higher in the isolates from the National Cheng Kung University Hospital than in those from district hospitals in Taiwan. No prevalent VNTR types were found among drug-resistant *M. tuberculosis* isolates from the National Cheng Kung University Hospital.

Conclusions and Suggestions

The present study indicates that VNTR typing is a simple and rapid

method for typing *M. tuberculosis* strains. It should be an acceptable auxiliary method to the standard IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis. An automatic typing method based on VNTR should be developed in the future to improve the technique. The variation of genotypes among isolates from different regions needs further investigation to understand the transmission of tuberculosis in Taiwan. The variation of susceptibilities to antituberculosis drugs between isolates from medical centers and district hospitals also need further investigation. The variation of genotypes of drug-resistant isolates suggests that the prevalence drug resistance in *M. tuberculosis* was due to the development of drug resistance among different strains rather than due to the spread of a resistant clone.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* ; restriction-fragment length polymorphism ; Variable-Number Tandem Repeat

前言

肺結核分枝桿菌的感染一直是台灣地區公共衛生上的重大課題 [1]。經數十多年的努力，肺結核病的發生率，在 20 歲以上的人口，已從民國 46 年的 5.15%，降至民國八十二年之 0.65%；而結核菌造成的死亡率已由民國三十六年時的每十萬人口 294 人，降至民國八十九年的每十萬人口 6.91 人。然而，這些數據仍遠高於歐美國家及日本，顯示臺灣仍須持續加強結核病的防疫工作。

抗藥性結核菌的出現是另一潛在的危機 [2]。對抗結核藥物產生抗藥性的結核菌株的產生，使得肺結核的治療充滿許多困難，特別是對目前最有效的兩種抗結核藥物 Isoniazid 及 Rifampin 以及同時具抗藥性的多重抗藥菌的產生。而結核菌對抗結核藥物產生抗藥性的主要原因，是由於染色體上的一些抗藥基因產生突變所致，特別是在接受不適當或不完全的藥物治療之病患身上，容易有突變菌株的出現。預防抗藥菌株之進一步散佈，亦是公共衛生上之一重大課題。

要降低結核病之發生率，除了必須要能監督患者接受抗結核藥物治療完整的療程，以預防其復發，並傳染給他人，另外，亦必須要能做好菌株

分型的工作，藉此了解其散佈情形與如何散佈，以便採取適當措施，預防其進一步擴散。要能夠達到快速追查到感染新結核病患者菌株來源之目的，必須有一套結核菌之基因與流行病學資料庫，透過比對及搜尋的方式，從資料庫中找出與過去菌株之關聯性。

目前，菌株分型的技術，主要有下列幾種：

(一) 標準分型技術 (限制酵素片段多形性分型法) [3-5]：

結核菌染色體上有多套 insertion sequence, IS6110, 在不同菌株的染色體上插在不同位置。IS6110 基因內有一 *PvuII* 限制酵素可切割的位置，因此，用 *PvuII* 切割結核菌染色體，將切割後 DNA 移轉至雜交膜，然後取至 IS6110 基因橫跨 *PvuII* 兩端之 probe 進行雜交，便可得到不同長度之許多片段。由於不同菌株被切割後含 IS6110 片段長短不一，分析這些片段，便可將不同菌株加以分型。此方法敏感度高，為現今結核菌之標準分型方法。這項技術的缺點，是需要較大量的結核菌 DNA，操作者比較容易有遭到感染的危險；對於 IS6110 套數少的菌株，分型效果較差；處理的步驟繁瑣；所需的時間較長；需要有足夠 ladder 來進行定位；需要相當熟練的技術方能得到一致性的結果，特別是不同實驗室的結果要進行比較或不同時期的菌株要進行比對時，否則，便必須把欲比較之菌株放在一起，同時分析。因此，此方法並不適合一般實驗室操作。

(二) Spoligotyping [6-8] :

結核菌染色體上有一直接重覆序列之區域[direct repeat (DR) region]，在此基因位點內，有一連串 36-bp 大小之 DR elements，分別插在一些具有獨特序列約 35 至 41-bp 大小之 spacer sequences 之間。利用聚合酶連鎖反應法 (PCR) 將 DR region 放大，然後將其與含有各種 spacer sequences 的雜交膜進行雜交，不同菌株會有不同數目之 spacer sequences，因而產生不同的雜交訊息型態 (patterns)。一般而言，此方法雖比限制酵素片段多形性分型法敏感度差 [9]，然對於 IS6110 套數少的菌株，分型效果較佳；另外，採用 PCR 的技術為其優點，不需要太大量的細菌且速度較快；可以建立資料庫，易於不同實驗室之結果比較，亦為其優點。本技術之缺點，除了敏感度較標準方法差外，特定雜交膜的來源為一大問題，因而一般實驗室無法操作；每一菌株之 PCR 反應須確定完全，否則會產生錯誤或不易判讀之訊息。此技術一般建議與限制酵素片段多形性分型法合併使用。

