

計畫編號：DOH99-DC-2019

行政院衛生署疾病管制局九十九年度自行研究計畫

建立結核菌標準化液態診斷平台－抗藥性基因分析

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

協同主持人：周如文、黃偉倫

研究人員：張永麟

執行期間：99年1月1日至99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	(11)
三、結果	(17)
四、討論	(19)
五、結論與建議	(20)
六、計畫重要研究成果及具體建議	(21)
七、參考文獻	(22)
八、圖、表	
圖一、以標準菌株 H37Rv 之 DNA 進行 3 組 multiplex PCR 測試結果	(24)
圖二、以標準菌株 H37Rv 之 DNA 多重聚合酶連鎖反應之產物進行 ASPE 反應及 SNPs 偵測結果	(25)
圖三、利用高效率液態診斷平台系統偵測 <i>rpoB</i> codon 533	

CTG→CCG 及 codon 176 GTC→TTC 突變位點及與 4 個 INH 抗藥相關抗藥基因 (2 個於 *inhAr*、2 個於 *ahpCr*) 突變位點；*rpoB* codon 176 wild type 與 mutation 同時存在之菌株偵測結果 (最右邊兩個長條圖) (26)

圖四、利用高效率液態診斷平台系統偵測 12 個 INH 抗藥相關抗藥基因 (3 個於 *furA*、1 個於 *ndh*、4 個於 *ahpCr*、2 個於 *iniA*、1 個於 *inhA*、1 個於 *iniC*) 突變位點 (27)

表一、抗藥相關基因之偵測標的 SNPs 用引子及探針序列 (multiplex PCR set 1) (28)

表二、抗藥相關基因之偵測標的 SNPs 用引子及探針序列 (multiplex PCR set 2) (29)

表三、抗藥相關基因之偵測標的 SNPs 用引子及探針序列 (multiplex PCR set 3) (30)

表四、針對 127 株樣本進行 3 組 multiplex PCR 及 ASPE 反應之成功率 (31)

表五、針對 127 株樣本 RIF 抗藥性相關 *rpoB* codon 533 及 codon 176 突變位點偵測結果 (32)

表六、針對 127 株樣本 INH 抗藥性相關基因突變位點偵測結果(33)

壹、摘要

研究目的 利用高效率液態診斷平台針對結核菌多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 相關基因突變位點建立快速偵測系統，可同時偵測多個基因多個單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)，提升分子檢驗效能。

研究方法 自 2008-2009 年送驗 MDR 複驗確認菌株中，須以抗藥性相關基因直接定序方法或傳統藥敏試驗，方可判定是否為 MDR 菌株共計 127 菌株為研究樣本。參考本實驗室常規分子複驗結果及 98 年計畫成果，選取 9 個基因及 2 個基因調節區域 (regulatory region) 共計 23 個 SNPs 作為抗藥基因偵測標的。

主要發現 (1) 在 9 株具 *rpoB* codon 533 CTG→CCG 突變位點及 7 株具 *rpoB* codon 176 GTC→TTC 突變位點之實驗組中，利用高效率液態診斷平台系統皆可正確偵測此 2 個 SNPs 位點，結果顯示敏感度為 100%，且其中 1 株經定序分析得知為 *rpoB* codon 176 wild type 與 mutation 同時存在；在 111 株 RIF 藥敏試驗結果為敏感性菌株之對照組中，108 株偵測結果皆為 wild type，顯示特異性為 97.3% (108/111)。(2) 在 21 個 INH 抗藥相關基因 (*inhA*、*inhAr*、*ahpCr*、*furA*、*ndh*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC*、*mabA*) SNPs 中，可正確偵測 16 個特定突變 SNPs，有 5 個少見的 SNPs (1 個於 *furA*、1 個於 *efpA*、1 個於 *iniB*、1 個於 *iniA*、1 個於 *mabA*) 因偵測樣本數過少尚無法評估突變位點的偵測結果。然在以標準菌株 H37Rv DNA 測試時，此 5 個 SNPs wild type 偵測結果仍相當明確。

結論及建議事項 根據本研究的結果，利用高效率液態診斷平台系統可快速並正確進行 MDR 抗藥相關基因的偵測。針對 RIF 抗藥相關的 *rpoB*

codon 533 及 codon 176 偵測結果顯示敏感度達 100%，特異性達 97.3%。在 INH 抗藥常見的 *ahpCr*、*inhAr*、*inhA* 突變位點亦有很好的偵測結果。對於較少見的 12 個 SNPs 仍有 7 個 SNPs 可正確被偵測到。針對少見的 SNPs 位點，利用此高效率液態診斷平台系統可大量進行樣品篩選，以確認與 INH 抗藥性的相關性。

利用此系統可同時偵測多個 SNPs 位點之優點，相較於定序分析尤其是 GC-rich 的基因序列，可大幅降低成本與檢驗時間以儘早確認多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 結核菌株。本研究所建立的系統將納入常規檢驗流程中以達快速分子診斷之目的。

關鍵詞：多重抗藥性結核菌、單核苷酸多型性、高效率液態診斷平台系統

Abstract

Purpose

To establish a high throughput microsphere-based suspension assay system to rapidly identify large amount of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of multidrug resistance (MDR) associated genes simultaneously so that to enhance the efficiency of molecular diagnosis.

Materials and Methods

A total of 127 isolates collected from those had to be confirmed as MDR or not by directly sequencing drug resistant associated genes or conventional drug susceptibility testing were included as study population. According to the results of routinely molecular diagnosis and preliminary study conducted in 2009, 23 SNPs of nine drug resistant associated genes and two regulatory regions of genes were selected as SNP detection targets in this study.

Results

1. Nine and seven isolates harboring mutations in *rpoB* codon 533 CTG→CCG and codon 176 GTC→TTC can be correctly recognized by the high throughput microsphere-based suspension assay system with 100% sensitivity. One isolate harboring wild type and mutation SNPs confirmed by sequencing also can be identified by this assay. 108 out of 111 RIF susceptible isolates can be correctly recognized as wild type SNP with 97.3% (108/111) specificity.
2. 16 out of 21 SNPs of INH resistant associated genes (*inhA*、*inhAr*、*ahpCr*、*furA*、*ndh*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC*、*mabA*) can be correctly recognized in this study. The results of mutant alleles of 5 SNPs (1 in *furA*,

1 in *efpA*, 1 in *iniB*, 1 in *iniA*, and 1 in *mabA*) rare present among INH resistant strains could not be evaluated because of the very small sample size in this study. However, the wild type alleles of these 5 SNPs can be correctly identified by using H37Rv DNA.

Conclusions and Suggestions

Based on the results of this study, the SNPs of MDR associated genes can be identified rapidly and correctly by this high throughput microsphere-based suspension assay system. The sensitivity and specificity of SNP detection in *rpoB* codon 533 and codon 176 were 100% and 97.3%, respectively. The detection results of frequent mutations associated with INH resistance, *ahpCr*, *inhAr*, and *inhA*, also showed high concordance. This high throughput microsphere-based suspension assay system can be applied to screen large amount of samples to confirm the association between rare mutations and INH resistance. Compared to DNA sequencing analysis especially for those GC-rich genes, this system showed its advantage with detection SNPs simultaneously to decrease the cost and turn around time in confirmation of MDR isolates. This high throughput microsphere-based suspension assay system can be applied as routine molecular platform to reach the purpose of rapid diagnosis.

