

計畫編號：DOH100-DC-2027

行政院衛生署疾病管制局 100 年度自行研究計畫

以高效率液態診斷平台建立分枝桿菌鑑別系統

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：莊珮君

研究人員：紀廷霖

執行期間：100 年 1 月 1 日至 100 年 11 月 15 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、中英文摘要	(4)
貳、本文	
一、前言	(8)
二、材料與方法	(12)
三、結果	(17)
四、討論	(21)
五、結論與建議	(24)
六、計畫重要研究成果及具體建議	(25)
七、參考文獻	(26)
八、圖、表	
圖一、以標準菌株 <i>M. tuberculosis</i> H37Rv 及 <i>M. bovis</i> BCG strain 之 DNA 進行 3 組引子之 multiplex PCR 結果	(27)
圖二、 <i>M. tuberculosis</i> complex、 <i>M. bovis</i> Family、 <i>M. bovis</i> BCG strain SNP s 鑑別用高效率液態診斷平台偵測極限結果 (Median Fluorescence Intensities, MFI)	(28)

圖三、*M. tuberculosis* complex、*M. bovis* Family、*M. bovis* BCG strain
SNP s 鑑別用高效率液態診斷平台偵測極限結果 (Allelic
Ratio) (29)

表一、*M. tuberculosis* complex、*M. bovis* Family、*M. bovis* BCG strain
SNP s 鑑別用 multiplex PCR 及 ASPE 引子序列 (30)

表二、個案分類之高效率液態診斷平台 SNP 分析結果與常規分子檢
驗結果比較 (31)

表三、高效率液態診斷平台 SNP 分析結果與常規分子檢驗之檢測結
果比較 (32)

壹、摘要

研究目的 建立高效率液態診斷平台應用於鑑別兒童及青少年疑似結核病或卡介苗不良反應檢體檢驗。

研究方法 根據本實驗室已發表的 *M. bovis* Family 專一性 single nucleotide polymorphism (SNP), *fbpA*³¹¹ GGC→GGG, 及 *M. bovis* BCG strain 專一性 SNP, *fbpB*¹⁴⁰ TTC→CTC, 利用本實驗室已應用於多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 結核菌分子快速檢測之高效率液態診斷平台 (microsphere-based suspension assay) 系統, 針對 2010 年 70 件送驗病理或臨床檢體進行 *M. tuberculosis*、*M. bovis* Family、BCG strain 鑑別系統分析與平台建立。

主要發現 (1) 以 *M. tuberculosis* (H37Rv)、*M. bovis*、*M. bovis* BCG strain 之 DNA 分析此鑑別系統偵測極限。顯示 5 個 SNPs (2 個為 *fbpA* codon 311 wild type 及 mutant、2 個為 *fbpB* codon 140 wild type 及 mutant、1 個為 *rpoB* MTBC positive control) 皆可偵測到 50 fg 原始 DNA 含量之 PCR 產物, 且各 SNP 之 Allelic Ratio 皆在 0.75 以上 (可達 0.9 以上), 顯示高效率液態診斷平台系統之高敏感性與特異性。(2) 以此鑑別系統分析 70 件檢體, 檢測出 7 件 BCG、1 件 *M. bovis* family、7 件 *M. tuberculosis*、6 件 MTBC, 檢測率分別為 10.0%、1.4%、10.0%、8.6%。與常規分子檢驗之結果 (檢測出 6 件 BCG、1 件 *M. bovis* family、7 件 *M. tuberculosis*、7 件 MTBC, 檢測率分別為 8.6%、1.4%、10.0%、10.0%) 相當, 無顯著的差異。其中有 4 件檢體以此鑑別系統分析結果優於常規分子檢驗。

結論及建議事項 本研究的結果主要為針對病理或臨床 MTBC 含量較低的檢體, 利用高效率液態診斷平台系統可快速並正確鑑別 *M.*

tuberculosis、*M. bovis* Family、BCG strain。此系統之偵測極限可達 50 fg，並具有流程簡化的優點，可建立標準檢驗方法並於臨床實驗室應用。此方法可提供臨床醫師針對懷疑可能為卡介苗不良反應或是其他肺外結核之病患檢體進行實驗室檢驗，可做為醫師進行臨床診斷之依據。

關鍵詞：病理檢體、BCG 鑑別、高效率液態診斷平台系統

Abstract

Purpose

To establish a high throughput microsphere-based suspension assay system applied in BCG identification for specimens from BCG complication cases including children and adolescents.

Materials and Methods

According to our preliminary study, two single nucleotide polymorphisms (SNPs), *fbpA*³¹¹ GGC→GGG and *fbpB*¹⁴⁰ TTC→CTC, have been identified specifically in *M. bovis* Family and *M. bovis* BCG strain, respectively. A total of 70 paraffin embedded tissue or other clinical specimens were collected in 2010. Using those SNPs and applying the high throughput microsphere-based suspension assay system which has been applied in identification of multidrug resistant associated SNPs to evaluate the performance for *M. tuberculosis*, *M. bovis* Family, and BCG strain identifications.

Results

1. Using DNA of *M. tuberculosis* (H37Rv), *M. bovis*, and *M. bovis* BCG strain to analyze the detection limitation of this suspension assay system. The result showed the PCR products from 50 fg DNA initial concentration still can be detected using 5 SNPs including *fbpA* codon 311 wild type and mutant, *fbpB* codon 140 wild type and mutant, and 1 *rpoB* MTBC positive control. The allelic ratio for each SNP were higher than 0.75 (also higher than 0.9) and these results showed the high sensitivity and high specificity for this system.
2. Among 70 DNA samples, 7 BCG, 1 *M. bovis* family, 7 *M. tuberculosis*, 6

MTBC were correctly identified using this SNP platform. The detection rates were 10.0%, 1.4%, 10.0%, and 8.6%, respectively. Compared with the detection rates of the regular examinations (6 (8.6%) BCG, 1 (1.4%) *M. bovis* family, 7 (10.0%) *M. tuberculosis*, 7 (10.0%) MTBC), there was no significant difference between this new SNP assay and regular examinations. In addition, the identification results for 4 samples using this SNP assay were better than those using regular examinations.

