

行政院及所屬各機關出國報告
(出國類別：開會)

參加第六屆國際流行病學標記會議
(6th International Meeting on Microbial Epidemiological
Marker , IMMEM6)

服務機關：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：瑞士
出國期間：92.8.27~92.8.30
報告日期：92.12.12

J4 / C09300529

系統識別號:C09300529

公 務 出 國 報 告 提 要

頁數: 16 含附件: 否

報告名稱:

參加第六屆微生物流行病學標記研討會

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 研究檢驗組 副研究員

出國類別: 其他

出國地區: 瑞士

出國期間: 民國 92 年 08 月 26 日 -民國 92 年 09 月 13 日

報告日期: 民國 92 年 12 月 12 日

分類號/目: J4/公共衛生、檢疫 J4/公共衛生、檢疫

關鍵詞: 流行病學

內容摘要: 隨著國際交流的頻繁、生活型態的改變及環境的變遷，使得新的病害隨之崛起。二十一世紀全球將面臨一連串的傳染病威脅，除了愛滋病、狂牛病、肺結核外，每年都有新面孔出現的流感病毒以及最近發生的SARS，再加上蠢蠢欲動的生物恐怖攻擊事件。這些傳染病除了再次印證了傳染病無國界外，更強調了早期偵測、流病分型對傳染病溯源及防治之重要。如何在疫情爆發初期即時偵測及精確分型對防治疫情關鍵性之影響。甚且應透過平日監測的工作，瞭解病原變化流行習性，以期防堵境外取得先機。先進精確的分子流性病學分型方法可望成為偵測、防治的利器。近年來，基因體計畫的蓬勃發展，為百餘物種的DNA解序，加速了物種間序列比對的效率，為分型技術帶來了莫大的助益，除有助於全基因體的蒐尋流病標記外，亦可望提升分子分型效率。本次有幸獲得SARS防治經費資助，參加92年8月27日至30日於瑞士Les Diablerets舉行的第六屆國際流行病學標記會議(6th International Meeting on Microbial Epidemiological Marker, IMM6)，主要目的在於收集呼吸道相關病原之最新流行病學分型技術資訊，希望能將這些先進技術建立到實驗室，除作為未來呼吸道病原流行病學監測及防治之利器，並希望能與國際接軌，加入相關研究網絡。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

目次

一、摘要	p.2
二、會議內容	p.4
三、建議	p.16

一、摘要：

隨著國際交流的頻繁、生活型態的改變及環境的變遷，使得新的病害隨之崛起。二十一世紀全球將面臨一連串的傳染病威脅，除了愛滋病、狂牛病、肺結核外，每年都有新面孔出現的流感病毒以及最近發生的 SARS，再加上蠢蠢欲動的生物恐怖攻擊事件。這些傳染病除了再次印證了傳染病無國界外，更強調了早期偵測、流病分型對傳染病溯源及防治之重要。如何在疫情爆發初期即時偵測及精確分型對防治疫情關鍵性之影響。甚且應透過平日監測的工作，瞭解病原變化流行習性，以期防堵境外取得先機。先進精確的分子流性病學分型方法可望成為偵測、防治的利器。近年來，基因體計畫的蓬勃發展，為百餘物種的 DNA 解序，加速了物種間序列比對的效率，為分型技術帶來了莫大的助益，除有助於全基因體的蒐尋流病標記外，亦可望提升分子分型效率。

本次有幸獲得 SARS 防治經費資助，參加 92 年 8 月 27 日至 30 日於瑞士 Les Diablerets 舉行的第六屆國際流行

病學標記會議 (6th International Meeting on Microbial Epidemiological Marker, IMM6), 主要目的在於收集呼吸道相關病原之最新流行病學分型技術資訊, 希望能將這些先進技術建立到實驗室, 除作為未來呼吸道病原流行病學監測及防治之利器, 並希望能與國際接軌, 加入相關研究網絡。

二、會議內容：

本次研討會由美國微生物學會(ASM)與歐洲流行標記研究小組(ESGEM)聯合主辦，主要在於探討各種先進分型技術及流行病學標記之發展及期於傳染病防治上之應用，本屆共有來至 45 個國家，308 個研究人員參加，口頭及壁報論文共 281 篇。屬於一個主題集中，論文平均水準高，小而美的會議。