Key Words: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, single nucleotide polymorphisms (SNPs), high throughput microsphere-based suspension assay

貳、本文

一、前言

利用偵測結核菌多重抗藥性 [multidrug resistance, MDR, 指至少對 rifampin (RIF) 及 isoniazid (INH) 抗藥] 相關基因 (如 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*inhAr*、*ahpC*) 突變位點所設計之分子診斷方法，可儘早鑑定 MDR，縮短因藥敏檢驗所需之冗長時間，協助病人獲得適當的治療。根據目前對 RIF 與 INH 抗藥機制之了解，針對 RIF 抗藥基因 *rpoB* 之 81-bp "Core-region" 定序結果，有超過 95% 對 RIF 產生抗藥之菌株於此區域皆發生基因突變【1】；但對於 INH 之抗藥基因及抗藥位點卻是多元化，*katG* codon 315 發生突變產生對 INH 抗藥之比例介於 50-95%【1,2,3】；*inhAr* 發生突變產生對 INH 抗藥之比例介於 20-35%【1,3,4】；此外，*ahpC* 發生突變產生對 INH 抗藥之比例介於 10-15%【1,4,5】，但此基因之突變通常亦伴隨 *katG* codon 315 之突變【6】。根據統計數據顯示，INH 抗藥與上述 *katG*、*inhAr*、*inhA*、*ahpCr* 有顯著相關【7】。

目前，以分子技術為基礎，適用於結核菌株及抗酸菌陽性痰檢體檢測的主要兩種商品化試劑組為：針對 *rpoB* 基因的 INNO-LiPA Rif 試劑組 (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) 及對 *rpoB* 與 *katG* 基因 Genotype[®] MTBDR 試劑組 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)，皆於各國進行評估與運用【8,9,10,11,12】。新一代之 Genotype[®] MTBDR^{plus} 試劑組也同時針對除 *katG* 基因以外之基因 (*inhAr*) 進行設計，試圖更廣泛偵測 INH 抗藥基因位點【13】。本實驗室自 2007 年 5 月開始利用 Genotype[®] MTBDR^{plus} 試劑組進行 MDR 分子複驗，監測結果顯示於 2008 年及 2009 年該試劑偵測 MDR 之準確率分別為 76.8% 及 80.6%。進一步針對 *rpoB*、*katG*、*inhAr*、*inhA*、*ahpCr* 抗藥基因進行直接定序分析，可將 MDR 分子複驗之準確率提高至

91.1%及 90.1%。根據 2008 年及 2009 年針對 RIF 及 INH 抗藥常見位點分析結果顯示，就 *rpoB* 定序分析，仍以 codon 531 出現突變頻率最高，其次分別為 codon 526 及 codon 516；就 INH 抗藥則仍以 *katG* codon 315 出現突變頻率最高，其次分別為 *inhAr-15* 及 *inhAr-8*。此等常見突變位點可於 Genotype[®] MTBDR*plus* 試劑組偵測。

以 2009 年分析結果為例，將 Genotype[®] MTBDR*plus* 試劑組及直接基因定序結果進行比對如下表：

Table . Genotype[®]MTBDR*plus* assay and sequencing results for 273 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates.

(2009.1-2009.10)

Genotype [®] MTBDR- <i>plus</i> test	Sequencing	Conventional drug susceptibility testing					
		Rifampin resistant		Isoniazid resistant		Multidrug-resistant	
		No	%	No	%	No	%
Resistance	Resistance	262	96	220	80.6	211	77.3
Resistance	Susceptible	0	0	0	0	0	0
Susceptible	Resistance	7	2.6	26	9.5	31	11.4
Susceptible	Susceptible	4	1.5	27	9.9	31	11.4

就抗藥基因定序結果顯示，對 RIF 單一抗藥而言，可檢測出 269 株，達 98.6%，基因直接定序判定較 Genotype[®] MTBDR*plus* 試驗增加 2.6%，分析主要增加判定的突變位點為 *rpoB* codon 533 CTG→CCG；對 INH 單一抗藥之基因直接定序，可檢測出 246 株，達 90.1%，主要增加判定的突變位點為 *ahpCr* -10 C→T、*ahpCr* -17 C→T 及 *inhA* 194 ATC→ACC，上述抗藥基因位點皆非商品化試劑組可偵測之位點，目前僅能利用基因定序判定抗藥結果。

為進一步增加分子檢測 MDR 的準確率，於去年亦針對新的相關抗藥性

基因進行分析，結果發現在 10 株原 *rpoB* core-region 定序結果 wild type，然 RIF 藥敏為抗藥的菌株中，有 7 株 (70.0%) 發生 *rpoB* codon 176 GTC→TTC 突變。在 57 株 INH 藥敏結果為抗藥，但 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*ahpCr* 常規基因定序結果為 wild type 的菌株中則發現 8 個基因 (*furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC*) 的 14 個與 INH 抗藥性有關的突變位點出現在 19 株 (33.3%, 19/57) 菌株中，且這些位點未見於 INH 敏感性菌株中。因此根據去年研究結果發現利用偵測新的突變位點約可再提高 MDR 分子快速鑑定 4.49% 敏感度。

然若以基因直接定序方法檢測未能以 Genotype® MTBDRplus 試驗組偵測之抗藥基因突變位點，將需進行多個 PCR 反應及多個定序分析，為此本計畫將利用高效率液態診斷平台 (microsphere-based suspension assay)，此平台技術已廣泛應用於 SNPs 偵測以做為藥物開發及臨床診斷之用【14,15,16,17】，將針對 MDR 未能以 Genotype® MTBDRplus 試驗組偵測之抗藥基因突變位點利用此平台建立快速偵測系統，可同時偵測多個基因多個 SNPs 於單一反應管中，藉以提升分子檢驗效能並大幅節省時間及成本。

二、材料與方法

1. 菌株與資料收集

自 2008-2009 年送驗 MDR 複驗確認菌株中，須以抗藥性相關基因直接定序方法或傳統藥敏試驗，方可判定是否為 MDR 菌株共計 127 菌株為研究樣本。參考本實驗室常規分子複驗結果及 98 年計畫成果，選取 9 個基因及 2 個基因調節區域 (regulatory region) 共計 23 個 SNPs 作為抗藥基因偵測標的。在 RIF 抗藥部份，包括 9 株具 *rpoB* codon 533 CTG→CCG 突變位點、7 株具 *rpoB* codon 176 GTC→TTC 突變位點為實驗組，111 株 RIF 藥敏試驗結果為敏感性菌株做為對照組進行實驗。在 INH 抗藥部份，則包括 28 株 RIF 抗藥性菌株未能以 GenoType MTBDRplus 檢測出抗藥性，但具 *inhA*、*inhAr*、*ahpCr*、*furA*、*ndh*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC*、*mabA* 抗藥性相關突變位點為實驗組，26 株可經 GenoType MTBDRplus 快速檢測為 RIF 抗藥性菌株、73 株 INH 藥敏試驗結果為敏感性菌株做為對照組。

