

計畫編號：DOH91-DC-2023

行政院衛生署九十一年度

自行研究計畫

台灣地區結核病分子流行病學之研究（一）

研究報告

執行機構： 行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人： 周如文

研究人員： 林惠文、黃偉倫

執行期間： 九十一年三月一日至九十一年十二月三十一日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見＊＊

目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、中英文摘要 (3)

貳、本文

一、前言 (5)

二、材料與方法 (7)

三、結果 (10)

四、結論與建議 (9)

五、參考文獻 (12)

六、圖、表 (15)

壹、 摘要：

(中文)

研究目的本研究計劃之目標，在於掌握結核菌病原體起源(origin)及動態傳播(transmission)方式，即時偵測與確定病例；以標準化偵測實驗方法，建立本土結核菌指紋資料庫，藉以與全球相關實驗室比對，進行資訊與技術交流，邁向本局防疫國際化之願景。

研究方法本研究計畫將運用 IS6110-限制性斷片長度多態型 (IS-6110 Restriction Fragment Length Polymorphism, IS-6110 RFLP)及/或間距寡核酸分型 (Spacer Oligonucleotide Typing, Spoligotyping) 方法，佐以資料庫建構 Bionumerics 電腦軟體，藉著參照比對標準菌株型態，續由圖譜進行結核分枝桿菌菌株分子型別鑑定與親源性分析。

主要發現 IS6110-RFLP 分型能力佳，可運用於結核分枝桿菌抗藥菌分型，Spoligotyping 則無法運用。後者可做為初級篩選，再以前者細部分析。初步結果顯示，台灣地區結核分枝桿菌菌株具相當多樣性，病人間相互之間的動態傳播似乎不常見，需再收集更多代表性菌株繼續加以分析。

結論及建議事項藉由結核菌不同的基因標幟為分析標的之 IS6110-RFLP 的分型效果較 Spoligotyping 佳，但處理步驟多較耗時且較不易標準化。反觀，Spoligotyping 易操作且易標準化，可同時鑑定結核分枝或非分枝桿菌。此二分析方法，可同時應用於菌株鑑定與分子流行病學研究，以深入瞭解台灣地區結核分枝桿菌菌株之種類與特異性。

關鍵詞：結核菌、RFLP、Spoligotyping

(英文)

Abstract

Tuberculosis infection, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, continues to be a major disease of morbidity and mortality in human and other mammals causing around 2 million deaths and 8 million cases each year. DNA fingerprinting methods have been proved to be powerful epidemiological tools for the control of tuberculosis. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* are feasible by several fingerprinting methods. Different strain-specific DNA markers have to be used at same time to make sure the accurate strain clustering. The purpose of this study is to establish molecular techniques, such as IS-6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (IS-6110 RFLP) and Spacer Oligonucleotide Typing (Spoligotyping) methods for the understanding the origin and transmission of *Mycobacterium Tuberculosis* in Taiwan. Both methods have been standardization in the Laboratory of Tuberculosis in CDC, Taiwan. RFLP is able to differentiate drug-resistant genotypes but not the Spoligotyping. Spoligotyping can be applied for primary screening, but still need RFLP for further analysis.

貳、 本文

一、 前言：

結核病(Tuberculosis,TB)是由分枝桿菌所引發的一種傳染性疾病，現今全世界有二仟萬個患者，每年增加八百萬個新病人，並造成每年兩百萬人死亡(WHO, 1999)。尤其在最近五年內，在已開發國家中發生的病例急劇上昇，使得 TB 不再局限於未開發及開發中國家的專利，演變成爲全球的問題。

通常的感染是表現在肺部，但是它的確會侵害人體所有組織，病原體是 *Mycobacterium tuberculosis*，可經由咳嗽飛沫傳播 (Small, 1994)。此疾病可以藥物治療，早期之診斷治療可降低發病率及死亡率，只是療程常需達 6-12 個月，病人之合作度是關鍵。人類通常以由減毒之牛型結核桿菌製成之卡介苗(BCG)疫苗來預防肺結核。在西方已開發國家中，一般認爲 AIDS 流行的結果是造成 TB 再爆發流行主因 (Sepkowitz, 1995)。結核病的臨床症狀爲持續性咳嗽，痰中帶有血絲，胸部疼痛，疲勞，食慾不振，體重減輕，虛弱等。檢驗的方式有很多種，胸部 X 光比較不具特異性，但是對肺結核還算敏感。結核病主要分爲肺結核和非肺部的結核，前者又可分爲可培養出桿菌之開放性與無培養出桿菌之封閉性肺結核。封閉性肺結核的病人大約是開放性肺結核病人的 2-3 倍。

