計畫編號：DOH93-DC-1003

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

建立 Mycobacterial Interspersed Repetitive Units(MIRU)自動化大量分子分型方法及進行流行病學研究

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、莊錦戀

執行期間： 93 年 1 月 1 日 至 93 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	3 - 8
中文摘要	3 - 5
英文摘要	6 - 8
(2) 本文	9 - 25
前言	9 - 14
材料與方法	15 - 18
結果	19 - 21
討論	22 - 24
結論與建議	25
(3) 參考文獻	26 - 29
(4) 表	30 - 37
表一	30
表二	31
表三	32-34
表四	35
表五	36-37
(5) 圖	38
圖一	38
(6) 附錄	39

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、Variable-Number Tandem Repeat typing (VNTR) 與 Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) 分型法。VNTR 與 MIRU 的基本原理相同，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 MIRU 法並並將之進行自動化。

研究方法

本計畫研究菌株包括 2002 至 2003 年分離自成大醫院 203 位病人之 493 肺結核分枝桿菌菌株。本計畫將選用 12 個基因位點，分成四組，利用 multiplex 聚合脢連鎖反應(PCR)法將此 12 基因位點基因放大，利用自動化核酸分析儀，以毛細管電泳分析 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，每一菌株可得到一

12 數字構成之分型代號，不同菌株之分型代號不同。另外，我們亦進一步探討利用 VNTR 及 MIRU 結果以偵測臨床微生物實驗室結核桿菌培養偽陽性結果的可行性。

主要發現

在來自 203 位病人 493 株結核菌研究菌株中，利用 VNTR，可得到 54 型；利用 MIRU，可得到 106 型；綜合 VNTR 與 MIRU，總共可分出 125 型。在 125 種 VNTR-MIRU 型中，有 106 型僅出現在單一病人，有 2 型出現在 4 及 8 位病人，有 1 型出現在 3、12 及 39 位病人。根據文獻上使用之標準以及 VNTR 及 MIRU 結果，我們找到一個疑似偽陽性結果以及四個可能為偽陽性結果。

結論及建議事項

(1) 本研究計畫建立了肺結核分枝桿菌 MIRU 菌株分型技術，可作為流行病學追蹤與研究用。

(2) VNTR 技術的分型能力遠不及 MIRU 技術，VNTR 加上 MIRU 法的分型能力又較僅使用 MIRU 技術好。因此若要得到最好的肺結核菌分型結果，應同時進行 VNTR 與 MIRU 分型。

(3) VNTR-MIRU 分型法可運用在臨床實驗室，作為分析肺結核菌實驗室交互污染問題的工具。

(4) 由於發現有些較常出現的 VNTR-MIRU 型，是否有流行病學上的關係，應進一步研究。

關鍵詞：肺結核分枝桿菌；限制酵素切割片段多型性分型法；不等數目串聯重覆基因；分枝桿菌散佈性重覆單位

英文摘要

Purpose

In Taiwan, tuberculosis remains an important treat 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, variable-number tandem repeats (VNTR) typing, and mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) typing. The VNTR and MIRU methods are based on the fact that there are variable numbers of tandem repeats among different strains of *M. tuberculosis*. The purpose of the present project is to develop an automated MIRU method.

Materials and Methods

Test organisms included 493 *M. tuberculosis* isolates from 203 patients collected between 2002 and 2003 at the Department of Pathology, National Cheng Kung University Hospital. Twelve targets were selected for MIRU analysis. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays were performed to amply these genes, followed by capillary electrophoresis on an automated DNA analyzer 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 MIRU type with a 12-digital number, which is derived

from 12 numbers of tandem repeats of five targets, is given for each isolate. Susceptibility tests were performed with the proportion method. We also used the VNTR-MIRU analysis to investigate the laboratory cross contamination by *M. tuberculosis*.

Results

Among 493 isolates of *M. tuberculosis* from 203 patients, 54 and 106 types were obtained by VNTR and MIRU typing, respectively. When the results of VNTR and MIRU were combined, 125 VNTR-MIRU types were obtained. Among the genotypes, four VNTR-MIRU types were shared by eight to 32 nonrepetitive isolates, and the remaining 121 types were representative by a single isolate or were shared by isolates from two to four patients. One presumed false positive and four possible false positives were detected by the VNTR-MIRU analysis and clinical analyses.