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，針對抗藥相關基因之偵測標的 SNPs 進行引子設計，各標的基因之引子序列詳如表一至表三。

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

共設計 3 組多重聚合酶連鎖反應用以偵測所有 23 個 SNPs，以 QIAGEN multiplex PCR 試劑組進行實驗，單一反應管 PCR 液分別配

製如下：

(A) multiplex PCR set 1

試劑	體積 (μL)
無菌水	3.25
2X PCR master mix	12.5
Primer mix (2 or 3 μM)	2.5
Q solution	3.75
檢體	3.0
總體積	25.0

(B) multiplex PCR set 2

試劑	體積 (μL)
無菌水	3.25
2X PCR master mix	12.5
Primer mix (2 or 3 μM)	2.5
Q solution	3.75
檢體	3.0
總體積	25.0

(C) multiplex PCR set 3

試劑	體積 (μL)
無菌水	4.5

2X PCR master mix	12.5
Primer mix (2 or 3 μ M)	2.5
Q solution	2.5
檢體	3.0
總體積	25.0

PCR 程式 (multiplex PCR set 1) :

步驟	溫度	時間
1	95 °C	15分鐘
2	94 °C	30秒
3	68 °C	90秒
4	72 °C	50秒
步驟2至4循環重複35次		
5	72 °C	8分鐘
6	16 °C	∞

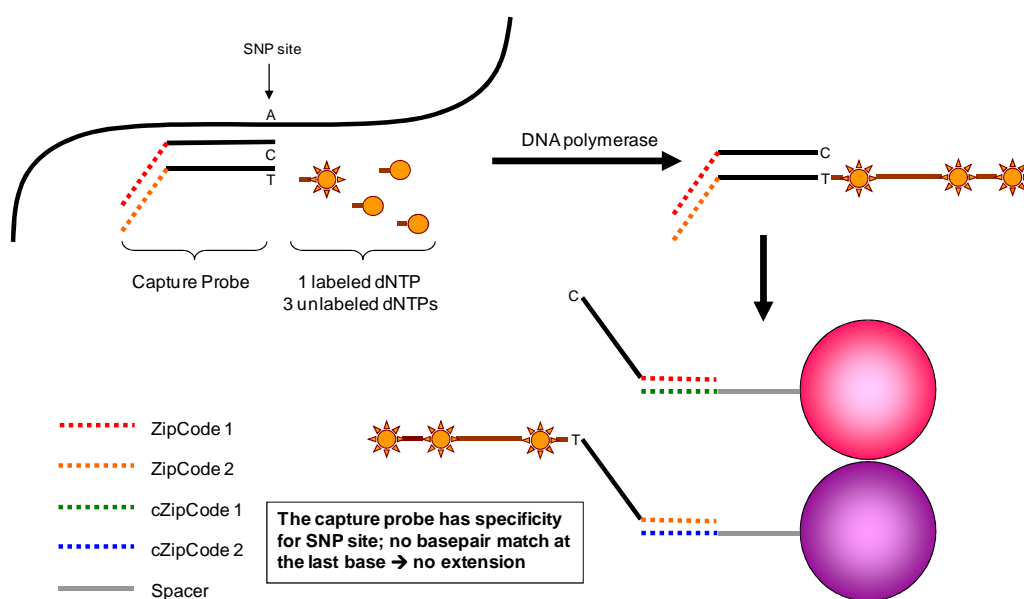
PCR 程式 (multiplex PCR set 2 及 set 3) :

步驟	溫度	時間
1	95 °C	15分鐘
2	94 °C	30秒
3	67 °C	90秒
4	72 °C	50秒
步驟2至4循環重複35次		

5	72 °C	8分鐘
6	16 °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聚合酶去除：取 5 μL multiplex PCR 反應液混合 2 μL 之 ExoSAP-IT 溶液，於 37°C 反應 30 分鐘後，並以 80°C 去活化反應 15 分鐘。接著取 5 μL 處理過的 multiplex PCR 反應液以專一性的探針進行 Allele-Specific Primer Extension (ASPE) 實驗以偵測特定的 SNP，探針序列詳如表一至表三。ASPE 之原理如下圖所示：



ASPE 單一反應管溶液配製如下：

試劑	體積 (μL)
無菌水	10.1

10X ASPE reaction buffer	2.0
50 mM MgCl ₂	0.5
20X TAG-probe mix (500 nM each)	1.0
5 U/ μ L Tsp DNA polymerase	0.15
20X dNTP mix (-dCTP) (100 μ M each)	1.0
400 μ M biotin-dCTP	0.25
處理過的 multiplex PCR 產物	5.0
總體積	20.0

ASPE 反應條件：

步驟	溫度	時間
1	96 °C	2分鐘
2	94 °C	30秒
3	55°C	60秒
4	74°C	120秒
步驟2至4循環重複30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)，利用 1.5x TMC buffer 稀釋至 96 孔反應盤中每個反應孔含每種微珠 200 beads，總體積為 33 μ L，加入 5 μ L ASPE 反應產物，並補無菌水至總體積 50 μ L，於 96°C denature 90 秒，接著於 37°C 反應 30 分鐘。將反應盤離心後去除上清

液，並加入 75 μ L 1X Tm hybridization buffer 清洗微珠，共清洗兩次後，加入含 2 μ g/mL streptavidin-R-phycoerythrin (SAPE) 之 75 μ L 1X Tm 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，每一隻檢體偵測 45 秒鐘。偵測結果以 Allelic Ratio 表示：突變位點之 Allelic Ratio_{mut} = $MFI_{mut}/(MFI_{mut}+MFI_{wt})$ ，wild type 之 Allelic Ratio_{wt} = $MFI_{wt}/(MFI_{mut}+MFI_{wt})$ 。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. 多重聚合酶連鎖反應及 ASPE 反應結果

本實驗中共設計 3 組多重聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR set 1、set 2、set 3) 進行 SNPs 偵測。首先以標準菌株 H37Rv 之 DNA 進行測試，反應結果如圖一所示。分別可放大 7、4、4 個 PCR 產物，並可分別偵測 10、6、7 個 SNPs。接著並以標準菌株 H37Rv 之 DNA 進行多重聚合酶連鎖反應之產物進行 ASPE 反應及 SNPs 偵測，結果顯示 23 個 SNPs wild type 之 Allelic Ratio 皆在 0.75 以上，顯示高效率液態診斷平台系統之高專一性，結果如圖二所示。接著以 127 株去活化菌液樣本進行 3 組 (set 1、set 2、set 3) 反應顯示完成成功率分別為 86.6%、88.2%、95.3%，分別有 17、14、6 株樣本無法成功將所有 PCR 產物放大反應，其中以 set 3 之反應結果最佳，set 2 其次，set 1 則顯示結果最不理想。結果如表四所示。

2. RIF 抗藥性相關 *rpoB* codon 533 及 codon 176 突變位點偵測

在 9 株具 *rpoB* codon 533 CTG→CCG 突變位點及 7 株具 *rpoB* codon 176 GTC→TTC 突變位點之實驗組中，利用高效率液態診斷平台系統皆可正確偵測，結果顯示敏感度為 100%，且其中 1 株經定序分析得知為 *rpoB* codon 176 wild type 與 mutation 同時存在，經此平台偵測 Allelic Ratio 亦介於 0.25 與 0.75 之間 (圖三)；在 111 株 RIF 藥敏試驗結果為敏感性菌株之對照組中，顯示特異性為 97.3% (108/111)，其中 3 株因 multiplex PCR 陰性結果所致無法進行 ASPE 反應及 SNP 偵測。結果如表五所示。

