

行政院衛生署各機關因公出國人員出國報告書

(出國類別：進修研習)

「病原真菌及披衣菌診斷技術」

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

出國人職稱：副研究員

姓 名：李淑英

出國地區：美國

出國期間：民國 91 年 8 月 15 日-民國 91 年 8 月 28 日

報告日期：民國 91 年 11 月 15 日

JL/c09200615

系統識別號:C09200615

公務出國報告提要

頁數: 21 含附件: 否

報告名稱:

病原真菌及批衣菌診斷技術研習

主辦機關:

行政院衛生署疾病管制局

聯絡人/電話:

黃貴玲/23959825x3022

出國人員:

李淑英 行政院衛生署疾病管制局 檢驗研究組 研究員

出國類別: 考察 進修

出國地區: 美國

出國期間: 民國 91 年 08 月 15 日 - 民國 91 年 08 月 28 日

報告日期: 民國 91 年 10 月 28 日

分類號/目: J4/公共衛生、檢疫 J4/公共衛生、檢疫

關鍵詞: 病原真菌、批衣菌、黴漿菌、診斷

內容摘要: 此行至美國亞特蘭大疾病管制局，主要研習病原真菌快速診斷及流病分型技術，並順道研習肺炎批衣菌及肺炎黴漿菌之檢驗技術。在病原真菌部門經其主管Dr. Warnock 安排至流病、分子檢驗、參考實驗室、分型、抗藥性五個單位與各負責人詳談並了解相關實驗流程。此外，並至肺炎批衣菌及肺炎黴漿菌實驗室瞭解檢驗流程。此行收穫相當豐盛除了建立了與各實驗室聯絡及未來合作的管道，所研習的技術如PCR-EIA, sequence-based typing 及real-time PCR等對於國內建立相關快速檢驗及流病調查架構助益頗大。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

行政院及所屬各機關出國報告提要

系統識別號 C09200615

出國報告名稱：病原真菌及披衣菌診斷技術 頁數 21 含附件：否

出國計畫主辦機關/聯絡人/電話：行政院衛生署疾病管制局/黃貴玲
/02-23959825#3022

出國人員姓名/服務機關/單位/職稱/電話：李淑英/行政院衛生署疾病
管制局/副研究員/02-26531388

出國類別：1 考察 2 進修 3 研究 4 實習 5 其他

出國期間：民國 91 年 8 月 15 日-民國 91 年 8 月 28 日

出國地區：美國

報告日期：民國 91 年 11 月 15 日

分類號/目

關鍵詞：病原真菌、批衣菌、黴漿菌、診斷

內容摘要：（二百至三百字）

此行至美國亞特蘭大疾病管制局，主要研習病原真菌快速診斷及流病分型技術，並順道研習肺炎批衣菌及肺炎黴漿菌之檢驗技術。在病原真菌部門經其主管 Dr. Warnock 安排至流病、分子檢驗、參考實驗室、分型、抗藥性五個單位與各負責人詳談並了解相關實驗流程。此外，並至肺炎批衣菌及肺炎黴漿菌實驗室瞭解檢驗流程。此行收穫相當豐盛除了建立了與各實驗室聯絡及未來合作的管道，所研習的技術如 PCR-EIA, sequence-based typing 及 real-time PCR 等對於國內建立相關快速檢驗及流病調查架構助益頗大。

摘要

此行至美國亞特蘭大疾病管制局，主要研習病原真菌快速診斷及流病分型技術，並順道研習肺炎批衣菌及肺炎黴漿菌之檢驗技術。在病原真菌部門經其主管 Dr. Warnock 安排至流病、分子檢驗、參考實驗室、分型、抗藥性五個單位與各負責人詳談並了解相關實驗流程。此外，並至肺炎批衣菌及肺炎黴漿菌實驗室瞭解檢驗流程。此行收穫相當豐盛除了建立了與各實驗室聯絡及未來合作的管道，所研習的技術如 PCR-EIA, sequence-based typing 及 real-time PCR 等對於國內建立相關快速檢驗及流病調查架構助益頗大。