Conclusions and Suggestions

In this study, an automated MIRU method for typing *M. tuberculosis* has been developed. The MIRU method has been shown to be more discriminatory than the VNTR method, and the combined used of MIRU and VNTR methods were found to be more discriminatory than the use of MIRU typing alone. The VNTR-MIRU method can be used not only for epidemiological studies on tuberculosis but also for investigation of laboratory cross-contaminations by *M. tuberculosis*. More studies are needed to investigate the links among the isolates showing the same genotypes, the most common genotype in particular.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*；restriction-fragment length polymorphism；Variable-Number Tandem Repeat; Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

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 (INH) 及 Rifampin (RMP) 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，IS*6110*，在不同菌株的染色體上插在不同位置。IS*6110* 基因內有一 *Pvu*II 限制酵素可切割的位置，因此，用 *Pvu*II 切割結核菌染色體，將切割後 DNA 移轉至雜交膜，然後取至 IS*6110* 基因橫跨 *Pvu*II 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 IS*6110* 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 IS*6110* 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。利用聚合脢連鎖反應法 (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 IS*6110* 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(loci)，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。

(四) 自動化 Mycobacterial Interspersed Repetitive Units 分型技術(MIRU 法) [16-19]

MIRU 法之原理與 VNTR 法相同，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，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。其差異僅在於 MIRU 法所使用之基因位點數目較多(12 位點)，兩方法使用之基因位點不同 (僅兩位點相同)。由於 MIRU 法使用較多位點，

因而可得到比 VNTR 法較多的菌株分型。有研究指出，MIRU 法甚至比限制酵素片段多形性分型法可得到較多的分型(80 vs. 58 型/180 株肺結核分枝桿菌)[16]。由於使用了 12 個基因位點，需耗費較多的人力操作與判讀結果。為了改善此方法，有人使用 multiplex PCR 法，將 PCR 引子一端分別以三種不同螢光染劑(FAM、HEX 與 NED)標示，使原先 12 次 PCR 反應減少為 4 次，再結合自動化基因分析儀器及電腦分析軟體進行結果分析判讀[19]。如此一來，此方法便可以快速地對大量菌株進行分型工作。

另外，尚有一些以 PCR 方法作為基礎的方法 [20, 21]，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。此外，比起限制酵素片段多形性分型法、spoligotyping 及 VNTR 分型法，這些方法的再現性(reproducibility)較差，。

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完成限制酵素片段多形性分型與 spoligotyping 方法的建立，基因資料庫亦正在設立當中。在 92 年疾病管制局計畫中，本實驗室負責 VNTR 方法之開發，目前此法已可被利用於結核分枝桿菌之分型。本計劃將進一

步發展自動化 MIRU 分型技術，以期台灣結核分枝桿菌之分型工作，達到更完善的境界，同時，進一步充實基因資料庫之菌株分型資料。

材料與方法

(一) 研究菌株

本計畫研究菌株第一年將包括 90-91 年分離自成大醫院之肺結核分枝桿菌菌株。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，將之次培養於固體培養基 Middlebrook 7H11，再將菌株收集於-70 °C。

(二) 菌株 DNA 之萃取

(1) 將收集菌株取出，接種於 Middlebrook 7H11，待長出菌落後，直接從 Middlebrook 7H11 取一環之分離菌於含 200 µl digestion buffer 之微量管中。

(2) 於加熱板上將菌株以 100 °C 煮沸 45 分鐘以滅菌。以商品化之 DNA 萃取組進行菌株 DNA 抽取。

(三) MIRU 操作條件之建立 [16-18]

自動化 MIRU 法使用 multiplex PCR 法，將 PCR 引子一端分別以三種

不同螢光染劑(FAM、HEX 與 TAMRA)標示，使 12 次 PCR 反應減少為 4 次，再以自動化基因分析儀器進行結果分析。為避免 multiplex PCR 因條件問題，造成部份反應不完成或結果不佳，因此，首先先用未標示螢光染劑之 PCR 引子，藉由一般 agarose 瓊膠電泳分析，分別測試各組 PCR 引子適合的反應溫度與條件，以確定 PCR 反應沒問題。控制組之菌株為標準菌株 H37Rv。PCR 引子序列及各 MIRU 基因位點之 repeat 長度列於表一。

測試出各組 PCR 引子適合之反應條件範圍後，將 PCR 引子分為四組，MIRU4、26、40 為一組，MIRU10、16、31 為一組，MIRU 2、23、39 為一組，MIRU 20、24、27 為一組，分別進行 multiplex PCR，藉由一般 agarose 瓊膠電泳分析，以找出最佳之 PCR 反應條件。

(四) MIRU 法之自動化[19]

multiplex PCR 中，每一組含三對 PCR 引子，每一對引子各找出一條，分別用 FAM、HEX、NED 標示，然後，依照之前實驗得到之適當的 PCR 反應條件與溫度，進行 multiplex PCR。PCR 反應完畢，取 1 µl PCR 反應產物，加入 1.25 µl deionized formamide (PE Applied Biosystems, Taipei, Taiwan)、0.5 µl blue dextran-EDTA(PE Applied Biosystems)與 0.25 µl

Genescan 2500 Rox-labeled ladder (PE Applied Biosystems)，置於 95°C、2 分鐘後，置於冰上，用自動化基因分析儀器 ABI 310 (PE Applied Biosystems) 進行電泳，並以 GeneScan 與 Genotyper 軟體(PE Applied Biosystems)分析 PCR 反應產物大小。Genotyper 軟體運用於 MIRU 法之部份，將請 PE Applied Biosystems 程式師負責撰寫。每一菌株的結果儲存於 Excel 軟體中。待 MIRU 法之自動化系統建立後，首先將 90-91 年收集之菌株，利用 MIRU 法進行菌株分型。