3. INH 抗藥性相關 *inhA*、*inhAr*、*ahpCr*、*furA*、*ndh*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC*、*mabA* 突變位點偵測

在 28 株 INH 抗藥性菌株未能以 GenoType MTBDR*plus* 檢測出抗藥性，但具 *inhA*、*inhAr*、*ahpCr*、*furA*、*ndh*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC*、*mabA* 抗藥性相關突變位點之實驗組中，利用高效率液態診斷平台系統有 19 株可正確偵測 16 個特定突變 SNPs (3 個於 *furA*、1 個於 *ndh*、6 個於 *ahpCr*、2 個於 *iniA*、1 個於 *inhA*、1 個於 *iniC*、2 個於 *inhAr*) (圖三、圖四)，2 株結果為偽陰性，7 株為 multiplex PCR 反應陰性。因有 5 個少見的 SNPs (1 個於 *furA*、1 個於 *efpA*、1 個於 *iniB*、1 個於 *iniA*、1 個於 *mabA*) 包含予此 7 株 multiplex PCR 反應陰性檢體中，因此尚無法評估偵測結果，然此 5 個 SNPs 位點於標準菌株 H37Rv DNA 測試時偵測結果相當明確。在 26 株可經 GenoType MTBDR*plus* 快速檢測為 RIF 抗藥性菌株中 (即已具有 *katG* codon 315 或 *inhAr* -15、-16、-8 突變位點)，23 株顯示本實驗偵測之抗藥性相關 SNPs 皆為 wild type，1 株則同時具有 *ahpCr* -17 C→T 突變位點，其餘 2 株為 multiplex PCR 反應陰性。在 73 株 INH 藥敏試驗結果為敏感性菌株之對照組中，63 株顯示偵測之抗藥性相關 SNPs 皆為 wild type，10 株則為 multiplex PCR 陰性 (表六)。

四、討論

本研究結果顯示，針對 GenoType MTBDR_{plus} 快速診斷試劑無法檢測的 RIF 與 INH 抗藥基因相關突變位點，利用高效率液態診斷平台系統可快速並正確的偵測。針對 RIF 抗藥相關的 *rpoB* codon 533 及 codon 176 偵測結果顯示敏感度達 100%，特異性達 97.3%。在 INH 抗藥相關基因偵測部份，則選取 8 個基因及 2 個基因調節區域共包含 21 個 SNPs 進行實驗，針對較常見的 *ahpCr*、*inhAr*、*inhA* 突變位點偵測結果顯示：12 株具有 6 個 *ahpCr* 突變位點之樣本，皆可正確被偵測；2 株具有 2 個 *inhAr* 突變位點之樣本亦可正確被偵測。3 株以定序發現具有 *inhA* codon 194 突變位點之樣本，其中 1 株可正確被偵測，另外 2 株則因 multiplex PCR 反應陰性而無法進行偵測。於 7 個 (*furA*、*ndh*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC*、*mabA*) 較少見的 INH 抗藥相關基因的 12 個 SNPs 偵測結果顯示，有 7 個 SNPs 仍可正確被偵測到，其餘 5 個 SNPs 則因受限於樣本數原本就較少又因 multiplex PCR 反應陰性而無法被偵測。然此 5 個 SNPs 位點於標準菌株 H37Rv DNA 測試時偵測結果相當明確。由於本研究直接使用加熱處理過的菌液為樣本，且為 2008 至 2009 年之追溯性樣本，相對儲存時間較長，相較於 DNA 確實有可能因菌量少或其他抑制物等原因而造成 multiplex PCR 反應陰性。因此若使用新鮮去活化菌液進行實驗分析，推估應可獲得更好的結果。

利用此快速液態診斷平台系統亦可同時偵測 SNP 為 wild type 與 mutation 同時存在之樣本，亦可避免因定序讀取的誤差而漏失抗藥性菌株的共同存在而影響治療。同時利用此系統可同時偵測多個 SNPs 位點之優點，相較於定序分析尤其是 GC-rich 的基因序列，可大幅降低成本與檢驗時間。

五、結論與建議

根據本研究的結果，利用高效率液態診斷平台系統可快速並正確進行 MDR 抗藥相關基因的偵測。針對 RIF 抗藥相關的 *rpoB* codon 533 及 codon 176 偵測結果顯示敏感度達 100%，特異性達 97.3%。在 INH 抗藥常見的 *ahpCr*、*inhAr*、*inhA* 突變位點亦有很好的偵測結果。對於較少見的 12 個 SNPs 仍有 7 個 SNPs 可正確被偵測到。針對少見的 SNPs 位點，利用此高效率液態診斷平台系統可大量進行樣品篩選，以確認與 INH 抗藥性的相關性。

利用此系統可同時偵測多個 SNPs 位點之優點，相較於定序分析尤其是 GC-rich 的基因序列，可大幅降低成本與檢驗時間以儘早確認多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 結核菌株。本研究所建立的系統將納入常規檢驗流程中以達快速分子診斷之目的。

六、計畫重要研究成果及具體建議

根據本研究的結果，利用高效率液態診斷平台系統可快速並正確進行 MDR 抗藥相關基因的偵測。針對少見的 SNPs 位點，亦可利用此系統大量進行樣品篩選，以確認與 INH 抗藥性的相關性。

同時利用此系統可同時偵測多個 SNPs 位點之優點，應用於分子快速檢驗將大幅降低成本與檢驗時間。因此此高效率液態診斷平台系統將納入常規檢驗流程中以達快速分子診斷之目的。

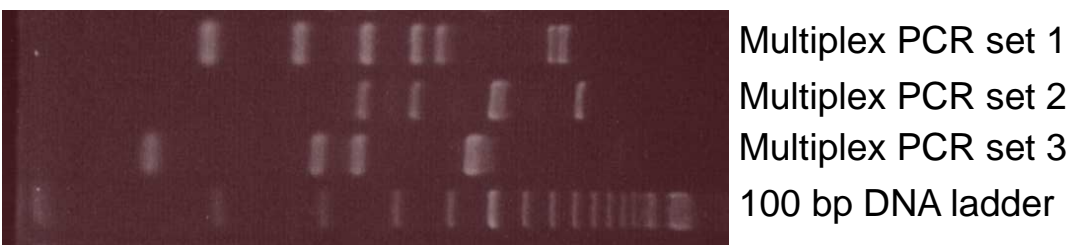
七、参考文献

1. Telenti, A., N. Honore', C. Bernasconi, J. March, A. Ortega, H. E. Takiff, and S. T. Cole. 1997. Genotyping assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J. Clin. Microbiol.* 35:719–723.
2. Mokrousov, I., O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko, L. Steklova, and B. Vyshnevkiy. 2002. High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1417–1424.
3. Musser, J. M., V. Kapur, D. L. Williams, B. N. Kreiswirth, D. van Soolingen, and J. D. van Embden. 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J. Infect. Dis.* 173:196–202.
4. Piatek, A. S., A. Telenti, M. R. Murray, H. El-Hajj, W. R. Jacobs, Jr., F. R. Kramer, and D. Alland. 2000. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:103–110.
5. Kelley, C. L., D. A. Rouse, and S. L. Morris. 1997. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2057–2058.
6. Sreevatsan, S., X. Pan, Y. Zhang, V. Deretic, and J. M. Musser. 1997. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:600–606.
7. Hazbon, M. H., M. Brimacombe, M. Bobadilla del Valle, M. Cavatore, M. I. Guerrero, M. Varma-Basil, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, C. I. Leon, M. Bose, F. Chaves, M. Murray, K. D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, M. D. Cave, A. Ponce de Leon, and D. Alland. 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2640–2649.
8. Hillemann, D., M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter, and S. Niemann. 2005. Use of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43:3699–3703.