常見之主要結核菌檢測與分型方法中含：(1) 染色鏡檢法 (Acid-fast Microscopy):利用桿菌細胞壁含 mycolic acids 特性之耐酸桿菌染色法，敏感度約 30-50%；(2)菌體培養法：BACTEC 及 Septi-Chek 方法，確定報告太耗時。BACTEC system 利用含碳-14 palmitic acid 之

培養基，不易操作與管理。(3)Nucleic Acid Probe：使用放射性元素，不夠敏感且無法運用於抗藥性判定。(4)Phage Typing：利用噬菌體分型，尚未運用於臨床檢體確認。(5) 分析 Tuberculostearic acid (TSBA)：配合 gas-liquid chromatography 設施分離非肺結核性檢體（如：CSF），此法昂貴且難施行。(6)酵素分析：分析由 lymphocyte macrophage 釋出之 adenosine deaminase (ADA)，易造成偽陽性結果。(7)PCR: 針對 IS6110 進行分型分析，含 denaturation、primer binding 及 DNA synthesis 三步驟，偵測敏感度為 10 個單一菌。唯 PCR 無法區隔死菌與活菌及抗藥性菌株；(8) RFLP: 針對 IS-6110 進行分型分析，為目前世界公認之指紋分型法（Sola, 1997）；(9) Spoilotyping:新發展之快速分型法（Kamerbeek, 1997；Sola, 1998；Sola, 2000），與 RFLP 相輔相成。

本實驗室擬建立 RFLP 且評估 Spoilotyping 方法，於台灣地區臨床檢驗與判定結核菌之實用性（Goyal, 1997）。基本上，RFLP 是利用幾乎所有 *M. tuberculosis* 及 *M. bovis* 皆含多個 IS-6110 片段之特性（Groenen, 1993），在取得檢體經 decontamination 後，進行菌體培養，抽取 DNA 後以限制酵素定點反應。依照各結核菌型中 IS-6110 於 chromosome 之不同數目及位置等性質，利用 gel electrophoresis 及 western-blotting 技術配合電腦分析軟體進行影像圖譜數位化後（Meyer, 1996），以分析軟體如 Gel Compar（Applied Maths, Kortrijk, Belgium）常態化處理，並將單一菌株之 DNA 圖譜當成單件資料儲存，將圖譜資料配合菌株之流病資料，即為菌株之身分資料，資料庫於是建立。然而，此法因牽涉菌體培養，相當耗時且步驟繁瑣。自 1990 年起，快速 DNA 指紋分型檢驗法先後在不同實驗室發展著，Isogen Bioscience B.V.更推出 Spoilotyping 檢驗套組。其原理為：結核菌之 chromosomal locus 中之”direct repeat”(DR)部位具 spacer DNA 多態現

象，可做為菌體分型之依據（Hermans, 1991）。此法與 RFLP 同樣可利用 unweighted pair-group method using arithmetic averages(UPGMA) clustering（Sneath, 1973）或 neighbor-joining 方法（Saitou, 1987），常態化圖譜後，採用 Dice Index 分析相似性（計算誤差容忍度為 3.0%），將具相似 IS-6110 圖譜之結核桿菌分類並以樹狀圖（dendrogram）標示，並與菌株之流病資料連結，做成可供比對型式之數位化資料與資料庫。

本計畫目的：除了標準化菌株鑑定與分型操作流程、標準化設備與軟體，培養多元化技術（微生物、分子生物、流病統計分析及電腦系統等）人才及建立結核桿菌指紋資料庫外，最重要的是可對台灣地區結核病相關研究建立基本背景資訊，例如：地域特性、地區流行菌株之 genotype 多樣性、菌株來源（本土或外來）、菌株傳染途徑、菌株感染族群（population）結構、菌株之演化（Sreevatsan, 1997）等。由病原體之多樣性配合流病資料，可供疾病防治策略擬定參考。

