

出國報告（出國類別：研究）

研習全基因體檢驗技術於結核病群聚之應用

服務機關：衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：莊珮君 副研究員

派赴國家：西班牙

出國期間：民國 103 年 10 月 26 至 11 月 3 日

報告日期：民國 104 年 1 月 5 日

摘要

本次研習內容主要為瞭解目前全球以全基因體檢驗技術應用於結核病群聚（包括抗藥性）之現況與未來趨勢。研習期間（包含路程）自 103 年 10 月 26 日至 11 月 3 日。研習內容包括：(1) 目前結核病快速分子診斷進展；(2) 全基因體檢驗技術於結核菌抗藥性分析及群聚之應用與發展；(3) 全基因體序列資料之標準化與分享平台之建構。自 2012 年起世界各國如英國、美國、加拿大、德國、荷蘭等已利用全基因體檢驗技術進行結核病聚集及抗藥性相關研究分析。為瞭解及評估全基因體於結核病檢驗應用之可行性，擬藉由本次參加國際抗癆聯盟舉辦之研習，汲取國際經驗，瞭解全基因體於結核菌檢驗進展及應用現況，並評估未來執行以全基因體為基礎的抗藥性、聚集等檢驗實務與研究的可行性分析，以做為實驗室未來導向全基因體檢驗參考。

目次

壹、 目的	4
貳、 過程	5
參、 心得及建議.....	14

壹、目的

因應近年全基因體檢驗技術於結核病研究應用日趨成熟，自 2012 年起世界各國如英國、美國、加拿大、德國、荷蘭等已利用全基因體檢驗技術進行結核病聚集及抗藥性相關研究分析。為瞭解全基因體於結核菌檢驗進展及應用現況，並評估未來執行以全基因體為基礎的抗藥性、聚集等檢驗實務與研究的可行性分析，藉由本次參加國際抗癆聯盟舉辦之研習，汲取國際經驗，以做為實驗室未來導向全基因體檢驗參考。

貳、過程

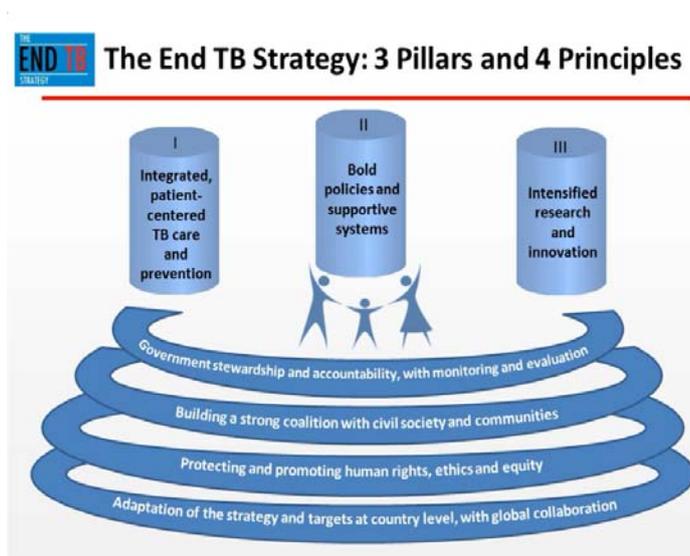
一、行程與工作紀要

日期	工作紀要
10月26日(日)	啟程 (台北→西班牙巴塞隆納)
10月27日(一)	抵達巴塞隆納
10月28日(二)至11月1日(六)	國際抗癆聯盟研習
11月2日(日)	返程 (西班牙巴塞隆納→台北)
11月3日(一)	抵達

二、內容

(一) 目前結核病快速分子診斷進展

世界衛生組織在今年的世界衛生大會 (World Health Assembly) 會議中，針對 2015 年之後，全球結核病的防治策略已提出了 3 項支柱 (pillars) 及 4 項原則 (principles)，藉此來達成” End TB” 的目標。3 項 pillars 包括：(1) 整合性且以病人為中心的結核病照護與預防；(2) 堅強的政策與支持體系；(3) 增強結核病的研究與創新。4 項 principles 則包括：(1) 政府需肩負監測與評估的責任；(2) 建構堅強的社區體系；(3) 保護並促進人權；(4) 以國家層級執行策略與目標，進行全球合作。