(五) 分型方法比較：

將 MIRU 法分型結果與前一年度計劃中已完成 VNTR 分型結果及疾病管制局分枝桿菌實驗室已完成限制酵素片段多形性分型與 spoligotyping 方法之分型結果交由疾病管制局分枝桿菌實驗室進行分析，比較各方法分型能力，並將結果輸入疾病管制局分枝桿菌之基因資料庫。

(六) VNTR-MIRU 分型法之實際運用

MIRU 分型法建立後，我們進一步探討利用 VNTR 及 MIRU 結果以偵測臨床微生物實驗室結核桿菌培養偽陽性結果的可行性。偽陽性結果的判定，乃根據 Ruddy 等人所使用的標準[20]。假定偽陽性結果(presumed false

positive)的定義為：(1)病人僅有一套陽性結果；(2)檢體抗酸性染色結果為陰性；(3)陽性檢體在七天內有其他具有含相同 VNTR-MIRU 型結核菌的檢體送檢；(4)病人臨床各項證據顯示非感染結核菌者。可能偽陽性結果 (possible false positive) 的定義為：(1)病人僅有一套陽性結果；(2)檢體抗酸性染色結果為陰性；(3)陽性檢體在七天內有其他具有含相同 VNTR-MIRU 型結核菌的檢體送檢；(4)病人臨床各項證據顯示有可能為結核病患者。偽陽性結果的判定流程如圖一所示。首先，我們用 VNTR 方法，然後在加上 VNTR 方法，以探討僅使用 VNTR 方法便已足夠偵測偽陽性結果。

結果

MIRU 操作條件之建立

首先，我們測試各種不同 PCR 反應條件，以找出各引子皆適用的條件。經測試後，PCR 的條件如下：(1) 12.5 μL 之 PCR 混合液，其中包含 0.5 μL 結核菌 DNA，0.625 U 聚合酶，1.25 μL 含 $MgCl_2$ 之 10 倍 PCR 緩衝液，2.5 mM 之各 dNTP 與各 0.5 μL 之 10 μM 引子；(2)所有引子皆適用的反應條件為：96 °C，12 分鐘，1 cycle；94 °C，1 分鐘，55 °C，1 分鐘，72 °C，2 分鐘，30 cycles；72 °C，10 分鐘，1 cycle。PCR 反應後，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。

接下來，我們測試各種 multiplex PCR 反應條件，測試後採用的 MIRU 操作步驟與條件如下：

(1) 配置 24 μL 之 PCR 混合液，其中包含 1.25 U 聚合酶，2.5 μL 含 $MgCl_2$ 之 10 倍 PCR 緩衝液，2.5 mM 之各 dNTP 與各 0.5 μL 之 10 μM 引子

(2) 在 PCR 混合液中加入 1 μL 結核菌 DNA。

(3) PCR 反應機器為 Perkin-Elmer 9700 機型。各 multiplex PCR 適用的反應條件為：96 °C，12 分鐘，1 cycle；94 °C，1 分鐘，55 °C，1 分鐘，72 °C，2 分鐘，30 cycles；72 °C，10 分鐘，1 cycle。

(4) PCR 反應後，取 1 μL PCR 產物用 H_2O 作 20 倍稀釋。

(5) 取 1 μL PCR 產物稀釋液，加入事先配好之 2 μL loading buffer (1.25 μL deinoized formamide，0.5 μL blue dextran-EDTA，0.25 μL Genescan 2500 Rox-labeled 之大小標示)。

(6) 95ºC 加熱 10 分鐘後，立即置於冰上。

(7) 上機，用自動化基因分析儀器 ABI 310 (PE Applied Biosystems)進行電泳 1.5 小時。

(8) 電泳紀錄存在 GeneScan 軟體，然後用 Genotyper 軟體(PE Applied Biosystems)分析 PCR 反應產物大小。

各 MIRU 基因位點之各 allele 之 PCR 產物大小如表二所示。

MIRU 分型

我們總共分析了來自 203 位病人的 493 株結核菌，分型結果如表三所示。利用 MIRU 分型，總共可分出 106 種 MIRU 型。這 106 種 MIRU 型中，有 86 型僅出現在單一病人，有 12 型出現在兩位病人，有 2 型出現在 3 及 9 位病人，有 1 型出現在 4、7、19 及 39 位病人。

MIRU 與 VNTR 分型法之比較

這來自 203 位病人的 493 株結核菌，利用 VNTR 分型，總共僅能分出 54 種 VNTR 型。當 MIRU 與 VNTR 兩種分型法一起使用時，則可分成 125 型。這 125 種 VNTR-MIRU 型中，有 106 型僅出現在單一病人，有 2 型出現在 4 及 8 位病人，有 1 型出現在 3、12 及 39 位病人。