二、 材料與方法

（一）菌株檢體之收集與運送

由醫療院所收集菌株檢體，檢體經標準化程序分離後，保存於超低溫冷凍櫃，並將菌株之流病資料以電腦建檔。菌株收集對象將以榮總與長庚醫院開始所分離之結核桿菌株為優先。菌株先存放於檢驗實驗室，以 15% glycerol 保存於-75 中，待分析後選擇值得保存之特定菌株，轉交疾病管制局生物材料中心進行永久保存。

(二) 菌株流病資料電腦檔之建立：

將由以電腦軟體 Access 建立菌株之流病基本資料：包括菌株分離者與單位；採檢與菌株分離日期病人之姓名、年齡、性別、地址；發病日期；其它疾病歷史及其他相關流病資料等。由生物科技實驗室負責菌株與流病資料之彙集與建檔工作，將收集菌株流病資料加以彙整之後，交於本局相關權責組（實驗室資源服務組或結核病防治組），以利其掌握檢驗室之陽性檢驗資料。

(三) 標準化菌株 RFLP 分型：

以特定核酸限制酶 (*Pvu* II) 切割整個結核桿菌基因體後可得到多條長短不一之片斷，於 0.8% 瓊脂凝膠以電泳儀將 DNA 片斷分層。再利用南方墨點法轉移至融合膜上，續以 DIG 或 ECL 標幟之 IS-6110 核酸探針進行核酸融合反應。即可於解析與比較多態性菌株 DNA 圖譜。將影像圖譜數位化與常態化後，再以 Bionumerics 分析軟體進行菌株後續電腦分析。

(四) Spoligotyping 技術評估：

依據 Kamerbeek 方法，此法以 PCR 為分析原理。需由檢體中分離大約 10ng 之基因組的 mycobacterial DNA，當 biotin 標幟之 primer 與模板 DNA 經 PCR 放大後融合至已先固定化之 43 種 spacer DNA 序列之膜上，再與 streptavidin peroxidase 作用，訊號可以任何 biotin 偵測系統紀錄。每一黑點視為一 band，不同分型菌株具不同 banding pattern。將影像圖譜數位化與常態化後，再以分析軟體進

行菌株後續電腦分析。

(五) 電腦分析與建立資料庫：

RFLP 及 Spoligotyping 圖譜之影像檔以 Gel Compar (Applied Matts, Kortrijk, Belgium) 分析軟體, 依據核酸分子量標記 (DNA size marker) 定位法, 並利用 unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering 或 neighbor-joining 方法, 常態化圖譜後, 依疾管局規範編號建檔, 並與菌株之流病資料連結。採用 Dice Index 分析相似性 (計算誤差容忍度為 3.0%), 將具相似 IS-6110 圖譜之結核分枝桿菌分類並以樹狀圖 (dendrogram) 標示, 做成可供比對型式之數位化資料與資料庫。

(六) 菌株永久保存：

依照分型結果分類之不同型別與不同亞型別之菌株, 每一 (亞) 型別菌株將送交疾管局生物材料保存中心進行永久保存。

三、結果

本研究計畫，第一年度完成下列目標及工作項目包含：收集技術與流病資料；建立標準化 RFLP 及 Spoligotyping 分析核心技術；建立電腦數位化資料庫；進行結核菌株收集及建立菌株庫及訓練分子檢驗結核菌技術人員。初步結果分項敘述於下：

(一) 菌株檢體之收集與運送

拜訪台大、北市慢、胸腔病院、北榮、台中醫院、中山醫院、門諾、慈濟、高榮及高醫等主要 TB 臨床檢驗室。瞭解檢驗人員、檢驗方法及硬體實驗室設施之優缺點外，亦建立由台灣地區北、中、南及東區醫療院所收集菌株之管道。檢體菌株經標準化程序分離後，保存於超低溫-70°C 冷凍櫃，並將菌株之流病資料以電腦建檔。菌株先存放於研究檢驗實驗室，以含 15% glycerol 的 7H9 培養基保存於-70 中，待分析後選擇值得保存之特定菌株，轉交疾病管制局生物材料中心進行永久保存。目前，先向 ATCC 採購屬 BSL3 分枝桿菌菌株 (*M. bovis*, *M. tuberculosis*:H37Rv, *M. tuberculosis*:H37Rv-INH-R, *M. tuberculosis*:H37Rv-EMB-R, *M. tuberculosis*:H37Rv-RIF-R) 及收集結核分枝桿菌野生 (wild type) 及標準參考 (reference) 株與臨床抗藥菌株約四千株。