Conclusions and Suggestions

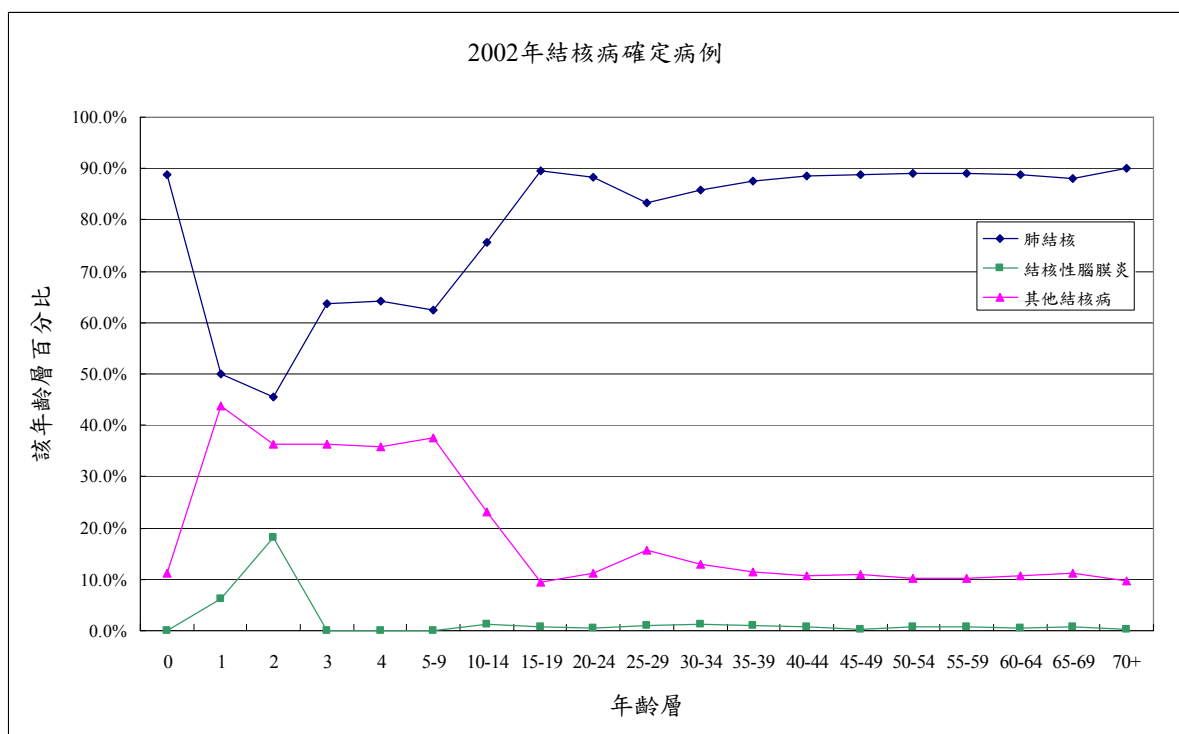
Regarding to the limited MTBC contents in paraffin embedded tissue or other clinical specimens, *M. tuberculosis* (H37Rv), *M. bovis*, and *M. bovis* BCG strain can be correctly identified using this high throughput microsphere-based suspension assay system. The detection limitation is 50 fg for this system. The process flow of this assay is simple and can be documented as a standard operation protocol and then applied in clinical laboratories. The application of this platform in BCG identification will help the clinical doctors to diagnose suspected BCG complication cases as well as extrapulmonary cases.

Key Words: Paraffin embedded tissue specimens, BCG identification, high throughput microsphere-based suspension assay

貳、本文

一、前言

根據通報系統資料顯示，以 2002 年為例，結核病依肺結核、結核性腦膜炎、其他結核病分類分析，1 至 9 歲年齡層之其他結核病比例較肺結核比例高，佔 35.7%至 43.8%，相較於成人 80%以上為肺結核者，臨床病理分布上有顯著的差異（下圖）。

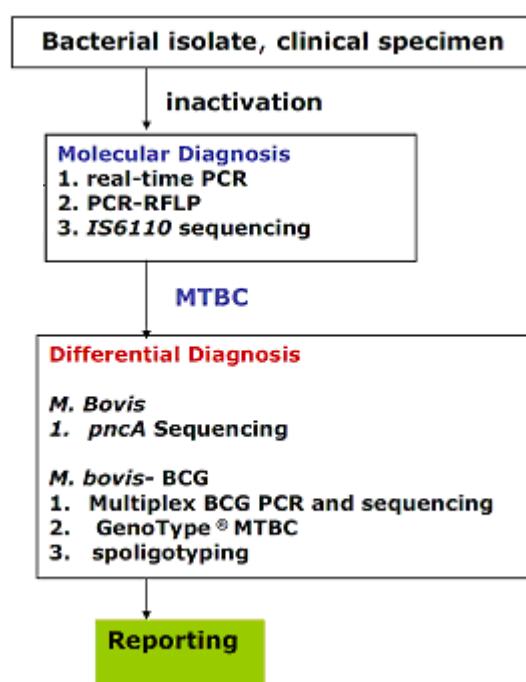


由於目前臨床結核菌實驗室絕多數僅能以培養菌株鑑別至結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)，針對臨床醫師若懷疑病人，特別是五歲以下幼兒之肺外結核，是否為 *M. bovis* BCG 疫苗株所引起的卡介苗不良反應個案，臨床結核菌實驗室提供的檢驗條件仍有所限制。因此本實驗室利用分子檢測的方法針對臨床非培養的病理檢體進行 BCG 的鑑定，以協助臨床醫師進行病人的診斷並正確用藥。

然病理檢體常因核酸含量過低，及受限檢測敏感度，根據統計資料顯

示，2008、2009、2010 年(至 10 月) 送驗五歲以下疑似個案分別為 10、26、43 人之檢體 (含病理及其他臨床檢體、培養菌株) 共計 94 件 (2008 年 10 件、2009 年 29 件、2010 年 55 件)，其中 8、16、22 個案可經由分子檢驗鑑定檢體為 *M. bovis* BCG。因此針對五歲以下疑似個案送驗者約 60.8% 可確認為 *M. bovis* BCG。而以送驗檢體類別統計 (不僅限於五歲以下疑似個案之檢體)，2008 年至 2010 年送驗非菌株之病理及其他臨床檢體之數量也逐年上升 (2008 年 2 件、2009 年 19 件、2010 年 76 件)，顯示病理及其他臨床檢體之 BCG 分子鑑定需求顯著增加。