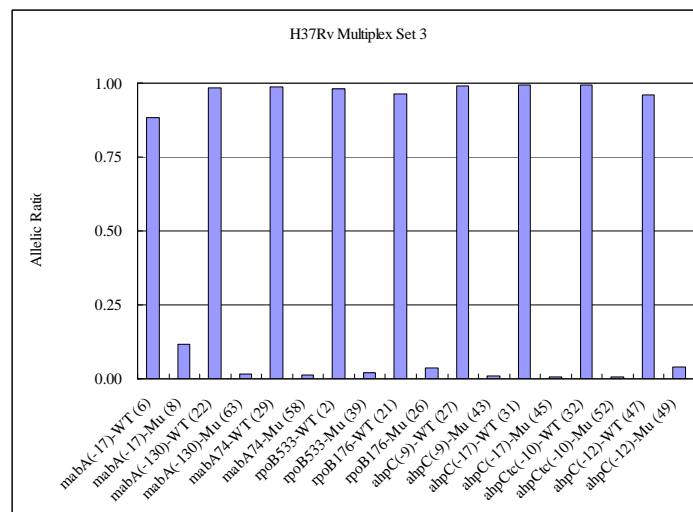
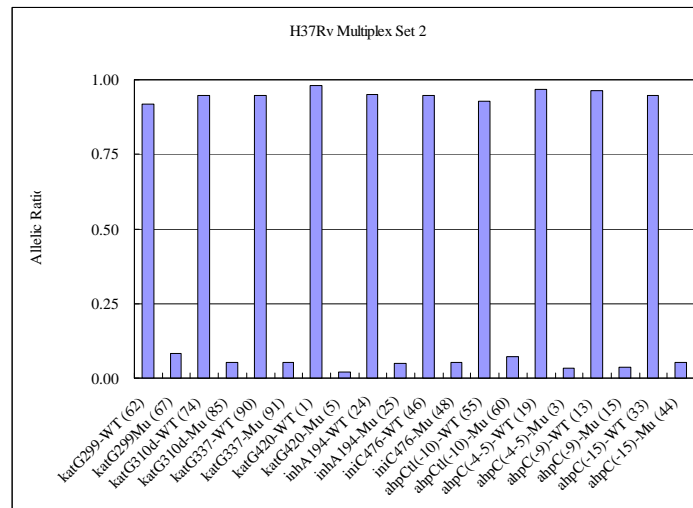
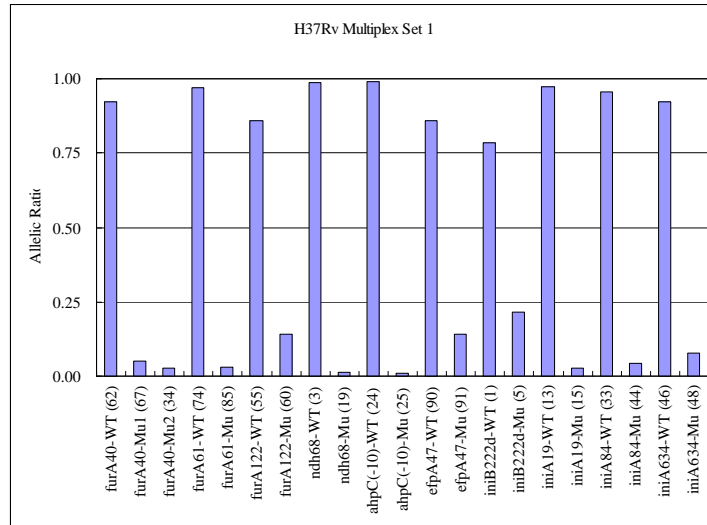
9. Bang, D., A. B. Andersen, and V. O. Thomsen. 2006. Rapid genotypic detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44:2605–2608.
10. Mäkinen, J., H. J. Marttila, M. Marjamäki, M. K. Viljanen, and H. Soini. 2006. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44:350–352.
11. Miotto, P., F. Piana, V. Penati, F. Canducci, G. B. Migliori, and D. M. Cirillo. 2006. Use of GenoType MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 44:2485–2491.
12. Traore, H., A. van Deun, I. C. Shamputa, L. Rigouts, and F. Portaels. 2006. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* 44:4384–4388.
13. Hillemann, D., Sabine R-G, and E. Richter. 2007. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45:2635–2640.
14. Bruse, S., M. Moreau, M. Azaro, R. Zimmerman, L. Brzustowicz. 2008. Improvements to bead-based oligonucleotide ligation SNP genotyping assays. *Biotechniques.* 45:559-571.
15. Chen, J., M.A. Iannone, M.S. Li, J.D. Taylor, P. Rivers, A.J. Nelsen, K.A. Slentz-Kesler, A. Roses, M.P. Weiner. 2000. A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res.* 10:549-557.
16. Ye, F., M.S. Li, J.D. Taylor, Q. Nguyen, H.M. Colton, W.M. Casey, M. Wagner, M.P. Weiner, J. Chen. 2001. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum Mutat.* 17:305-316.
17. Armstrong, B., M. Stewart, A. Mazumder. 2000. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry.* 40:102-108.
18. Wang, H.Y., M. Luo, I.V. Tereshchenko, D.M. Frikker, X. Cui, J.Y. Li, G. Hu, Y. Chu, M.A. Azaro, Y. Lin, L. Shen, Q. Yang, M.E. Kambouris, R. Gao, W. Shih, H. Li. 2005. A genotyping system capable of simultaneously analyzing >1000 single nucleotide polymorphisms in a haploid genome. *Genome Res.* 15:276-283.

