

行政院所屬各機關因公出國人員出國報告書 (出國類別：研
習)

「赴世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室及法國巴斯
德研究所研習」出國報告書

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

出國人職稱：薦任技士

姓 名：莊珮君

出國地點：法國、荷蘭

出國日期：民國 95 年 12 月 3 日至 12 月 18 日

報告日期：民國 96 年 3 月 3 日

目錄

一、 摘要	3
二、 目的.....	4
三、 行程及工作紀要	5
四、 內容	6
(一)、 法國巴斯德研究所研習	6
(二)、 世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室研習	9
五、 心得.....	14
六、 建議.....	16
七、 參考文獻.....	18

摘要

本次奉派至世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室及法國巴斯德研究所研習，研習期間 (包含路程) 自 95 年 12 月 3 日至 18 日，研習內容包括結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 分子流行病學、基因體學、基因分型資料庫、分子檢驗等。首先抵達法國巴斯德研究所分枝桿菌基因學組 (Mycobacterial Genetics Unit) Christophe Sola 博士實驗室進行結核菌基因標幟 (genetic markers) 及分子流行病學研習，為期四天，主要針對本實驗室正在進行之基因標幟相關研究與 Christophe Sola 博士請益與討論，並建立雙方合作模式。接著前往位於荷蘭國家公共衛生暨環境研究所 (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM) 之世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室進行分枝桿菌基因分型實驗及資料庫研習，為期五天，主要針對本實驗室進行之基因分型方法與資料庫分析與 Dick van Soolingen 博士及 Kristin Kremer 博士討論，並研習資料庫之分析方法，受益良多。經由本次研習，對本實驗室所進行之分子流行病學、基因標幟、基因體學及基因分型資料庫之分析與建立相關實驗工作有相當大的助益。同時與法國巴斯德研究所建立良好合作關係有助於日後之國際交流。

目的

- 一、 與法國巴斯德研究所建立合作模式，並針對 spoligotyping 基因型演化分析方法進行討論與研習，借重 Christophe Sola 博士演化學專長，以深入瞭解台灣地區結核菌菌株特性及與亞洲地區其他國家或其它地區國家之差異性與相似處，並對尚未定義之結核菌菌株基因型別有更明確之解析。
- 二、 至世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室進行分枝桿菌基因分型實驗及資料庫研習，並研習資料庫之分析方法，以加強目前本實驗室資料庫不足之部分，同時擷取荷蘭國家結核病參考實驗室之豐富經驗，期能有助於本實驗室結核菌分子流行病學之研究。

三、 行程及工作紀要

日期	工作紀要
12月3日	啟程 (台北→德國法蘭克福) 轉機
12月4日	抵達 (德國法蘭克福→法國巴黎)
12月5-9日	法國巴斯德研究所研習
12月10日	路程 (法國巴黎→荷蘭阿姆斯特丹)
12月10日	抵達 (荷蘭阿姆斯特丹→荷蘭烏德斯勒)
12月11-15日	世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室研習
12月16日	路程 (荷蘭烏德斯勒→荷蘭阿姆斯特丹)
12月17日	返程 (荷蘭阿姆斯特丹→德國法蘭克福) 轉機
12月18日	抵台 (德國法蘭克福→台北)

四、 內容

(一) 法國巴斯德研究所研習

1. 法國巴斯德研究所簡介

法國巴斯德研究所進行分枝桿菌 (*Mycobacterium*) 相關實驗與研究的單位包括位於 Guadeloupe 的 Institut Pasteur de Guadeloupe 及位於巴黎的 Mycobacterial Genetics Unit。分枝桿菌的培養、抗藥試驗、DNA 的萃取等主要工作都在 Institut Pasteur de Guadeloupe 進行。Mycobacterial Genetics Unit 則進行研究性質工作較多，包括毒性因子探索研究、細胞壁毒性決定因子研究、結核菌與樹狀細胞 (dendritic cells) 之交互作用、抗結核藥物標的鑑定、BCG 與疫苗研究、主要臨床流行型別菌株基因標幟搜尋等。本次拜訪負責主要臨床流行型別菌株基因標幟搜尋研究的 Christophe Sola 博士，Christophe Sola 博士於拜訪時剛自 Institut Pasteur de Guadeloupe 轉換至巴黎工作三個月左右，但是他在 Institut Pasteur de Guadeloupe 工作經歷超過二十年，對於結核菌基因分型 (spoligotyping, MIRU-VNTR)、基因標幟與基因演化研究經驗相當豐富，2006 年公佈之國際 spoligotype 資料庫即是出自其手所建立的，截至目前為止發表近七十篇之論文。

