

計畫編號：DOH85-TD-027



行政院衛生署八十五年度委託研究計畫

結核桿菌Rifampin抗藥性基因之分析與盛行率之調查

研究報告

執行機構：高雄醫學院微生物學科

計畫主持人：張瑞烽

執行期限：84年7月1日至85年6月30日

本研究報告僅供參考用，不代表本署意見

摘 要

Rifampin 為治療結核病常用的第一線藥物，在高市收集的 307 株臨床菌株中，有 40 株(12.46%)對 rifampin 具抗藥性，其中有 35 株(11.4%)同時對 INAH 與 rifampin 有抗藥性(MR-TB)。Rifampin 之作用機制為結合在結核桿菌 RNA 聚合酶每 β subunit (*rpoB*) 上，抑制其轉錄作用。若 *rpoB* 基因發生突變，導致由其轉譯出的 RNA 聚合酶每 β subunit 產生結構上的改變，可能會使 rifampin 無法結合上去，而形成抗藥性。因此本實驗利用聚合酶鏈鎖反應合併單股核酸多性分析(PCR-SSCP)的方法，快速篩檢 *rpoB* 基因是否發生變異，並進一步作核酸定序比較 rifampin 敏感性結核桿菌與 rifampin 抗藥性結核桿菌，其 *rpoB* 基因序列上鹼基之差異，尋找出 *rpoB* 基因序列上的變異。目前發現的 *rpoB* 基因發生點突變，皆為意誤突變(missense mutation)，分別分佈在譯碼 511 與 533 之間，以在在譯碼 516、522、531 發生的點突變為多，顯示結核桿菌 *rpoB* 基因的突變可導致對 rifampin 之抗藥性。

關鍵詞：結核桿菌，立復平抗藥性，*rpoB* 基因

緒 言

結核桿菌由於其細胞壁的特殊結構，對於惡劣環境之耐力相當強，再加上患者的飛沫傳染，很容易在族群中傳染開來。由於初感染時，症狀不明顯，許多初期患者不知就醫，所以對於傳染的控制，極為不易。而傳統對於結核病的診斷，除了依賴胸腔 X 光片的判讀外，在實驗診斷上，即是做臨床檢體的抗酸性染色法及直接培養法。抗酸性染色法雖然快速，但必需每毫升檢體中，至少含有 10^4 個細菌，方可鏡檢出來(1)。由於許多患者之檢體中，所含菌數可能低至數百甚至數十，因此對這些患者即無法以抗酸性染色法做正確診斷，而且抗酸性染色法也不能鑑別不同種的分枝桿菌。至於培養法，雖只需在每毫升檢體中，含10個以上的細菌(1)，即可培養出，但一般引起結核病的分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)培養在 Lowenstein - Jensen 培養基中，需六至八星期方可長出可見的菌落，而即使是併用含同位素之液體培養基(BACTEC系列)其培養時間仍需二星期(1)。有鑑於此，發展出一套可快速且正確鑑定結核桿菌的方法，實為刻不容緩。

用聚合 鏈鎖反應法來增幅檢體中結核桿菌 DNA 的量，藉以鑑別檢體中所含 *Mycobacterium* 的 species，乃近年來最快速且有效的鑑別法(2-12)。此法可縮短鑑定時間為二天左右，選擇不同的核酸序列加以放大，其特異性與敏感性也因之而異。在結核桿菌染色體上有一段重覆序列(IS6110, IS : insertion sequence)，為極理想之目標序列，因其重覆次數多達十幾次，且專屬於結核桿菌，故可大大提高特異性及敏感性。

雖然國內公共衛生已奠定良好基礎，但結核病仍是困擾國人健康的一個大問題。尤其是近幾年來，隨著人口高齡化時代的來臨，愛滋病例增加，外籍勞工輸入．．．，國人受結核桿菌感染而引起結核病的機率大增，更有甚者，由於國人用藥之不良習慣；包括：未遵照醫師指示定時服藥，喜歡隨便購買抗生素服用．．．等，不僅在病患個人治療上形成困擾，更導致結核病相對的擴散。

Rifampin是治療結核病最常用之第一線藥物，然而目前臨床分出之抗藥性結核桿菌中，卻有不少是對rifampin具抗藥性。一般相信結核桿菌出現抗藥性主要的原因為基因隨機的自然突變(13、14、15、16)，其自然突變率rifampin為 $1/10^8$ ，INH (isoniazid)、SM (streptomycin)為 $1/10^6$ ，EMB (ethambutol)為 $1/10^4$ ，而若同時發生多種突變之機率則更低，因此要在人體內自然產生多種抗藥性結核桿菌 (multiple-drug resistant T.B.; MDR-TB) 之機率是甚低的。但為何實際上病人體內分離出之結核桿菌，MDR-TB所佔比例卻逐年快速升高呢？文獻報告 (13、17、18、19、20) 指出，不當的用藥及病人未遵循正規的療程服藥，為最主要的原因。在治療結核病患時，因傳統的藥物感受性試驗需耗時數週(3~8週)，所以醫師一般皆在試驗結果未明瞭前，即先以藥物治療病患。治療時若單只使用一種藥物，則很容易在病人體內發展出對此藥物具抗藥性之菌株族群，尤其是當病人未依照醫師指示定時服藥時。因此醫師會開出二種以上之藥物，給病人合併服用治療，但即使如此，在藥物感受性試驗結果未明前，合併給藥仍有可能對病人造成莫大傷害，例如：若醫師開給病患三種藥物，而病患體內之結核桿菌原本已對兩種藥物具抗藥性，如此則會造成病人體內發展出對第二種藥物具抗藥性之多重抗藥性菌株出現，在往後的治療上，將更加的費時費事(13)。在此不僅點出正確用藥之重要性，更是要強調結核桿菌抗藥

性的快速鑑別方法之迫切需要。因為唯有能夠發展出快速鑑別結核桿菌各種抗藥性之方法以取代傳統費時過久之藥物感受性試驗，方可迅速提供醫師正確用藥之依據。

幸賴分子生物學的進步，已知Rifampin抑制細菌生長之機制為結合在細菌之 RNA polymerase β subunit上，干擾細菌之轉錄作用(56~ 58)；若 *rpoB* 基因發生突變，導致由其轉譯出的 RNA 聚合酶 β subunit 產生結構上的改變 (conformational changes)，使rifampin無法結合上去，形成抗藥性(55、57、63)。國外許多研告對於大腸桿菌(21)及結核桿菌 rifampin 抗藥性均有深入之探討(14、15)。根據Telenti(14)等人的研究報告指出，結核桿菌產生rifampin抗藥性之分子機轉為：轉譯 RNAPolymerase的一段約 411bp 長之基因序列上之鹼基(base)發生置換突變(substitution mutation)或是有部分鹼基被刪除(deletion)而造成轉譯出的RNA polymerase β subunit 上之部份重要胺基酸被置換或刪除，其中機率最高的是codon 531(Ser \rightarrow Leu)與 codon 526 (His \rightarrow Ser)，而引起結構上的改變，造成結核桿菌對 rifampin 的抗藥性。

因為未來突變之敏感菌株與突變後之抗藥性菌株，其基因序列會有些許差異，此差異可藉由 PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) (14、22、24~26)的方法來偵測結核桿菌的*rpoB* 基因突變菌株。首先以PCR法增幅*rpoB*基因序列後，再以高溫將增幅出的基因序列變性成單股DNA，而後跑中性膠體電泳。在跑中性膠體電泳的過程中，單股DNA本身又會慢慢纏繞起來，因對rifampin 敏感菌株與抗藥性菌株基因序列上之差異，會導致單股DNA 纏繞後形成不同的結構，因此跑電

泳後形成band的位置也會不同，而後再作核酸定序將可快速判定菌株是否有因突變而產生抗藥性。

本實驗即先利用聚合 鏈鎖反應法(Polymerase chain reaction簡稱PCR)，經由特定核 酸序列的引子(primer)，選擇性的找出IS6110基因的一段，以 *Taq* DNA 聚合 的合成作用加以增幅後，再以瓊脂糖明膠電泳法(agarose gel electrophoresis) 辨識是不是具有這段基因存在。同時，將所得結果與傳統方法者相比較，以了解 PCR 法的敏感性和特異性。此外由於針對國內結核桿菌rifampin 抗藥性之研究，目前尚付諸闕如，然而rifampin 抗藥性結核桿菌在國內公衛醫療上形成之嚴重性，實不下於國外，是以本實驗乃擬由rifampin 抗藥性結核桿菌之研究著手，藉PCR-SSCP配合direct sequencing， 分析基因突變形式，期能拋磚引玉，讓國人更重視抗藥性結核桿菌的嚴重性，並能在臨床診斷及治療上有所裨益。

材料及方法

一、菌株的收集與保存：

自民國八十三年七月至民國八十五年六月由高雄地區醫院所收集的307株結核桿菌，接種在Lowenstein Jensen (L-J)斜面培養基，平放於37°C CO₂培養箱之暗處進行培養，定期觀察並記錄其生長情形。此外尚有 ATCC 標準菌株包括 *M.tuberculosis* ATCC25177, *M.intracellulare* ATCC 13950, *M. phlei* ATCC 11758, *M. smegmatis* ATCC 14468, *M.vaccae* ATCC 15483, *M. gordonae* ATCC 14470 將以上生長的菌株懸浮在含有10%甘油的 Middlebrook 7H9培養液，在-20°C冷凍保存。