(二) 菌株流病資料電腦檔之建立：

以電腦軟體 Access 或建立菌株之流病基本資料：包括菌株分離者與單位；採檢與菌株分離日期病人之姓名、年齡、性別、地址；發病日期；其它疾病歷史及其他相關流病資料等。由結核

分枝桿菌實驗室負責菌株與流病資料之彙集與建檔工作，將收集菌株流病資料加以彙整之後，交於本局相關權責組（實驗室資源服務組或結核病防治組），以利其掌握檢驗室之陽性檢驗資料。

（三）標準化菌株 RFLP 分型：

RFLP 分型需純度較佳之 DNA，而且其分析程序之標準化將影響分析結果。目前，實驗室已完成菌株培養、熱處理及 DNA 萃取與純化步驟（如圖一），並進行以特定核酸限制酶（*Pvu II*）切割結核桿菌基因體後可得到多條長短不一之片斷，於 0.8% 瓊脂凝膠以電泳儀將 DNA 片斷分層（如圖二）。再利用南方墨點法轉移至融合膜上，續以 DIG 或 ECL 標幟之 IS-6110 核酸探針進行核酸融合反應。即可於解析與比較多態性菌株 DNA 圖譜（圖三）。將影像圖譜數位化與常態化後，將再以分析軟體進行菌株後續電腦分析（圖四）。

（四）Spoligotyping 技術評估與建立：

依據 Kamerbeek 方法，此法以 PCR 為分析原理。需由檢體中分離大約 10ng 之基因組的 mycobacterial DNA，當 biotin 標幟之 primer 與模板 DNA 經 PCR 放大後融合至已先固定化之 43 種 spacer DNA 序列之膜上，再與 streptavidin peroxidase 作用，訊號可以任何 biotin 偵測系統紀錄。每一黑點視為一 band，不同分型菌株具不同 banding pattern。將影像圖譜數位化與常態化後，再以分析軟體進行菌株後續電腦分析。已赴比利時 ITM 與荷蘭 RIVM 此技術開發與運用實驗室完成試作（圖五）。

三、 結論與建議

藉由結核菌不同的基因標幟為分析標的之 IS6110-RFLP 的分型效果較 Spoligotyping 佳，但處理步驟多較耗時且較不易標準化。反觀，Spoligotyping 易操作且易標準化，可同時鑑定結核分枝或非分枝桿菌。此二分析方法，可同時應用於菌株鑑定與分子流行病學研究，以深入瞭解台灣地區結核分枝桿菌菌株之種類與特異性。基因體相關研究當下已成為顯學，本室擬配合本局相關基因體計畫，將結核病防治中之結核桿菌病原體透徹分析。此計畫本年度已經建立結核菌分子指紋分析標準化實驗室；收集技術與流病資料；建立標準化 RFLP 及評估 Spoligotyping 分析核心技術；建立電腦數位化資料庫；進行結核菌株收集及建立菌株庫及架構國內外結核病相關機構防疫資訊與技術聯繫系統。目前，已經利用標準化方法進行台灣地區北京株流傳情形之研究、多重抗藥性菌株分子基因型分析等，並進行特定主題分子流行病學所需菌株之收集、培養與保存。預定長期監測結核桿菌菌株於 age-adjusted 不同族群之流行趨勢、接觸者追蹤、復發或再感染、機構內散播、實驗室交叉感染、抗藥性菌株演化等。以上訊息，將有利於台灣日後結核病防治。

四、 主要參考文獻

WHO, The world health report 1999, Geneva: WHO 1999; 110.

Sepkowitz, K. A., J. Raffalli, L. Riley, T. E. Kiehn, D. Armstrong, 1995. Tuberculosis in the AIDS era. Clin. Micro. Rev., 8: 180-199.