8 月 27 日大會開幕演講由 1978 年因發現限制酵素(restriction enzyme)得諾貝爾獎的瑞士籍教授 Werner Arber 主講「Genetic Variation: Molecular mechanisms and impact on microbial evolution」。Prof. Arber 闡述基因的演變可經由 DNA 解序及變異型的表現得知，而造成生物基因演化的三種機制包括：局部序列改變、片段的重組(rearrangement of DNA segments)及基因的平行移轉(horizontal transfer)。造成基因演化變異的因素除各種不同非遺傳因子外，尚包括能生產特定酵素的演化基因(evolution gene)。演化基因產物能致使遺傳變異亦能調節遺傳變異的發生頻率。因此基因體可視為二種基因的組合，傳統的功能性基因負責個體的

生存；演化基因則負責群體的繁衍及適應各種環境的生物多樣性。精確地瞭解變異發生的機制有助於發展後續生物技術及遺傳工程的應用。

接著由美國的 Paul Keimian 演講「Tracking bioterrorism agents: example from plaque and anthrax」Keimian 先從 1979 年前蘇聯、1993 年日本真理教徒的炭疽熱炭量產設施(因為 Sterne strain 為 vaccine strain 而未能得逞)、到美國近年來的炭疽熱郵件攻擊事件談到建立生物恐怖及時偵測系統(RT-PCR、real-time PCR)、參考資料庫及發展各種先進分型技術在監測生物恐怖攻擊事件上的重要性，包括 VNTR、MLVA、microarray、SNP 等。其中，VNTR 可應用在 *E. coli* k12, *B. anthracis* Ames 及 *Y. pestis* CO92 的分型，其原理基於病原基因體中散佈數目不等的連續重複序列，其偵測方法亦日新月異，由傳統凝膠電泳法，至凝膠或毛細管定序機器偵測，到使用先進質譜儀及生物晶片技術。VNTR 衍生的 Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis 15 (MLVA15) 分析技術實際應用於 *B. anthracis* 的流病調查。

皆下來三天的議程可大分為 11 大主題，茲簡要概述如下：

I：基因體及分子流行病學：包括使用高通量 SNP、MLST-array 等技術分析病原(如 GAS、*E. coli*、沙門氏菌與 TB)與寄主於致病過程中之互動。

Dr. Musser 主講「Microarray and High-throughput SNP analysis in Molecular population genetics and epidemiology」，以 GAS 菌分型為例，包括 prophage PCR profiling, target gene sequencing, high-throughput SNP, DNA-DNA microarray 及 whole-genome PCR profiling。以 TB 分型為例包括 IS6 110 RFLP, 荷蘭發展的 Spoligotyping, MIRU (一種 VNTR)，到先進的 DNA-DNA Microarray 技術。並介紹全基因體分析 sSNPs, nsSNPs 及 iSNPs 三種 SNP。針對 SNP 分析 ABI 公司已推出自動化套組，配合其網路上資料庫的方法。

Dr. Piffaretti 主講「The Genomics of *Escherichia coli* and its Epidemiology」，比較 Array 及 MLST 分型方法之差異。MLST 著重在少數基因（通常 6-8 條）的序列分析，資訊少但精確。Array 則涉及數千條基因之雜和（每條代表一個 ORF），較為廣泛，但僅能知道 match/mismatch。晚近則有結合二者的 MLST-like array 之出現。

Dr. Etienne 則主講眾所關注的全球性社區型 MRSA(CA-MRSA)菌株的型別特性，經由分析全球收集之 CA-MRSA 之病原性及抗藥性基因序列，發現他們都帶有 type IV SCCmec cassette 及 Panton-Valentine leukocidin locus. 這些分析結果並排除了 CA-MRSA 來自於醫院感染株(HA-MRSA)之可能性。

荷蘭的 Dr. Leeuwen 則介紹他們發展的 chip-defined MLST 於 MRSA 分型上之應用。

美國的 Dr. Garaizar 實驗室利用 antibiotyping, plasmid

analysis 及 PFGE-SpeI 及 XbaI 限制酵素分析片段，找出 *Samonella enterica* Carlifornia strain 藉由飼料傳播情形，並藉由 microarray 分析此菌株之基因特性。