二、細菌染色體DNA 的抽取：

DNA的抽取乃參考Wit & Steyn (7)等方法，加以修改適合本實驗的進行。由 L-J 培養基上挑取少許菌落到微量離心管 (microcentrifuge tube)，加入 500 μ l TES buffer (Trischloride, pH 8.5, 10mM; EDTA, 1mM; NaCl, 150mM) 使成懸浮液，70°C水浴半小時後，加入 10% sodium dodecyl sulfate(最終濃度 1.5%) 及等體積的 buffered phenol (以 100mM, pH 8.0 的Tris-HCl buffer 加以飽合)，在37°C的水溫箱中，持續搖晃，水浴 3小時，一方面讓結核桿菌能完全溶解，一方面也將蛋白質和脂質從菌液中萃取出來。接著，將微量離心管蓋緊，上下顛倒緩緩搖晃約 5 分鐘，離心10,000 x g 15 分鐘，吸取上清液至一新的微量離心管；再以等量的

chloroform-isoamyl alcohol (24:1, vol/vol) 重覆上述方法萃取二次，將上清液收集至新的微量離心管，加入等體積含 2.5M NaCl 的 polyethyleneglycol (PEG 6,000)，徐緩地上下顛倒使溶液充分混合，放置於 -20°C 冰箱半小時，俟 DNA 沉澱於管底，離心 $12,000 \times g$ 15 分鐘，將溶液倒掉，再加 $100 \mu\text{l}$ 70% 酒精，蓋緊管蓋後輕緩的上下倒置，輕拍管壁，清洗 DNA，離心 $12,000 \times g$ 15 分鐘，倒掉溶液；重覆清洗一次後，將微量離心管置於真空抽氣箱內乾燥，俟其完全乾燥後加 $30 \mu\text{l}$ TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8.0) 溶解(28)。

至於痰液檢體內 DNA 之抽取與純化，則將痰液先用傳統的 NaOH-N-acetyl-cysteine 消化痰液去汙染後，再以 Jaber (70) 等之方法抽取 DNA。簡言之，先以含 chaotropic agent (6M guanidinium HCl) 之緩衝液溶解菌體，再以 phenol-chloroform 抽取 DNA，最後以酒精沈澱之。

DNA 的濃度測定，以 Ultrospec III (Pharmacia LKB, Sweden) 測量其於 260nm 光波長的吸光度(即 OD 值)，1 OD 260 表示內含 $50 \mu\text{g/ml}$ ，測其純度則為 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 約為 1.8。

三、瓊脂醣明膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

瓊脂醣明膠 (agarose gel, FMC, USA) 用 1xTBE-buffer (90mM Tris, 90mM borate, 2mM EDTA, pH 8.3) 配製，先用微波爐加熱使瓊脂醣溶於 1x TBE buffer 內，冷卻至 55°C ，倒入水平的電泳板上，厚度約 4-6 mm，約 30 分鐘後凝固堅硬即可將梳齒拔除，放入水平式電泳槽 (Mupid-2, Cosmo, Japan)，倒入 1x TBE buffer，使明膠平板沒入液面下 1 cm，再將待測之 DNA 加入 tracking dye (30% (v/v) glycerol, 0.25%

(w/v)bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol], 以尖端小管移置於製備完成的瓊脂明膠平板前端的小孔中, 以100V 電泳 3.5 cm, 取出明膠平板以 0.5 μ g/ml 的 ethidium bromide (Sigma, USA) 染色10分鐘, 再以自來水退染 5 分鐘, 最後將明膠放在 ultraviolet transilluminator (Ultraviolet Product USA)上觀察, 同時以拍立得相機 (Polaroid)或一般相機 (Nikon FM-2)拍照存底。

四、細菌染色體DNA分子量的決定：

染色體抽出後, 同時配合已知分子量的標準DNA, 以1%瓊脂明膠電泳, 然後作出其移動的迴歸直線, 就可以求出未知的染色體的分子量。

五、聚合酉每鏈鎖反應 (polymerase chain reaction)

依據 Saiki 等多人的方法(27~30), 加以修改而成。取上述抽取的 DNA 0.05 μ g為模板 (template), 以 10 μ l 為反應總體積, 內含 200 μ M dNTP (deoxynucleoside triphosphates; Boehringer Mannheim), 二種引子的濃度皆為 0.4 μ M, *Taq* DNA 聚合酉每 (Promega, USA.) 1U, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1.5mM, KCl 50 mM, gelatin 0.1mg/ml, pH 8.3。各項條件配製完畢後, 以微量玻璃毛細管 (Idaho Technology, ID., USA.) 吸取溶液, 兩端直接置於火焰上加熱, 熔化玻璃以封住管口(兩端必須預留至少 1 cm 的寬度), 避免管內溶液於受熱時蒸發流失。置於溫度循環機 (Air Thermol-cycler; Idaho Technology)的小孔內, 設定溫度循環機執行程式為: 94°C 加熱 2 分鐘, 然後DNA 變性於 94°C

1秒，引子煉合於55°C 1秒，延伸作用於74°C 1秒，共循環35次，最後於74°C延長5分鐘；全部反應需時僅約30分。程式執行完畢後，拿出微量玻璃毛細管，以石英刀切割兩端封住的管口後，將溶液收集於微量離心管。進一步以瓊脂糖明膠分析。

六、PCR 產物分子量的決定

PCR 產物作出後，同時配合已知分子量的DNA 片段以3%瓊脂糖明膠電泳，作出其移動的迴歸直線，求出PCR 產物的分子量marker DNA為pBR322 DNA以*Hae*III鑑識酵素切割之DNA molecular weight marker V (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)，其 DNA片段大小有 587、540、458、434、264、267、234、213、192、184、124、123、104、89、80、64、57、51、21、18、11、8 鹽基對。

七、PCR 產物的純化

於PCR產物中，加入tracking dye，均勻混合，在3%瓊脂糖明膠（含0.5 μ g/ml ethidium bromide）電泳。在長波 UV 燈下可清楚看見 DNA亮帶，使用乾淨鋒利的刀片切下DNA亮帶。置於1.5 ml微量離心管中，準備利用Mermaid Kit(BIO 101, USA)從瓊脂糖明膠中純化 DNA。每100 mg的瓊脂糖明膠加入300 μ l的high salt binding solution(concentrated solution of sodium perchlorate)及 glass fog(5 μ l per μ g of DNA，使用前需將vial劇烈振盪，使之完全懸浮)，持續振盪微量離心管15分鐘，使glassfog 能完全將 DNA 吸附。離心10,000 x g 30秒，移去上清液，加入 200 μ l的 high salt

binding solution，劇烈振盪，以除去殘留的瓊脂糖明膠。離心 $10,000 \times g$ 30 秒，移去上清液，加入 $300 \mu l$ 的90% 酒精，劇烈振盪使 pellet 懸浮，洗去鹽類及其他雜質。然後，離心 $10,000 \times g$ 30秒，移除上清液，重覆此步驟。移去上清液後，將微量離心管置於真空抽氣箱內乾燥，俟其完全乾燥後，加入 $15 \mu l$ TE buffer， $55^{\circ}C$ 水浴 5 分鐘，使DNA pellet完全溶解，離心 $10,000 \times g$ 1分鐘，將上清液轉移到另一支新的微量離心管。重覆此步驟一次，以提高回收率。

八、聚合酉每鏈鎖反應合併單股核酸結構多型性之分析(PCR-SSCP analysis)

經過修飾過的PCR-SSCP方法(14、22、24~26、32)，主要目的是用來篩選結核桿菌 *rpoB* 基因型DNA的點突變。其原理為在作聚合酉每鏈鎖反應的同時嵌入放射性標幟物，經過加熱及formamide 變性後，雙股核酸變成單股核酸，接著以中性聚丙烯醯胺凝膠電泳，在電泳的同時，單股核酸會形成自己的構形；若其中有不相同的序列，即使分子量一樣，DNA所纏繞(folding)出來的構形也會不同，在電泳時移動快慢就會有差別，故可偵測到點突變的發生。取 $1 \mu l$ 的結核桿菌染色體DNA(約 $0.5 \mu g$)加熱至 $94^{\circ}C$ 5分鐘後，迅速置於冰上。配製PCR-SSCP反應混合液：包括一組 $25 \mu M$ 的引子，各 $1 \mu l$ ； $10 \times$ PCR緩衝液($500mM$ KCl， $100mM$ Tris-HCl， $15mM$ MgCl₂，1% Triton X-100，pH8.8) $10 \mu l$ ， $5mM$ dCTP $1 \mu l$ ， $1.25mM$ 的dGTP、dATP、dTTP 混合液取 $4 \mu l$ ， $[\alpha^{-32}P]$ dCTP ($10mCi/ml$ ，NEG013H，NEN，Boston，USA) $3 \mu l$ ，無菌水 $60 \mu l$ ， $5U/\mu l$ 之Taq DNA 聚合 $0.5 \mu l$ 。充分混合後，取 $7 \mu l$ 的混合液加入含

1 μ l DNA的0.5 ml微量離心管裡，覆蓋一層礦物油 (mineral oil)。置於溫度循環機之中，設定程式為 94°C，1 分鐘； 61°C，1分鐘；72°C，1分鐘，進行40 個循環後，再於74°C，10分鐘。程式執行完畢後，取出 0.5 ml 微量離心管，加入 16 μ l 的loading緩衝液 (95%formamide, 1%xylylene cyanol, 1 % bromophenol blue)加熱94°C，5分鐘後，迅速置於冰上冷卻，以尖端小管取3 μ l 移置於中性聚丙烯醯胺凝膠 (6% non-denaturing poly acrylamide gel) 前端的小孔(well) 中，在 36W 25°C下電泳4 小時。

中性聚丙烯醯胺凝膠電泳 (*Neutral polyacrylamide gelelectrophoresis*)

首先配製中性聚丙烯醯胺凝膠溶液，包含5x TBE 緩衝液 16ml, acrylamide(BioRad)4.64g, bis-acrylamide(Merck)0.16g, acrylamide:bis-acrylamide=29:1glycerol(Merck) 5.33 ml，加去離子水補滿 80 ml，攪拌使其完全溶解。接著將兩片玻璃分別以洗碗精清洗乾淨，然後以酒精擦拭，去灰塵，再以含 5% dimethyl-dicholoro-saline (Sigma) 的氯仿溶液擦拭其中一片玻璃，使凝膠只附著於另外一片玻璃，兩側放好薄片 (spacer, 0.2mm厚)，蓋上玻璃後，在兩邊對稱地夾上夾子，再將夾好的玻璃水平放置。然後在先前泡好的凝膠溶液中加入320 μ l 的10% APS (ammonia persulfate, Bioad)及40ml TEMED (Promega)混合均勻，注入夾好的玻璃空隙，小心不可有氣泡，然後放好梳齒(comb)，平放靜置約3 小時，讓凝膠凝固。待凝膠凝固完全後，取下夾子，在垂直式電泳槽(康谷公司產品，台北)裝滿1x TBE緩衝液，將玻璃放上去，再用夾子固定