八、圖、表

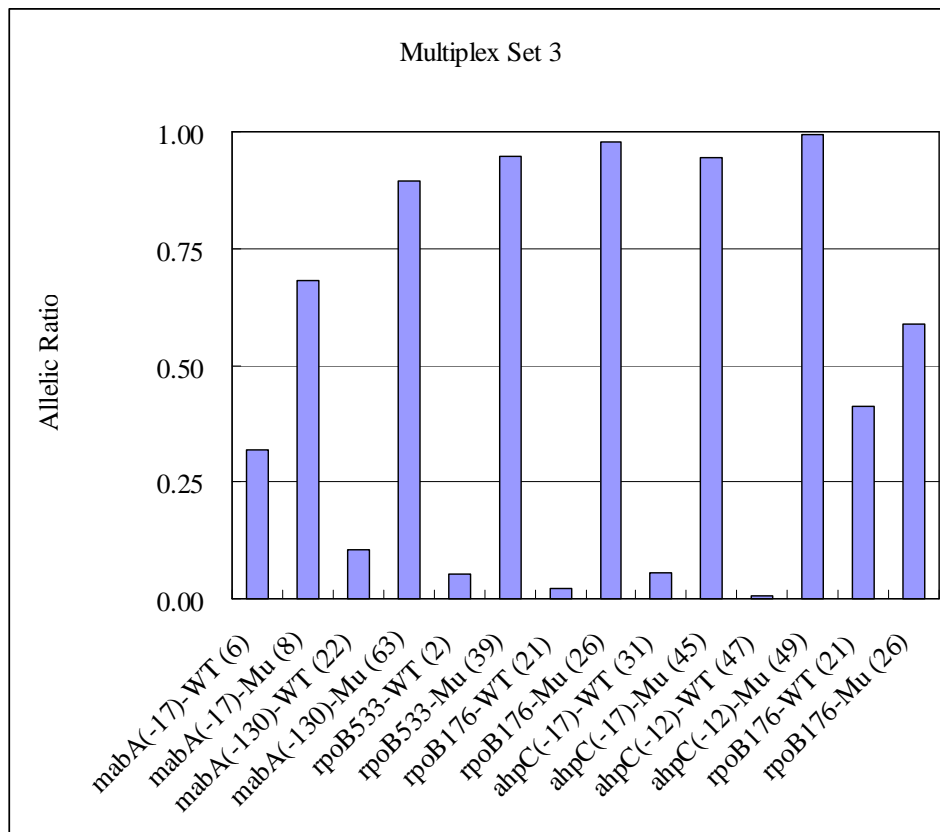
圖一、以標準菌株 H37Rv 之 DNA 進行 3 組 multiplex PCR 測試結果



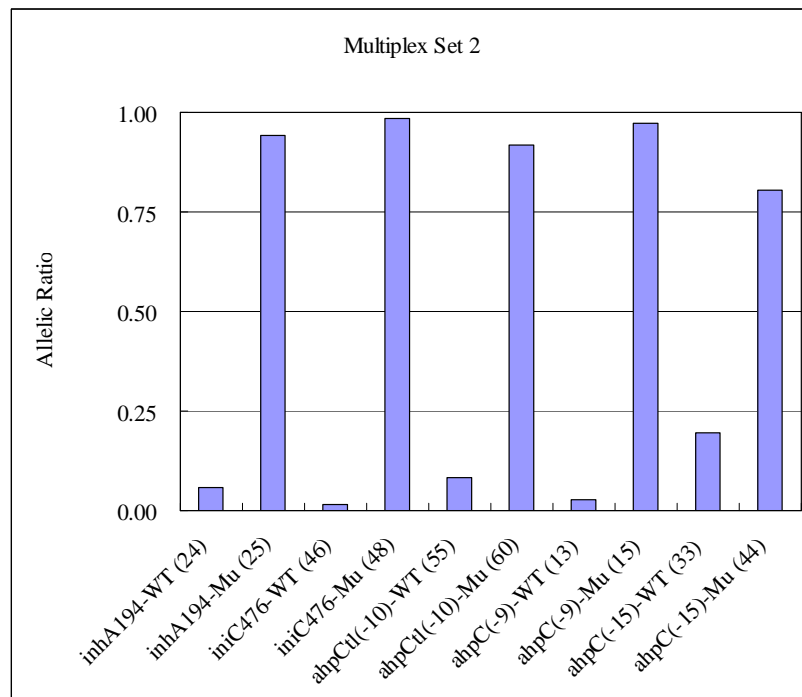
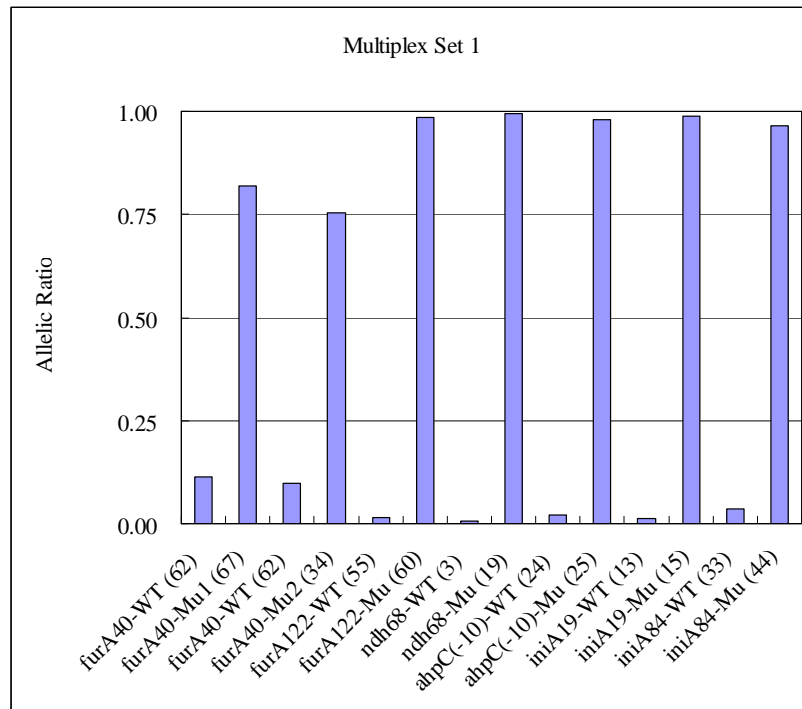
圖二、以標準菌株 H37Rv 之 DNA 多重聚合酶連鎖反應之產物進行 ASPE 反應及 SNPs 偵測結果



圖三、利用高效率液態診斷平台系統偵測 *rpoB* codon 533 CTG→CCG 及 codon 176 GTC→TTC 突變位點及與 4 個 INH 抗藥相關抗藥基因 (2 個於 *inhA*r、2 個於 *ahpC*r) 突變位點；*rpoB* codon 176 wild type 與 mutation 同時存在之菌株偵測結果 (最右邊兩個長條圖)



圖四、利用高效率液態診斷平台系統偵測 12 個 INH 抗藥相關抗藥基因 (3 個於 *furA*、1 個於 *ndh*、4 個於 *ahpCr*、2 個於 *iniA*、1 個於 *inhA*、1 個於 *iniC*) 突變位點



表一、抗藥相關基因之偵測標的 SNPs 用引子及探針序列 (multiplex PCR set 1)