(三) Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) 分型法 [10-15] :

這是最近新發展出來的技術，其原理乃根據結核菌染色體上一些具不同長短多形性之 tandem repeat 基因位點，不同菌株可能具有不同數目之 repeats，利用 PCR 法，將不同 tandem repeat 基因位點放大，依照估計出來 repeat 之數目，分別給予各基因位點一數字代碼，如取五個基因位點分析，

每一菌株即可得到一五數字構成之分型代號，不同菌株之分型代號不同，然菌株間關係愈近者，五數字中具相同數字者愈多，反之，則五數字中具相同數字者愈少。此法亦較限制酵素片段多形性分型法簡易、快速，方便作為不同實驗室比較用，且對於低套數 IS6110 之菌株，分辨能力較佳；然敏感度仍遠不及標準方法。目前建議可作為一篩選方法，相同者方進行標準方法作進一步分型，或作為標準方法之輔助技術，用於將低套數 IS6110 之菌株分型。

另外，尚有一些以 PCR 方法作為基礎的方法 [16, 17]，類似 arbitrarily primed PCR，分析不同長短之被放大 PCR 片段，較之限制酵素片段多形性分型法，其優缺點都類似 spoligotyping 及 VNTR 分型法，分辨菌株能力皆不及標準方法。

完整的分枝桿菌菌株分型工作必須能夠合併數種不同的分型技術結果，方能達到精確地將菌株分型之目的。目前，疾病管制局結核分枝桿菌實驗室已著手進行限制酵素片段多形性分型與 spoligotyping 方法的建立與基因資料庫之設立。本計畫之目的，乃發展 VNTR 之技術，以輔助上述兩種方法，並作為基因資料庫之基本資料。同時，也藉此瞭解南臺灣分枝桿菌之抗藥性盛行率及抗藥菌株之基因型。

材料與方法

(一) 研究菌株

本計畫肺結核分枝桿菌之研究菌株來源有二：

- (1) 2002 年一月至 2003 年一月分離自成大醫院之菌株 (151 株)。
- (2) 疾病管制局提供之其他醫院菌株，北部為台大醫院 (50 株)，中部為彰化基督教醫院與台中榮民總醫院 (共 50 株)，以及東部的慈濟醫院 (50 株)。

(二) 微生物學技術

- (1) 分離分枝桿菌：成大醫院之菌株乃利用 MGIT 液體培養基系統進行分枝桿菌分離，若有分枝桿菌分離出來，將之次培養於 Lowenstein-Jensen 固體培養基。
- (2) 傳統鑑定法鑑定菌種：待固體培養基培養出分枝桿菌後，利用傳統生化反應法區別結核菌與非結核性分枝桿菌。
- (3) 藥物敏感性試驗[18, 19]：參照疾病管制局編印之結核菌檢驗手冊，進行傳統結核菌藥物敏感性試驗。本計劃使用之藥物敏感性試驗方法為比例法，測試之藥物為第一線抗結核用藥，包括 isoniazid、streptomycin、rifampin 與 ethambutol。使用之培養基為 Middlebrook 7H10。藥物的濃度為：isoniazid (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)； streptomycin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)；

rifampin (1 µg/mL) ; ethambutol (5 µg/mL 與 10 µg/mL)。

(三) VNTR 分型技術

在 2001 年之前的文獻報告中，有五個基因位點被使用[10-14]，分別是 ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D 與 ETR-E。由於這五個基因位點的分型結果不及限制酵素片段多形性分型法及 spoligotyping[10-14]，因此，在 2002 年的文獻報告中，有另外八個基因位點被使用，分別為 0960c、2531c、QUB 3232、QUB 1451、QUB 1895、QUB 4156c、QUB 3336 與 QUB 1281c。此文獻報告指出，使用 1895、3232、3336、ETR-A 與 ETR-B 五個基因位點的分型結果最佳。因此，本計畫將選用這五個基因位點。使用之引子，乃根據文獻報告使用過之引子序列設計。

基本試劑與儀器

1. 引子, working concentration (10 µM), 序列如下：

ETR-A: 5'-AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT-3';

5'-CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT-3'

ETR-B: 5'-GCGAACACCAGGACAGCATCATG-3';

5'-GGCATGCCGGTGATCGAGTGG-3'

ETR-C: 5'-GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG-3';