Small PM, van Embden JDA. Molecular epidemiology of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: American Society for Microbiology; 1994, p. 569-82.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al.

[Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination.](#) Proc Natl Acad Sci U S A 1997;97:9869-74.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. [Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.](#) J Clin Microbiol 1993;31:406-9.

Sola C, Horgen L, Goh KS, Rastogi N. [Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes.](#) J Clin Microbiol 1997;35:843-6.

Sola C, Horgen L, Maïsetti 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.

Sola C, Horgen L, Devallois A, Rastogi N. [Combined numerical analysis based on the molecular description of *Mycobacterium tuberculosis* by four-repetitive sequence-based DNA typing sequence.](#) Res Microbiol 1998;149:349-60.

Kamerbeek J, Schouls L, van Agterveld M, van Soolingen D, Kolk A, Kuijper S, et al. [Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology.](#) J Clin Microbiol 1997;35:907-14.

Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy: the principles and practices of classification. San Francisco (CA): W.H. Freeman & Co.; 1973.

Saitou N, Nei M. [The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.](#) Mol Biol Evol 1987;4:406-25.

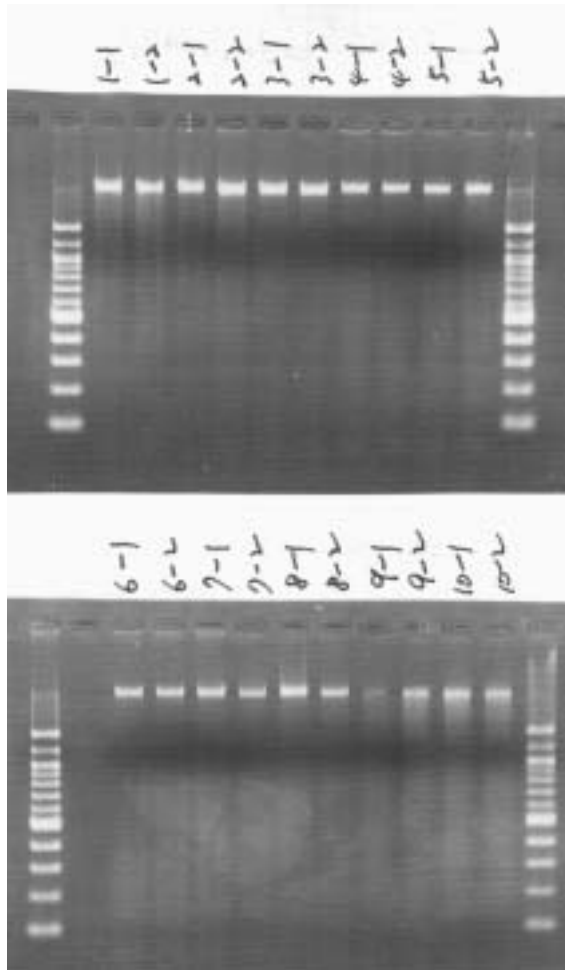
Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997;35:647-51.

Goguet de la Salmonière Y, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden JDA, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997;35:2210-4.

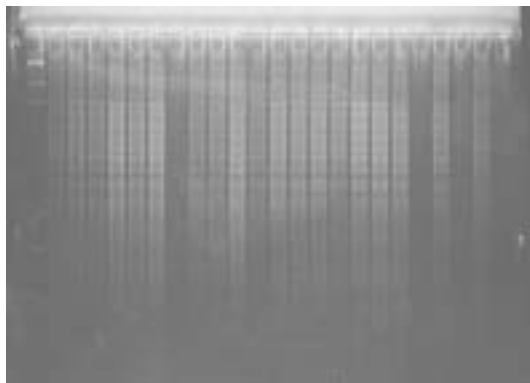
Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JDA. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application

for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 1993;10:1057-65.