兩邊，拔出梳齒，用滴管將空隙處清洗完全，插入梳齒，即可將 PCR 產品load上去，開始電泳。36W，25°C 4小時，分開二片玻璃板，以3MM濾紙(Whatmann, England) 吸附凝膠(厚約0.22mm)，然後在上面包一層保鮮膜，置於凝膠乾燥器 (Model 583 Gel Dryer, BioRad)80°C 乾燥2小時。

自動放射顯影 (Autoradiography)

乾燥後的凝膠固定在 X 光片夾 (X-ray film cassettes; CURIX cassette, 8" × 10")內，將 X 光底片 (Kodak, XAR-5film) 覆蓋於乾燥後之凝膠上，一同壓在 X 光片夾內，在-70°C 下感光4~12小時，以自動沖片機顯像。

九、核酸定序法 (Direct sequencing)

依 Sanger 的原理 (31)，利用 chain - terminating dideoxynucleotides 及 dsDNA cycle sequencing system (BRL, USA) 直接定序純化後的PCR產物 (53)

引子末端標記 (primer end labeling)

在0.5ml的微量離心管中加入 1 μ l 去離子水、1 μ l 引子 TR9 (1 pmol) 1 μ l 5X Kinase 緩衝液 [300 mM Tris-HCl (pH 7.8) 50 mM MgCl₂, 1 M KCl]，1 μ l [γ -³²P] ATP (10 mCi/ml, NEG002Z, NEN) 及 1 μ l T4 polynucleotide kinase (PNK, 1U/ μ l, BRL, USA)，總體積為5 μ l。蓋緊並混合均勻，離心30秒，在37°C下作用半小時後，移到55°C 5分鐘，以終止酵素作用，離心30秒，置於冰上。

核酸定序反應 (sequencing reactions)

在先前裝有已完成末端標記之引子的微量離心管中，再加入 $25\ \mu\text{l}$ 去離子水， $4.5\ \mu\text{l}$ $10\times$ *Taq*定序緩衝液[$300\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 9.0)， $50\ \text{mM}$ MgCl_2 ， $300\ \text{mM}$ KCl， 0.5% (w/v) W-1]， $1\ \mu\text{l}$ 純化過的PCR產物 ($50\ \text{fmol}$)及 $0.5\ \mu\text{l}$ *Taq* DNA聚合 ($5\text{U}/\mu\text{l}$)，總體積 $36\ \mu\text{l}$ 。接著在另外4支新的 0.5ml 微量離心管中，分別加入 $2\ \mu\text{l}$ 的Termination Mix-A (2mM ddATP and $50\ \mu\text{M}$ each dATP、dCTP、7-deaza-dGTP and dTTP)，Termination Mix-C (1mM ddCTP and $50\ \mu\text{M}$ each dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP and dTTP)，Termination Mix-G (0.2mM ddGTP and $50\ \mu\text{M}$ each dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP and dTTP)，Termination Mix-T (2mM ddTTP and $50\ \mu\text{M}$ each dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP and dTTP)；再由剛才泡好的 $36\ \mu\text{l}$ 前反應混合液中分裝 $8\ \mu\text{l}$ 到這4支微量離心管裡，覆蓋一層礦物油。置於溫度循環機中，設定程式為 95°C ，30秒； 61°C ，30秒； 70°C ，1分鐘；進行20循環。接著， 95°C ，30秒； 70°C ，1分鐘；進行10個循環，以確保反應完全。程式執行完畢後，在每支微量離心管中加入 $5\ \mu\text{l}$ stop solution [95% (v/v) formamide, 10mM EDTA (pH 8.0), 0.1% (w/v) bromophenol blue, 0.1% (w/v) xylene cyanol]，混合均勻，離心30秒，保存於 4°C ，在24小時內分析可得最佳結果。

變性聚丙烯醯胺凝膠電泳 (*denaturing polyacrylamide gel electrophoresis*):

首先配製 6% 變性聚丙烯醯胺凝膠溶液。包含 $5\times$ TBE 緩衝液 16ml ，acrylamide 4.56g ，bis-acrylamide 0.24g (acrylamide: bisacrylamide=19:1)，urea 38.4g (最終濃度

為8M, Promega), 加去離子水補滿至80ml。溶解完全後, 使用 Whatman 3MM 濾紙過濾, 靜置於室溫。接著將兩片玻璃分別以洗碗精清洗乾淨, 然後以酒精擦拭, 去灰塵, 再以含 5% dimethyl-dichlorosaline (Sigma) 的氯仿溶液擦拭其中一片玻璃, 使 gel 只附著於另外一片玻璃, 兩側放好薄片 (spacer, 0.2mm 厚), 蓋上玻璃後, 在兩邊對稱地夾上夾子, 再將夾好的玻璃水平放置。然後在先前泡好的凝膠溶液中加入 320 μ l 的 10% APS 及 40 μ l 的 TEMED, 混合均勻, 注入夾好的玻璃空隙, 小心不可有氣泡, 然後放好梳齒 (comb), 平放靜置約 3 小時, 讓凝膠凝固。待其凝固完全後, 取下夾子, 在垂直式電泳槽 (康谷公司產品) 裝滿 1X TBE 緩衝液, 將玻璃放上去, 再用夾子固定兩邊, 拔出梳齒, 用滴管 (dropper) 將空隙處清洗完全, 插入梳齒。拿出定序反應產物, 在 90°C 加熱 5 分鐘後, 即可取 3 μ l 移置到凝膠上端的小孔 (well), 開始電泳。40W, 2 小時後, 分開二片玻璃, 將凝膠浸泡在 5% 醋酸, 15% 甲醇, 約 5 分鐘, 以去除 urea。以 3MM 濾紙 (Whatman) 吸附凝膠 (厚約 0.2mm), 然後在上面包一層保鮮膜, 置於凝膠乾燥器中, 80°C 乾燥兩小時。

自動放射顯影 (Autoradiography)

乾燥後的凝膠固定在 X 光片夾 (X-ray film cassettes CURIX cassette, 8" \times 10") 內, 將 X 光底片 (Kodak, XAR-5 film) 覆蓋於乾燥後之凝膠上, 一同壓在 X 光片夾內, 在 -70°C 下感光 4~12 小時, 以自動沖片機顯像。

十、DNA 自動定序

為避免同位素使用上之困擾，本實驗部份亦採用DNA自動定序儀 (Applied Biosystemes 373-18 DNA Sequencer, Perkin-Elmer, USA) 分析DNA序列。四種不同的dideoxy nucleotides (ddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP) 標記不同顏色的螢光染劑，形成所謂的dye-deoxy terminators，在DNA聚合酶合成DNA過程中，若使用其中的一個terminator，除了DNA合成受阻外，螢光染劑也出現在終止處，經由DNA自動定序儀藉著對顏色的區別而判斷在何種鹼基終止反應，而把整個序列讀出。有關PCR cycle sequencing，PCR產物的純化，自動定序儀凝膠的製備，電泳等皆按產品的說明 (PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem, USA) 去做。

十一、菌液濃度之定量

首先需配製二種培養基：Middlebrook 7H9培養液及Middlebrook 7H10培養平板。培養液之泡法如下，首先在燒杯中加入50ml蒸餾水、0.235 g之粉末 (DIFCO)、0.025ml Tween 20 (WAKO，日本)，煮沸並攪拌均勻後分裝到9支乾淨的試管中(各4.5ml)放在消毒鍋中滅菌後，待其冷卻，再以針管加0.5ml OADC (oleic acid、bovine albumin fraction V、dextrose、catalase之混合液、DIFCO) 於每管中。培養平板之泡法如下：在燒杯中加入45ml蒸餾水、0.235g之粉末、0.75g agar (DIFCO)、0.25ml glycerol、0.025ml HCl(6N) 0.125ml malachite green (0.01% 溶液、WAKO)，煮沸並攪拌均勻後，放在消毒鍋滅菌(121°C，10分鐘)，在室溫下冷卻至約56°C後，再以針筒注

入5ml OADC，分裝到無菌的平板 (plate)上。接著準備10 支品質佳，同樣大小的試管，徹底洗淨並滅菌、準備 1% H_2SO_4 及1% $BaCl_2$ 水溶液，依 McFarland 氏濁度標準液(MacFarland Nephelometer Standards) 配製法所列，將兩溶液所需的量加至試管，每管最後的總量為 10ml，密封試管，每管中硫酸鋇($BaSO_4$)沈澱物之懸浮濁度，相當於一定之細菌濃度。由 Lowenstein Jensen 斜面培養基上挑取少許菌落，接種到Middlebrook 7H9培養液中，培養在37°C之 CO_2 培養箱暗處，在接種後3、5、6天，及隨後之每星期檢查，直到菌落發育完全。與McFarland 氏濁度標準液之懸浮濁度比較，估計其大約之細菌密度，再以Middlebrook 7H9 培養液作10倍系列稀釋(10 fold serial dilution)得 $10^5/ml$ 、 $10^4/ml$ 、 $10^3/ml$ 、 $10^2/ml$ 、 $10/ml$ 、 $1/ml$ 六管，各取 0.1ml 菌液接種於 Middlebrook 7H10 培養平板，均勻塗抹後，置於 37°C之 CO_2 培養箱暗處培養，在接種後，3、5、6天及隨後之每星期檢查，直至菌落發育完全。看平板(plate)上有多少菌落，即可推算出其確切之細菌密度。再由原先稀釋的六管培養液中取0.5ml菌液，進行細菌染色體DNA之抽取及聚合鏈鎖反應，以估計此結核桿菌快速偵測法之敏感度 (sensitivity)。

十二、分枝桿菌的藥物感受性試驗

由 Lowenstein Jensen 斜面培養基上挑取少許菌落，加入1.5ml的生理食鹽水，以研磨器均勻磨碎，視其懸浮濁度加以稀釋至相當於 McFarland No.1 標準液密度，吸取 0.1ml 稀釋菌液，接種含藥物之 Middlebrook 7H10 平板之