5'-GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG-3'

ETR-D: 5'-CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC-3';

5'-GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC-3'

ETR-E: 5'-CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC-3';

5'-CGGAACGCTGGTCACCACCTAAG-3'

2. dNTP, 2.5 mM
3. Taq Polymerase (Perkin-Elmer Corp.)及 10X buffer (with MgCl₂)
4. sterilized deionized H₂O
5. 含 ethidium bromide (1 µg/ml) 之 2% agarose gels
6. 1X TAE buffer
7. ATCC 標準菌株 H37Rv
8. PCR 反應機器：Perkin-Elmer 480 機型
9. mini-gel electrophoresis system
10. midi-gel electrophoresis system

步驟

(1) 菌株 DNA 之抽取

(A) 分離菌株

1. 從 7H11 之 agar 上取一 loop 的菌量,置於已事先加入 100 µl H₂O 的 1.5 ml eppendorf 管中;或從 MGIT 培養管中抽取 500 µl 培養液,置於 1.5 ml eppendorf 管中,在 microcentrifuge 中離心 10 分鐘,去上清液後,加入 100 µl H₂O。
2. Vortex 使菌液均勻後,置其於乾式加熱板上,100 °C 加熱 30 分鐘。
3. 在 microcentrifuge 中離心 20 分鐘,取上清液至另一乾淨 1.5 ml eppendorf

管。

(B) 疾管局菌株 DNA

疾管局提供之菌株 DNA 濃度為 26.5 – 6931 $\mu\text{g/ml}$ 。可再稀釋 1000 倍使用。

(2) PCR mixture 配製

每一 PCR 管最終體積為 50 μl ，可事先配製 PCR mixture，使每一 PCR 管包括 5 μl 10X PCR buffer、各引子 1 μl 、2 μl dNTP、0.25 μl polymerase 及 38.75 μl H_2O 。PCR 前，加入 2 μl 菌株 DNA，每管並滴入 50 μl 礦物油，spin down。

(3) PCR 反應條件及預期結果 (表一)

本研究使用之 PCR 反應機型為 Perkin-Elmer 480 機型。PCR 反應後，取 10 μl PCR 產物，負載於 25 x 30 cm 2% 含 ethidium bromide (1 $\mu\text{g/ml}$) agarose gel 上，以 100 V 在 1X TAE buffer 中跑 3.5 小時後，直接用 UV 光照射並照相。根據 100-bp ladder 每條 band 所跑距離，以 Excel 軟體計算出 PCR 產物大小，算出與標準菌株 H37Rv 在某一基因位點 PCR 產物大小之差異，即可推估出該菌株各基因位點所含重覆(repeat)之 Copy 數。待熟悉各基因位點含不同 Copy 數之大小後，僅憑目測即可判讀出各未知樣本在某一基因位點所含重覆(repeat)之 Copy 數；亦可使用 mini gels，以 50 V 在 1X TAE

buffer 中電泳 1 小時。

(四) 限制酵素片段多形性分型法與資料庫建立

此部份由疾病管制局結核分枝桿菌實驗室進行。

(五) 菌株分型技術之比較

VNTR 分型結果將由疾病管制局結核分枝桿菌實驗室進行其與 spoligotyping 與限制酵素片段多形性分型結果之比較，以探討各技術對於菌株分型之區分能力。

結果

VNTR 分型

PCR 反應後，電泳分析的結果如圖一所示。在 2% 的 agarose gels 上，用 midi-gel 系統 100 V、電泳 3.5 小時的結果，比起用 mini-gel 系統 50 V、電泳 1 小時的結果，要來的得容易判讀。

利用 VNTR，在 299 株結核分枝桿菌研究菌株中，總共分出 62 型。其中，北台灣 50 菌株中，可被分出 18 型；中台灣 50 菌株中，可被分出 17 型；南台灣 151 菌株中，可被分出 40 型；東台灣 50 菌株中，有兩株分型不成功，其餘的 48 菌株中，可被分出 25 型。詳細的分型結果列於表二中。各區域常出現的 VNTR 型有明顯不同（圖二），北台灣以 42435 一型最多，佔 50 菌株的 46.0%。中台灣以 31433 一型最多，佔 50 菌株的 36.0%，其次則為 46464 一型，佔 14.0%。南台灣以 46464、31433 與 42435 三型最多，分別佔 151 菌株的 24.5、17.2 與 16.6%。東台灣以 31433 與 32433 兩型最多，分別佔 48 菌株的 25.0 與 14.6%。