目前 BCG 分子鑑定檢驗流程如下圖所示：

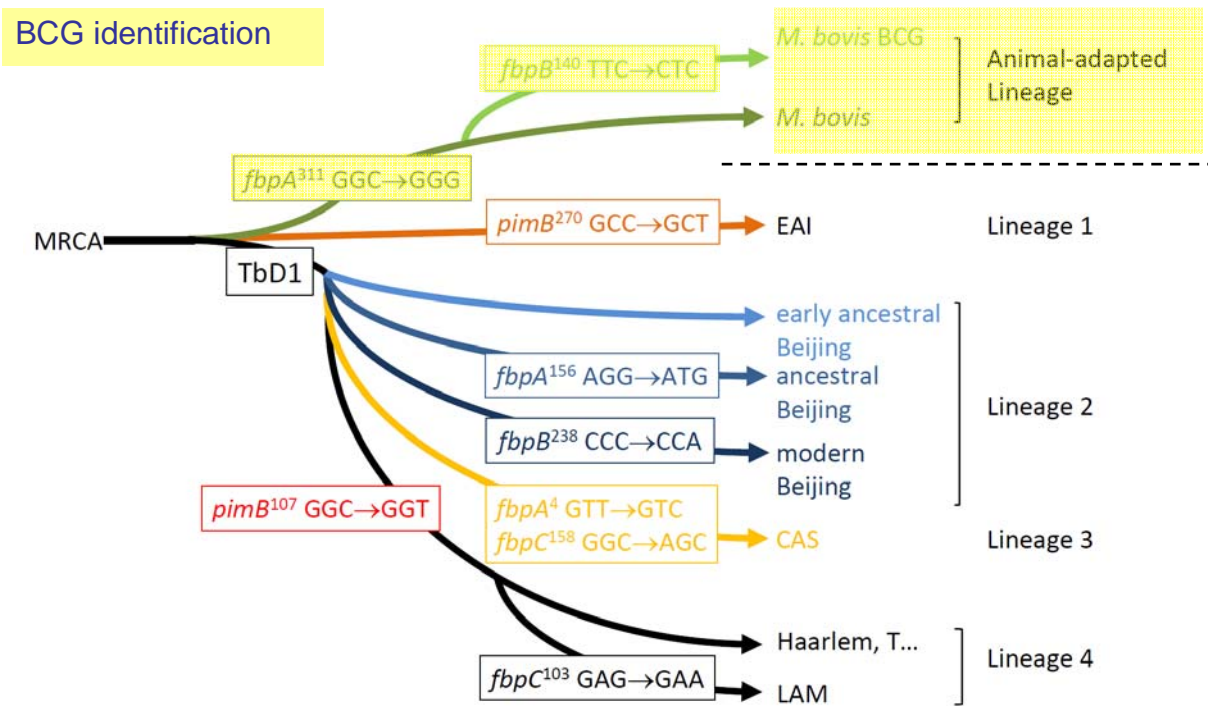


BCG分子鑑定檢驗流程

由上圖可知目前檢驗流程較為繁複，以菌株檢體而言，經 *IS6110* real-time PCR 篩選為 MTBC 後，可利用 GenoType MTBC 快速檢測試劑及

spoligotyping 基因分型方法【1,2】進行 BCG 鑑定。然若為病理或臨床檢體萃取之 DNA，則須先鑑定為 MTBC 後，再逐步鑑定是否為 BCG strain。主要是利用偵測 *pncA* 基因序列是否有 nucleotide 169 C to G 的 SNP 存在以鑑別為 *M. bovis* Family【3】，再進一步利用 multiplex BCG PCR【4】及定序確認是否為 BCG strain。也由於已知 *M. bovis* Family 之 *pncA* nucleotide 169 C to G 的 SNP 與 PZA 抗藥有關，因此正確診斷出 *M. bovis* Family 亦有助於臨床醫師的正確用藥。目前病理檢體於 DNA 萃取後，至少須經四次 PCR 反應 (real-time PCR、IS6110 sequencing、*pncA* sequencing、multiplex BCG PCR and sequencing) 及定序方可獲得檢驗結果。

由於病理檢體量有限，且 DNA 濃度相當低，為了縮短檢驗時效並且能以有限的檢體量進行快速檢驗，此計畫根據本實驗室已發表的 *M. bovis* Family 專一性 single nucleotide polymorphism (SNP)，*fbpA*³¹¹ GGC→GGG，及 *M. bovis* BCG strain 專一性 SNP，*fbpB*¹⁴⁰ TTC→CTC【5】(如下圖)，利用本實驗室已應用於多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 結核菌分子快速檢測之高效率液態診斷平台 (microsphere-based suspension assay) 系統，針對 2010 年 70 件送驗病理或臨床檢體進行分析與方法建立，期能加速並有效的鑑別診斷 BCG，以提供臨床診斷及治療參考。



結核菌群世系(Lineage)專一性SNPs (黃色底標示者為*M. bovis* Family及BCG疫苗株鑑別之SNPs)

二、材料與方法

1. 檢體來源

以 2010 年送驗疑似卡介苗鑑定之 70 件病理及臨床檢體萃取之 DNA 為本研究之樣本進行分析。

2. 偵測標的基因之引子設計與多重聚合酶連鎖反應最佳化條件建立

(1) 引子的設計

利用 PREMIER 軟體，針對 *fbpA* codon 311 之 nucleotide 933 及 *fbpB* codon 140 之 nucleotide 418 SNPs 進行多重聚合酶連鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction, multiplex PCR) 及 Allele-Specific Primer Extension (ASPE) 反應引子設計，另亦根據文獻【6】合成 MTBC 專一性之 *rpoB* 引子，做為 MTBC positive control 用。引子序列詳如表一。

(2) 多重聚合酶連鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction, multiplex PCR)

以 QIAGEN multiplex PCR 試劑組進行 3 對引子之 multiplex PCR 實驗，單一反應管 PCR 液分別配製如下：

試劑	體積 (μL)
無菌水	6.00
2X PCR master mix	12.50
50 mM MgCl ₂	0.25
Primer mix (2 μM for each)	1.25
檢體萃取之 DNA	5.00

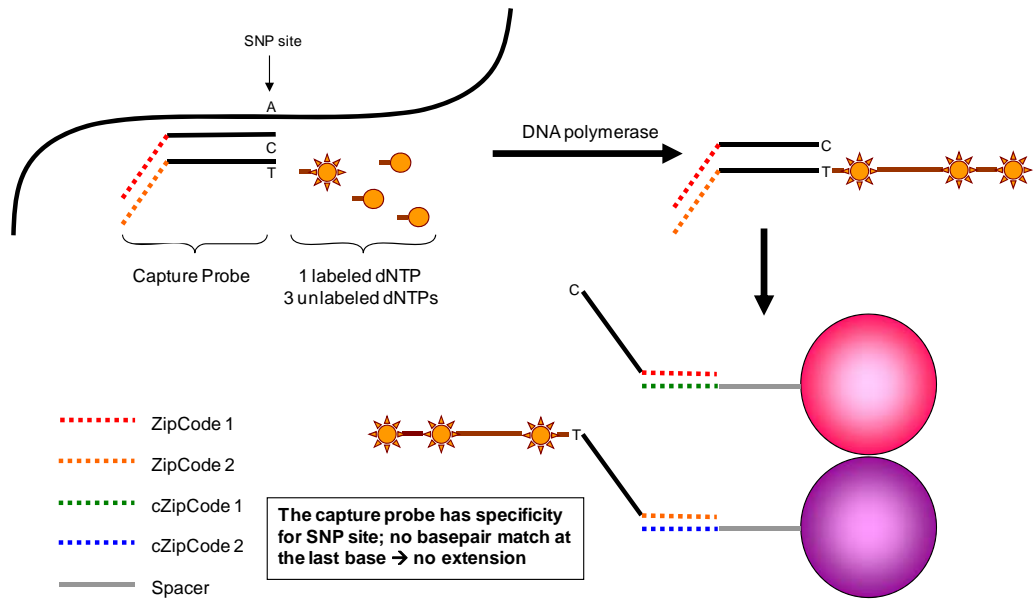
總體積	25.00
-----	-------

PCR 程式：

步驟	溫度	時間
1	95 °C	15分鐘
2	94 °C	30秒
3	65 °C	90秒
4	72 °C	30秒
步驟2至4循環重複50次		
5	72 °C	10分鐘
6	4°C	∞