目 錄

壹、前言-----	4
貳、目的-----	6
參、行程-----	6
肆、考察內容-----	7
伍、心得與建議-----	16

赴美國研習「病原真菌及披衣菌診斷技術」出國報告

壹、前言

近年來因人類免疫不全病毒(HIV)之感染、癌症、抗生素及類固醇之濫用及器官移植、重症照護等醫療行為及人口老化等因素、導致免疫功能不全之個體大量增加，助長了病原真菌感染之趨勢。除上述機緣性感染之案例外，肇因於都市的發展、人口遷移及自然災害等因素，病原真菌對於健康個體之威脅性亦與日俱增。以美國為例，2001年以來，因美國西部地區氣候變遷，持續熱浪侵襲使得 *Coccidioides immitis* 案例遽增。此外，抗真菌藥物選擇甚少，這些藥物被當廣效性或預防性藥物使用的結果，使抗藥性問題日漸浮現，更增加問題的棘手性。要言之，真菌感染之嚴重性漸獲重視。以美國為例，傳染病死亡案例統計中，真菌性病害已由1980的1557例增至1997年的6534，排名由第十位躍升至第七位。其他歐美國家之調查報告亦指向病原真菌漸趨嚴重之事實。

台灣高溫多濕之氣候環境十分適合真菌之繁衍，然而多數病原真菌屬非報告傳染病，加以診斷困難，故其發生率、嚴重性常有被低估的傾向。除台灣較常見的病原真菌如念

珠菌(*Candida spp.*)、隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、麴黴菌 (*Aspergillus fumigatus*)…等之外,因國際旅遊頻繁或生態變遷導致其他新興病原真菌如 *Penicillium marneffe*、*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum*、*Mucormycosis*....等之移入及崛起,亦值得吾人注意,應及早收集相關資訊建立相關診斷方法及本土性流行病學資料,以為擬定防治策略之參考。

病原真菌在診斷上頗為困難,正確的診斷有助於瞭解真菌性病害的實際嚴重性及經濟上衝擊,而早期及時的診斷則對病害診治具有莫大的幫助。分子生物診斷技術如PCR等技術具有快速、高敏感及專一性之特性。在流病溯源調查及分子流行病學之研究方面,近年來則有限制酵素與圖多型性分析(restriction fragment length polymorphisms, RFLP),去氧核糖核酸指紋圖譜分析法(DNA fingerprinting)、逢機增幅多型性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)及核酸定序分析等技術被發展應用。

真菌實驗室自2002年疾病管制局組織重組後成立,負責病原真菌及一些特殊病原如批衣菌及肺炎黴漿菌之檢驗

及研究事宜，對於各種檢驗研究方法之建立，流病資料的調查及收集，抗藥性趨勢之追蹤，未來相關領域研究發展趨勢，美國CDC以其多年累積之經驗，應有許多值得吾人借鏡的地方，因此藉由此次研習的機會瞭解CDC各實驗室運作的情形。

此外，由於近年來生物恐怖戰之陰影籠罩，病原真菌中的*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum*等亦被視為潛在的生物戰劑之一。台灣的氣候溫度雖然不適合此菌的繁衍，但是若發生最壞狀況時，國人仍應有檢驗因應能力，且應與美國CDC建立合作管道，必要時能請他們提供協助。

貳、目的

- 1、研習病原真菌快速診斷及流病分型技術。
- 2、研習肺炎批衣菌之檢驗技術。
- 3、研習肺炎黴漿菌之檢驗技術。
- 4、建立與各實驗室聯絡及未來合作的管道。