成大醫院結核菌菌株之藥物敏感性試驗

分離自成大醫院的結核菌株中，對 isoniazid、streptomycin、ethambutol 與 rifampin 有抗藥性之菌株數與比率摘要於表三。在 151 菌株中，有 32 (21.2%) 菌株對任一藥物有抗藥性。其中，對 isoniazid 有抗藥性的比率最高，達 14.6%，對 ethambutol 有抗藥性的比率最低，為 4.6%。這些抗藥菌株的

抗藥表現型則摘要於表四。其中，有 8 (5.3%) 菌株為多重抗藥菌株(至少對 rifampin 與 isoniazid 有抗藥性者)；有 5 (3.3%) 菌株對所有四種藥物皆有抗藥性者。對 ethambutol 有抗藥性者，皆伴隨對至少一種其他抗結核藥物的抗藥性。在 9 株對 rifampin 有抗藥性的菌株中，高達 8 (88.9%) 株為多重抗藥菌株。

成大醫院結核菌抗藥菌株抗藥表現型與 VNTR 分型之關係

成大醫院結核菌具各種抗藥表現型菌株，其 VNTR 分型之菌株數列於表五。在僅對 isoniazid 有抗藥性之 8 株菌株中，有四株之 VNTR 分型為 31433。其餘的抗藥型，皆未發現有特定 VNTR 分型的菌株盛行。

討論

本研究計畫的目的，在建立 VNTR 的技術，以作為肺結核分枝桿菌菌株分型之工具之一。此項技術相當簡單，只要實驗室具備一般 PCR 所需之簡單設備與耗材，便可進行；操作步驟容易，不須培養大量細菌。然而，就操作技術本身而言，這項技術主要有以下兩點問題：

- (1) 判讀上的問題：當 PCR 產物較大時，有時不易判讀出差異；另外，電泳時，每一片 gel 上，皆必須有足夠的 ladder，ladder 數不足亦會產生判讀上的困難或錯誤。本研究嘗試用 mini-gels 與 midi-gels 兩種。用 midi-gel 系統、100 V、電泳 3.5 小時的結果，比起用 mini-gel 系統、50 V、電泳 1 小時的結果，要來的得容易判讀。然而，mini-gels 的備製較容易，電泳時間較短，可處理較多的檢體，因此，較之 midi-gels，節省許多時間。因此，雖然效果稍差，只要熟悉各基因位點含不同 Copy 數之大小後，僅憑目測即可迅速判讀出結果。midi-gels 可留待 PCR 產物較大，使用 mini-gels 時產生判讀困擾的檢體使用。
- (2) PCR 污染的問題：凡是 PCR，都可能會有 PCR 產物污染造成的問題。在本研究計畫中，每一批 PCR 皆伴隨陽性與陰性對照組。然而，即使陰性對照組未出現偽陽性，仍不能完全排除有 PCR 污染的問題。要確立本研究計畫 VNTR 分型的準確度，須待疾病管制局結核分枝桿菌實

驗室進行進一步與其他分型技術比較，方可確立。

另外，雖說 VNTR 操作上較標準的限制酵素片段多形性分型法簡易快速許多，然而，當有大量檢體需要處理時，此法仍稍嫌耗時與耗費人力，特別是電泳分析所費時間、人力。此項缺點，未來可應用自動化儀器，作進一步改進。

利用 VNTR，在 299 株結核分枝桿菌研究菌株中，總共可分出 62 型。各區域常出現的 VNTR 分型與各 VNTR 型之菌株數所佔比率不甚相同（表二、圖二），此結果似乎暗示，臺灣結核桿菌之流行菌株，可能存在著區域性的差異。造成這種差異的原因，有待進一步公共衛生與流行病學的研究，而這個問題的解答，可有助於了解臺灣結核桿菌散佈的方式，亦將有助於臺灣結核病的防治。至於 VNTR 對臺灣結核桿菌菌株區分能力是否理想，則有待疾病管制局結核分枝桿菌實驗室與其他分型技術的比較結果，方可得知。

分離自成大醫院的結核菌 151 菌株中，有 32 (21.2%) 菌株對任一藥物有抗藥性。其中，有 8 (5.3%) 菌株為多重抗藥菌株。我們進一步將本研究所得資料與同一時期來自台灣區域醫院的資料比較(尚未發表資料) (圖三)。若與南台灣區域醫院比較，四種藥物的抗藥菌株以及多重抗藥菌株比率，皆高