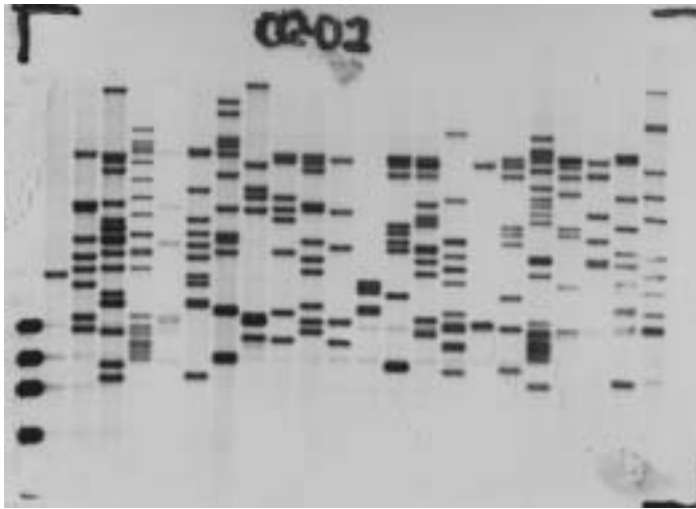
Meyer A. In: Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J, editors. *New uses for new phylogenies*. London: Oxford University Press; 1996. p. 322-40.



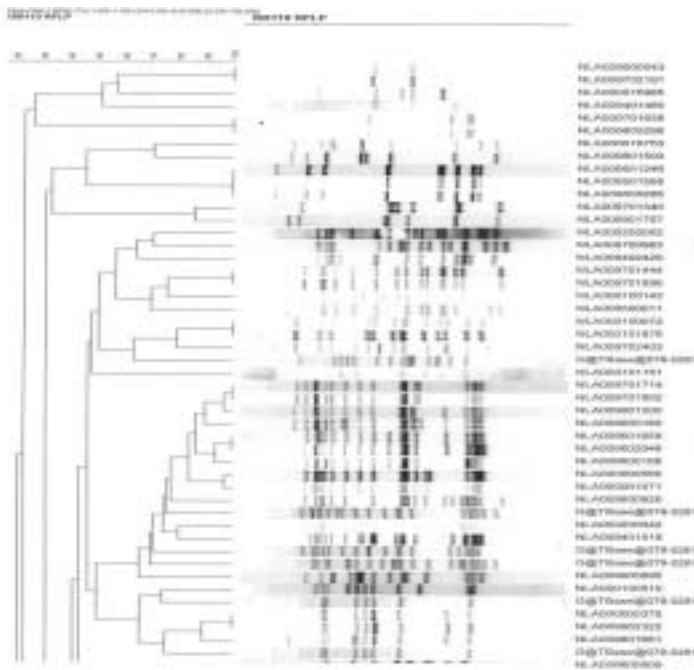
(圖一) 結核桿菌 genomic DNA 純化電泳膠片



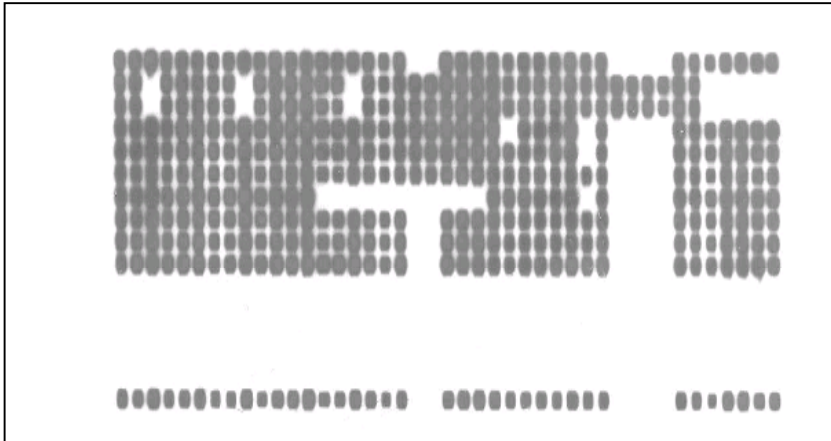
(圖二) 特定核酸限制酶 (*Pvu* II) 切割整結核桿菌基因體電泳膠片



(圖三) 結核桿菌 RFLP DNA 圖譜



(圖四) 結核桿菌 RFLP 親源性分析



(A)



(B)

(圖五) 結核桿菌 Spoligotyping 分析: (A) 方法標準化; (B) 檢體分析