Gene	codon	WT allele	mutant allele	F-primer	R-primer	product
<i>furA</i>	40	A	C/G	GGACTACGCCGAACAGCTC(1.5x)	CGAAGTGTCGGATATCGAACAA(1.5x)	414
<i>furA</i> -40-WT-ASPE-62			LUA-62	TCAATCATAATCTCATAATCCAAT-CGCATCCACACGCCGACA		
<i>furA</i> -40-MT1-ASPE-67			LUA-67	TCATTTACTCAACAATTACAAATC-CGCATCCACACGCCGACC		
<i>furA</i> -40-MT2-ASPE-34			LUA-34	TCATTCATATACATACCAATTCAT-CGCATCCACACGCCGACG		
<i>furA</i>	61	G	C	GGACTACGCCGAACAGCTC(1.5x)	CGAAGTGTCGGATATCGAACAA(1.5x)	414
<i>furA</i> -61-WT-ASPE-74			LUA-74	TACACATCTTACAACTAATTTC-CCC GGCAAGCCGTGTACG		
<i>furA</i> -61-MT-ASPE-85			LUA-85	ATACTACATCATAATCAAACATCA-CCC GGCAAGCCGTGTACC		
<i>furA</i>	122	C	A	GGACTACGCCGAACAGCTC(1.5x)	CGAAGTGTCGGATATCGAACAA(1.5x)	414
<i>furA</i> -122-WT-ASPE-55			LUA-55	TATATACACTTCTCAATAACTAAC-GACGGCCTCGGACCATAAC		
<i>furA</i> -122-MT-ASPE-60			LUA-60	AATCTACAAATCCAATAATTCAT-GACGGCCTCGGACCATAAA		
<i>ndh</i>	68	T	C	GCACCACCCATCACCTGTT	TGACCGAGCAATTCCGAGAC	184
<i>ndh</i> -68-WT-ASPE-03			LUA-03	TACACTTTATCAAATCTTACAATC-ATTATCTCCGAGGGAGAAAT		
<i>ndh</i> -68-MT-ASPE-19			LUA-19	TCAATCAATTACTTACTCAAATAC-ATTATCTCCGAGGGAGAAAC		
<i>ahpC</i>				CACTGCTGAACCACTGCTTT(1.5x)	GAACACCACCCGCCACTT(1.5x)	339
<i>ahpC</i> Δ(-10)-WT-ASPE-24			LUA-24	TCAATTACCTTTTCAATACAATAC-ACAGCGACTTCACGGCAC		
<i>ahpC</i> Δ(-10)-MT-ASPE-25			LUA-25	CTTTTCAATTACTTCAAATCTTCA-ACAGCGACTTCACGGCAT		
<i>efpA</i>	47	C	A	ACGGCTCTCAACGACACA(1.5x)	CGGCATCAGACAAGCTCAG(1.5x)	262
<i>efpA</i> -47-WT-ASPE-90			LUA-90	CTAAATACTTCACAATTCATCTAA-TACTACCCGACTTGGCTGCC		
<i>efpA</i> -47-MT-ASPE-91			LUA-91	TTCATAACATCAATCATAACTTAC-TACTACCCGACTTGGCTGCA		
<i>iniB</i>	222	12-bp	12-bp del	CGATTACATCCTGAGCCTGTTC	GCCTTCACTGGCGATCAAC	810
<i>iniB</i> 222Δ-WT-ASPE-01			LUA-01	CTTTAATCTCAATCAATACAAATC-TGCCGGCCAGGGTGCCGTT		
<i>iniB</i> 222Δ-MT-ASPE-05			LUA-05	CAATTCAAATCACAATAATCAATC-TGCCGGCCAGGGTGCCGTC		
<i>iniA</i>	19	G	C	CGAGCATGGCTTGGTCCT(1.5x)	CTGATGTCATCGACGGGAATG(1.5x)	767
<i>iniA</i> -19-WT-ASPE-13			LUA-13	CAATAAACTATACTTCTTCACTAA-GGCGTAAACGAGCGAGAAAG		
<i>iniA</i> -19-Mt-ASPE-15			LUA-15	ATACTTCATTCATTCATCAATTCA-GGCGTAAACGAGCGAGAAAC		
<i>iniA</i>	84	T	G	CGAGCATGGCTTGGTCCT(1.5x)	CTGATGTCATCGACGGGAATG(1.5x)	767
<i>iniA</i> -84-WT-ASPE-33			LUA-33	TCAATTACTTCACTTTAATCCTTT-GCTCAAACAGGGCAAGAGT		
<i>iniA</i> -84-Mt-ASPE-44			LUA-44	TCATTTACCAATCTTTCTTTATAC-GCTCAAACAGGGCAAGAGG		
<i>iniA</i>	634	G	C	GTGGTCGGACTTGGGTTGT(1.5x)	ATGGTTGCGTGCAGAATCG(1.5x)	457
<i>iniA</i> -634-WT-ASPE-46			LUA-46	TACATCAACAATTCATTCAATACA-GCCAACCTTGACGCCCCG		
<i>iniA</i> -634-MT-ASPE-48			LUA-48	AAACAACTTCACATCTCAATAAT-GCCAACCTTGACGCCCCC		

表二、抗藥相關基因之偵測標的 SNPs 用引子及探針序列 (multiplex PCR set 2)

Gene	codon	WT allele	mutant allele	F-primer	R-primer	product
<i>katG</i>	299	G	C	GATGAGCGTTACAGCGGTAAG	ACCTCCCACCCGACTTGT	900
<i>katG-299-WT-ASPE-62</i>			LUA-62	TCAATCATAATCTCATAATCCAAT-GGAGCAGATGGGCTTGGG		
<i>katG-299-MT-ASPE-67</i>			LUA-67	TCATTTACTCAACAATTACAAATC-GGAGCAGATGGGCTTGGC		
<i>katG</i>	310	A	G	GATGAGCGTTACAGCGGTAAG	ACCTCCCACCCGACTTGT	900
<i>katG-929d-WT-ASPE-74</i>			LUA-74	TACACATCTTACAAACTAATTTCA-TGGCACCCGGAACCGGTAA		
<i>katG-929d-MT-ASPE-85</i>			LUA-85	ATACTACATCATAATCAAACATCA-TGGCACCCGGAACCGGTAG		
<i>katG</i>	337	A	G	GATGAGCGTTACAGCGGTAAG	ACCTCCCACCCGACTTGT	900
<i>katG-337-WT-ASPE-90</i>			LUA-90	CTAAATACTTCACAATTCATCTAA-CAGTTTCCTCGAGATCCTGTA		
<i>katG-337-MT-ASPE-91</i>			LUA-91	TTCATAACATCAATCATAACTTAC-CAGTTTCCTCGAGATCCTGTG		
<i>katG</i>	420	T	C	GATGAGCGTTACAGCGGTAAG	ACCTCCCACCCGACTTGT	900
<i>katG-420-WT-ASPE-01</i>			LUA-01	CTTTAATCTCAATCAATACAAATC-AAGCTGATCCACCGAGACAT		
<i>katG-420-MT-ASPE-05</i>			LUA-05	CAATTCAAATCACAATAATCAATC-AAGCTGATCCACCGAGACAC		
<i>inhA</i>	194	T	C	TCTCGGCGTATTTCGTATGCT(1.5x)	TCGGCGTAGATGATGTCACC(1.5x)	417
<i>inhA-194-WT-ASPE-24</i>			LUA-24	TCAATTACCTTTTCAATACAATAC-CGTTGCCGCAGGCCCTAT		
<i>inhA-194-MT-ASPE-25</i>			LUA-25	CTTTTCAATTACTTCAAATCTTCA-CGTTGCCGCAGGCCCTAC		
<i>iniC</i>	476	C	T	CGACATTGAACGACGACGAA	CCAACGGCATCCACATCAC	593
<i>inic-476-WT-ASPE-46</i>			LUA-46	TACATCAACAATTCATTCAATACA-GTTCACTACCAGGGCCTGTC		
<i>inic-476-Mt-ASPE-48</i>			LUA-48	AAACAAACTTCACATCTCAATAAT-GTTCACTACCAGGGCCTGTT		
<i>ahpCtl</i>	-	G	T	CACTGCTGAACCACTGCTTT	GAACACCACCCGCCACTT	339
<i>ahpCtl(-10)-WT-ASPE-55</i>			LUA-55	TATATACACTTCTCAATAACTAAC-GCATTGTCCGCTTTGATGATG		
<i>ahpCtl(-10)-Mt-ASPE-60</i>			LUA-60	AATCTACAAATCCAATAATCTCAT-GCATTGTCCGCTTTGATGATT		
<i>ahpC</i>	-	-	insA	CACTGCTGAACCACTGCTTT	GAACACCACCCGCCACTT	339
<i>ahpC(-4-5)-WT-ASPE-19</i>			LUA-19	TACACTTTATCAAATCTTACAATC-GACTTCACGGCAGATGGAAT		
<i>ahpC(-4-5)-Mt-ASPE-03</i>			LUA-03	TCAATCAATTACTTACTCAAATAC-GACTTCACGGCAGATGGAAA		
<i>ahpC</i>	-	G	A	CACTGCTGAACCACTGCTTT	GAACACCACCCGCCACTT	339
<i>ahpC(-9)-WT-ASPE-13</i>			LUA-13	CAATAAACTATACTTCTTCACTAA-CAGCGACTTCACGGCACG		
<i>ahpC(-9)-Mt-ASPE-15</i>			LUA-15	ATACTTCATTCATTCATCAATTCA-CAGCGACTTCACGGCACA		
<i>ahpC</i>	-	C	T	CACTGCTGAACCACTGCTTT	GAACACCACCCGCCACTT	339
<i>ahpC(-15)-WT-ASPE-33</i>			LUA-33	TCAATTACTTCACTTTAATCCTTT-TGCCTGACAGCGACTTCAC		
<i>ahpC(-15)-Mt-ASPE-44</i>			LUA-44	TCATTTACCAATCTTTCTTTATAC-TGCCTGACAGCGACTTCAT		

