

出國報告（出國類別：研究）

「赴英國與英國 HPA 進行結核病檢驗研究合作」出國報告書

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

姓名職稱：莊珮君 薦任技士

派赴國家：英國

出國期間：民國 96 年 11 月 18 至 28 日

報告日期：民國 97 年 2 月 18 日

目錄

壹、 摘要	3
貳、 目的	4
參、 過程	5
肆、 心得	13
伍、 建議事項	14

壹、摘要

本次奉派赴英國 Health Protection Agency (HPA) 研習，研習期間（包含路程）自 96 年 11 月 18 日至 28 日，主要研習單位為 Centre for Infections，目的乃研習 HPA 所建立的新型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 基因分型方法，評估該方法應用於本實驗室的可行性，並期藉由檢驗技術研究進行合作。本次研習主要由 HPA Applied and Functional Genomics Unit 的 Dr. Catherine Arnold 安排，除了在其所屬單位研習外，Dr. Arnold 並安排其他相關應用領域的單位進行研習及相互討論與合作的可能性，同時並至 HPA Mycobacterium Reference Unit 參考實驗室參訪，就菌株鑑定、抗藥等檢驗技術及基因分型、資料庫等相關議題進行討論；另外也至結核病傳染病防疫相關單位 Respiratory Diseases Department 瞭解 HPA 結核病的通報與監測系統。藉由本次研習對 HPA 結核病防疫與檢驗的相關單位有完整的認識與瞭解，同時針對實驗技術面進行深入的討論，並建立良好關係將有助於未來國際交流與合作。

貳、目的

- 一、 至英國 HPA 研習結核菌新型基因分型技術，同時借重 Dr. Catherine Arnold 演化學專長，針對台灣地區結核菌菌株特性建立更客觀及數位化資料的基因分型技術，並建立雙方合作模式。
- 二、 至 HPA Mycobacterium Reference Unit 參考實驗室參訪，就菌株鑑定、抗藥等檢驗技術及基因分型、資料庫等相關議題進行討論，並建立良好關係以利未來國際交流與合作。

參、過程

一、行程與工作紀要

日期	工作紀要
11 月 18 日(日)	啓程 (台北→英國倫敦)
11 月 18 日(日)	抵達
11 月 19 日(一)	HPA Applied and Functional Genomics Unit 研習
11 月 20 日(二)	HPA Bioinformatics Unit 研習
11 月 21 日(三)	HPA Bioinformatics Unit 研習 HPA Respiratory Diseases Department 研習
11 月 22 日(四)	HPA Applied and Functional Genomics Unit 研習 HPA Bioinformatics Unit 研習 HPA Modeling and Economics Unit 研習
11 月 23 日(五)	HPA Applied and Functional Genomics Unit 研習 HPA Molecular Identification Services Unit 研習
11 月 24-25 日(六-日)	資料整理
11 月 26 日(一)	HPA Mycobacterium Reference Unit 參訪
11 月 27 日(二)	返程 (英國倫敦→台北)
11 月 28 日(三)	抵台

二、內容

英國 Centre for Infections, HPA 研習主要內容如下：

1. Applied and Functional Genomics Unit

本次研習主要經由 Dr. Catherine Arnold 的安排，首先就 fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) 基因分型技術進行討論，也是本次研習的主要技術學習。Dr. Arnold 實驗室於 2007 年 10 月在 *Clinical Microbiology and Infection* 期刊中發表「An IS6110-targeting fluorescent amplified fragment length polymorphism alternative to IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium tuberculosis* DNA fingerprinting」，主要目的為針對結核菌的菌株建立一新的 fAFLP 基因分型技術，以期能取代技術與人力繁複的 IS6110 RFLP 基因分型方法。在 Dr. Arnold 實驗室所建立的 fAFLP 基因分型方法是利用 Beckman Coulter sequencer 進行分析，主要是以 IS6110 為 target，先以 *Mse* I 限制酶將結核菌全基因體進行切割成片段，再以 *Taq* I 限制酶進行切割後，並加入 proline 以利形成 linear 的結構，較易進行後續之 PCR 反應。fAFLP 相較於傳統標準的 RFLP 基因分型方法較為客觀，PCR 產物判別方法與 MIRU 基因分型方法相同，可避免像 RFLP 人為主觀判定 band 的差異。理論上 fAFLP 經限制酶切割後所產生的 band 數目應該會與 RFLP band 數目相等或較少，band 數目會較少的原因主要是因為若在限制酶切割處有 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 發生時，將導致限制酶無法辨識切割，因而無法產生 PCR 產物。

fAFLP 基因分型所產生之 PCR 產物約可產生 300 個 DNA 片段，其優點同 MIRU 基因分型，可精確知道 DNA 片斷的大小，因此 fAFLP 基因分型的結果是數位格式，有利於菌株比對時資料的交換，同時亦可進行 phylogeny 分析。另外針對 IS6110 數目少於 6 個以下的菌株，也可利用其他的 IS element 作為 target 進行 fAFLP 基因分型實驗，已達到足夠的