2. 2006 年公佈之 spoligotyping 資料庫包含來自 122 個國家收集之 35,925 株菌株，其中共包含 1,939 種基因型別。遠東亞洲地區主要盛行型別為 Beijing、East-African-Indian (EAI) 及 T families (1)。目前根據夏威夷、菲律賓及泰國的研究顯示，夏威夷 EAI2-Manila 基因型 (2) 可能是源自於菲律賓，此結果與人類遷徙與起源之 Express train 理論相符，在 Express train 理論中，菲律賓推論乃源自於台灣，因此可進一步探討在台灣的 EAI2-Manila 菌株是否與夏威夷之 EAI2-Manila 菌株有演化上的相關，但須先釐清台灣感染 EAI2-Manila 基因型之病人是台灣人而非菲律賓人。
3. Haarlem family 最早由荷蘭國家結核病參考實驗室所定義，其主要特徵包括：(A) RFLP 基因型在 1.4kb 的位置經常 (very frequently) 有 2 個 bands；(B) spoligotyping 基因型在 spacer 31 總是 (always true) 為 absence；(C) VNTR 基因型經常 (very frequently) 是 32333；(D) 具有專一性之單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。
4. 針對台灣地區的研究中所發現未定義之 spoligotyping 基因型別，可進一步確定是否為 Haarlem-like，同時可討論於同一 clade 之菌株來源是否有流病相關；另外可進一步針對特定之 spacer

進行菌株演化分析 (3,4)。ST742 基因型應為 H1 lineage，可 e-mail 告知 spoligotyping 資料庫之管理者修正。另外亦可利用 GeoDis 軟體 (5) 進行基因型別及地域性相關性之研究。

5. 在進行 spoligotyping 基因型別分析及分子流行病學研究時，必須注意菌株之抽樣及代表性。
6. 目前 Christophe Sola 博士實驗室正在建置國際 MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat) database，因為 MIRU-VNTR 分型鑑別力 (discriminatory power) 較 spoligotyping 高，且 MIRU-VNTR 基因分型結果可以數位 (digital) 格式表示，容易進行國際間資料之傳輸。
7. 利用 decision tree 分析方法 (6) 可選擇具關鍵性之 spoligotyping 及 MIRU-VNTR 的位點進行 clade analysis，如此可找出具有決定性分型之位點進行實驗分析即可，可有效降低基因分型實驗之成本、人力與時間。
8. Christophe Sola 博士實驗室目前正在進行有關結核菌多重抗藥性菌株 (multi-drug resistant, MDR) 或超級抗藥性菌株 (extensively drug resistant, XDR) 之單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 研究，同時並可進行 phenotype 分析，以瞭解 SNPs 與 phenotype 之相關性，並進一步找出有意義之 SNPs，可加速 MDR 或 XDR 之診斷，有助於臨床上之治

療。

9. 目前 Christophe Sola 博士實驗室仍以基因全定序的方法進行 SNPs 分析，除了進行結核菌菌株抗藥性相關之 SNPs 研究外，亦針對結核菌之毒性相關基因進行 SNPs 分析，這些基因如：與細胞壁合成有關的基因等。另外 SNPs 可能比較少出現在細菌之必須基因 (essential genes)，這些必須基因之功能可在如 *E. coli*、*Chlostrium*、*Streptococcus* 等其他細菌中尋找，可藉以瞭解該基因之功能與重要性。