VNTR-MIRU 分型法之實際運用

我們進一步探討利用 VNTR 及 MIRU 結果以偵測臨床微生物實驗室

結核桿菌培養偽陽性結果的可行性。根據 Ruddy 等人所使用的標準以及 VNTR 及 MIRU 結果，我們找到一個疑似偽陽性結果以及四個可能為偽陽性結果，這些案例的臨床特性如表四所示。這五個案例造成偽陽性結果的原因，可能是由於檢體處理時，受到其他陽性檢體污染所致，因為這五個檢體與同一天處理的陽性檢體中，有含相同 VNTR-MIRU 型結核菌者。另外，我們從所有案例中，找出 15 個臨床懷疑可能是偽陽性結果，但根據 Ruddy 等人所使用的標準卻不被視為偽陽性結果之案例作進一步分析。我們發現，這 15 個案例中，有 12 個應確診為結核病，因為這些陽性檢體在送檢之前的 2 個月內，皆未出現含相同 VNTR-MIRU 型結核菌之檢體者；有 3 個案例可能也是偽陽性結果，因為在處理這些檢體當天，有相同 VNTR-MIRU 型結核菌被培養出來，且正進行次培養或正進行菌種鑑定者。

討論

本研究計畫的目的，在建立自動化 MIRU 的技術，以作為肺結核分枝桿菌菌株分型之工具之一，以作為流行病學之研究分析。此項技術相當簡單，只要具備一般 PCR 的技術即可；而且使用液體培養基養出來的菌即可，不需要繁瑣的抽取菌株 DNA 的步驟，因此也比較安全。最大的缺點是需要有昂貴的儀器才能自動化，這不是一般臨床實驗室可以負擔得起的。然而，若一般實驗室要進行 MIRU 分型，可用瓊膠電泳加上人工判讀，亦可得到不錯的結果。這種方式需要較大量的人力，比較適合小型實驗室，或研究菌株數量不多時使用，並不適合大規模流行病學研究時。

與去年度計劃中 VNTR 分型技術相比，VNTR 分型法的區分能力大概僅及 MIRU 技術的一半，顯示 MIRU 技術對不同來源菌株的區分能力遠高於 VNTR 的分型技術。然而，我們亦發現，光用 MIRU 法，可能仍無法將不同來源的菌株區分出來，因為當我們將 VNTR 分型結果加入 MIRU 分型結果後，可由原先 106 型增加為 125 型。因此若要得到最好的分型結果，應同時進行 VNTR 與 MIRU 分型。由於 VNTR 與 MIRU 兩種分型法中，有兩個基因位點是被重複使用的(MIRU-2 或 ETR-D 與 MIRU-31 或 ETR-E)，因此，事實上僅需要在 MIRU 分型法中再加入 3 個 VNTR 基因

位點即可。利用這 15 個基因位點在我們的研究菌株中，僅有 4 種 VNTR-MIRU 型(31433-222325153323、42435-223325173533、46464-253326223432、46464-254326223432)出現在超過 5 個病人(總共 60 個病人)，其餘 143 個案例，其分離之結核菌共可分出 121 種 VNTR-MIRU 型，此結果顯示 VNTR-MIRU 法適合作為流行病學之追蹤及尋找感染源之用。

臨床分枝桿菌實驗室的肺結核菌交互污染率是一確實存在但很難確定的問題。交互污染率，除了實驗室品管好壞外，依地區肺結核盛行率高低不同亦會有些差異，一般而言，不應超過 3%。由於台灣仍屬肺結核中高度盛行的區域，應該會存在肺結核菌實驗室交互污染的問題。在過去，關於實驗室交互污染問題的確認，大多使用 IS6110-RFLP 的方法，此方法步驟繁瑣，並不適合臨床分枝桿菌實驗室使用。因此，本研究亦進一步探討除了社區流行病學調查研究外，VNTR-MIRU 法是否可以運用在實驗室的品質確保。參考文獻上評估實驗室結核菌交互污染的方法，我們用 VNTR-MIRU 法找到了可能的污染源與被污染的檢體。此結果顯示，臨床分枝桿菌實驗室應該可以使用 VNTR-MIRU 法，評估實驗室的交互污染率。另外，由於結核病的臨床表現常呈現多樣性，造成診斷的困難。對於這些困難案例，應該可以利用 VNTR-MIRU 法去區分實驗室污染與真正陽

性的結果，以避免病人沒有或錯誤地接受抗結核藥物的治療。一般臨床分枝桿菌實驗室運用 VNTR-MIRU 技術在探討交互污染的問題時，由於研究菌株數量不會太大，應該可以使用瓊膠電泳以及人工判讀的方式便可達到目的，不見得需要有昂貴的自動化儀器才能夠進行。