(資料來源：<http://www.who.int/tb/en/>)

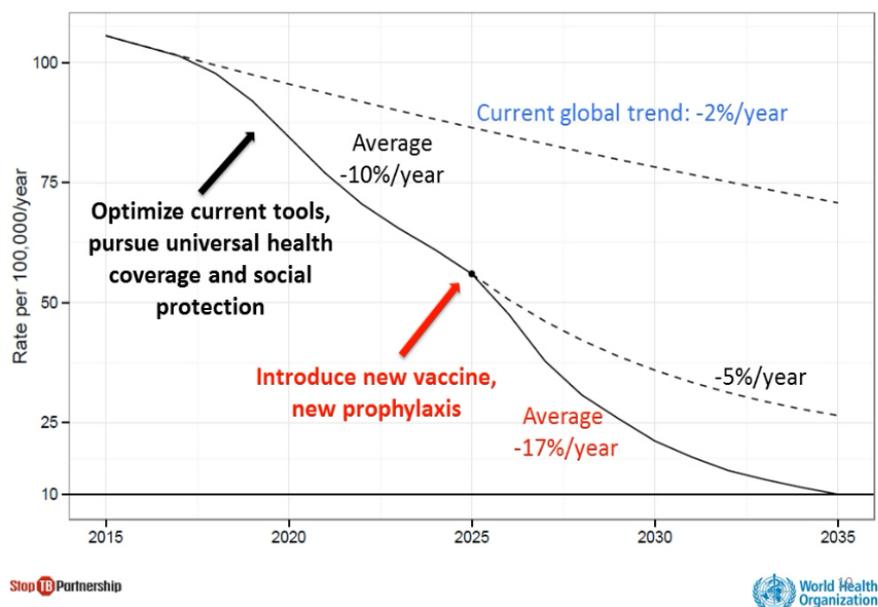
The table lists the components of the End TB Strategy, organized into three main categories: 1. Integrated, Patient-Centred Care and Prevention; 2. Bold Policies and Supportive Systems; and 3. Intensified Research and Innovation. Each category has four sub-points (A, B, C, D). The table is titled 'The End TB Strategy Components' and includes logos for the Global TB Programme and the World Health Organization at the bottom.

THE END TB STRATEGY Components	
1. INTEGRATED, PATIENT-CENTRED CARE AND PREVENTION	
A.	Early diagnosis of tuberculosis including universal drug-susceptibility testing, and systematic screening of contacts and high-risk groups
B.	Treatment of all people with tuberculosis including drug-resistant tuberculosis, and patient support
C.	Collaborative tuberculosis/HIV activities, and management of co-morbidities
D.	Preventive treatment of persons at high risk, and vaccination against tuberculosis
2. BOLD POLICIES AND SUPPORTIVE SYSTEMS	
A.	Political commitment with adequate resources for tuberculosis care and prevention
B.	Engagement of communities, civil society organizations, and public and private care providers
C.	Universal health coverage policy, and regulatory frameworks for case notification, vital registration, quality and rational use of medicines, and infection control
D.	Social protection, poverty alleviation and actions on other determinants of tuberculosis
3. INTENSIFIED RESEARCH AND INNOVATION	
A.	Discovery, development and rapid uptake of new tools, interventions and strategies
B.	Research to optimize implementation and impact, and promote innovations

(資料來源：<http://www.who.int/tb/en/>)

世界衛生組織所訂定的終極目標乃希望在 2035 年死亡率相較於 2015 年需減少 95%，發生率則降至每 10 萬人口小於 10 個結核病人 (即每 100 萬人小於 1 人)。為達此目標，除了需要新的疫苗或新的預防性介入措施來降低結核病的發生率之外，利用有效的快速結核病診斷工具提升病人的發現率及正確的快速診斷，一直是結核病全球防治策略重視的一環。

Projected acceleration of TB incidence decline to target levels



(資料來源：<http://www.who.int/tb/en/>)