(3) Allele-Specific Primer Extension (ASPE) 最佳化條件反應建立

先將 multiplex PCR 反應管內之殘留引子及 dNTPs 去除：取 5 μL multiplex PCR 產物混合 0.5 μL 之 alkaline phosphatase (1 U/ μL) 及 0.05 μL 之 Exonuclease I (5U/ μL)，於 37°C 反應 30 分鐘後，並以 80°C 去活化反應 15 分鐘。接著將處理過的 multiplex PCR 產物以專一性的 ASPE primers 進行反應以偵測特定的 SNPs。ASPE 之原理如下圖所示：



配製 2X ASPE 單一反應液如下：

試劑	體積 (μL)
無菌水	5.10
10X ASPE reaction buffer	2.00
50 mM MgCl ₂	0.50
20X d(A,T,G)TP mix (100 μM for each)	1.00
400 μM biotin-dCTP	0.25
20X ASPE primer mix (500 nM for each)	1.00
5 U/μL Tsp DNA polymerase	0.15
總體積	10.00

配製 1X ASPE 單一反應液如下：

試劑	體積 (μL)
無菌水	5.00

2X ASPE 反應液	10.00
處理過之 PCR 產物	5.00
總體積	20.00

ASPE 反應條件：

步驟	溫度	時間
1	96 °C	2分鐘
2	94 °C	30秒
3	58°C	60秒
4	74°C	120秒
步驟2至4循環重複40次		
5	4 °C	∞

(4) 高效率液態診斷平台偵測系統建立

取各 SNP 偵測用之特定微珠 (microsphere) 共 5 種，利用 2X hybridization buffer 稀釋至每個反應管含每種微珠 200 beads，總體積為 25 uL，加入 5 μL ASPE 反應產物，並補 5 μL 無菌水至總體積 50 μL，於 96°C denature 90 秒，接著於 37°C 反應 30 分鐘。將反應產物移至 96 孔過濾盤，以 75 μL 1X hybridization buffer 清洗微珠，共清洗兩次後，加入含 2 μg/mL streptavidin-R-phycoerythrin (SAPE) 之 75 μL 1X hybridization buffer，於 37°C 反應 15 分鐘後進行 SNP 偵測。每種 beads 收集 20 顆偵測，每一反應管檢體至多偵測 90 秒。偵測結果以 Allelic Ratio 表示：SNP 之 Allelic Ratio_{SNP1}=

$MFI_{SNP1}/(MFI_{SNP1}+MFI_{SNP2})$ 。Allelic Ratio >0.75 代表該 SNP 存在，Allelic Ratio <0.25 代表該 SNP 不存在，Allelic Ratio 介於 0.25 與 0.75 之間代表有 SNP 與 wild type 同時存在。

三、結果

1. 高效率液態診斷平台 SNP 偵測極限

首先以標準菌株 *M. tuberculosis* H37Rv 及 *M. bovis* BCG strain 之 DNA 進行 3 組引子之 multiplex PCR 測試。反應結果如圖一所示，3 個預期 PCR 產物為 360 bp (*rpoB*)、634 bp (*fbpA*)、682 bp (*fbpB*)，顯示引子可正確的放大 3 個標的基因產物。

接著將 *M. tuberculosis* (H37Rv)、*M. bovis*、*M. bovis* BCG strain 之 DNA 自 10^{-10} g/ μ L 進行 10 倍系列稀釋至 10^{-16} g/ μ L，各取 5 μ L 進行 multiplex PCR 及 ASPE 反應以分析 SNPs 偵測極限。結果顯示 5 個 SNPs (2 個為 *fbpA* codon 311 wild type 及 mutant、2 個為 *fbpB* codon 140 wild type 及 mutant、1 個為 *rpoB* MTBC positive control) 皆可偵測到 5×10^{-14} g (即 50 fg) 原始 DNA 含量之 PCR 產物 (圖二)，且各 SNP 之 Allelic Ratio 皆在 0.75 以上 (可達 0.9 以上) (圖三)，顯示高效率液態診斷平台系統之高敏感性與特異性。

2. 高效率液態診斷平台之專一性

為確保 SNP 偵測之專一性，選取 6 株常見之非結核分枝桿菌 (nontuberculous mycobacterium, NTM) 進行分析，包括：*M. avium*、*M. abscessus*、*M. chelonae*、*M. fortuitum*、*M. goodii*、*M. kansasii*。SNP 偵測結果皆為陰性，顯示此方法之高專一性。

3. 70 件病理檢體萃取之 DNA 樣本 SNP 分析結果

70 件病理檢體為 62 位病患之送驗檢體，其中 8 人送驗 2 件檢體。查結核病個案管理系統，62 位個案中，3 位為 NTM、8 位為 BCG 者通報予以排除(皆 5 歲以下個案)、7 位為醫師診療予以排除、38 位無以上註記、6 位未通報。

針對 70 件病理檢體萃取之 DNA，將利用高效率液態診斷平台進行 SNP 偵測分析結果，與原本以本實驗室常規分子檢驗流程檢驗之結果相比較 (表二)：

(1) 3 件 NTM 個案之檢體：

以目前實驗室常規分子檢驗及 SNP 偵測分析，結果皆為陰性。

(2) 8 位 BCG 排除個案之檢體：

以常規分子檢驗結果可得：5 件檢測為 BCG、其餘 3 件檢體可能因受限於核酸濃度或當時病理組織切除部位，1 件僅可分析至 MTBC (即無法進一步鑑別為 *M. bovis* 或 BCG strain)、2 件為陰性。5 件常規分子檢驗鑑定為 BCG 者，於本計畫之 SNP 分析可檢測出 4 件，另 1 件僅得 MTBC 之結果。然常規分子檢驗 1 件為 MTBC 及 1 件為陰性者，SNP 分析可分別檢測為 BCG 及 *M. bovis* Family，另一件常規分子檢驗為陰性者，SNP 分析結果亦為陰性。