於南台灣區域醫院。若與北與中台灣區域醫院比較，四種抗結核的藥物中，僅有 ethambutol 在成大醫院的抗藥菌株比率較高，其他三種藥物抗藥菌株比率的差異不大，然多重抗藥菌株比率仍以成大醫院較高。整體而言，成大醫院的結核菌菌株對 ethambutol 的抗藥比率以及多重抗藥菌株比率皆高於區域醫院的結核菌菌株。此比較顯示，結核菌菌株的多重抗藥菌株比率，醫學中心高於區域醫院，推測此結果應是感染多重抗藥菌株的患者，被轉往醫學中心治療所致。因此，要瞭解台灣結核菌的抗藥情形，應該包含區域醫院與醫學中心的菌株，方可得到正確的數據。

在成大醫院結核菌抗藥菌株抗藥表現型與 VNTR 分型關係的分析中，並未發現兩者有密切關係，亦即未發現有特定 VNTR 分型的抗藥菌株盛行。此結果暗示，此區域抗藥性結核菌菌株的散佈，可能主要不是因為同一菌株的擴散流行所致，而是由於不同菌株各自發展出抗藥性。同樣地，我們將本研究所得資料與同一時期來自台灣區域醫院的多重抗藥性菌株資料比較(表六)，亦得到類似結果。亦即未發現有特定 VNTR 分型的多重抗藥性菌株盛行。VNTR 分型的中，42435 一型的多重抗藥性菌株在區域醫院稍多一些，共有四株 (30.8%)，然這一型的菌株，在成大醫院的多重抗藥菌株中，卻僅有一株 (12.5%)。42435 這一型的多重抗藥性菌株在其他區域是否較為盛行，值得進一步研究。

結論與建議

- (1) 本研究計畫顯示，VNTR 為一簡單快速的肺結核分枝桿菌菌株分型之技術，可作為篩選工具或標準的限制酵素片段多形性分型法之輔助技術。
- (2) 本技術在處理大量檢體時，仍需須耗費時間與人力，未來改進的方向，應朝向自動化進行。
- (3) 台灣不同區域常出現的 VNTR 分型與各 VNTR 型之菌株數所佔比率不甚相同，暗示著臺灣結核桿菌之流行菌株，可能存在著區域性的差異，有待進一步公共衛生與流行病學的研究，將可有助於了解臺灣結核桿菌散佈的方式及結核病的防治。
- (4) 成大醫院的多重抗藥菌株比率皆高於台灣區域醫院的比率。因此，欲瞭解台灣結核菌的抗藥情形，應包含區域醫院與醫學中心的菌株，方可得到正確的數據。
- (5) 本研究並未顯示有特定 VNTR 分型的抗藥菌株盛行。此結果暗示，此區域抗藥性結核菌菌株的散佈，暗示台灣的抗藥菌株可能主要不是因為同一菌株的擴散流行所致，而是由於不同菌株各自發展出抗藥性。
- (6) VNTR 分型的中，42435 一型的多重抗藥性菌株在區域醫院稍多，在成大醫院的卻不多，是否多重抗藥性菌株的散佈在台灣有區域性的差異，值得進一步研究。