鑑別力。

另外在 Dr. Arnold 的實驗室亦建立 pyrosequencing 快速鑑定方法來鑑定 NTM 菌株或結核菌的 MDR 菌株，此方法亦可用於偵測是否有 mix strains，如結核菌與 NTM 混合培養，或是 MDR 菌株與非抗藥性菌株的混合培養。

在英國，結核菌的基因型別也是相當多元，主要是因為英國有許多來自不同國家的移民，因此結核菌株的基因型別也多樣化。

由於 HPA 不可再進行動物實驗，因此 Dr. Arnold 亦嘗試建立 *in vitro* assay，例如 macrophage, T cell, dendritic cell, NK cell 等系統來瞭解結核菌的感染機制。

2. Bioinformatics Unit

在 Dr. Arnold 的引薦及安排下有機會與 Bioinformatic Unit 的負責人 Dr. Jonathen Green 及其成員 Dr. Richard Myers、Dr. Anthony Underwood 及博士班學生 Steve Platt 等人見面與討論，首先由 Dr. Green 進行簡介，並有機會參加該組每兩個星期舉行一次的討論會，可對該小組的工作內容進行了解。接著由 Dr. Myers 介紹 TB Strain Typing database，該資料庫目前約含有 17,000 筆資料，MIRU 基因分型由 5 個 reference laboratories (包括 HPA National Mycobacterium Reference Unit, London；Regional Centres for Mycobacteriology, Birmingham and Newcastle；Wales Centre for Mycobacteriology, Cardiff；Scottish Mycobacterial Reference Laboratory, Edinburgh) 進行，菌株之抗藥資料並不完整，資料庫所含菌株之流病資料亦不完整，然該資料庫具有 GIS 功能，可追蹤到個案住家，但為了確保個案隱私，資料庫僅呈現至區域地理座標。根據該資料庫顯示，英國並沒有發現一個主要的 MIRU 流行菌株型別。

接著與 Dr. Underwood 針對 MIRU 基因分型進行討論，Dr. Underwood 認

爲 2 個菌株比較若有 2 個 locus repeat unit 數目不同時，應該是不同的 strain，因爲這種情形發生的機率很小，就算是在同一個病人也不像是從一個 strain 衍生出來的。MIRU 與 direct repeat (DR) 不同，DR 在演化的過程中只會丟掉，但是 MIRU 有可能是獲得或是丟掉 repeat unit。對細菌而言，MIRU repeat unit 數目應該不會過多，否則會造成 genome instability，所以會選擇丟掉 repeat unit。另外就 single nucleotide polymorphisms (SNPs) 進行討論，Dr. Underwood 認爲像 PE 或 PGRS family genes 其 gene variation 大，有可能因爲基因序列的改變而影響到結核菌對宿主的 immune response，但若是基因的單一個 SNP 改變，不太會造成 immune response escape，但是有可能會影響該基因蛋白質的其他功能，這是可以實驗來證明。

接著與博士班學生 Steve Platt 進行 crystal structure 討論，針對我們實驗室已發現特定基因型菌株之特定 SNPs 進行分析，一般而言，若 SNPs 發生在 loop 結構處對整個蛋白質的功能比較不會有影響，若 SNPs 發生在 helix 結構處可能比較會有影響。利用 crystal structure 分析可預先評估 SNP 對該基因蛋白質結構可能造成的改變，再進一步利用實驗證明。Steve 並提供以下 crystal structure 分析相關網站：

<http://www.uniprot.org> : UniProt - Central protein sequence database

<http://expasy.org/sprot/> : SwissProt – Protein sequence database with easier searching

<http://www.pdb.org> : PDB – International database of protein structure

<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html> : Swiss-Model – Protein structure prediction server. Select ‘First approach mode’ from the left-hand

menu, then enter your e-mail and your sequence into the form.