II：院內感染檢驗、監測、防治的分型：使用技術包括 PFGE、RAPD、RFLP、rep-PCR、AFLP、PCR-ribotyping、Microarray。

III：病毒的分子流行病學：麻疹及腸道病毒主要以序列分析為主。

並描述因應 1995/1996 全球爆發 Norovirus 之感染，1999 年由歐盟成立的 Foodborne viruses in Europe (FBVE) 網絡監測 Norovirus。FBVE 由歐洲 9 個國家 11 個實驗室組成網絡，藉由建立疫情爆發時病毒偵測及分型之標準方法，並建立集中共享之資料庫，歐洲近年來得以對 Norovirus 藉由食物傳播之途徑、人畜共通傳播情形及新型別病毒的崛起有更精確的瞭解。

IV：無法或難培養病原的分型：包括 *Pneumocystis carinii* (PFGE、RAPD、PCR-single-strand conformation polymorphism)、力克次體(RFLP、PFGE)、TB(利用 pyrosequencing 測 VNTR 數目)、及退伍軍人症(MLST)等。

V：人畜共通及抗藥性病原的分子流行病學：包括 PFGE、MLST、AFLP、PCR-fingerprinting、SRF (substracted restriction fingerprinting)等。

VI：分子分型在食因性疾病監控及疫情調查上之應用：美國 CDC 的 Dr. Bala Swaminathan 以 *E.coli* 及 *C. jejuni* 與 *C.coli* 為實例闡明他們所建立以 PFGE 技術的 PulseNet 於食物中毒流病調查上之應用情形，生動地說明 PFGE 技術經標準化後，作為食因性病原追溯感染源頭及發揮預警效果，避免疫情擴大之實例探討。國內在本局邱乾順研究員努力下亦已在國內建立類似網絡供國內學者共享比對，並已加入亞太地區的網絡。

VII：新的鑑定及分型方法：包括 MALDI-TOF、MLST-SNP、自動化的 rep-PCR、Microarray、ML-VNTR、高通量-AFLP、single sequence repeat、PFGE、AFLP-PCR 等。

英國的 Dr. Shah 介紹利用 MALDI-TOF 於菌種分型的新應用，迄今並亦有超過 2000 種臨床、環境及食因性病原的資料庫已被建立，並與臨床記流病資料作連結。細菌經特殊表面結晶處理後，經由掃瞄全菌體表面，可建立種別專一性的指紋圖譜，成為種別鑑定的新利器。此外，MALDI-TOF 的應用亦被擴展至菌體二維電泳的特殊分子標記及序列分析上，現亦有商用應用系統上市，如 Pathogen Oligo Printing (Waters)及 SEQUENOM 技術用於 MLST 的分型。在可預見的未來 MALDI-TOF 將對分型技術帶來革命性的影響。

澳洲的 Dr. Giffard 介紹以 MLST 為基礎的 SNP 分型方法。細菌病原挑選出 7 個 house-keeping genes,藉由其 SNP

突變篩選出具區分鑑別力的 SNP 作為分型依據。

美國 FDA 的 Dr. Volokhov 等人發展微陣列(microarray)分型技術平台，原理為將病原型別特異性的探針固定化在晶片上，病原標的基因經增幅並標幟以螢光後，與晶片上探針雜和，藉由辨識型別基因之雜和與否來鑑別型別。實例包括 *Listeria spp.* 的 *iap*, *hly*, *inlB*, *plcA*, *plcB* 及 *clpE* 和 *Campylobacter spp.* 的 *fur*, *glyA*, *cdtABC*, *ceuB-C* 及 *fliY* 和 *B. anthracis* 的 *cyaA*, *pagA*, *lef* 及 *capA*, *capB*, *capC* 等。

荷蘭 Dr. Simons 等人發展高通量-AFLP，除比對指紋資料建立菌株間關聯性外，亦藉由比對差異性找出 *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *C. jejuni*, *Listeria monocytogenes* 及 *Salmonella spp.* 的新型鑑定及多型性標記。以 *M. tuberculosis* 為例已找出 PE 及 PPE 重複性 peptides, ABC transporter 及 potassium efflux genes。