參、行程

赴美國研習「病原真菌及披衣菌診斷技術」行程

日期	工作 日誌	地 點	行 程 內 容
91/08/15 (四)	啟程	台北→洛杉磯	啟程
91/08/16 (五)	轉機	洛杉磯→亞特蘭大	啟程
91/08/16 (五) - 91/08/26 (一)	研習	亞特蘭大	至美國疾病管制局真菌 研究部門及呼吸道披衣 菌與黴漿菌實驗室研習
91/08/27 (二)	轉機	亞特蘭大→洛杉磯	返程
91/08/28 (三)	回程	洛杉磯→台北	返程

肆、研習內容：

1、研習病原真菌快速診斷及流病分型技術：

在病原真菌部門先與主管Dr. Warnock晤談，接著經其安排至流病、分子檢驗、參考實驗室、分型、抗藥性五個單位與各負責人詳談並了解相關實驗流程。研習的技術包括PCR-EIA, sequence-based typing及real-time PCR等。

a. 流行病學單位(Epidemiology Unit):

流病單位負責人Rana A. Hajjeh醫生除負責美國本土病原真菌的流行病學調查工作外，也與許多國家合作流病調查工作。和她談及剛開始從事病原真菌研究時普遍遇到的非報告傳染病問題時，他很驕傲的告訴我經由爭取近年來*Coccidioides immitis*已被列為報告傳染病。

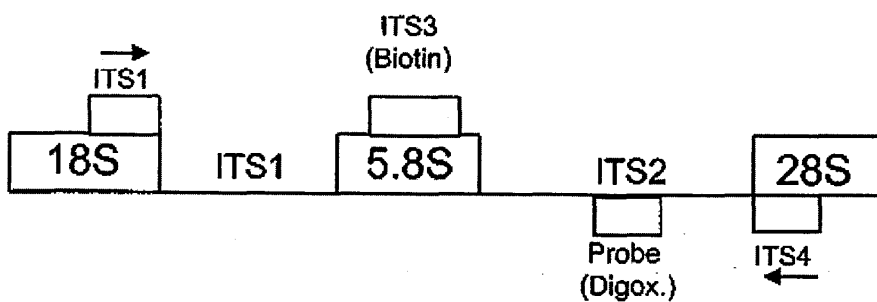
b、檢驗試劑發展單位(Diagnostics Development Unit):

檢驗鑑定方法的研習是此行的重點，病原真菌尤其是黴菌(mould)的鑑定最為人詬病的是鑑定困難，且多依賴型態學的區分，需多年經驗且易流於主觀。近年來，隨著分子生物及基因體學的進展，分子分類(molecular taxonomy) 觀念被引入，也使得分類學有重大改變。像毛癬菌(*Trichophyton* spp.)

就被認為過去有過度分類的現象，這些不合時宜的分類已被歸併重新分類。

本單位負責人Dr. Christine J. Morrison生病住院，由其代理人Dr. Mark D. Lindsley負責接待，此單位除負責一些特殊爆發流行檢體的血清及分子檢驗工作外，也開發一些新的檢驗方法

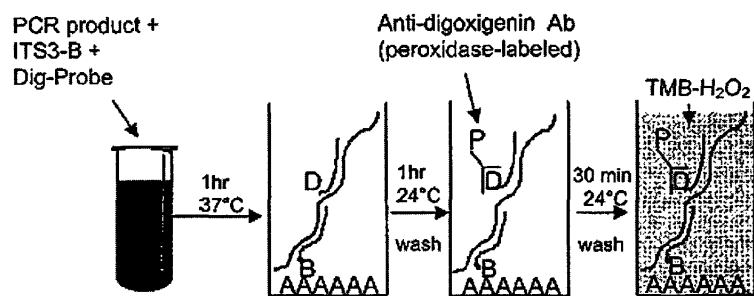
在此單位研習最大收穫就是學到PCR—EIA方法，其原理為先將病原真菌的18S、5.8S與28S的rDNA(ribosomal DNA)區域(見圖一)利用泛真菌引子(pan-fungal primers)ITS1及ITS4作PCR增幅，接著以用digoxigenine標誌的種別探針(probe)與PCR增幅出之產物做雜合(hybridization)，接著利用呈色原理始有雜合的反應呈色(見圖二)，依此作種別的鑑定(species identification)。



增幅之區域。(摘自Lindsley et al.2001. Rapid

Identification of Dimorphic and Yeast-like Fungal Pathogens Using Specific DNA Probes. J. Clin.