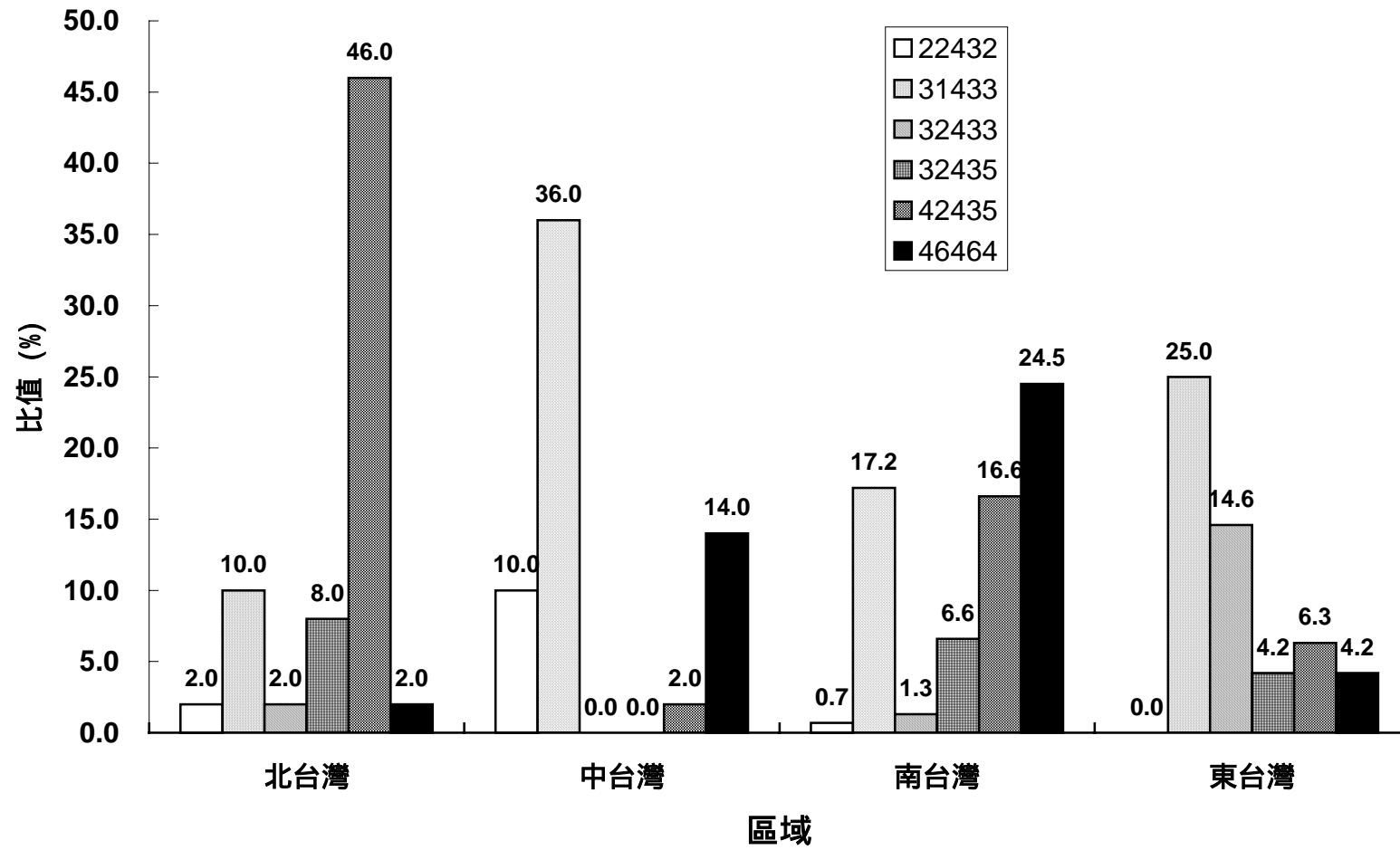
參考文獻

1. 取自疾病管制局網站資料
2. Inderlied CB, Salfinger M. Antimycobacterial agents and susceptibility tests, p. 1601-23. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 1999 American Society for Microbiology, Washington, D. C.
3. Van Soolingen D, Hermans PWM, De Haas PEW, Sikkink DB, van Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2578-86.
4. Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997;35:647-51.
5. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-9.
6. Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JDA. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application of strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 1993;10:1057-65.