(二) 世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室研習

1. 世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室簡介

世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室位於荷蘭國立公共衛生暨環境研究所 (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM)。協助世界許多國家建立結核菌分子分型實驗室。本局亦於 2005 年曾邀請該實驗室負責人 Dick van Soolingen 博士至本局訪問，並進行討論，給予本實驗室相當多有意義的建議。本次至荷蘭國家結核病參考實驗室主要由 Kristin Kremer 博士負責接待，首先先拜訪實驗室負責人 Dick van Soolingen 博士，討論目前台灣結核菌分子流行病學研究與重要發現，接著並由實驗室成員 Petra de Haas 指導資料庫及分

析方法，Annemarie van den Brabdt 指導 VNTR 實驗，Arno 指導 RFLP 實驗。期間並隨時與 Kristin Kremer 博士討論及請教結核菌分子流行病學研究相關議題與研究方法。

2. 荷蘭結核病發生率極低，2004 年之年發生率為 8/100,000，荷蘭結核病患者之危險因子為年輕族群、藥癮者及酒癮者，研究並發現與 HIV 無顯著關聯性，因為荷蘭之 HIV 感染者相當少。荷蘭結核病高危險族群則為遊民及移民，且由於荷蘭之結核病發生率極低，為避免因遊民與外來移民造成荷蘭本國之發生率增加，因此荷蘭針對這兩個族群有進行主動監測，利用病人取藥時先進行胸部 X 光檢查再取藥。荷蘭並未全國實施 DOTS，如果病人配合度高，只有在取藥時進行胸部 X 光檢查。另外對於 TB 工作接觸者則每年進行兩次健康檢查。
3. 荷蘭 MDR 病例相當少，現在平均每年皆少於十例，而歐洲其他 MDR 病例較高的國家主要在東歐，根據初步估計 2003 年至 2005 年，包含十七個國家之資料統計，MDR 菌株總數為 1,050 株，其中 XDR 總數為 215 株，平均比例為 20.5%，但由於收集之菌株可能不完全代表該國家之 MDR 盛行率，或是並非所有國家進行之抗藥試驗皆包含所有藥物，或者可能有些是實驗室污染等因素，所以在進行 XDR 相關研究分析時需謹慎。

4. 荷蘭國家結核病參考實驗室進行分子流行病學主要可藉由菌株 cluster 的發現提供流行病學調查參考，以進一步進行介入，防止疫情之擴散。一般而言在進行某一地區或國家菌株 cluster 分析時，通常須連續觀察五年之後才可見 cluster 數目趨緩穩定，因此在進行國家或地區代表菌株之研究時，需至少有五年之長期監測才能真正得知其盛行或流行菌株型別 (7)。
5. 世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室自 1993 年起每年收集來自全國所有分枝桿菌菌株，並進行菌株之鑑定與基因分型，每年總計約有 1,800 至 2,000 株菌株，包括 typical 及 atypical mycobacteria，兩者比例約為 1:1。當菌株送到參考實驗室時，會先利用 genotype strip (自動化機器進行實驗) 確認為 typical 或 atypical mycobacteria，若為 typical mycobacteria 則進一步進行 IS6110 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 基因分型，所有結核桿菌群菌株皆進行 IS6110 RFLP 基因分型。另外根據疫情需要也會進行 *M. avium* 的 RFLP 基因分型。
6. 荷蘭結核桿菌群中 90%以上為結核菌，牛型結核菌次之，也有 BCG 菌株，多為器官移植而感染。atypical mycobacteria 則以 *M. avium*、*M. goodnae*、*M. intracellulare* 等為主要盛行菌株。
7. 來自全國之菌株會連同荷蘭國家結核病參考實驗室制式個案與

菌株相關資料表格送至荷蘭國家結核病參考實驗室，並有專人將紙本資料建入實驗室資訊系統，另外所有實驗室基因分型結果也會建置入實驗室資訊系統，並有確效 (validation) 機制以確保實驗結果輸入無誤。因此醫院可以電話詢問某個案之基因分型資料，實驗室人員即利用實驗室資訊系統可快速查詢回覆。