每個 1/4小格中。製備含有不同藥物的 Middlebrook 7H10平板的方法如下：將含標準劑量之藥物，放在四分格培養皿其中三個小格，另一格作對照組每個小格中，使用的藥物濃度每毫升分別為 isoniazid(0.2及1 μ g)、rifampin (1 μ g)、streptomycin(2 μ g)、ethambutol(5 μ g)與 kanamycin(6 μ g)。將平板培養於37°C 之 5% CO₂ 培養箱之暗處。連續三週，每週檢查平板之細菌生長情形。若藥物小格的菌落數大於對照小格的1%，即可判定為對藥物具有抵抗性(37)。在此實驗中，若有來自同一病人之菌株，則不列入最後之統計。多重抗藥性結核菌株 (MDR-TB) 依Iseman之定義是指同時對isoniazid與rifampin有抗藥性的菌株 (72)。原發性抗藥性(primary drug resistance) 是指病人未曾接受抗結核藥物治療者，續發性抗藥性(secondary drug resistance) 之定義則依Barnes之建議，是泛指以前只要接受過抗結核藥物治療者，而非局限於以前使用同一藥物，主要原因是因病人對以前用藥之成份並不明確(71)，分別由病人之病歷或電話查詢。統計方法是採用卡方檢定 (Chi-square test) 與Fisher's exact test。

結 果

一、結核分枝桿菌之鑑定

在高雄地區收集 307 株臨床菌株，首先進行niacin 試驗，皆呈陽性反應。接著抽取其染色體 DNA。進一步作毛細管聚合 鏈鎖反應，看其中是否具有於IS6110 的那段123bp DNA。307 株臨床菌株皆呈陽性反應，此外結核分枝桿菌之標準菌株(ATCC 25177) 亦呈陽性反應，其他的標準菌株如*M. intracellulare* (ATCC 13950)、*M. phlei* (ATCC 11758)、*M. smegmatis* (ATCC 14468)、*M. vaccae* (ATCC 15483)及 *M. goodii* (ATCC 14470) 皆呈陰性反應，顯示以 PCR 來鑑定結核桿菌之專一性 (specificity) 極高(Fig 1)；至於其靈敏度(sensitivity)，則僅需10pg之DNA，在痰液則一毫升約需100個桿菌即可偵測到其中有123bp DNA之存在(Fig 2)。

二、結核分枝桿菌之抗藥性表現

在307株臨床菌株中，對單一藥物具抗藥性菌株中，有149株(48.2%)對 isoniazid ($0.2 \mu\text{g/ml}$) 具抗藥性、對較高濃度的 isoniazid ($1 \mu\text{g/ml}$)則僅有50株(16.3%)具抗藥性(表一)；對 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 rifampin，有 40株 (12.4%) 具抗藥性；對 ethambutol、streptomycin與kanamycin抗藥性菌株的比率則分別為9.1%(28株)、15%(46株)與18.9%(60株)，如表一所示。同時對 INH 與 rifampin具有抗藥性的菌株，則將近 11.4%(35株)；對五種測試藥物皆無抗藥性的菌株，只有40%左右(表一)。

若將這兩年所收集的菌株做統計分析，就其抗藥性而言，對kanamycin的抗藥菌株比例由前一年的36.5%降為近一年的4.7% ($p < 0.05$)，如表一所示。若病人以前曾接受過抗結核藥物治療的，菌株對rifampin與ethambutol有抗藥性的機會，則有顯著的增加($p < 0.05$) (表二)。

三、增幅 *rpoB* 基因

利用聚合酉每鏈鎖反應來增幅這段*rpoB* 基因(157bp)，以進一步分析 *rpoB* 基因突變與 rifampin 抗藥性之間的關係。將此反應產物作瓊脂糖明膠電泳，並與DNA marker V (pBR 322 DNA 以HaeIII 鑑識 加以切割之 DNA molecular weight marker) 對照可知，分子量在184bp與124 bp 之間有一DNA片段，與我們預期結果相等，其大小約157bp (Fig 3)。

四、聚合酉每鏈鎖反應合併單股核 酸結構多型性之分析 (PCR-SSCP analysis)

為了快速篩檢*rpoB*基因的變異情形，採用經過修飾過的PCR/SSCP方法 (14、22、24-26、32)，它的原理主要是利用單股DNA 構形的變化以及中性聚丙烯凝膠電泳 (neutral polyacrylamide gel electrophoresis)位置不同來判斷。首先需將 genomic DNA 增幅，並同時利用放射性標幟的核酸 (α - ^{32}P -dCTP)當做材料，在增幅過程中同時嵌入在鹼基序列中，最後在 x-ray film上來觀察結果。結果發現在40株具rifampin 抗藥性的菌株中，有31株之DNA片段電泳移動位置，和標準菌株比較有所差異，而敏感性菌株之 DNA片段電泳位置則和標準菌株沒有差異(Fig 4)。

五、核酸定序 (*direct DNA sequencing*)

為了進一步證實突變的位置以及型式，利用聚合酶鏈鎖反應來增幅這段 *rpoB* 基因 (157bp)，使用之引子及反應條件同 PCR-SSCP，但不增加放射性標識的核酸，將此反應產物作瓊脂糖明膠電泳。接著在 UV transilluminator 上將此片段從瓊脂糖明膠中切下來，經過 Mermaid 之純化步驟除去 PCR 產物中的前引子、核酸及其他殘餘的雜質。將上述純化的 PCR 產物，依 Sanger 之 chain-terminating dideoxynucleotide 原理，利用 ds DNA cycle sequencing system 進行直接核酸定序。結果發現在這受檢的 157bp 中，共有 29 個病例有點突變 (point mutation) 的現象發生，突變位置有 8 個，分別分佈在譯碼 511-533 之間 (附圖一)，較多的，包括譯碼 516、522 及 531 (Fig 5、6、7、8、9, Table 3)，另有 12 株則未見變異；至於 rifampin 無抗藥性的菌株則亦無變異。

結核病一向被認為貧窮落後地區的重要疾病，根據世界衛生組(WHO)的估計，全世界五十三億人口中，幾乎有三分之一的人口(17億)感染了結核病(40)，每年有800萬新病例，每年約有300萬人死於結核病(按:1995年死亡310萬人)，而其中至少有80%發生在開發中國家。對於結核病的防治，一直是國內公衛及醫療上之一大課題，台灣地區肺結核的防治工作，經四十多年的努力，成效有目共睹，如在民國三十六年，每十萬人口死於結核病的人數為294人，到民國七十四年，其死亡率已下降為10.72人，首次排在台灣地區十大死亡原因之外，此後死亡率下降之趨勢漸緩，根據民國八十一年年的調查，其死亡率為9人(按:八十二年的初步報告已降為7人)，居台灣地區十大死亡原因之第十一位(44、45)。雖然如此，仍與世界衛生組織認定之結核病已被控制之標準，盛行率0.143%以下，死亡率每十萬人口2人以下，尚有一大段距離。再觀國外結核病之防治情形，在美國每年新感染結核病的人口，由1953年的84,000人降低至1984年的22,255人(13)，但自1985年至1991年發生率卻上升了18%，至1993年初步估計已有超過39,000個新感染結核病之病例被發現(13)。根據世界衛生組織的調查顯示，不僅是美國的結核病盛行率在回升，似乎全球各地結核病都有死灰復燃的趨勢(40、46、47)。造成結核病再度盛行的因素甚多，在美國可能的因素包括愛滋病之流行感染，因交通便利造成人口流動率及外來人口數之增加，基層醫療衛生組織對結核病之忽視……等(13、47、48)，而在台灣可能的因素包括愛滋病的流行、外籍勞工之引進、人口的老化、旅遊人口

的增加及對於防癆工作之逐漸忽視．．．等(40)。根據文獻報告顯示，不論在國內外，結核病盛行率回升主要因素其實是抗藥性結核桿菌之出現(13、17、48)，根據統計，1991年由美國紐約市的結核病患體內分離出之結核桿菌，至少對一種藥物具抗藥性的菌株佔33%，對INH (isoniazid) 及 RIF (rifampin) 皆具抗藥性的菌株佔19%(18)。1982至1985年，全美國新感染結核病的患者，其體內分離出之結核桿菌，對INH及RIF皆具抗藥性者，僅0.5%，至1991年則上升到3%，舊感染結核病(復發)之患者，體內結核桿菌對INH及RIF皆具抗藥性者，在1982~1985年為3%，至1991年則上升到6.9%(13)。

由本調查(表一)可看出在這兩年高雄地區所分離的結核桿菌對INH與rifampin同時具有抗藥性者，約在11%與12%之間；而台北地區在1995年與基隆地區在1993-1994年的報告(75,76)，也分別在14.3%與17%左右，可見全省MDR-TB的嚴重性，幾乎與愛滋病流行地區MDR-TB之發生率相若(77)。由於INH與Rifampin為常用藥物，臨床醫師用藥時，需多作全面性評估。另外，在表(一)中，kanamycin之抗藥性發生率有明顯下降之趨勢，原因不明，可能與減少開處方藥有關。Pyrazinamide亦為目前常用藥物之一，本實驗並未列為抗藥性試驗，原因是菌株無法在此酸化的傳統培養中生長良好，影響判讀之正確性。

病人以前接受過抗結核藥物治療與愛滋病感染常被認為與抗藥性呈正相關因素(78)，由表(二)中亦可看出，以前服過藥的病患，對rifampin與ethambutol的抗藥發生率要比未接受抗結核藥物治療者來得高，但對於其他藥物則不明顯。由於此類調查是回溯性的調查，受限於病人以前之用藥不明，若能做一預期性的追蹤調查，應有較明確的結果，才可知是否曾用過該藥。

文獻報告(13、19、49)指出愛滋病患者若感染MDR-TB，則其死亡率高達72~89%，且自診斷出感染結核桿菌至病患因感染而死亡之平均時間僅4~16週。對於全球逐年增多的愛滋病患而言，MDR-TB無疑是一可怕的殺手(50、51)。而在公共衛生的立場上，早期診斷及正確治療結核病患，可避免結核桿菌之散佈傳染，一般結核病患在正確服藥三個月後，其痰檢查結果即會陰轉（由陽性變成陰性，即傳染性消失）(19)。但若患者感染的是MDR-TB，而醫師未能正確用藥（使用之抗生素無效），造成病人持續具有高傳染性，若加以未能對病患採取有效的隔離措施，則可能造成MDR-TB的散佈，形成公共衛生上嚴重的問題(20)。