表三、抗藥相關基因之偵測標的 SNPs 用引子及探針序列 (multiplex PCR set 3)

Gene	codon	WT allele	mutant allele	F-primer	R-primer	product
<i>mabA(-17)</i>	-	G	T	GCAATTCGTAGGGCGTCAATA	GGTGAGGTTGGCGTTGATG	545
<i>mabA-17-WT-ASPE-06</i>			LUA-06	TCAACAATCTTTTACAATCAAATC-TTTCGGCCCCGGCCGCGGCGAG		
<i>mabA-17-MT-ASPE-08</i>			LUA-08	AATCCTTTTACATTCACTTAC-TTTCGGCCCCGGCCGCGGCGAT		
<i>mabA(-130)</i>	-	T	C	GCAATTCGTAGGGCGTCAATA	GGTGAGGTTGGCGTTGATG	545
<i>mabA-130-WT-ASPE-22</i>			LUA-22	AATCCTTTTACTCAATTCAATCA-ATCCGTCATGGTCGAAGTGT		
<i>mabA-130-MT-ASPE-63</i>			LUA-63	CTACTTCATATACTTTATACTACA-ATCCGTCATGGTCGAAGTGC		
<i>mabA74</i>	74	G	A	GCAATTCGTAGGGCGTCAATA	GGTGAGGTTGGCGTTGATG	545
<i>mabA-74-WT-ASPE-29</i>			LUA-29	AATCTTACTACAAATCCTTTCTTT-TCGATCGCGCCTTCACGG		
<i>mabA-74-MT-ASPE-58</i>			LUA-58	CTACTAATTCATTAACATTACTAC-TCGATCGCGCCTTCACGA		
<i>rpoB(533)</i>	533	T	C	AGCCAATTCATGGACCAGAAC	GGCGGTCAGGTACACGAT	291
<i>rpoB533-WT-ASPE-02r</i>			LUA-02	CTTTATCAATACATACTACAATCA-CGTGACAGACCGCCGGGCCCCA		
<i>rpoB533-MUT-ASPE-39r</i>			LUA-39	TACACAATCTTTTCATTACATCAT-CGTGACAGACCGCCGGGCCCG		
<i>rpoB(176)</i>	176	G	T	ATCAAGAGTCAGACGGTGTTT _(1.5x)	CTTGTCGGTGGACTTGTCAA _(1.5x)	153
<i>rpoB176-WT-ASPE-21</i>			LUA-21	AATCCTTTCTTTAATCTCAAATCA-AACGGGACCGAGCGTGTGGTGG		
<i>rpoB176-MUT-ASPE-26</i>			LUA-26	TACTCAAATCTACTTTTTTCA-AACGGGACCGAGCGTGTGGTGT		
<i>ahpC(-17)</i>	-	C	T	CACTGCTGAACCACTGCTTT	GAACACCACCCGCCACTT	339
<i>ahpC(-17)-WT-ASPE-31</i>			LUA-31	TTCACTTTTCAATCAACTTTAATC-TTGCCTGACAGCGACTTC		
<i>ahpC(-17)-MT-ASPE-45</i>			LUA-45	TCATTTACAATTCAATTACTCAA-TTGCCTGACAGCGACTTT		
<i>ahpC(-12)</i>	-	C	T	CACTGCTGAACCACTGCTTT	GAACACCACCCGCCACTT	339
<i>ahpC(-12)-WT-ASPE-47</i>			LUA-47	CTTCTCATTAATTAATTTACTTACATAAT-TGACAGCGACTTCACGGC		
<i>ahpC(-12)-MT-ASPE-49</i>			LUA-49	TCATCAATCTTTCAATTTACTTAC-TGACAGCGACTTCACGGT		

表四、針對 127 株樣本進行 3 組 multiplex PCR 及 ASPE 反應之成功率

SNP assay	PCR (+) (%)	PCR (-)	Total
multiplex set 1	110 (86.6%)	17	127
multiplex set 2	112 (88.2%)	14	127
multiplex set 3	121 (95.3%)	6	127

表五、針對 127 株樣本 RIF 抗藥性相關 *rpoB* codon 533 及 codon 176 突變位點偵測結果

RIF DST	<i>rpoB</i> mutation	SNP assay			Total
		Mut	WT	NA	
R	codon 533	9	0	0	9
R	codon 176	7	0	0	7
S	wild type	0	108	3	111
Total		16	108	3	127

表六、針對 127 株樣本 INH 抗藥性相關基因突變位點偵測結果

INH DST	GenoType MTBDR _{plus}	SNP assay			Total
		Mut	WT	NA	
R	S	19	2 ^a	7	28
R	R	1 ^b	23	2	26
S	S	0	63	10	73
Total		20	88	19	127

^a: two isolates harboring *inhA* codon 194 mutation confirmed by sequencing were not identified by SNP assay

^b: one isolate harboring mutation in *katG* 315 recognized by GenoType MTBDR_{plus} had additional mutation in *ahpC* -15 identified by SNP assay