Microbiol.39:3505-3511)



圖二、PCR—EIA步驟流程圖。(摘自Lindsley et al.2001. Rapid

Identification of Dimorphic and Yeast-like Fungal Pathogens Using Specific DNA Probes. J. Clin.

Microbiol.39:3505-3511)

本項PCR—EIA技術已在本局真菌實驗室積極發展成功，測試成功的菌株包括*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* 及 *Cryptococcus neoformans*。本此原理，未來只要能找出適當的種別專一性序列當探針，其他種別也都能套用此方法鑑定出來。

c、參考實驗室單位(Fungus Reference Unit):

Dr. Mary E. Brandt主要負責後送病原株的確認鑑定工作，也作部分菌株保存工作。每年8月初他們也舉辦為期二天

的病原真菌鑑定課程，接受全球有興趣人士參加。

他們的標準檢驗流程與國內相差不多，酵母菌利用 Chromagar、API20等做鑑定，黴菌則多依賴slide culture等型態學鏡檢。針對*Blastomyces dermatitidis*、*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum* 三種真菌因培養的困難及危險性則採 Gen-Probe公司所研發的AccuProbe for Fungal Identification分子鑑定套組，原理也是核酸雜合及後續呈色反應再以 Luminometer讀取數值。不需PCR也不需繁複的步驟，整個流程僅需約一個小時。國內因應*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum*生物恐怖戰可能威脅，可考慮引進此套系統。

值得一提的是，他們的檢體進來到檢驗結果的追蹤是以條碼輔以電腦管理。另外，由於他們常協助其國內遠處或國外解決疑難雜症，所以還有一項遠距鑑定服務 (telediagnosis) 的業務，尋求諮詢者只要將附有比例尺的菌株圖像透過 internet傳至CDC，他們可協助鑑定。

d、分子分型單位(Molecular Typing Unit)

Dr. Tim Lott主要協助流病調查，研究方面則探討病原的族群遺傳動態變化。

詢問分型技術的未來發展，他認為隨著DNA序列分析技術的進步及普及，DNA序列分析技術上已不再像過去那麼複雜，價格也大幅度降低，因此，他預見DNA序列分析將是未來分型技術主流，經由分析特定基因的序列或種別專一性重複單元序列 (species-specific repetitive element) 或微衛星基因 (microsatellite gene) 作為型別區分之依據。例如種別專一性重複單元序列已被應用在 *C. parapsilosis* 的分型上。至於被問及真菌是否像病毒，研究學者已有共識，可針對某一段基因的序列建立基因資料庫，如流感病毒H及N基因或腸病毒的VP1，目前則仍言之過早，有待真菌學者累積更多資料後形成共識。他們自己作定序工作，使用的定序機器是ABI310。

e、抗藥性單位(Antifungal Drugs Unit)

Dr. B.A. Arthington-Skaggs主要負責病原真菌如 *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*及皮癬菌 (Dermatophytes)的抗藥性測試及抗藥性檢測方法的研發及改良。

此外，他們也使用先進分子分析方法如Light-Cycler real-time PCR 分析抗藥性基因之表現及變異。

2、研習肺炎批衣菌之檢驗技術。

至呼吸道細菌部門與肺炎批衣菌(*Chlamydia pneumoniae*)檢驗負責人Dr. Maria Lucia C. Tondella討論。

肺炎批衣菌除為重要非典型肺炎之元兇外，與動脈硬化症及許多慢性心血管疾病有關。該實驗室檢測 *C. pneumoniae* 主要用MIF檢測抗體及二種nested-PCR 分別針對16S rRNA and ompA genes。最近更研發以TaqMan螢光探針為主的 real-time PCR檢測方法。偵測的基因標的為ompA 基因的VD4片段大小為125-bp。偵測極限為 0.001包涵體(inclusion-forming unit)。