幸賴分子生物學的進步，已知在結核桿菌染色體上，有一重覆序列基因 IS6110，只存在於結核桿菌中，而整段IS6110基因的核酸序列也已被發表(38、39、52)。因此本實驗首先利用聚合酉每鏈鎖反應法（PCR）來偵測IS6110基因是否存在於菌體中，以鑑定其是否結核桿菌。

聚合酉每鏈鎖反應法(PCR)可透過引子(primer)的選擇性，和Taq DNA聚合酉每的聚合作用，增幅一段特定的基因。而且由於科技的進步，使得此方法的操作愈來愈簡單、快速，同時，PCR法具有相當高的敏感性，能夠將極少量的DNA (pg)增幅成在明膠電泳上肉眼能夠觀察的量(ng)。因此，常廣泛被應用在臨床微生物診斷上，尤其是需長時間培養，不易培養的特殊菌種，更是有其開發的必要(2~12、27~30、59、60)。

由於IS6110基因大小有1361bp，對PCR而言太長，不適合反應，同時必須考慮IS6110基因核酸序列的特異性，所以本實驗選擇IS6110基因中，位置在759~881之間，具有特異性，長度又適合進

行PCR 反應的一個123bp 的 DNA片段，作為PCR增幅的對象 (52)。以本實驗PCR的結果加以印證，發現僅結核桿菌染色體DNA中，可增幅上述123bp 的DNA片段，而在非結核桿菌之分枝桿菌包括 *M. intracellulare*、*M. phlei*、*M. smegmatis*、*M. vaccae* 及 *M. goodsonae*等 ATCC標準菌株中則無此DNA片段存在，足見其特異性甚高。此外本實驗所採用的溫度循環機是利用毛細管直接加熱的機種，其傳熱及升降溫度的速度快，循環 25 次可在30分內完成，而傳統使用微量離心管 (ependorf microcentrifuge tube) 進行反應的溫度循環機則需要大約4 小時。因此整個鑑定的過程由染色體DNA的抽取到PCR反應，只需一天的時間。而就其靈敏度(sensitivity)而言，只需10pg(在痰液則需約每毫升100個桿菌)的DNA，即可偵測出結核桿菌的存在，尚符合臨床診斷上迅速確實的需求。

在初步以PCR增幅IS6110中123bp DNA片段，鑑定結核桿菌之，接下來本實驗所要探討的是結核桿菌rifampin抗藥性與*rpoB*基因點突變之相關性。一般相信，rifampin 抑制細菌生長之機制為結合在細菌 RNA 聚合酶的 β subunit 上使其 mRNA 之轉譯在起始作用 (initiation) 即被阻斷，因為 β subunit 的作用就是結合新的核酸(55~58、62~68)。在許多學者所做的研究報告 (21、33~35) 指出在大腸桿菌及麻瘋桿菌中*rpoB* 基因 (負責製造RNA聚合酶每 β subunit的基因) 發生點突變，導致細菌對rifampin 產生抗藥性。而在Telenti針對122株結核桿菌臨床菌株的研究報告(14、24)，顯示其中66株具rifampin抗藥性的臨床菌株皆有*rpoB*基因點突變，而另外6株不具抗藥性的臨床菌株則無*rpoB*基因的突變。推測在結核桿菌發生rifampin 抗藥性的機轉，可能是由於*rpoB* 基因發生突變，使RNA polymerase β subunit構造改變，因而造成rifampin無法發

揮作用。此外在 Huj 的研究報告(54)中指出穿透性障壁(permeability barrier)可能造成對 rifampin 的抗藥性。在目前對結核桿菌的研究中，尚未發現有質體(plasmid)或轉位子(transposon)造成對rifampin 的抗藥性(15、16)。

為了瞭解南台灣具rifampin抗藥性的結核桿菌臨床菌株在 *rpoB* 基因的變化情形，所以本實驗利用快速而且敏感的PCR-SSCP方法來偵測40株結核桿菌臨床菌株，分析 *rpoB* 基因的結構變化。PCR-SSCP的原理乃結合了PCR 和SSCP的方法，使用已作放射性標幟的核酸進行聚合酶鏈鎖反應增幅想要偵測的DNA 片段，接著利用加熱使其變性，放在中性的聚丙烯醯胺凝膠中進行電泳，由於單股的DNA 藉著分子內鍵結的作用而形成穩定的摺疊形狀，因此移動位置就與DNA形成的構形有關，而DNA的構形與DNA 的序列有關，若是有移動位置的差異，我們就認定為因序列變化而造成結構的改變。這種方法的優點是可以簡單、快速、有效地來偵測核酸序列的變化，包括單一核酸的置換，欲偵測的序列在實行聚合酶鏈鎖反應同時增幅及標幟，效率很高，故可大大縮短X 光底片接受曝露的時間，整個實驗過程，包括曝露的時間可以在24小時內完成。也因為由於使用的聚丙烯醯胺凝膠很薄，厚度只有 0.2mm，可以用很高的電壓來跑而沒有因電阻過高而發熱的現象，而且跑電泳的時間可以縮短很多，這方面的改進非常重要，因為單股DNA 的構形對於溫度特別敏感；此外薄的凝膠對於偵測檢體中細微的核酸結構變化有很高的解析，這點是非常有利的。若有大量的檢體需要檢查核酸序列的變化時，PCR-SSCP的方法是很好的選擇(22、25、26、32)。

不過，PCR-SSCP有一個限制就是必須已經先知道想要篩選之核酸序列，然後設計PCR 所要用到的前引子(primer)，而且對於想要篩選的DNA 片段長度不能太長，若是超過400個base pair以上的DNA

片段，可能因為分子的結構太大，而微小的序列不明顯而檢測不出來，因此，最好選擇100到300 base pair的DNA片段長度。由於國外的報告指出(14、24)結核桿菌 *rpoB* 基因之點突變集中在譯碼511、513、516、518、522、526、531、533，所以本實驗選取 *rpoB* 基因中包含這8個譯碼的DNA片段(其大小為157bp)，利用PCR-SSCP加以分析。

根據我們以PCR-SSCP分析的結果，在40株抗藥性菌株中，有31株在PCR-SSCP結果和結核桿菌標準菌株(ATCC 25177)有所差異；另外用來作對照組的15株敏感性菌株之PCR-SSCP結果則沒有變化。為了進一步驗證PCR-SSCP的正確性，再以聚合酶鏈鎖反應增幅這段157bp的基因，進行直接核酸序列分析(direct sequencing)(31、53)。結果發現經由PCR-SSCP結果有變化的31個檢體中，都有點突變的發生，而且皆為意誤突變(missense mutation)。

由聚合酶鏈鎖反應合併單股核酸結構多形性之分析(PCR-SSCP analysis)及核酸定序(direct sequencing)之結果，得到具rifampin抗藥性之結核桿菌臨床菌株中，*rpoB*基因變異的發生率約為77.5%，而在歐美地區，則約有90%的突變率(14)。推測其原因可能由於我們所分析的只是 *rpoB* 基因中一段大小為157bp的DNA片段，也許在 *rpoB* 基因之其他片段存在著其他基因的突變(24)，如 *E. coli* 的rifampin抗藥菌株，其 *rpoB* 基因之突變，亦有在 *rpoB* 基因之其他片段發生(73)。此外，結核桿菌對於rifampin產生抗藥性的機轉，可能不只是因 *rpoB* 基因突變，造成 RNA polymerase β subunit 之結構有所改變 (conformational change)，影響rifampin之作用；結核桿菌複雜的細胞壁，也可能是阻絕藥物進入的通透性障壁(permeability barrier)，如 *M. avium* 即有類似情形發生(74)。值得注意的是我們在譯碼516所發現的點突變(GAC變為TAC，

天門冬酸變為酪胺酸)是國外研究未曾發現的突變型式，因此也許尚其他的突變造成 rifampin 抗藥性，在未來，仍有待更進一步的研究去證實在 rifampin 抗藥性結核桿菌中 *rpoB* 基因的其他部位是否有突變；此外亦須探討通透性障壁與結核桿菌的 rifampin 抗藥性之間的相關性。

總之，由本研究得知了本地區結核菌對常用藥物之抗藥發生率，尤其是MR-TB之發生率已接近愛滋病流行地區，更值得吾人警惕。由本實驗也得知IS6110普遍存於本地區之結核桿菌，從而可利用其片段做DNA增幅，做結核桿菌之快速診斷。本地區之rifampin之抗藥性也主要是由於*rpoB*基因之突變，因此利用PCR-SSCP對rifampin之抗藥菌株也可做快速診斷，應有助於本地區之已日漸著效的結核病防治工作，而能早日達到世界衛生組織之控制標準。

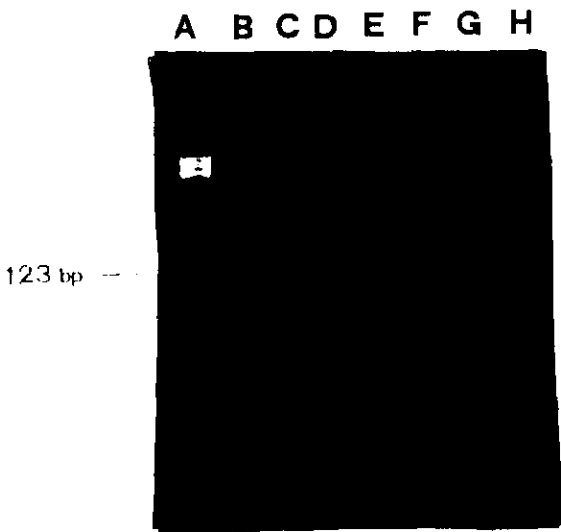


Fig 1. 3 % Nusieve agarose gel electrophoresis of 123 base pair amplified fragments after PCR .
 (A) pBR322 - *Hae* III DNA molecular weight marker
 (B) *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177
 (C) - (E) clinical strains
 (F) *Mycobacterium intracellulare*
 (G) *Mycobacterium smegmatis*
 (H) *Mycobacterium phlei*