在研究中，發現有兩 VNTR-MIRU 型(42435-223325173533、46464-254326223432)較常出現，這是否代表著流行病學上的意義，值得進一步研究。如果沒有流行病學上的意義，而是因為所用方法分型能力不足所致，則應繼續嘗試其它基因位點，找出變異性更大者，不僅增加菌株間區分能力，進一步更可減少 PCR 所需要的數目，以減少人力物力。

結論與建議

(1) 本研究計畫建立了肺結核分枝桿菌 MIRU 菌株分型技術，可作為流行病學追蹤與研究用。

(2) VNTR 技術的分型能力遠不及 MIRU 技術，VNTR 加上 MIRU 法的分型能力又較僅使用 MIRU 技術好。因此若要得到最好的肺結核菌分型結果，應同時進行 VNTR 與 MIRU 分型。

(3) VNTR-MIRU 分型法可運用在臨床實驗室，作為分析肺結核菌實驗室交互污染問題的工具。

(4) 由於發現有些較常出現的 VNTR-MIRU 型，是否有流行病學上的關係，應進一步研究。

(5) 應繼續嘗試其它基因位點，找出變異性更大者，以減少 PCR 所需要的數目。

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. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology. 1999 American Society for Microbiology, Washington, D. C.
3. Van Soolingen D, Hermans PWM, De Hass PEW, Sikk 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 IS*6110* 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 IS*6110*-restriction fragment length polymorphism analyses for

discrimination of high- and low-copy-number IS*6110 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 IS*6110*-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 IS*6110* 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
20. Ruddy M, McHugh TD, Dale JW, Banerjee D, Maguire H, Wilson P, Drobniewski F, Butcher P, Gillespie SH. Estimation of the rate of

unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2002;40:4100-4104.

21. 表一、MIRU 分型法所使用之引子序列

Multiplex PCR mixture	基因位點	Repeat 長度(bp)	引子序列(5’-3’)
A	4	77	CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC (FAM)
			GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC
	26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC (TAMRA)
			CATAGGCGACCAGGCGAATAG
	40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (HEX)
			GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
B	10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC (FAM)
			GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
	16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA (TAMRA)
			CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
	31	53	CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC (HEX)
			CGGAACGCTGGTCACCACCTAAG
C	2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT (FAM)
			TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
	23	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG (TAMRA)
			AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC
	39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC (HEX)
			CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
D	20	77	CTATAGTGACTTTTGCGGGA (FAM)
			TGCCGAAACCAATCACCGTT
	24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT (TAMRA)
			GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
	27	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA (HEX)
			GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA

表二、MIRU 各基因位點各 allele 大小

	MIRU 各基因位點各 allele 大小 (bp)												
Allele	2	4	4'	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
0	402	175	122	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	199	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	276	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	353	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483		696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560		749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637		802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714		855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791		908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868		961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945		1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022		1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099		1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176		1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253		1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330		1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

表三、MIRU 與 VNTR 型結果

MIRU 型																
2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	菌株數	病人數	VNTR 型	菌株數	病人數
1	2	3	3	2	6	1	5	3	2	2	10	4	1	22432		
1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	3	1	1	22532		
1	4	2	3	2	4	1	5	2	3	2	2	3	1	162453		
2	0	3	3	2	5	1	6	3	5	3	3	2	1	42405		
2	1'	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	1	1	42415		
2	2	1	3	2	5	1	5	3	3	2	3	2	1	31433		
2	2	1	3	2	5	1	5	3	5	3	3	2	1	42435		
2	2	1	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	1	42435		
2	2	1	3	2	7	1	5	2	3	2	1	4	1	31433		
2	2	2	1	2	3	1	5	3	3	2	3	2	1	31433		
2	2	2	1	2	5	1	4	1	3	2	3	4	1	31433		
2	2	2	2	2	4	1	5	3	3	2	3	6	2	31433		
2	2	2	2	2	4	1	6	3	3	2	3	1	1	31433		
2	2	2	2	2	5	1	4	3	3	2	3	3	1	21433		
2	2	2	2	2	5	1	5	2	3	2	3	2	2	31433		
2	2	2	2	2	5	1	5	3	2	2	3	5	1	21432		
2	2	2	2	2	5	1	5	3	3	1	3	1	1	31433		
2	2	2	2	2	5	1	5	3	3	2	2	1	1	31433		
2	2	2	2	2	5	1	5	3	3	2	3	9	2	31433		
2	2	2	2	2	5	1	6	3	3	2	3	4	1	31433		
2	2	2	3	1	5	1	5	2	3	2	3	3	1	31433		
2	2	2	3	2	1	1	5	3	3	1	2	1	1	31433		
2	2	2	3	2	2	1	5	3	3	2	3	1	1	31333		
2	2	2	3	2	3	1	5	3	3	2	3	3	1	31433		
2	2	2	3	2	4	1	5	3	3	2	4	1	1	31433		
2	2	2	3	2	4	1	7	3	5	3	3	1	1	42435		
2	2	2	3	2	5	1	11	3	3	2	3	1	1	31433		
2	2	2	3	2	5	1	3	3	3	2	3	1	1	31433		
2	2	2	3	2	5	1	4	2	2	2	3	7	1	31332		
2	2	2	3	2	5	1	4	3	3	2	3	5	1	21333		
2	2'	2	3	2	5	1	4	3	3	2	3	2	1	31423		
2	2	2	3	2	5	1	5	3	2	2	3	5	2	31432		
2	2	2	3	2	5	1	5	3	3	2	1	3	1	21433		
2	2	2	3	2	5	1	5	3	3	2	2	1	1	31433		
2	2	2	3	2	5	1	5	3	3	2	3	27	9	21433	5	1
														31433	22	8
2	2	2	3	2	5	1	5	3	3	2	4	4	2	31433		
2	2	2	3	2	5	1	6	3	3	2	2	1	1	31433		
2	2	2	3	2	5	1	6	3	3	3	1	1	1	31433		
2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	1	3	1	1	32435		
2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	3	42435		