(3) 7 位醫師診療排除個案之檢體：

以常規分子檢驗有 1 件可鑑別至 *M. bovis* family，6 件結果為陰性。然以 SNP 分析結果皆為陰性。

(4) 38 位無特別註記個案之檢體：

包括 6 件為同人之第 2 件檢體，共計 44 件檢體。

(A) 以常規分子檢驗有 7 件可檢測為 *M. tuberculosis*，其中 6 件以 SNP 分析亦為 *M. tuberculosis*，1 件僅檢測至 MTBC。

(B) 以常規分子檢驗有 4 件僅檢測至 MTBC，以 SNP 分析有 1 件可進一步檢測為 *M. tuberculosis*。

(C) 以常規分子檢驗有 33 件為陰性，其中有 1 件以 SNP 分析可檢測為 BCG，其餘結果亦為陰性。

(5) 6 位未通報個案之檢體：

包括 2 件為同人之第 2 件檢體，共計 8 件檢體。

(A) 以常規分子檢驗有 1 件為 BCG，以 SNP 分析結果亦同。

(B) 以常規分子檢驗有 2 件僅檢測至 MTBC 者，以 SNP 分析可得 1 件為 MTBC，1 件為陰性。

(C) 其餘 5 件常規分子檢驗與 SNP 分析結果皆為陰性。

4. 高效率液態診斷平台檢測 70 件病理檢體之整體檢測率 (表三)：

(1) 以常規分子檢驗 70 件檢體中，檢測出 6 件 BCG、1 件 *M. bovis* family、7 件 *M. tuberculosis*、7 件 MTBC，檢測率分別為 8.6%、1.4%、10.0%、10.0%。

(2) 以 SNP 分析相同 70 件檢體，檢測出 7 件 BCG、1 件 *M. bovis* family、7 件 *M. tuberculosis*、6 件 MTBC，檢測率分別為 10.0%、1.4%、10.0%、8.6%。

(3) SNP 分析與目前常規分子檢驗之檢出率無顯著的差異。然 70 件

檢體中，有 4 件檢體以 SNP 分析結果優於常規分子檢驗；有 3 件檢體則是略差於常規分子檢驗。

四、討論

本研究結果顯示，利用高效率液態診斷平台系統可進行單次快速檢測，且檢出率與現行之分子檢驗流程結果相當，顯示此 SNP 分析系統之可行性。利用標準菌株萃取之 DNA 進行系列稀釋分析此高效率液態診斷平台 BCG SNP 鑑別系統之偵測極限可達 50 fg，與本實驗室同仁先前測試之 IS6110 real-time PCR 偵測極限相同，顯示此平台之高敏感度。同時亦針對 NTM 進行專一性檢測，結果亦顯示無非專一性的反應。

由於本研究主要針對病理或臨床檢體萃取之 DNA 進行分析，以 IS6110 real-time PCR 分析此等 70 件檢體之 Ct 值乃介於 31.23 至 39.98，MTBC DNA 含量較低。與目前常規分子檢驗結果相比，有 4 件檢體以 SNP 分析結果優於常規分子檢驗：

- (1) 1 件 Ct 值為 34.23、常規分子檢驗結果為 MTBC、SNP 分析結果為 *M. tuberculosis*，與此檢體之個案送驗之另一件檢體，常規分子檢驗及 SNP 分析結果皆為 *M. tuberculosis* 之結果一致。
- (2) 1 件 Ct 值為 39.98、常規分子檢驗結果為 MTBC、SNP 分析結果為 BCG，此檢體之個案經查個管系統為 BCG 感染者於通報系統排除。
- (3) 1 件 Ct 值為 undetected、常規分子檢驗為陰性、SNP 分析可至 *M. bovis* Family，該個案查個管系統為 BCG 感染者。
- (4) 1 件 Ct 值為 undetected、常規分子檢驗為陰性、SNP 分析可至 BCG，該個案於管理系統無特別註記。

由以上比對結果可知，高效率液態診斷平台系統所建立之 SNP 分析

方法即使是 Ct 值高於 38.0 以上，仍有機會可被檢測出，顯示此平台之高敏感度。

另有 3 件檢體則是 SNP 分析結果略差於常規分子檢驗：

- (1) 1 件 Ct 值為 38.63、常規分子檢驗結果為 *M. tuberculosis*，然於 SNP 分析結果僅至 MTBC。
- (2) 1 件 Ct 值為 38.72、常規分子檢驗結果為 BCG，然於 SNP 分析結果僅至 MTBC。
- (3) 1 件 Ct 值為 39.69、常規分子檢驗結果為 MTBC，然於 SNP 分析結果為陰性。

由以上結果可知當病理或臨床檢體萃取之 DNA 以 IS6110 real-time PCR 偵測 MTBC 於 Ct 值 38.0 以下時，此高效率液態診斷平台可正確並快速的鑑別 *M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. bovis* BCG strain，即使是 Ct 值介於 38.0 至 39.0 間，仍至少可檢測至 MTBC。

利用此高效率液態診斷平台建立之 BCG 快速鑑別系統雖先以 in house multiplex PCR 方法再進行後續平台分析，multiplex PCR 為使用高效率之商品試劑組，將反應條件最佳化後之 PCR 成功率可趨近 100%，且後端 ASPE 分析之高效率液態診斷平台具有高敏感性與專一性，目前已逐漸應用在蛋白質與核酸檢測分析，因此本研究之成果相較於常規分子檢驗方法，流程較為簡單並可縮短檢驗時間並降低成本，可建立為標準檢驗方法，推廣至臨床實驗室檢驗用。

由於臨床醫師須有相當的臨床經驗與敏感度才可完全藉由臨床診療鑑別 BCG 感染者，因此實驗室檢驗所提供更敏感、更快速、更正確的檢

驗結果，將可協助臨床醫師正確診斷與用藥治療。

五、結論與建議

根據本研究的結果，針對病理或臨床 MTBC 含量較低的檢體，利用高效率液態診斷平台系統可快速並正確進行 BCG 分子鑑別。此系統之檢測率與目前常規分子檢驗結果相當，然具有流程簡化，且所需之檢體量與檢驗時間較少、檢驗成本亦較低等優點。相較於 real-time PCR 系統，具有相同的偵測靈敏度，但可於單一反應管完成多個 SNP 偵測。若欲以 real-time PCR 系統進行檢測，則會受限於偵測螢光數目的限制，需以多個反應管完成，相對所需檢體量及試劑量將較多。