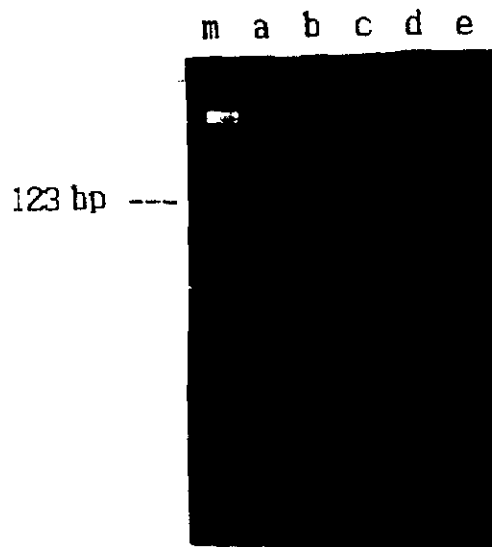


Fig 2. Sensitivity of detection of input DNA by PCR .
Tenfold serial dilutions : (a) 10 ng , (b) 1 ng
(c) 100 pg , (d) 10 pg , (e) 1 pg
(m) pBR322 *Hae* III DNA molecular weight marker

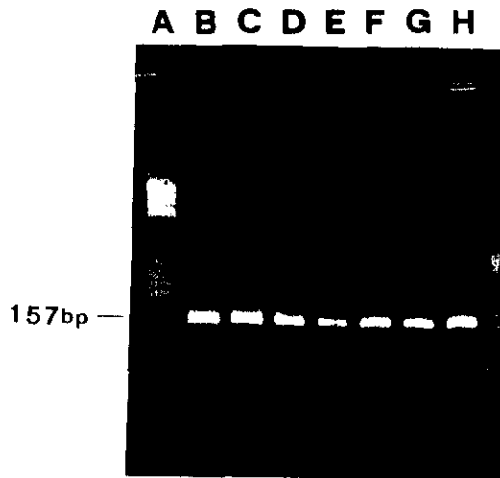


Fig 3. 3 % Nusieve agarose gel electrophoresis of 157 base pair amplified fragments after PCR .
(A) pBR322 *Hae* III DNA molecular weight marker
(B) *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177
(C) - (E) rifampin-resistant strains
(F) - (H) rifampin-sensitive strains

S A S B S C S D

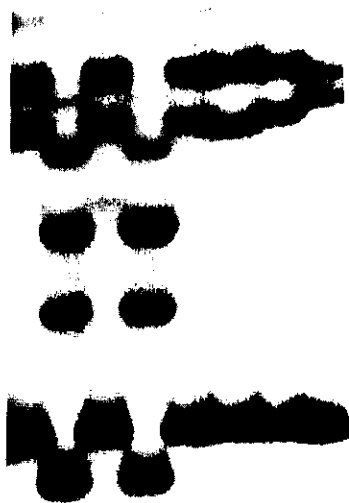


Fig 4. PCR-SSCP analysis of *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* showing mobility shift. Electrophoresis was performed with 6% polyacrylamide gel at room temperature.

(S) *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177

(A) - (D) rifampin-resistant strains

(A) case 23, (B) case 28, (C) case 51,

(D) case 58.

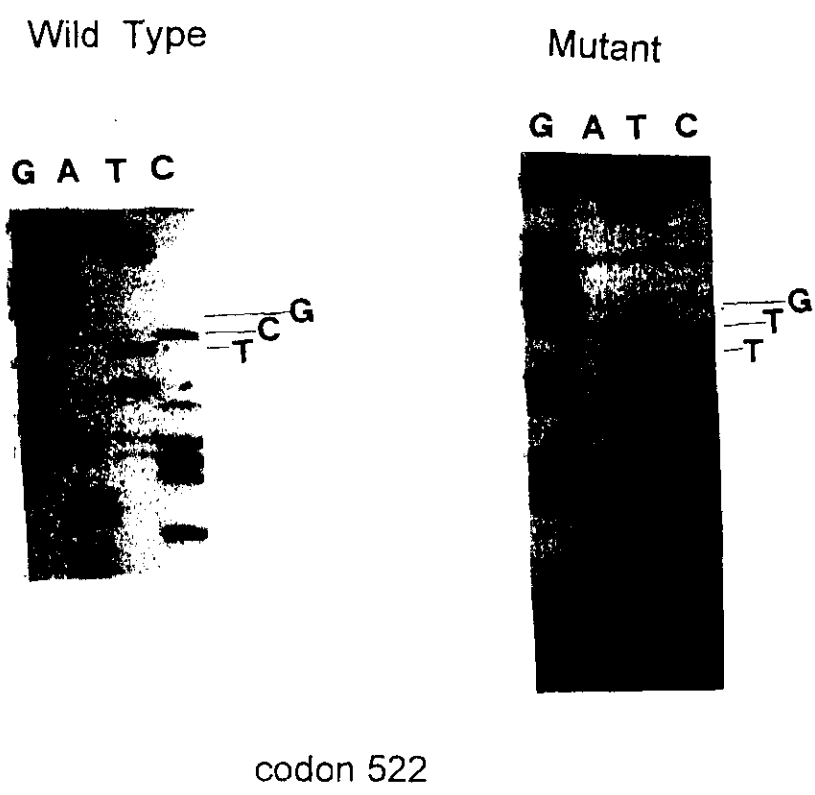
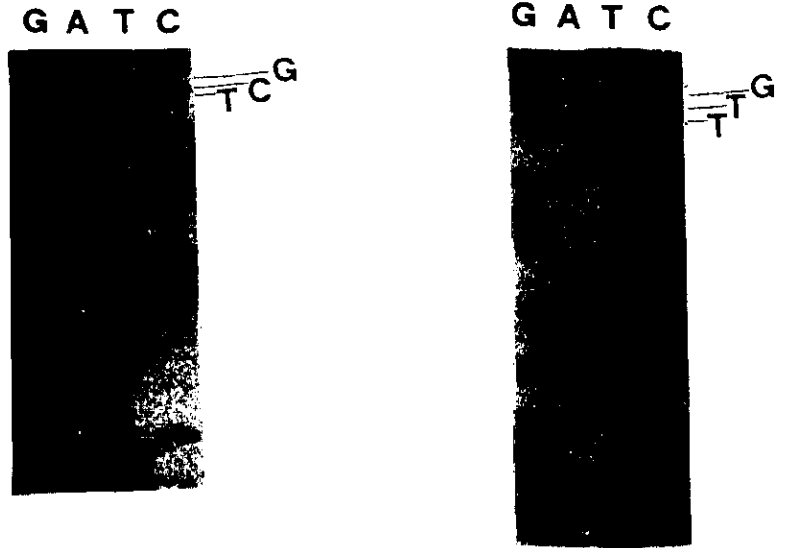


Fig 5. Identification of point mutation in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. The *rpoB* gene from case 16 and case 51 was amplified and sequenced. Substitution at codon 522 from serine (TCG) to leucine (TTG).
 Wild type : *Mycobacterium tuberculosis*
 ATCC 25177
 Mutant : case 16 , case 51 .

Wild Type

Mutant

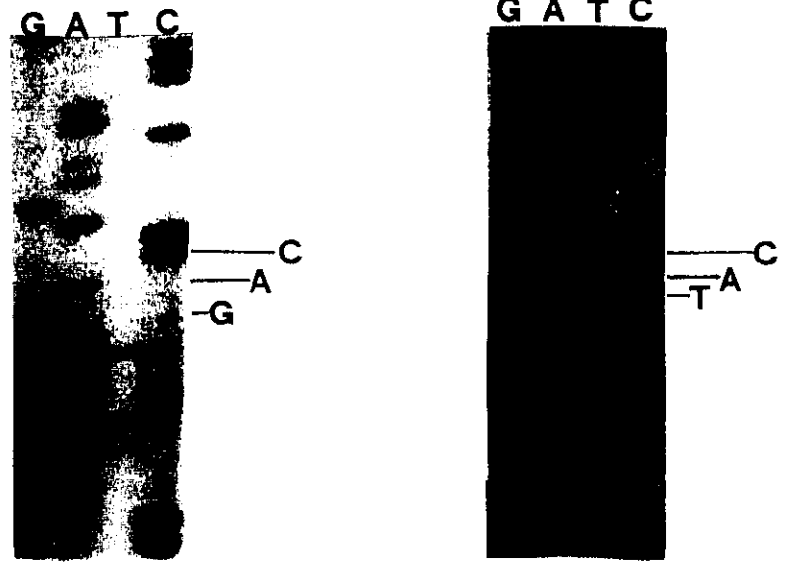


codon 531

Fig 6. Identification of point mutation in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. The *rpoB* gene from case 23 and case 28 was amplified and sequenced. Substitution at codon 531 from serine (TCG) to leucine (TTG).
Wild type : *Mycobacterium tuberculosis*
ATCC 25177
Mutant : case 23 and case 28 .

Wild Type

Mutant



codon 516

Fig 7. Identification of point mutation in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. The *rpoB* gene from case 33 and case 58 was amplified and sequenced. Substitution at codon 516 from aspartate (GAC) to tyrosine (TAC).
Wild type : *Mycobacterium tuberculosis*
ATCC 25177
Mutant : case 33 and case 58 .