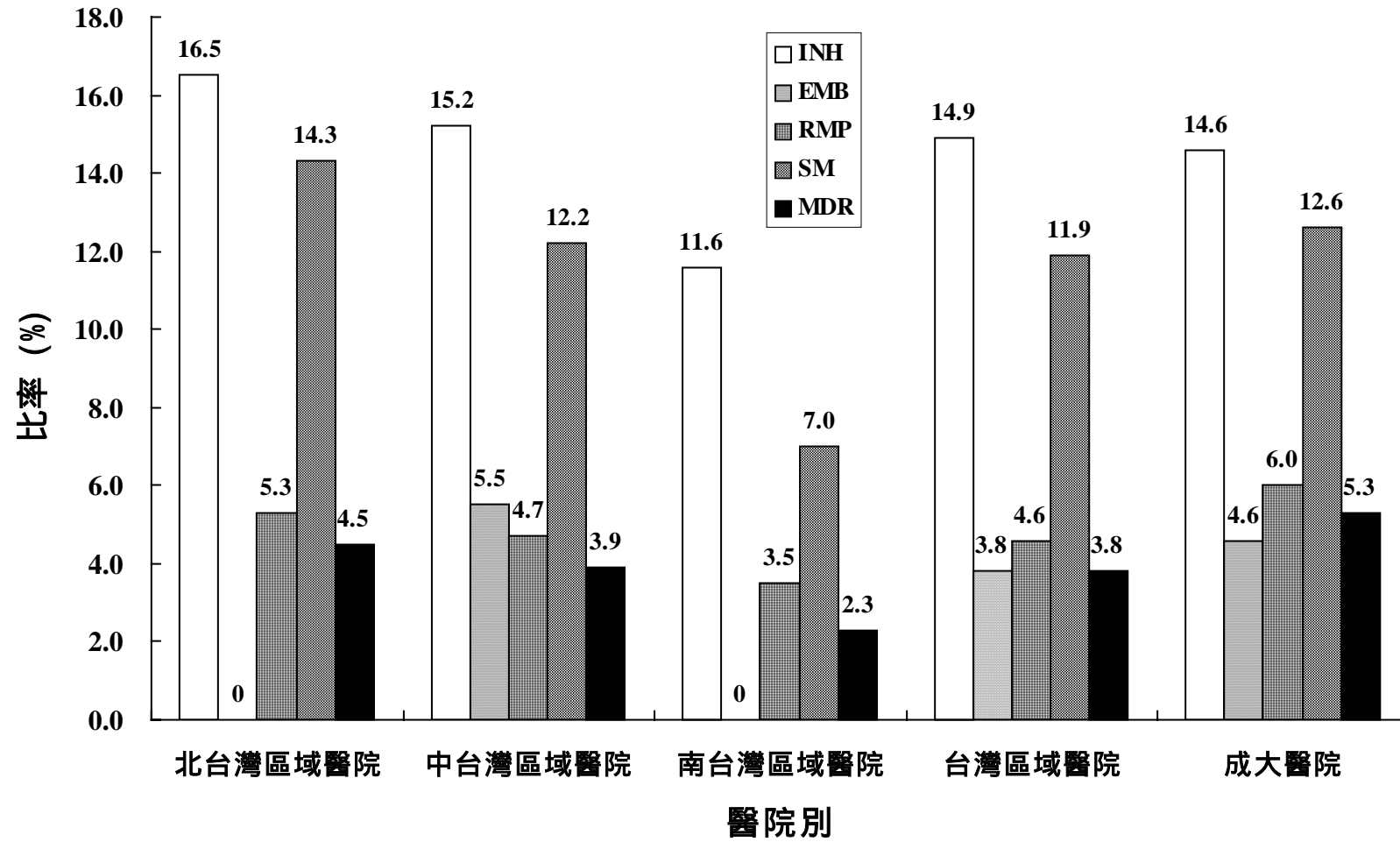
7. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Spoligotyping of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996;34:2734-40.
8. Cousins DV, Williams SN, Ross BC, Ellis TM. Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1993;37:1-17.
9. Cousins D, Williams S, Liebana E, et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 1998;36:168-78.
10. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology 1998;144:1189-96.
11. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999;37:2607-18.
12. Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. J Clin Microbiol 2000;38:2520-24.
13. Barlow REL, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for

- discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2001;39:2453-7.
14. Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats. J Clin Microbiol 2001;39:57-65.
 15. Roring S, Scott A, Brittain D, et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. J Clin Microbiol 2002;40:2126-33.
 16. Yates MD, Drobniewski FA, Wilson SM. Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002;40:712-4.
 17. Sola C, Horgen L, Maisetti J, Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998;36:1122-4.
 18. Rusch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Feyffer GE. Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. J Clin Microbiol 1999;37:45-8.
 19. 結核菌檢驗手冊、疾病管制局、臺灣





圖二、常出現的 VNTR 分型在各區域分布情形



圖三、成大醫院與臺灣區域醫院結核菌之抗藥性比較

表

表一、VNTR 之 PCR 條件、各基因位點之重覆(repeat)大小、以及標準菌株 H37Rv 分型之結果

基因位點	PCR 條件 (溫度、時間、cycle 數)						PCR 產物		重覆	
	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	PCR		大小 (bp)*	Copy 數*	(repeat)大	
					cycle 數	Final extension			小 (bp)	
ETR-A	95°C, 10 min, 1 cycle	94°C, 1 min	50°C, 1 min	72°C, 2 min	40	72°C, 10 min, 1 cycle	419	3	75	
ETR-B	95°C, 10 min, 1 cycle	94°C, 1 min	65°C, 1 min	72°C, 2 min	40	72°C, 10 min, 1 cycle	291	3	57	
ETR-C	95°C, 10 min, 1 cycle	94°C, 1 min	65°C, 1 min	72°C, 2 min	40	72°C, 10 min, 1 cycle	275	4	58	
ETR-D	95°C, 10 min, 1 cycle	94°C, 1 min	65°C, 1 min	72°C, 2 min	40	72°C, 10 min, 1 cycle	309	3	77	
ETR-E	95°C, 10 min, 1 cycle	94°C, 1 min	65°C, 1 min	72°C, 2 min	40	72°C, 10 min, 1 cycle	223	3	53	