利用此研究成果所建立的快速 BCG 分子鑑別系統，可協助臨床醫師針對五歲以下疑似卡介苗不良反應個案所送驗之臨床病理檢體進行 BCG 診斷，給予病人適當積極的治療，減少用藥錯誤的機會。而針對其他肺外結核之病理檢體，除傳統的培養檢驗外，亦可提供快速的分子檢驗系統，以快速鑑別 *M. tuberculosis*、*M. bovis* Family，正確用藥以將病人完治。

六、計畫重要研究成果及具體建議

本研究的結果主要為針對病理或臨床 MTBC 含量較低的檢體，利用高效率液態診斷平台系統可快速並正確鑑別 *M. tuberculosis*、*M. bovis* Family、BCG strain。

此系統之偵測極限可達 50 fg，並具有流程簡化的優點，可建立標準檢驗方法並於臨床實驗室應用。

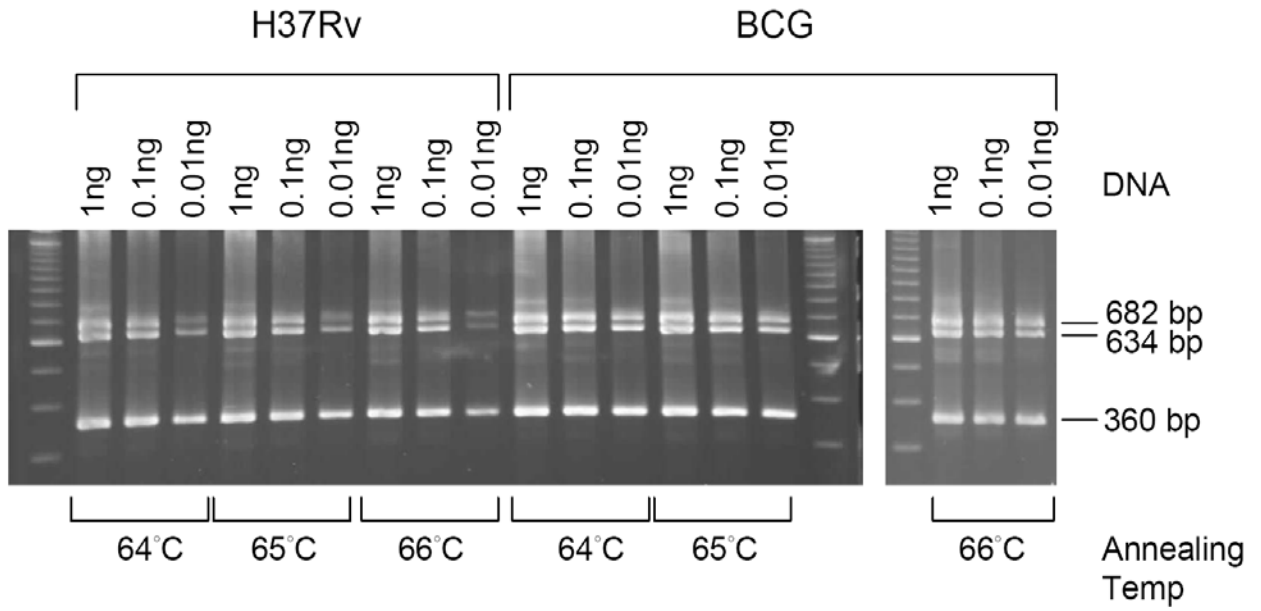
此方法可提供臨床醫師針對懷疑可能為卡介苗不良反應或是其他肺外結核之病患檢體進行實驗室檢驗，可做為醫師進行臨床診斷之依據。