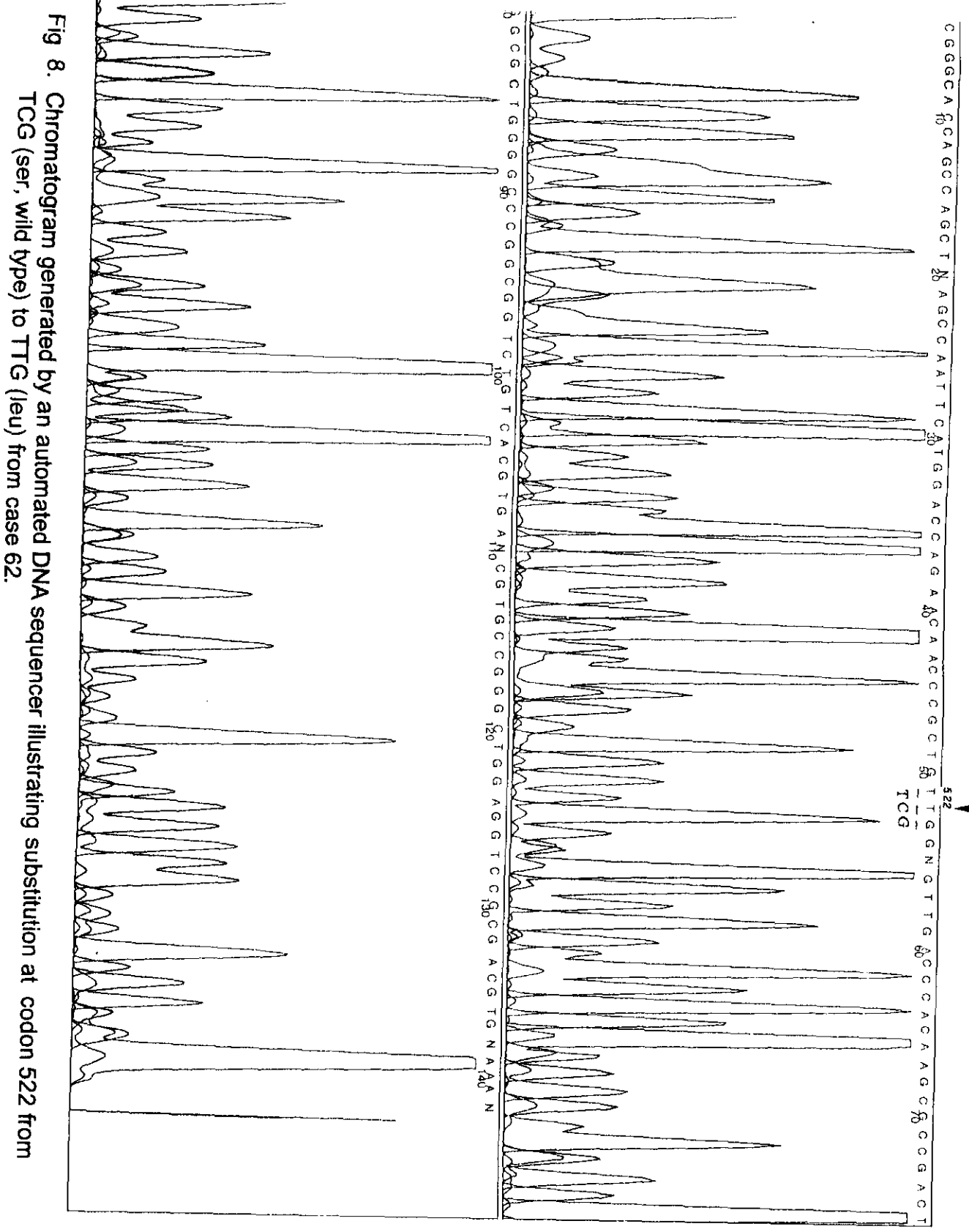


Fig 8. Chromatogram generated by an automated DNA sequencer illustrating substitution at codon 522 from TCG (ser, wild type) to TTG (leu) from case 62.

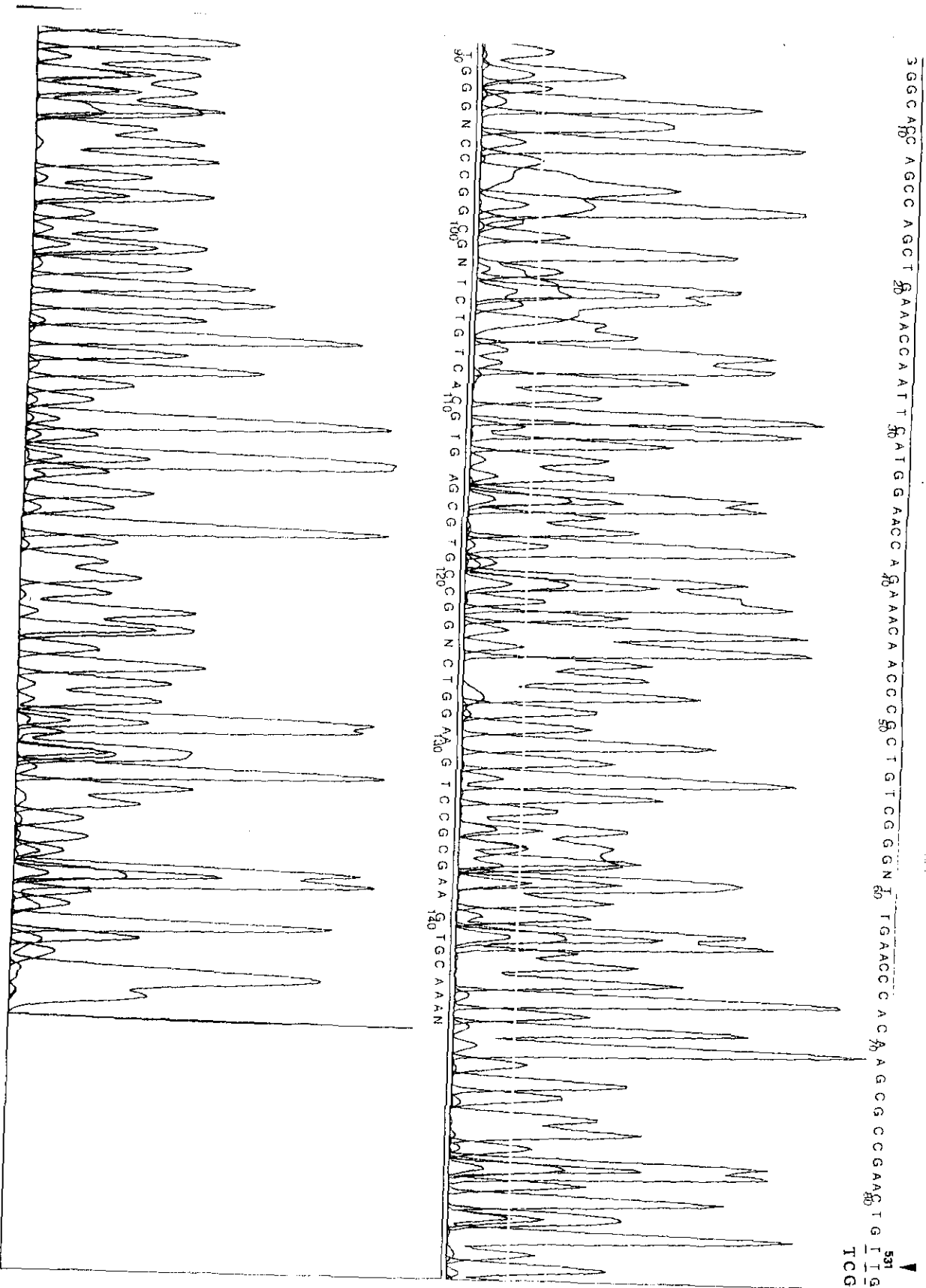


Fig. 9. Chromatogram generated by an automated DNA sequencer illustrating substitution at codon 531 from TCG (ser, wild type) to TTG (leu) from case 87.

Table 1. Antimicrobial Resistance of *M.tuberculosis* Isolates from 307 Patients

| | July 1994-June 1995 (n = 137) | July 1995-June 1996 (n = 170) | Total (n = 307) |
|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Resistnace to (μ g/ml) | No.(%) of Isolates | No.(%) of Isolates | No.(%) of Isolates |
| INH (0.2) | 73(53.3) | 76(43.1) | 149(48.2) |
| INH (1.0) | 22(16.1) | 28(16.4) | 50(16.3) |
| Rifampin (1.0) | 20(15.0) | 20(11.8) | 40(12.4) |
| Ethambutol (5.0) | 13(9.4) | 15 (8.8) | 28 (9.1) |
| Streptomycin (2.0) | 16(11.7) | 30(17.6) | 46(15.0) |
| Kanamycin (6.0) | 52(36.5) | 8 (4.7)* | 60(18.9) |
| INH (0.2) + Rif | 17(11.7) | 18(11.2) | 35(11.4) |
| All resistance | 4 (2.9) | 4 (2.3) | 8 (2.6) |

*: Significant difference between the first year and the second year (p<0.05).

Table 2. Primary and Secondary Drug Resistnace to *M. tuberculosis* from 307 Patients

| | No Previous TB Rx (n = 171) | Previous TB Rx (n = 136) |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Resistnace to (μ g/ml) | No. (%) of Isolates | No. (%) of Isolates |
| INH (0.2) | 81(26.4) | 68(50.0) |
| INH (1.0) | 23(13.5) | 27(19.9) |
| Rifampin (1.0) | 16(9.4) | 24(17.6)* |
| Ethambutol (5.0) | 9(5.3) | 19(14.0)* |
| Streptomycin (2.0) | 24(14.0) | 22(16.2) |
| Kanamycin (6.0) | 33(19.3) | 27(19.9) |
| INH (0.2) + Rif | 16(9.4) | 19(14.0) |
| All resistance | 3(1.8) | 5(3.7) |

*: Significant difference between no previous treatment and previous treatment(p<0.05).

Table 3. Sequence Analysis of 40 Rifampin-Resistant Isolates

| Phenotype | Amino acid affected | Amino acid substitution | No. of isolates(%) |
|-------------|---------------------|-------------------------|--------------------|
| Resistant | Leu 533 | Pro | 1 (2.5) |
| | Ser 531 | Leu | 18(45.0) |
| | His 526 | Tyr | 2 (5.0) |
| | | Arg | 1 (2.5) |
| | Ser 522 | Leu | 3 (7.5) |
| | Pro 520 | Glu | 1 (2.5) |
| | Asp 516 | Tyr | 3 (7.5) |
| | | Val | 2 (5.0) |
| | Glu 513 | Leu | 1 (2.5) |
| | Leu 511 | Pro | 1 (2.5) |
| None | None | 9(22.5) | |
| Susceptible | None | None | 10 |

參 考 文 獻

1. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM and Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 4th ed. Lippincott Philadelphia 1992.
2. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N and Ellis K. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 1994; 32 (3): 672-678.
3. Sjobring U, Mecklenburg M, Andersen AB and Miorner H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(10): 2200-2204.
4. Pierre C, Lecossier D, boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P and Hance AJ. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 712-717.
5. Hance AJ, Grandchamp B, Frebault VL, Lecossier D, Rauzier J. Bocart D and Gicquel B. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacteria DNA. Mol. Microbiol. 1989; 3: 843-849.
6. Fiss EH, Chehab FF and Brooks GF. DNA amplification and reverse dot blot hybridization for detection and identification of mycobacteria to the species level in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 1220-1224.
7. Wit DD, Steyn L, Shoemaker S and Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(11): 2437-2441.
8. Buck GE, O'hara LC and Summorsgill JT. Rapid, Simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to re-

- move DNA for polymerase chainreaction. J. Clin. Microbiol. 1992; 30(5): 1331-1334.
9. Noel AB, Gicquel B, Lecossier D, Frebault VL, Nassif X and Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; vol II : 1069-1071.
 10. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH and Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 1990; 161: 977-981.
 11. Wakefield AE, Guiver L, Miller RF and Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet 1991; 337: 1378-1379.
 12. Patel RJ, Fries JWV, Piessens WF and Wirth DF. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(3): 513-518.
 13. CDC. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance: Recommendation of the advisory council for the elimination of tuberculosis. MMWR 1993; 42(RR-7): 1-8.
 14. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Shopfer K and Bodmer T. Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993; 341: 647-650.
 15. Tsukamura M. The pattern of resistance development to rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercule 1972; 53:111-117.
 16. Mitchsun D.A. Drug resistance in mycobacteria. Br. Med. Bull. 1985; 40: 84-90.
 17. American Thoracic Society, CDC. Treatment of TB and TB infection in adults and children. Am. Rev. Respir. Dis. 1986; 134 :355-363.