Dr. Tondella 說real-time PCR檢測方法確實有速度快、特異性及敏感度高及不易污染的缺點。現在他們已經逐漸用real-time PCR取代nested-PCR。未來標準檢驗流程將會是MIF結合real-time PCR方法。

本實驗室目前亦積極發展*C. pneumoniae*的real-time PCR檢測方法，目前以*C. pneumoniae*純化DNA(由成大林遵湄副教授提供)測試結果，特異性高、敏感度可達10pg。且僅需時一小時。

3、研習肺炎黴漿菌之檢驗技術。

至呼吸道細菌部門與肺炎黴漿菌負責人Dr. Deborah F. Talkington討論。

該實驗室的檢驗方法主要用Labsystem的及nested-PCR針對Plgenes。最近也研發以TaqMan螢光探針為主的 real-time PCR檢測方法。可見real-time PCR方法已經漸成為檢驗方法的主流之一。

4、建立與各實驗室聯絡及未來合作的管道。

此行另一項目的是與各實驗室負責人認識後建立未來E-mail聯絡的管道，以後不論是檢驗或研究上的問題皆可與他們討論，交換心得。尤其是標準菌株及/或其DNA的收集，罕見或生物恐怖戰有關病原的檢驗皆可與他們取得聯繫請求協助。此外，為促進雙方交流瞭解，並邀請真菌部門主管Dr. Warnock 2003年4月來台訪問指導，並參加本局與國衛院舉辦的2003年致病性黴菌研討會。Dr. Warnock也提及美國CDC提供許多獎學金供國外學者申請至CDC進修研習，有興趣在CDC進一步作研究的人不妨申請。

伍、心得與建議

1. 加強實驗室的安全及門禁：

此次去美國 CDC 正逢 911 恐怖攻擊快滿週年之際，CDC 的警備森嚴，到處可見高大黑皮膚的警衛，荷槍實彈在各個部門的出入口盤查把關。訪問者不論到哪裡都要有 CDC 的人隨行陪伴，不得單獨行動。門戶的進出皆有電子鑰匙管理把關，依所被賦予的權限決定其在各部門間之移動自由度。有人說 911 以後使得美國人開始排外且對安全稽核事物上變得神經質。不過，一個負責全國傳染病防治最高機構，加上防衛生物恐怖戰的重任之下，確實應該針對所有可能的最壞情況(worst case scenario)研擬因應措施。

2. 加強罕見及未知病原之檢驗人力及能力：

近年來的經驗告訴我們，引起我們恐慌的傳染性病原已不再侷限是法定傳染病，尤其是今日的未知病原可能成為明日的新興病原。因此，應汲取先進檢驗技術，全方位強化檢驗研究架構及能力。在美國 CDC 幾乎所有傳染病原都找得到相應的專家，以病原真菌部門為例，正式研究及行政人員就有約 30 人，所以他們可以就檢驗、參考實驗室、分子分型、流病調查、抗藥性等問題作深入的全方位探討。

3.加強國外研習訓練機會：

應多派員前去研習檢驗技術汲取研究新知。雖然現在網路科技發達，許多檢驗或研究新技術雖可經由文獻發表取得資料，但畢竟仍有一年以上的時間落差。尤其一些管理或技術細節是不可能被發表或公佈的，例如 CDC 的檢體條碼管理系統，菌種保存系統，中央與地方衛生機構的分工...等。因此，應鼓勵助理研究員以上層級人員，擇其中英文能力較好者，多去國外見習，移植先進技術回來。經費除了國內提供外，也可考慮申請美國 CDC 的獎助。年輕的助理研究員是未來檢驗的中堅，應儘早培養他們的國際觀與能力，以免以後形成斷層。

4.建立與 CDC 合作交流之機制：

應建立平常 E-mail 聯絡討論的管道，並促進雙方交流互訪。

(附錄)