2	2	2	3	2	5	1	8	3	3	2	3	1	1	31433		
2	2	3	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	1	32433		
2	2	3	3	1	5	2	7	3	3	3	1	5	1	42433		
2	2	3	3	2	4	1	3	3	4	3	3	1	1	41434		
2	2	3	3	2	4	1	6	3	5	3	3	6	1	42435		
2	2	3	3	2	4	1	7	3	5	3	3	3	1	42435		
2	2	3	3	2	5	1	11	3	3	3	3	4	1	42433		
2	2	3	3	2	5	1	4	3	5	3	3	17	3	42435		
2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	2	3	4	1	32435		
2	2	3	3	2	5	1	6	3	5	3	3	13	4	32435	10	3
														42435	3	1
2	2	3	3	2	5	1	6	3	5	3	4	7	2	42435		
2	2	3	3	2	5	1	7	2	4	3	3	5	1	42434		
2	2	3	3	2	5	1	7	3	3	2	2	2	1	42433		
2	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3	3	3	1	42433		
2	2	3	3	2	5	1	7	3	4	3	3	4	1	32434	3	1
														53434	1	1
2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	2	4	1	42435		
2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	44	19	32435	13	4
														41435	4	1
														42435	23	12
														42535	2	1
														52435	2	1
2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	4	2	1	32435		
2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	4	3	2	1	43435		
2	2	3	3	2	5	1	8	3	5	3	3	1	1	42435		
2	2	3	3	2	7	1	6	3	2	2	6	1	1	22432		
2	2	3	3	2	8	1	1	3	5	3	3	1	1	42435		
2	2	3	3	3	5	1	2	3	5	3	3	1	1	32435		
2	2	3	3	3	5	1	7	3	5	3	3	1	1	31235		
2	2	4	2	2	8	1	6	3	4	3	3	3	1	53434		
2	2	4	3	2	5	1	7	3	4	3	3	3	1	42434		
2	2	4	3	2	5	1	8	3	6	3	1	2	1	32436		
2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	1	3	1	1	32333		
2	2	6	2	2	5	1	4	3	3	3	3	2	1	53433		
2	2	6	2	2	5	1	7	3	4	3	3	2	1	53434		
2	2	8	2	2	5	1	4	3	4	3	3	3	1	52434		
2	2	8	2	2	5	1	5	3	4	3	3	5	2	53434		
2	2	8	2	2	5	1	7	3	4	2	3	5	2	52434		
2	2	8	2	2	5	1	7	3	4	3	3	2	1	53434		
2	2	8	2	2	5	1	8	3	4	3	1	3	1	53434		
2	2	2	2	2	5	2	5	3	3	2	3	1	1	31433		
2	3	2	3	2	5	1	4	2	3	2	2	2	1	42443		
2	3	2	3	2	5	1	5	3	2	2	3	1	1	43442		
2	3'	2	3	2	5		6	3	3	2	3	2	1	21433		