18. Frieden TR, Sterling T, Mendez AP, Kilburn JO, Cauthen GM and Dooley SW. The emergence of drug resistant tuberculosis in New York City. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328(8): 521-526.
19. CDC. Probable transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a correctional facility, California. *MMWR.* 1993; 42(3): 48-51.
20. CDC. Transmission of multidrug resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system, New York, 1991. *MMWR* 1992; 41: 507-509.
21. Jin DJ and Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* 1988; 202: 45-58.
22. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T and Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874- 879.
23. Zhang Y, Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Pang Y, Murphy DT and Wallace RJ. DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1551-1556.
24. Williams DJ, Wafuespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP. Characterization of rifampin resistance in pathogenic *Mycobacteria*. *Antimicrob. agents Chemother.* 1994; 38(10): 2380-2386.
25. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 2766-2770.

26. Suzuki Y. Detection of *ras* gene mutations in human lung cancer by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 1990; 5: 1037-1043.
27. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (Washington DC)* 1988; 239: 487-491.
28. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor NY. 1989.
29. Wittwer CT, Fillmore GC and Hillyard DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucl. Acids Res.* 1989; 239: 487-491.
30. Wittwer CT, Fillmore GC and Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analyt. Biochem.* 1990; 186: 328-331.
31. Sanger F, Niklen S and Coulson AR. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 1981; 214: 1205.
32. Ilayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic PCR. *PCR Methods Application* 1991; 1:34-38.
33. Ovchinnikov YA, Monastyrshaya GS, Gubanov VV, Guryev SO, Chertov OY, Modyanov NN, Grinkevich VA, Makarova IA, Marchenko TV, Polovnikova IN, Lipkin VM and Sverdlov ED. The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the *rpoB* gene and amino acid sequence of the b-subunit. *Eur. J. Biochem.* 1981; 116:621-629.
34. Honore N, Bergh S, Chanteau S, Doucet-Populaire F, Eiglmeier K, Garnier T, Georges C, Launois P, Limpiboon T, Newton S, Niang K, Portillo P, Ramesh GR, Reddi P, Ridet PR, Sittisombut N, Wu-Hunter S and Cole

- ST. Nucleotide sequence of the first cosmid from the *Mycobacterium leprae* genome project: structure and function of the *Rif-Str* regions. *Mol. Microbiol.* 1993; 7(2): 207-214.
35. Honore N and Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(3): 414-418.
36. Gangadharam PRJ and Droubi AJ. A comparison of four different methods for testing the production of niacin by mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1971; 104: 434-437.
37. Siddigi S, Libonati J and Middlebrook G. Evaluation of a rapid method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1981; 13:908-912.
38. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH and Crawford JT. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell Probes.* 1991; 5: 73-80.
39. Eisenach KD, Siford MD, Cave MD, Bates JH and Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 1160-1163.
40. CDC. Tuberculosis in developing countries. *MMWR.* 1990; 39: 561-569.
41. Styblo K. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. *Rev. Inf. Dis.* 1989; 11: s339- s346.
42. 行政院衛生署防癆委員會：臺灣結核病流行之探討。民國81年10月，台北。
43. Lee LT, Chen CJ, Tsai SF, Suo J and Chen CY. Morbidity and mortality trends of pulmonary tuberculosis in Taiwan. *J. Formosan Med. Assoc.* 1992;91(9):867-872.

44. Department of Health, Taiwan Provincial Government Health statistical abstract. Taipei. 1967.
45. 楊世仰 1994. 台灣地區第八次肺結核盛行率調查。疫情報導10: 10-11。
46. WHO: Cause of death, World Health Statistics Annual, 1989-1992.
47. Young LS. The Garrod Lecture. Mycobacterial diseases in the 1990s. J. Antimicrob. Chemother. 1993;32:179-194.
48. Ehlers S, Mielke MEA and Hahn H. Progress in TB research: Robert Koch's dilemma revisited. Immunol. Today 1994; 15(1): 1-4.
49. CDC. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons, Florida and New York, 1988-1991. MMWR 1991; 40: 585-591.
50. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, Ong KR, Kilburn JO, Dooley SW, Castro KG, Jarvis WR and Hdmberg SD. An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 1992; 326: 1514-1521.
51. Culliton BJ. Drug-resistant TB may bring epidemic. Nature 1992; 356: 473.
52. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B and Guesdon JL. IS6110, an Is-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucl. Acids Res. 1990 ; 18(1): 188.
53. Rao VB. Review: Direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Analyt. Biochem. 1994; 216:1-4.
54. Hui J, Gordon N and Kajkioka R. Permeability barrier to rifampin in mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 1977; 11: 773-779.

55. Yamada T, Nagata A, Ono Y, Suzuki Y and Yamanouchi T. Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug - resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27(6) : 921 - 924.
56. Konno K, Oizumi K, and Oka S. Mode of reaction of rifampin on mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973; 107: 1006 -1012.
57. Wehrli W. Rifampin: Mechanism of action and resistance. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5 (suppl. 3) : S407 - S411.
58. White RJ, Lancini GC and Silvestri LG. Mechanism of action of rifampin on *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 1971; 108 (2) : 737 - 741.
59. Sooligen D, Haas PE , Hermans PW , Groenen PM, Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(8) : 1987 - 1995.
60. Soolingen D , Hermans PW , Haas PE , Soll DR , Embden JD. 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 (11) : 2578 - 2586.
61. Chen CH, Suo J, Goble M and Heifets L. Quantitative measurement of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* for monitoring chemotherapy response. *J. Formos. Med. Assoc.* 1994; 93 (1) : 35 - 39.
62. Stender W and Scheit KH. Studies of the topography of the binding site of DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli* for the antibiotic rifamycin SV. *Eur. J. Biochem.* 1977; 76 : 591 - 600.
63. Rabussay D and Zillig W. A rifampicin resistant RNA - polymerase from *E. Coli* altered in the b - subunit. *FEBS letters* 1969; 5 (2) : 104 - 106.

64. Heil A and Zillig W. Reconstitution of bacterial DNA - dependent RNA - polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. FEBS letters 1970; 11 (3) : 165 - 168.
65. Yazawa K, Mikami Y, Maeda A, Akao M, Morisaki N and Iwasaki S. Inactivation of rifampin by *Nocardia brasiliensis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1993; 37 (6) : 1313 - 1317.
66. Kumar KP, Reddy PS and Chatterji. Proximity relationship between the active site of *Escherichia coli* RNA polymerase and rifampicin binding domain : a resonance energy-transfer study. Biochem. 1992; 31 (33) : 7519 - 7526.
67. Iseman MD. Evolution of drug - resistant tuberculosis : a tale of two species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91: 2428 - 2429.
68. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science 1994; 264 : 388 - 393.
69. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977;74(12) : 5463 - 5367.
70. Jaber A, Rattan A, Verma a, Tyagi J and Kumar R. A simple method of DNA extraction from *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle. lung Dis. 1995; 76: 578-581.
71. Barnes PF. The influence of epidemiologic factors on drug resistnace rates in tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 1987; 36: 325-328.
72. Iseman MD. Treatment of multiple drug-resistnat tuberculosis. N. Engl. J. Med. 1993; 329: 784-789.
73. Jin DJ and Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. 1988; 202: 45-48.

74. Konno K, Oizumi K, and Oka S. Mode of action rifampin on mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973; 107: 1006-1012.
75. 葉國基、陳再晉、周若嬋、杜鴻運。抗藥性結核病在台北市立慢性病防治院的感染情況。1996; *胸腔醫學* 11: 101-105。
76. Hua CC, Chang LC, Yu TJ, Lee N, Shieh WB. Antituberculosis drug resistance in Keelung area-1993 to 1994. 1996; *長庚醫學* 19: 107-114.
77. Weltman AC, and Rose DN. Tuberculosis susceptibility patterns, predictors of multidrug resistance, and implications for initial therapeutic regimens at a New York City Hospital. 1994; *Arch. Int. Med.* 154: 2161-2167.
78. Bloch AB, Cauthen GM, Onorato IM, Dansbury KG, Kelly GD, Driver CR, and Snider DE. National survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. 1994 *JAMA*; 271: 665-671.

Summary

Rifampin is one of the first-line antituberculosis drugs in wide clinical use. The overall rate of rifampin-resistant strains of 307 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kaohsiung area was 12.4% (40/307). In addition to resistance to rifampin, 35 strains of them were resistant to INH (MR-TB). Rifampin can inhibit the transcription of *Mycobacterium tuberculosis* by binding to RNA polymerase β subunit (*rpoB*). Resistance to rifampin may involve conformational changes of RNA polymerase β subunit resulted from the mutations of *rpoB* gene. We used PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) and direct sequencing to detect mutations in the *rpoB* gene of *M. tuberculosis*. The mutations occurred most often in codons 516, 522 and 531. However, none of sensitive isolates showed mutations in the *rpoB* gene. Thus, substitution of a limited number of highly conserved amino acids encoded by the *rpoB* gene can cause rifampin-resistance in *M. tuberculosis*.

Key words: *M. tuberculosis*, rifampin-resistance, *rpoB* gene