世界衛生組織、GLI (Global Laboratory Initiative)、FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) 也在今年 4 月的聯合會議中，針對 point-of-care 的臨床快速診斷試劑的標的 [target product profiles (TPPs)]，鎖定以下 4 種：
(1) non-sputum based test：如血清學的診斷；(2) triage test：病人的快速分類診斷；(3) sputum based test as a replacement for microscopy：如 Xpert 能針對痰檢體進行檢測，進而取代痰塗片檢查；(4) drug susceptibility test：如快速分子抗藥性診斷。

分子快速診斷試劑 GenoType MTBDR_{plus} (屬於 line probe assay, LPA) 及 Xpert[®] (屬於 fully-automated nucleic acid amplification test, NAAT) 在 2008 年及 2010 年已相繼被世界衛生組織推薦使用。Xpert[®] 因操作技術門檻較 LPA 稍低，且檢驗時效也縮短至 2 小時，並可同時針對痰塗片陰性及陽性檢體進行檢測，在全球包括結核病發生率高的非洲地區已進行廣泛使用及評估。目前 Xpert[®] 第二代 Xpert[®] MTB-RIF Ultra 診斷試劑也發展至最後階段，預估 sensitivity 將由目前的 125 cfu/ml 降至 5 cfu/ml，可適用於現在的機器，費用維持相同 (9.98 美元)，預估在 2015 年第二季進行臨床試驗，於 2016 年第一季上線使用。另 Xpert[®] XDR 診斷試劑也在開發中，主要可偵測 isoniazid (INH)、fluoroquinolones (FQ)、aminoglycosides 藥物的抗藥性，以在抗藥盛行地區可快速鑑別 multidrug resistant (MDR)/ extensively drug resistant (XDR) 病人。

其次，Alere[™] Q TB 快速診斷試劑也進入開發後期，檢測時間僅 20 分鐘。預估 2015 年第四季將上線並進行評估。Alere[™] Q DST 亦正在研發中，同樣為 microarray 平台，可對 rifampicin (RIF)、INH、FQ、pyrazinamide (PZA) 藥物之抗藥性進行檢測。

再者，Abbott real-time MTB assay 也已上市，並已獲 CE mark approval。其設計原理除了 IS6110 專一性標的檢測外，也同時檢測 Protein Antigen B (PAB)，以確保若因 IS6110 片段有缺失或突變導致無法被 IS6110 probe 偵測時，仍可正確的被檢測為 MTBC 陽性。Abbott real-time MTB assay 之偵測極限設定為 17 cfu/ml。其評估結果在 818 個來自羅馬尼亞、香港、瑞士的臨床檢體中，在塗片陰性培養陽性的檢體中，sensitivity 也可達 93.5% (72/77)。評估結果顯示具有高度的再現性及相當低的抑制反應機率。

另外，仍在開發階段的快速診斷試劑還包括 QIAGEN 以 HDA (helicase dependent amplification) 為設計原理，並以可攜式的 tube scanner 進行快速分子偵測。未來也將同時開發抗藥性的檢測卡匣。

除此之外，以血清學為診斷基礎的檢測工具，仍舊不被放棄。儘管目前為止仍未有結核病的血清學診斷為世界衛生組織所推薦，然隨著全基因體序列分析成熟及生物資訊與篩選工具的發展，尋找具有專一性的血清學檢測標的仍舊是快速診斷試劑發展的重點之一。

(二) 全基因體檢驗技術於結核菌抗藥性分析及群聚之應用與發展

世界衛生組織估計在全球所有約 900 萬結核病人中，仍有三分之一的病人未被診斷發現或未被通報；而在預估 48 萬 (2013 年) 的 MDR 結核病人中，也僅有約 45% MDR 病人被診斷出來。隨著全基因體分析技術的蓬勃發展與廣泛應用趨勢，FIND 已明確的揭示在 2018 年建立抗藥性的 sequencing gold standard，期望能以分子基因序列分析做為結核菌抗藥性的快速診斷標準，以縮短需等待傳統費時的培養藥物感受性試驗 (culture drug susceptibility test, DST) 檢測時間。在此之前則必須藉由進行大規模的全基因體分析 (預估超過 5 萬筆全基因體資料)，以正確分析各抗藥性相關基因突變位點資料與臨床治療結果的相關性，進而彌補分子診斷檢測與 culture DST 結果之間的誤差，以建立 sequencing gold standard。