2	3	2	3	2	5	1	7	3	5	3	3	2	1	42445		
2	4	2	3	1	5	1	5	2	3	2	2	2	1	42453		
2	4	2	3	2	5	1	4	2	3	2	2	2	1	42453		
2	4	2	3	2	5	1	5	2	2	2	2	2	1	42452		
2	4	2	3	2	5	1	5	2	3	2	2	4	2	42453	2	1
														42553	2	1
2	4	2	3	2	5	1	5	3	3	2	3	1	1	42453		
2	4	2	3	2	5	1	5	2	3	2	2	5	1	51453		
2	4	2	3	2	5	1	5	2	3	2	2	2	1	162453		
2	4	3	3	2	5	1	7	3	5	3	4	4	1	42455		
2	4	4	3	2	6	2	2	3	4	3	3	1	1	46454		
2	5'	2	3	2	5	1	5	3	3	2	2	1	1	42453		
2	5	3	2	2	6	2	2	3	4	3	2	1	1	46464		
2	5	3	3	2	6	2	2	3	4	3	2	20	9	44464	1	1
														46464	19	8
2	5	4	3	1	6	2	2	3	4	3	2	2	1	46464		
2	5	4	3	2	2	2	2	3	4	1	4	3	1	43464		
2	5	4	3	2	5	2	2	3	4	3	2	1	1	47464		
2	5	4	3	2	6	2	2	1	4	3	2	5	2	46464		
2	5	4	3	2	6	2	2	2	4	3	2	1	1	46464		
2	5	4	3	2	6	2	2	3	3	3	2	4	2	47463		
2	5	4	3	2	6	2	2	3	4	2	2	22	7	42464	1	1
														43464	2	1
														45464	4	1
														46464	15	4
2	5	4	3	2	6	2	2	3	4	3	2	88	39	41464	2	1
														42464	1	1
														43464	1	1
														45464	2	1
														46364	1	1
														46464	75	32
														48464	4	1
														56464	2	1
2	5	4	3	2	6	2	4	3	4	2	2	2	1	41464		
2	6	4	2	2	6	2	2	2	4	3	2	2	2	43474		
2	5	4	3	2	6	2	2	3	4	3	2	1	1	46464		
2	7	4	4	2	6	2	2	3	5	3	3	1	1	71475		
2	8	4	3	2	6	2	2	3	4	3	2	4	1	46494		
2	8'	4	3	2	6	2	2	3	4	3	2	1	1	46484		

表四、疑似與可能是偽陽性結果之病患臨床表現

Case (VNTR/ MIRU profiles)	Specimen type[a]	Clinical data[b]	Anti-TB therapy	No. of possible source samples	Duration between submission of case and possible source samples	Interpre-tation[c]
A (32435/ 223325173534)	Sputum	Fever and right middle lobe infiltrates; resolved with cefuroxime; negative tuberculin skin test	No	1	Same day	Presumed CC
B (42435/ 223325173533)	Sputum	CXR suggested lung cancer or TB; lost to follow-up	No	2	Same day	Possible CC
C (47463/ 254326223332)	Sputum	Hemoptysis and increased lung markings; lost to follow-up	No	1	Same day	Possible CC
D (46464/ 254326223432)	CSF	Headache and consciousness disturbance; transferred to another hospital	Yes	4	Same day – 7 days	Possible CC
E (46464/ 254326223432)	BAL	CXR suggested lung cancer or TB; bronchoscopic biopsy showed negative findings; three sets of sputum culture were negative for *M. tuberculosis*	Yes	2	Same day	Possible CC

[a]CSF, cerebrospinal fluid; BAL, bronchoalveolar lavage.

[b]CXR, chest X-ray.

[c]CC, case of cross-contamination.

表五、15 個臨床懷疑可能是偽陽性結果案例之分析

Culture (VNTR/ MIRU profile)[a]	Specimen type	Clinical characteristics of patient	Initial diagnosis[b]	Anti-TB therapy	Detection of cultures[c] with the same profile	Interpre-tation[d]
F (31235/ND)	Sputum	Cough, fever, and left lower lobe infiltrate; improved with moxifloxacin	BP	No	No	NC
G (31433/ 222225153322)	Sputum	Fever and right lower lobe infiltrate; improved with piperacillin-tazobactam	BP	No	No	NC
H (31433/ 2223251-11-3323)	Sputum	Chronic renal failure; fever and right lower lobe infiltrate; blood cultures showed *Staphylococcus aureus*; improved with cephalexin	BP	No	No	NC
I (42435/ 223325183533)	Sputum	Chronic obstructive pulmonary disorder; dyspnea and right middle lobe consolidation; improved with amoxicillin-clavulanic acid	AP	No	No	NC
J (02453/ 242324252322)	Sputum	Persistent cough, fever, and right lower lobe infiltrate; improved with ceftazidime	BP	Yes	No	NC
K (42445/ND)	Pleural effusion	Persistent cough and pleural effusion; pleural biopsy revealed adenocarcinoma; fever, not responded to anti-TB therapy but improved with cefoxitin	Cancer with BP	Yes	No	NC
L (42415/ND)	Joint fluid	Systemic lupus erythematosus; normal chest radiograph; arthralgia, not responded to anti-TB therapy but improved with corticosteroids	Lupus arthritis or TB	Yes	No	NC
M (42435/ 223325183533)	Sputum	Hemoptysis and right upper lobe infiltrate; another sample isolated *Mycobacterium avium* complex	TB	Yes	No	NC