VIII：真菌的分子流行病學:包括 PFGE、AFLP、MLST。

法國 d'Enfert 介紹真菌的 MLST 分型方法，藉由定序 6 條 house keeping genes 並建立其基因之多型性可用於 *Candida albicans* 的型別分析及流病調查其鑑別力與需用放射線標幟雜和的 Ca3fingerprinting 法相當，但操作則簡易得多。

IX：建立電腦化型別資料庫及網絡之進展：包括建立 PFGE、VTEC 及 MLST 之國際性網絡均在討論之列。

鑒於傳染病無國界，學者目前皆肯定國際化、電腦化、透過網際網路交換病原型別資訊對於流病調查及防治之重要性，然而何種分型方法所建立之資料庫最為適合則仍未有定論。PFGE 固然二十餘年來被視為分型的黃金標準，然有技術複雜，標準化不易，比對不易之缺點。晚近，定序為主的分型技術如 VTEC 及 MLST 崛起，其優點為資訊明確，比對簡易，但仍有價昂、鑑別力不高及需事先已知病原序列之缺點，阻礙其普及化。

X：抗藥性病原分子流行病學之新方法：主要利用 PFGE、

及 MLST 分型方法。

MRSA 抗藥性菌株

XI：生物資訊學與分子流行病學介紹 Phylogenomic (species)、Microarray (strains)及 SNP (isolates)之應用實例及優缺點。

大會最後壓軸演講為瑞典 Uppsala 大學演化生物中心的 S.G.E.Anderson 博士主講「What can molecular epidemiology expect from bioinformatics?」Dr. Anderson 面貌姣好，演講內容充實，精湛流利，簡報製作精美又充滿藝術氣息，真是將簡報的藝術提升至另一境界。Dr. Anderson 指出許多微生物全基因體序列揭密後，為分子流行病學提供了全新的契機，以她實驗室定序的 *Bartonella* spp. 及 *Chlamydia* spp. 做為實例佐證，過去 Phylogenetic 著重於比對少數的 house-keeping genes 如 rRNA 或負責細胞分裂的基因，且往往僅適用於屬(genus)與種(species)的層次。近來崛起的 Phylogenomic 則更有效率，可自動化比

較 genome 內所有的基因。若同種內有不同株別(strain or isolate)被定序，則可藉由比較基因資訊，提供 MLST 發展時適當的基因標的訊息。也可標定表現性狀，並瞭解 SNP 差異與致病性強弱的關係。並介紹 Phylogenomic (species)、Microarray (strains)及 SNP (isolates)之應用實例及優缺點。

最後，會議圓滿閉幕，並宣布下屆 7th IMMEM 將於 2005 年 5 月 11-14 日於 Victoria(介於西雅圖與溫哥華間的小島)舉行。

本次研討會收穫甚多，除了實驗室已建立的 PFGE 分型技術外，回國後亦積極建立這些先進的分型技術，包括病原真菌、批衣菌及黴漿菌的 rep-PCR、MLST、AFLP 及 ME-AFLP 等方法，並考慮採取能與國際接軌的標準化方法。經過這次會議洗禮更深深體會生物資訊學及基因體學的衝擊，未來亦希望有機會充實這領域知識，與時俱進發展 Phylogenomic、Microarray、SNP 等技術。此外，擬先

建立本土資料庫再設法加入國際性組織與國際接軌，以茲
合作比對。

三、建議事項：

綜合感想，建議項目有如下三點：

1. 應與時俱進發展快速先進之流行病學分型技術，以協助建立傳染病之流行模式及預應機制。
2. 因應傳染病國際化時代的來臨，病原之分型逐漸走向標準化、數位化、及網路化，且持續有國際專業團體組成並針對特定病原成立網站，供病原型別資料的蒐尋比對。應設法建立相關標準化分型方法並積極加入這些組織。
3. 基因體時代的來臨，對全基因體流病標記的蒐尋將如虎添翼，應充實基因體方面的專業，以增加研究效率。