世界衛生組織自 1994 年開始至今已進行 20 年的抗藥性監測，因受限於 culture DST 方法學的限制，在抗藥性監測資料仍非全面性，因此世界衛生組織也在近年開始導入以抗藥性相關基因分析進行結核病抗藥性監測。首先自 PZA 及 FQ 抗藥性監測著手，選擇 5 個國家進行全國性或區域性的分析，由區域參考實驗室 (supernational reference laboratory, SRL) 進行 culture DST 及抗藥性基因 (*pncA* 及 *gyrA*、*gyrB*) 序列分析。將全基因體序列分析結果與 culture DST 進行比對，PZA 藥物的分子抗藥性偵測 sensitivity 為 80-90%，specificity 為 99%。此監測研究仍繼續進行中，也將再擴及其他地區，並利用其他抗藥相關的基因序列分析如 *rpoB*、*inhA*、*katG* 等進行監測。利用抗藥性相關基因突變位點檢測可進行即時監測，也可彌補如針對新藥物

所需花費建立 culture DST 方法學標準化的時間。同時，臨床治療結果資料的收集與基因資料比對仍是重要的一環，藉由比對結果才能正確獲得抗藥相關基因的關聯性，也才能真正利用分子快速診斷方法，建立未來分子抗藥性檢測基準。

在南非也以全基因體序列分析技術來進行抗藥性監測。分析使用的平台則須藉助商品化的生物資訊平台。該研究將全基因體序列分析與 culture DST 方法比較，其經驗顯示：(1) 全基因體序列分析的工作流程較不複雜，但在後端分析所需的技巧則較高；(2) 以目前結果分析全基因體序列分析的失敗率為 6%，培養 DST 則為 4%；(3) 兩者所需費用相當，全基因體分析為美金 103 元，培養 DST 則為美金 100 元。

然目前利用全基因體序列分析技術來進行抗藥性監測仍侷限於已知的抗藥性相關基因，如：*rpoB*、*katG*、*inhA* promoter、*pncA*/promoter、*gyrA*、*gyrB*、*rrs* 等，尚未有新的基因位點被推薦使用，主要是因為對於藥物作用機制與抗藥性相關基因的關聯尚未全盤了解。但相對地當我們進行大規模的全基因體序列分析時，可以幫助我們回答這個問題。例如，研究學者利用全基因體序列分析得知，在 RIF 抗藥相關的 *rpoB* 熱點突變也可藉由伴隨 *rpoA*、*rpoC* 補償性基因突變，增加抗藥性菌株的適應性 (fitness) 進而增加 MDR 菌株的傳播。

另外，由於全基因體以次世代定序技術 (next generation sequencing, NGS) 之序列分析敏感度遠較傳統定序的 Sanger sequencing 方法高，因此利用全基因體分析，也有較高敏感度來偵測 heteroresistant 的存在，這也是在 culture DST 的檢驗中有可能因為敏感性與抗藥性菌量存在的比例不同而被篩選，導致可能錯失了抗藥性的偵測。

其他在藥物開發的部分也可利用全基因體序列分析獲得相關資訊，如研究學者以全基因體序列分析找出了抗結核新藥 bedaquiline 在結核菌的作用標的為 ATP synthase 的 F0 subunit，且研究者也針對所有不同多樣性的結核