N (31433/ 222225153313)	Sputum	Dyspnea with pleural effusion; pleural biopsy revealed no evidence of TB	Cancer or TB	No	No	NC
O (42435/ 222325173533)	Sputum	Dyspnea and pleural effusion; expired before isolation of *M. tuberculosis*	AP	No	No	NC
P (42435/ 223325143533)	Urine	Hydronephrosis, renal stone, and ureter stricture; ureter biopsy showed no evidence of TB	TB	Yes	Yes	NC
Q (31433/ 222324153324)	Urine	Hematuria; lost to follow-up	TB	No	No	NC
R (46464/ 254326223422)	Sputum	Persistent cough, fever, and diffuse infiltrates; blood cultures showed *Staphylococcus aureus*; expired before isolation of *M. tuberculosis*	BP	No	Yes	PC
S (46464/ 253326223432)	Urine	Sterile pyuria; lost to follow-up	TB	No	Yes	PC
T (46464/ 254326223432)	Sputum	Septic shock and diffuse infiltrates; expired before isolation of *M. tuberculosis*	BP	No	Yes	PC

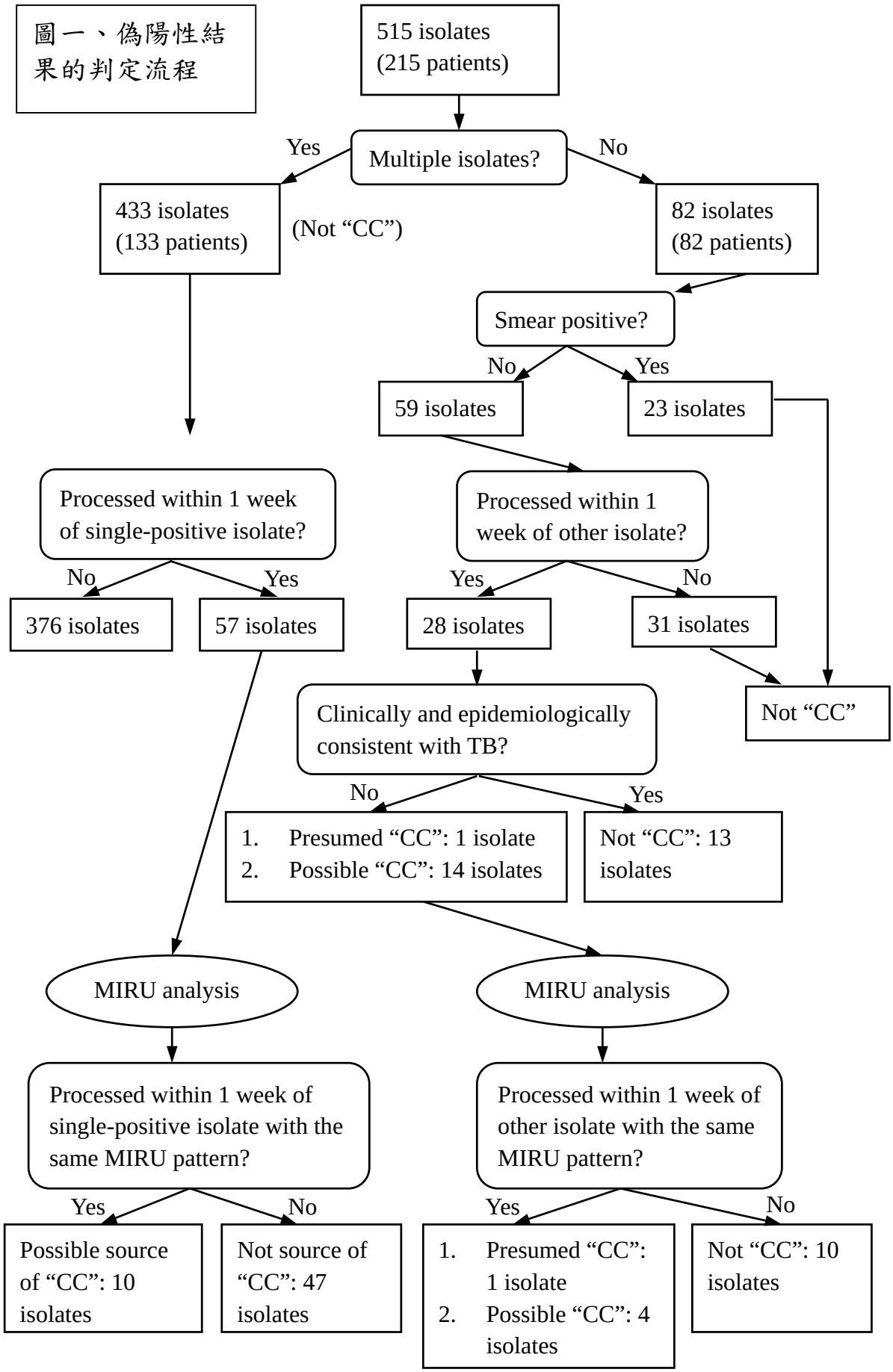
[a]ND, not done.

[b]BP, bacterial pneumonia; AP, aspiration pneumonia.

[c]Positive cultures that had been processed two months before the potentially contaminated sample.

[d]NC, not contaminated; PC, possibly contaminated.

圖一、偽陽性結果的判定流程



附錄

成大醫院之菌株資料 (電子檔): data.dbf