<http://expasy.org/spdbv/> : DEEPView – Protein structure viewer for PCs, Macs and Linux workstations. Simply recover the software ('Download' in left-hand menu); installation is very easy with a couple of clicks and there is very good help available from the link.

3. Respiratory Diseases Department

在本次研習中感謝 Dr. Arnold 的安排，有機會花了一天的時間至 Dr. John M Watson 及 Dr. Ibrahim Abubaker 負責的 Respiratory Diseases Department 進行英國結核病監測系統的認識，課程由 Ms. Michelle Kruijshoar 負責規劃，主要包括：

- (1) Statutory Notifications of Infectious Diseases (NOIDs)
- (2) Enhanced TB Surveillance in England, Wales and Northern Ireland (ETS)
- (3) Treatment outcome surveillance
- (4) United Kingdom Mycobacterial Surveillance Network (MycobNet)
- (5) Tuberculosis incident and outbreak surveillance (TBIOS)
- (6) *M. bovis* surveillance

過去英國傳染病通報系統涵括 England, Wales 及 Northern Ireland 三個區域，不包含 Scotland (該區域自己有通報系統)，今年才開始將 Scotland 資料串入，該通報系統形式仍維持在臨床醫生或護士填寫通報單後，由人工鍵入 local system，再經由 regional system 上傳至 national system (位在 HPA)，national system 可上傳至 EURO system 再將資料上傳至 WHO。該單位人員表示 HPA 此時正在建立 web-based system，以簡化臨床端通報流程，反觀我國已施行 web 版傳染病通報系統，完整有力的資訊化通報系

統仍為重要之媒介。目前英國之臨床端在填完通報單之後就會自動產出一張 treatment outcome 單子，在治療完 12 個月後填寫，若時間到但未治療完仍須填寫表格，所以有可能從通報系統資料仍不知該病人最後治療的結果。

英國現在 treatment outcome 平均約 80%，未達 WHO 的 85% 指標，但 WHO 指標是指 new smear positive cases 中 85% 治好，而英國的 80% 是為 new and relapse cases 計算之結果。

MycobNet 自 1994 年建立，主要是監測結核菌株的抗藥性。所有的菌株會在 reference laboratories (包括 HPA National Mycobacterium Reference Unit, London ; Regional Centres for Mycobacteriology, Birmingham and Newcastle ; Royal Brompton Hospital Microbiology Department, London ; Wales Centre for Mycobacteriology, Cardiff ; Scottish Mycobacterial Reference Laboratory, Edinburgh ; Northern Ireland Public Health Laboratory, Belfast) 進行菌株確認，菌種會鑑定至 *M. tuberculosis* complex 中的 *M. tuberculosis*, *M. bovis* 或 *M. africanum*。*M. africanum* 在英國可見主要是因為非洲移民的關係。根據 2007 年英國結核病年報統計，2006 年共計通報 8113 個案，5026 (62%) 為培養確認為 *M. tuberculosis* complex，有 4934 (97.3%) 有菌種名鑑定資料，其中 4879 (98.8%) 為 *M. tuberculosis*，25 (0.5%) 為 *M. bovis*，30 (0.6%) 為 *M. africanum*。抗藥試驗部分僅做一線藥敏試驗，包括 INH, RIF, EMB 及 PZA，未做 SM。2006 年 5026 培養確認個案中，4662 (92.7%) 具菌株抗藥資料。其中任一抗藥為 7.7%，INH 抗藥為 7.0%，MDR 為 1.1%。英國之 INH 抗藥性較高主要是起因於 1998 年起的 outbreak。

TBIOS 監測系統為自願性的通報給 HPA，該系統建立於 2004 年，為被動式監測 transmission of non-household contacts，包括 healthcare, education, aircraft, prison 等聚集事件，資料來源包括：HPA London Weekly bulletin，

Weekly Health Protection Update Meetings , Direct reports by phone/e-mail to TB section of Centre for Infections , Local and Regional Services Incident Reporting Information System (IRIS) , Tuberculosis in Prisons Surveillance Pilot (London) 。2004-2006 年平均每年約有 300 個個案爲此系統所通報。這些菌株同樣也會進行 strain typing 。

英國自 1999 年建立 *M. bovis* 監測系統，其實在英國 *M. bovis* 的個案並不多，根據結核病年報資料顯示 *M. bovis* 與 *M. africanum* 每年之個案數相似，此監測系統之建立主要是希望能更清楚的了解 *M. bovis* 的流行病學以提供政策參考。