七、參考文獻

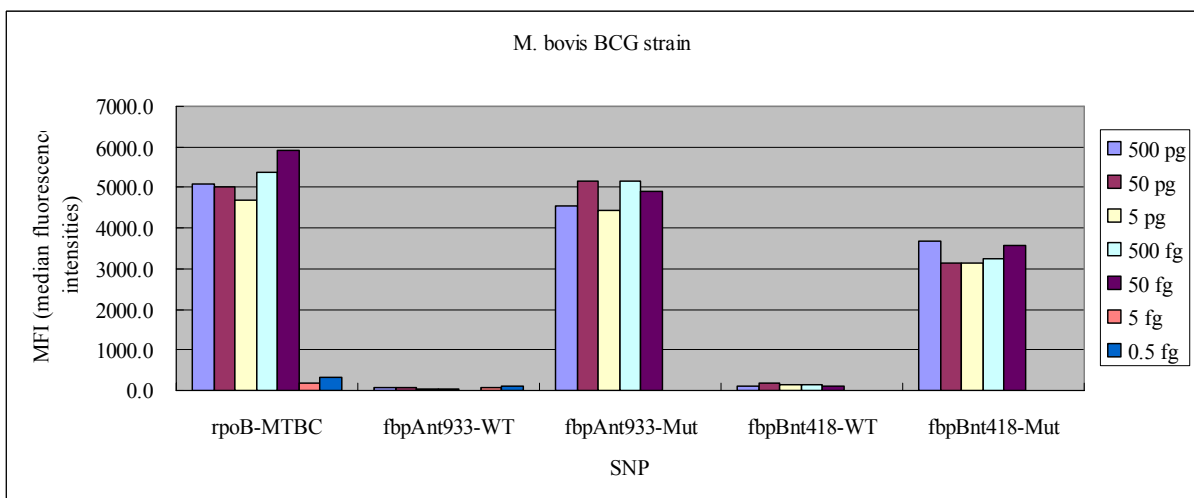
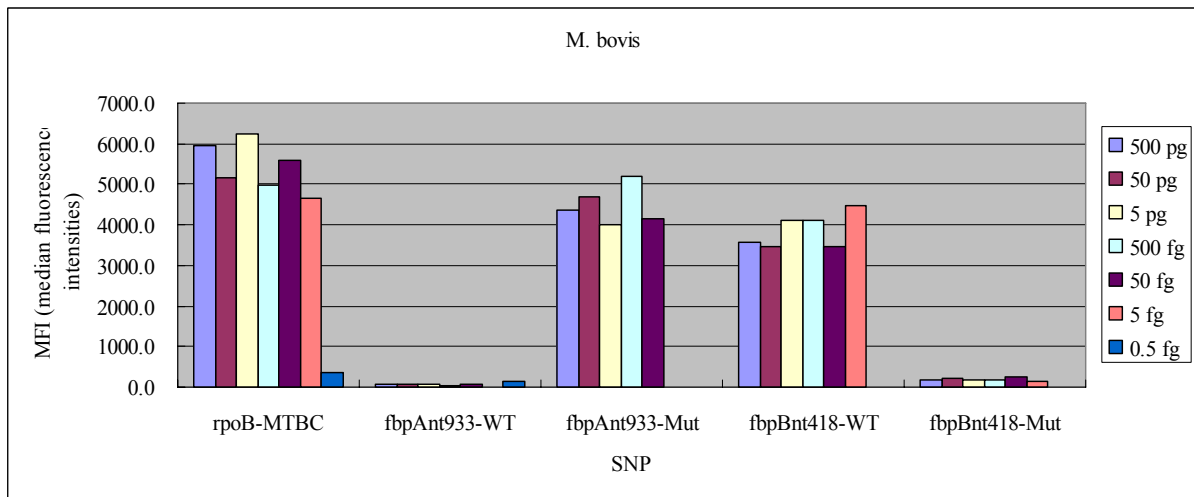
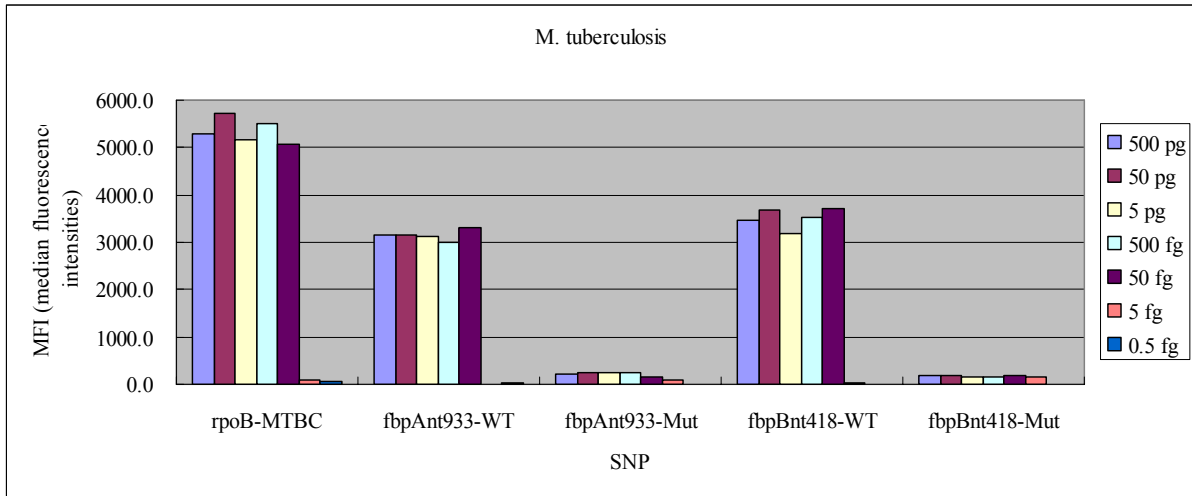
1. Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914.
2. Brudey, K., J. Driscoll, L. Rigouts, W. Prodinger, A. Gori, S. Al-Hajoj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. Gomes, M. C. Gutierrez, P. Hawkey, P. van Helden, G. Kadival, B. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, H. Ly, C. Martin, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaia, Y. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofo-Razanamparany, T. Rasolonavalona, M. L. Rossetti, S. Rusch-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. Shemyakin, U. Singh, A. Somoskovi, R. Skuce, D. van Soolingen, E. Streicher, P. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. Victor, R. Warren, S. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology* 6:23.
3. Scorpio, A., D. Collins, D. Whipple, D. Cave, J. Bates, and Y. Zhang. 1997. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J. Clin. Microbiol.* 35:106-110.
4. Yeboah-Manu, D., M. D. Yates, and S. M. Wilson. 2001. Application of a Simple Multiplex PCR To Aid in Routine Work of the Mycobacterium Reference Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 39:4166-4168.
5. Chuang PC, Chen YM, Chen HY, Jou R. 2010. Single nucleotide polymorphisms in cell wall biosynthesis-associated genes and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* lineages. *Infect Genet Evol.* 10(4):459-466.
6. Lee H, Bang HE, Bai GH, Cho SN. 2003. Novel polymorphic region of the rpoB gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 41:2213-2218.