8. 當 IS6110 RFLP 基因分型結果 band 數目只有一個時，則進行 PGRS (polymorphic GC-rich tandem repeat sequence) 基因分型。另外當 RFLP 基因分型實驗結束之後，將轉漬膜保存於-20℃，當未來有其他或新的 probe 時，仍然可以進行 hybridization，荷蘭國家結核病參考實驗室曾將十年前之轉漬膜重新以其他 probe 進行實驗仍可維持同樣實驗品質。
9. 在進行 RFLP probe wash 步驟時不可太久，否則轉漬膜會變寬，於後續將結果轉入 Bionumerics 時 IS6110 probe 與 internal probe 結果會無法對應。
10. 荷蘭國家結核病參考實驗室只針對特定 outbreak 或特殊案件進行 MIRU-VNTR 實驗，每週約進行 30 個菌株之實驗，該實驗乃以該研究所 (荷蘭國家公共衛生與環境研究所) 唯一一台之序列分析儀進行，並以 ABI Genotyper 軟體進行 repeat 數目分析。目前 VNTR 資料仍以 Microsoft Excel 分析，未來將建置於

Bionumerics 軟體分析。

11. 目前荷蘭國家結核病參考實驗室開始將自 1993 年起收集之菌株 DNA 送至法國民營實驗室進行 MIRU-VNTR 基因分型 (30 歐元/件，預估 2000 件/月)，並將藉此分析結果評估以 MIRU-VNTR 取代 RFLP 之可行性。
12. 目前歐洲各國已共同建立 Euro-TB 資料庫，該資料庫並建置於荷蘭國家結核病參考實驗室。目前荷蘭國家結核病參考實驗室正與歐洲其他國家共同進行「Molecular surveillance of multi-drug resistant tuberculosis in Europe」計畫，建立 MDRTbase，此 RFLP 資料庫與資料交換平台同樣建置於荷蘭國家結核病參考實驗室，乃由歐洲各國針對 MDR 菌株進行 RFLP 基因分型分析，以瞭解歐洲地區 MDR 結核菌株之特型及傳播方式或演化趨勢。
13. 本次並經由 Kremer 博士介紹認識該研究所傳染病流行病學中心 (Center for Infectious Disease Epidemiology) 負責人 Marianne A.B. van der Sande 博士，請教有關在進行流行病學資料分析時遭遇的問題。在進行分子流行病學研究時，首先須先確定研究之目的為何，才能確定對照組之族群為何，同時必須注意抽樣及代表性的問題，以避免結論誤差產生。

五、心得

本次奉派至法國巴斯德研究所及荷蘭國家結核病參考實驗室研習受益匪淺。首先在法國巴斯德研究所跟隨 Christophe Sola 博士學習 spoligotyping 基因分型資料之比對與演化分析，同時針對國際資料庫尚未定義之基因型別研究進行討論。另外對於台灣地區特定地區盛行之特定型別與台灣鄰近亞洲國家之異同進行分析與推論。同時藉由 Christophe Sola 博士之專長，對此特定型別之演化來源分析亦有著墨。藉由本次研習也更深入瞭解 spoligotype 演化之原理及分析方法，及於結核菌分子流行病學研究之應用。同時亦瞭解到追求更準確、高敏感度與高特異性的基因分型策略，以有效降低實驗成本、人力與時間，才是結核菌基因分型應用於分子流行病學之最終目標。

接著至荷蘭國家結核病參考實驗室主要接受基因分型方法及資料庫分析比對之研習。已知荷蘭國家結核病參考實驗室在世界佔有舉足輕重的地位，世界上許多國家都是藉由該實驗室的協助以建立各國之結核病國家實驗室。該實驗室負責人 Dick van Soolingen 博士發表之期刊論文截至目前為止已超過 170 篇。該實驗室乃為定義 Beijing 基因型及 Haarlem 基因型之實驗室 (8,9)。儘管荷蘭本國結核病發生率極低，但是其基因分型及分子流行病