4. Modeling and Economics Unit

這次研習有機會與 Modeling and Economics Unit 的 Dr. Emilia Vynnycky 進行約一小時的討論，該單位主要是進行模式分析，Dr. Emilia Vynnycky 曾經針對香港及荷蘭族群利用模式分析進行 TB risk factors 研究，Dr. Emilia Vynnycky 相當友善並給予其研究論文，可做爲日後相關研究之參考。

5. Molecular Identification Services Unit

在 Colindale 研習的最後一天有機會拜訪 Molecular Identification Services Unit 的負責人 Dr. Haroun N. Shah 。Dr. Haroun N. Shah 主要是進行 proteomics 的研究與應用，Dr. Haroun N. Shah 熱心的介紹 proteomics 原理。該單位購置許多貴重儀器包括 MALDI TOF MS 並致力於病原體的蛋白質體學研究，同時該單位每年定期舉辦有關人類病原體之基因體學及蛋白質體學的研討會 (International Symposium in Genomics and Proteomics of Human Pathogens) ，針對不同主題及新的技術進行相關討論。

6. HPA Mycobacterium Reference Unit, Clinical TB and HIV Group, Centre for

Infectious Disease

本次研習的最後一站是到位在 Whitechapel Royal Hospital 的 HPA National Mycobacterium Reference Unit 拜訪 Dr. Francis Drobniewski。該實驗室除了進行菌株鑑定及抗藥性試驗外，亦進行菌株基因分型。Dr. Francis Drobniewski 介紹實驗室運作情況，並由博士班學生 Preya Velji 介紹該實驗室最近將發表之 MIRU typing 研究。根據分析結果在英國結核菌株之基因型具有多樣性，一年可進行>2000 isolates (一人一株) 的基因分型，spoligotyping 包括 CAS, EAI, LAM 等 families。該實驗室並建立新的 MIRU set, 包含原有 15 個 loci (2001 年 Supply et al.發表) 及新增加的 7 個 VNTR loci (2163A, 2163B, 2347, 3232, 1982, 3336, 4052)，研究結果並顯示該 MIRU set 之鑑別率與原來 15 個 loci 加上 spoligotyping 的鑑別率相當，clustering rate 可降至 20%左右。

肆、心得

本次研習在 Dr. Arnold 的安排下內容相當充實，除了基因分型的技術研習外，對 HPA 在結核病防治與控制的監測系統也有深入的瞭解，獲益良多。同時在經過這一個星期於不同單位研習後更深深感受到 HPA 資源的豐富及支援性與功能性的整合，對於結核病的研究與防治有事半功倍的效果。

英國由於移民、種族等的因素，結核菌菌株的特性多樣化，因此也推動其在基因分型技術與分析的精進。儘管目前英國結核病通報監測系統未完成 web-based system，但由其結核病年報資料顯示，其對結核病個案的掌握仍相當確實，同時其公衛護士對工作的熱誠，是任何參與防疫工作的一份子都該學習的。HPA 目前所建置的 TB strain typing database 中，對於菌株的臨床流病資料仍有缺漏，這與我們目前所遇到情況類似，因此對結核病防疫工作而言，建立整合性與完整的結核病資料庫絕對是刻不容緩的事。

另外藉由本次研習，也再次代表本局邀請 HPA Mycobacterium Reference Unit 負責人 Dr. Francis Drobniewski 至台灣參訪，Dr. Francis Drobniewski 對我國結核菌抗藥性相關議題也表示相當的關心，尤其是在 XDR 發現之後，任何一個國家參考實驗室都應具備標準的抗藥性試驗檢驗能量，以提供正確實驗數據供當國決策單位及國際間參考。

經由本次機會除了研習基因分型技術與相關防疫研究資訊外，同時也深刻體認實驗室檢驗技術對於結核病防治工作之重要性。本實驗室將持續檢驗技術的精進並持續國際合作與交流，為結核病的防治工作持續努力。

伍、建議事項

1. 邀請 HPA Mycobacterium Reference Unit 負責人 Dr. Francis Drobniewski 至台灣參訪及演講，並藉由邀請演講讓國內結核病相關防疫檢驗與研究人員獲得及時的重要國際資訊與檢驗技術進展，體認結核病防疫工作的重要性。
2. 建議本局應多延攬具有生物資訊及生物性資料庫建置專長之人才，以協助生物實驗資料之分析，同時應積極建立結核病整合型資料庫，將實驗與流行病學資料整合，才能真正建立台灣完整的結核病資訊以提供防疫政策參考。