*標準菌株 H37Rv 分型之結果

表二、各 VNTR 型在不同區域出現之菌株數

VNTR 型	菌株數				總數
	北台灣	中台灣	南台灣	東台灣	
21432	0	1	1	0	2
21433	1	2	4	1	8
22423	0	1	0	0	1
22432	1	5	1	0	7
22433	0	0	0	1	1
22435	2	1	0	0	3
22463	0	1	0	0	1
22532	0	0	1	0	1
22643	0	0	0	1	1
31233	1	0	0	1	2
31332	0	0	1	0	1
31333	0	1	1	1	3
31423	0	0	1	1	2
31432	0	2	1	1	4
31433	5	18	26	12	61
32233	0	0	0	1	1
32235	1	0	0	0	1
32333	0	0	1	3	4
32334	0	0	0	1	1
32413	0	0	0	1	1
32433	1	0	2	7	10
32434	0	0	1	0	1
32435	4	0	10	2	16
32436	0	0	1	0	1
32443	0	0	0	1	1
41435	0	0	1	0	1
42335	1	0	0	0	1
42432	1	0	0	1	2
42433	0	0	3	0	3
42434	0	0	2	1	3
42435	23	1	25	3	52
42436	1	0	0	0	1
42443	0	0	1	0	1
42445	0	0	2	0	2
42452	0	0	1	0	1

42453	2	3	3	1	9
42454	0	0	0	1	1
42455	0	0	1	0	1
42464	0	2	0	1	3
42535	2	0	1	0	3
43435	0	0	1	0	1
43464	0	0	1	0	1
43474	0	0	1	0	1
44464	0	0	1	0	1
45464	0	0	2	1	3
46264	0	0	0	1	1
46364	0	0	1	0	1
46454	0	0	1	0	1
46464	1	7	37	2	47
46484	0	0	1	0	1
47463	0	0	2	0	2
47464	0	1	0	0	1
48464	0	0	1	0	1
51453	0	0	1	0	1
52334	1	0	0	0	1
52433	0	1	0	0	1
52434	1	1	2	0	4
52435	0	0	1	0	1
53334	0	2	0	0	2
53434	0	0	5	1	6
54455	1	0	0	0	1
56464	0	0	1	0	1
總數	50	50	151	48	299

表三、成大醫院 151 株結核菌對 isoniazid (INH)、streptomycin (SM)、ethambutol (EMB) 與 rifampin (RMP)有抗藥性之菌株數與比率

	INH (0.2 µg/ml)	INH (1 µg/ml)	SM (2 µg/ml)	SM (10 µg/ml)	EMB (5 µg/ml)	EMB (10 µg/ml)	RMP (1µg/ml)
菌株數	22	14	19	11	7	2	9
比值 (%)	14.6	9.3	12.6	7.3	4.6	1.3	6.0

表四、成大醫院 151 株結核菌對 isoniazid (INH)、streptomycin (SM)、ethambutol (EMB) 與 rifampin (RMP)四種藥物產生抗藥性之各種抗藥表現型抗菌株數與比率

	菌株數	比值 (%)
無抗藥性	119	78.8
具抗藥性	32	21.2
單一藥物抗藥性	18	11.9
INH	8	5.3
SM	9	6.0
EMB	0	0
RMP	1	0.7
兩種藥物抗藥性	8	5.3
INH+SM	5	3.3
INH+EMB	1	0.7
INH+RMP	2	1.3
三種藥物抗藥性	1	0.7
INH+EMB+RMP	1	0.7
四種藥物抗藥性	5	3.3
多重抗藥性*	8	5.3

*多重抗藥性指至少對 rifampin 與 isoniazid 有抗藥性者。

表五、成大醫院結核菌抗藥菌株抗藥表現型與 VNTR 分型之關係

抗藥型與 VNTR 分型	菌株數
單一藥物抗藥性	18
INH	8
31433	4
32435	1
42435	1
46464	2
SM	9
32433	1
32435	1
42434	1
42435	2
42535	1
46464	2
53434	1
RMP	1
42435	1
兩種藥物抗藥性	8
INH+SM	5
31433	1
42435	1
42455	1
46464	1
51453	1
INH+EMB	1
46464	1
INH+RMP	2
31333	1
52434	1
三種藥物抗藥性	1
INH+EMB+RMP	1
32435	1
四種藥物抗藥性	5
42433	1
42435	1
46464	1
47463	2

表六、多重抗藥菌株之 VNTR 分型

VNTR 分型	區域醫院	成大醫院	共計
22432	1	0	1
31333	0	1	1
31433	1	0	1
32433	1	0	1
32435	1	1	2
42433	1	1	2
42435	4	1	5
42535	1	0	1
42553	1	0	1
46464	0	1	1
47463	0	2	2
52453	1	0	1
52434	0	1	1
53434	1	0	1
	13	8	21

附錄

1. 成大醫院之菌株資料 (電子檔)
2. 疾病管制局菌株之 VNTR 資料 (電子檔)