八、圖、表

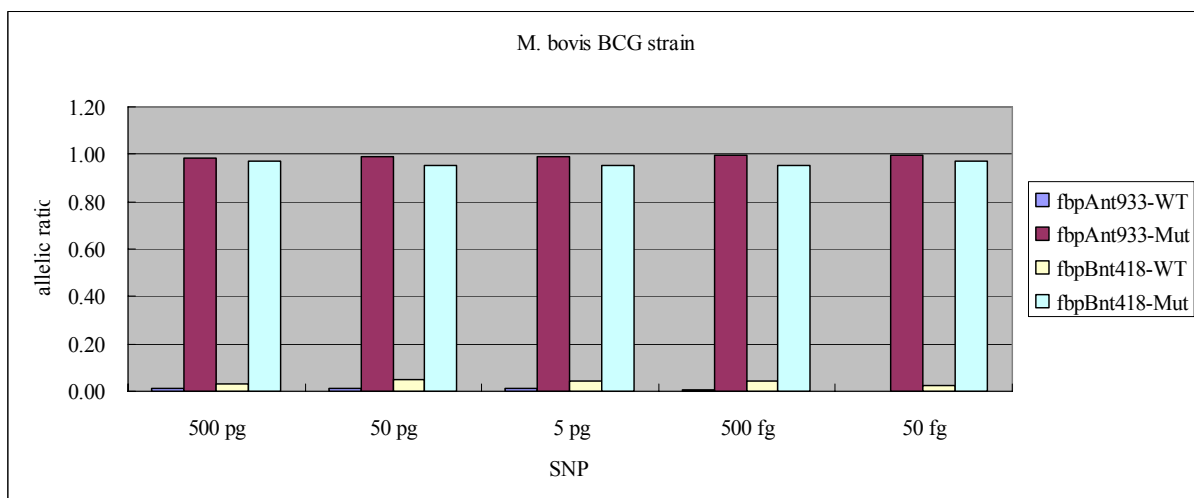
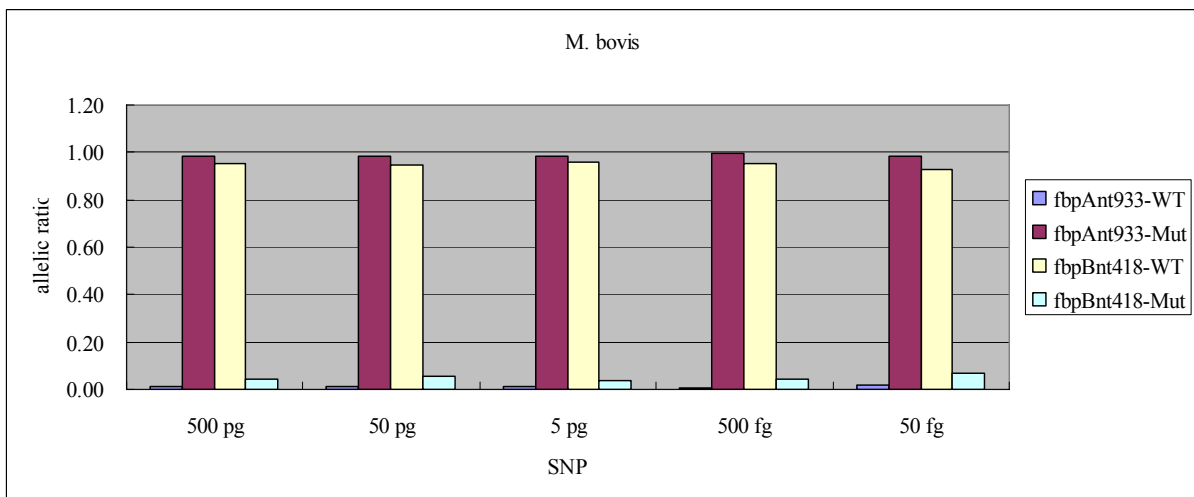
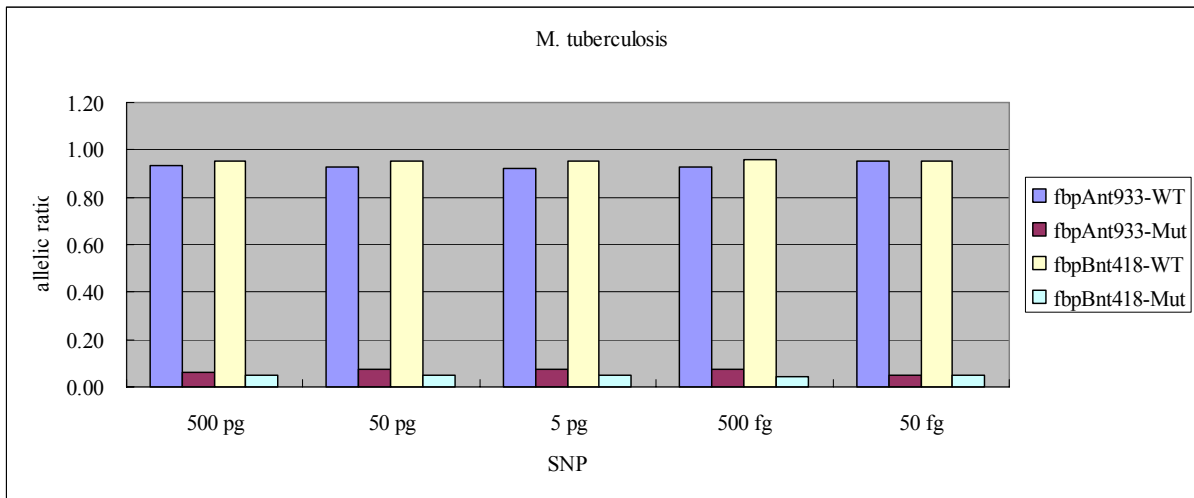
圖一、以標準菌株 *M. tuberculosis* H37Rv 及 *M. bovis* BCG strain 之 DNA 進行 3 組引子之 multiplex PCR 結果



圖二、*M. tuberculosis* complex、*M. bovis* Family、*M. bovis* BCG strain SNP s 鑑別用高效率液態診斷平台偵測極限結果 (Median Fluorescence Intensities, MFI)



圖三、*M. tuberculosis* complex、*M. bovis* Family、*M. bovis* BCG strain SNP s 鑑別用高效率液態診斷平台偵測極限結果 (Allelic Ratio)



表一、*M. tuberculosis* complex、*M. bovis* Family、*M. bovis* BCG strain SNPs 鑑別用 multiplex PCR 及 ASPE 引子序列

Gene	Codon	WT allele	Mutant allele	Primer	Sequence	Site	Product (bp)
<i>fbpB</i>	140	TTC	CTC	F-primer	AACTCACCTGCGGTTTATCTG	214-234	682
				R-primer	TGGGCGGGAAGTTGAACAC	877-895	
				ASPE-Mut	AATCAACACACAATAACATTCATA-CAGACTTACAAGTGGGAAACCC	396-418	
				ASPE-WT	CAAACAAACATTCAAATATCAATC-GACTTACAAGTGGGAAACCT		
<i>fbpA</i>	311	GGC	GGG	F-primer	GCTTCTACTCCGACTGGTAC	359-378	634
				R-primer	GTGTTGGGCGTGGCACCC	975-992	
				ASPE-WT	ACATCAAATTCTTTCAATATCTTC-AGCTGGGAGTACTGGGGC		
				ASPE-Mut	TTAACAACTTATACAAACACAAAC-AGCTGGGAGTACTGGGGG		
<i>rpoB</i>				F-primer	TCAAGGAGAAGCGCTACGA	884-902	360
				R-primer	GGATGTTGATCAACGTCTGC	1224-1243	
				ASPE-MTBC	CTTTCTCATACTTTCAACTAATTT-CATGTCGGCGAGCCC	949-963	

表二、個案分類之高效率液態診斷平台 SNP 分析結果與常規分子檢驗結果比較

病人於個案管理系統之註記	SNP 分析結果	常規分子檢驗結果				總計	
		BCG	<i>M. bovis</i> Family	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC		陰性
NTM	陰性					3	3
小計						3	3
BCG 排除	BCG	4			1		5
	<i>M. bovis</i> Family					1	1
	MTBC	1					1
	陰性					1	1
小計		5			1	2	8
醫師診療排除	陰性		1			6	7
小計			1			6	7
完成管理/其他完治/未註記	BCG					1	1
	<i>M. tuberculosis</i>			6	1		7
	MTBC			1	3		4
	陰性					32	32
小計			7	4		33	44
未通報	BCG	1					1
	MTBC				1		1
	陰性				1	5	6
小計		1			2	5	8
總計		6	1	7	7	49	70

表三、高效率液態診斷平台 SNP 分析結果與常規分子檢驗之檢測結果比較

SNP 分析結果	常規分子檢驗結果					總計
	BCG	<i>M. bovis</i> Family	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC	陰性	
BCG	5			1	1	7 (10.0%)
<i>M. bovis</i> Family					1	1 (1.4%)
<i>M. tuberculosis</i>			6	1		7 (10.0%)
MTBC	1		1	4		6 (8.6%)
陰性		1		1	47	49 (70.0%)
總計	6 (8.6%)	1 (1.4%)	7 (10.0%)	7 (10.0%)	49 (70.0%)	70

黃底代表 SNP 分析結果優於常規分子檢驗

灰底代表 SNP 分析結果差於常規分子檢驗