學之研究經驗豐富，同時並為歐洲 Euro-TB 及 MDRTbase 資料庫平台建置之實驗室，顯示其資料庫及建置與分析平台能力相當高。同時藉由本次研習實地了解資料庫之分析技巧及整合功能，將有助於加強本實驗室基因分型資料庫之完整性。除了目前公認之 IS6110 RFLP 標準基因分型方法之外，該實驗室於 2006 年 12 月發表最適 MIRU-VNTR 基因分型之建議標準方法 (10)，此目的亦為取代實驗步驟繁瑣之 RFLP 方法，同時 MIRU-VNTR 基因分型結果可進行數位之資料交換，提高國際間資料交換之可行性與可比較性，且該實驗室目前亦針對自 1993 年起荷蘭結核菌株之 MIRU-VNTR 基因分型，以作為評估 MIRU-VNTR 取代 RFLP 可行性之依據。

經由本次機會除了研習基因分型技術與資料庫分析技巧外，同時也拓展對於結核菌分子流行病學研究之視野。另外也深刻了解到台灣地區結核菌特定基因型別之演化與亞洲鄰近國家或非亞洲國家之相關性，因此本實驗室之研究除了有助於我國結核菌菌株特性之瞭解，同時可藉由國際合作與交流將台灣的研究成果與國際接軌，使結核菌菌株特性研究更具全球性與完整性。

六、建議

1. 本次拜訪世界衛生組織荷蘭國家結核病參考實驗室，詢問有關流行病學資料分析相關問題時，Kristin Kremer 博士表示其實驗室之流行病學資料分析乃藉助於該研究所傳染病流行病學中心 (Center for Infectious Disease Epidemiology) 之分析，因此經由 Kristin Kremer 博士介紹與 Marianne A.B. van der Sande 博士認識，van der Sande 博士表示根據不同的研究目的，所要進行母群體分析之變相及方法會有所不同，解釋的意義也會有所不同，同時根據不同傳染病之不同特性所要考慮的因子也會不同，因此必須不斷藉由與實驗室密切地討論才能達到研究的目的。因此局內應多延攬流行病學專家 (Epidemiologist)，協助本局實驗室分子流行病學研究之流行病學資料分析，以達研究成果之完整性與代表性，才可真正將分子流行病學的研究成果應用於防疫參考。
2. 本次研習針對法國巴斯德研究所建立的 spoligotype 資料庫及荷蘭國家結核病參考實驗室之 RFLP 資料庫內容與應用分析有更進一步的認識，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，同時應整合本局之相關資料庫，將實驗與流行病學資料整合並轉化為力

量，才能真正反應台灣地區傳染病流行趨勢並提供防疫政策參考。

七、 参考文献

- (1) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, Aristimuno L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaia O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rusch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol.** 6:23.
- (2) Douglas JT, Qian L, Montoya JC, Musser JM, Van Embden JD, Van Soolingen D, Kremer K. 2003. Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 41(6):2723-6.
- (3) Filliol I, Sola C, Rastogi N. 2000. Detection of a previously unamplified spacer within the DR locus of *Mycobacterium*

- tuberculosis*: epidemiological implications. **J Clin Microbiol.** 38(3):1231-4.
- (4) Legrand E, Filliol I, Sola C, Rastogi N. 2001. Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 39(4):1595-9.
 - (5) Posada D, Crandall KA, Templeton AR. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Mol Ecol.** 9(4):487-8.
 - (6) Sebban M, Mokrousov I, Rastogi N, Sola C. 2002. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioinformatics.** 18(2):235-43.
 - (7) van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M, Kremer K, van Embden JD. 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. **J Infect Dis.** 180(3):726-36.
 - (8) Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, Niemann S, Kurepina NE, Kreiswirth BN, Bifani PJ, van Soolingen D. 2004. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. **J Clin Microbiol.** 42(9):4040-9.
 - (9) Hermans PW, Messadi F, Guebrexabher H, van Soolingen D, de Haas PE, Heersma H, de Neeling H, Ayoub A, Portaels F, Frommel D, et al. 1995. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. **J Infect Dis.** 171(6):1504-13.

- (10) Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 44(12):4498-510.