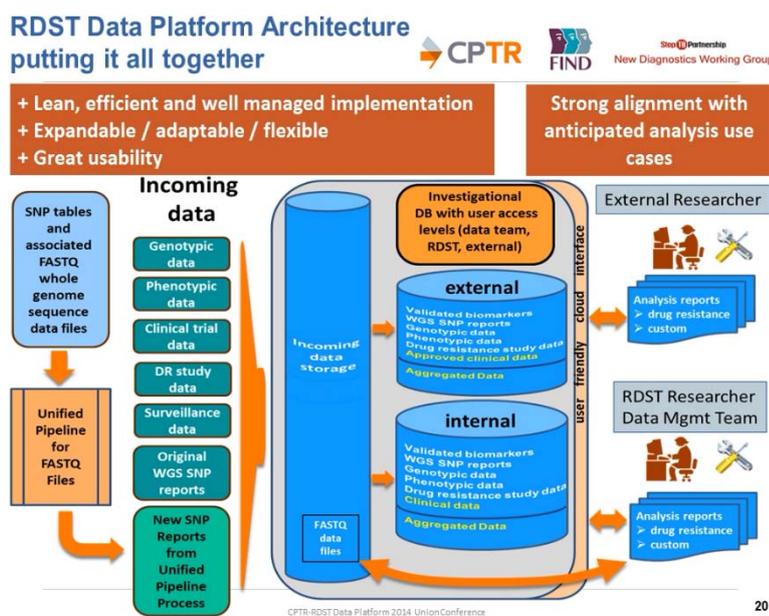
菌株甚至包括結核菌群中的 *Mycobacterium canettii* 皆確認該基因的表現，以確保新藥的可用性，避免如另一個新藥 PA-824 在臨床試驗第三期發現了一些原本就是內在性的抗藥菌株，導致藥物無法使用。

由以上經驗可知，當我們針對大量代表性及多樣性的檢體（如超過 5 萬筆）進行全基因體序列分析，並與治療結果比對，可找出新的抗藥相關基因突變位點以加入抗藥性檢測標的，以達到分子快速診斷符合要求的 sensitivity 及 specificity，並同時符合臨床醫生期待的正預測值 (positive predict value)，如此才能確實縮短 MDR/XDR 病人診斷時間，給予適當治療，以減少 MDR/XDR 的傳播機會。

在全基因體序列分析應用於結核病群聚事件調查的研究，因基因序列的 single nucleotide polymorphism (SNP) 改變是具有時序性，除可獲得不同菌株間的基因 SNP 差異外，也可獲知疾病傳播的方向，進而追蹤到 index case 或者是 super spreader，因此對結核病的傳播與防治可提供相當大的資訊。現今在結核病低發生率的國家如英國，已開始針對每一個結核病人的結核菌株進行全基因序列分析。在低發生率的國家因為接觸者追蹤相較於高發生率的國家困難，因此全基因體的分析是有利的利器。利用全基因體序列分析資料也可幫助掌握結核病在該國境內的傳播途徑，並可釐清境外移民對該國結核病發生率的影響，進而有不同的防治策略與作為。然而低發生率與高發生率國家傳播的結核菌其 SNP 變化的速率可能不同，也可能與宿主及環境有關。以日本研究為例，發現 foreign born 的結核病人菌株之 SNP 數目要比本國者為高。因此到目前為止，儘管各國皆有以全基因體序列分析進行群聚事件的評估，也發現確實比現行的基因分型如 MIRU 的分析結果正確（即排除非真正的群聚事件），然對於菌株間 SNP 差異多少以上視為相同或不同基因型仍尚未有定論。

(三) 全基因體序列資料之標準化與分享平台之建構

由於全基因體檢測的技術已趨成熟，且所需耗費的時間與金錢已較兩年前有明顯的下降，在世界衛生組織與 FIND 及 stop TB partnership 的推動下，可以預期全基因體檢測的技術應用於抗藥性監測及群聚事件調查勢必指日可待。有了成熟的檢測技術，產生了大量的序列資料，最重要的即是要將這些資料標準化並整合於共享平台，以供大家使用。因此 FIND 也尋求 CPTR (Critical Path to TB Drug Regimens) 合作進行資料平台的建立。CPTR 原本建構平台的目的是為藥物開發及合併治療時使用，而後並納入體外診斷試劑及分子快速抗藥性偵測所用。CPTR 建構了一個整合性的平台，並方便使用者進行資料的擷取。



(資料來源：http://www.stoptb.org/wg/new_diagnostics/)

以目前公開的結核菌基因有關的資料庫，包括 TB database、MIRU-VNTR_{plus}、TBDReaMDB 等，各資料庫所包含的資訊與資料呈現方式皆不同。有的以 fasta 格式、有的以 SNP 呈現、有的以表列式呈現。如同實驗室在基因序列分析結果呈現方式可能因人而異，以 *rpoB* S531L mutation 為例，也可以 TCG to TTG 或 Ser531Leu 方式呈現。因此在基因序列呈現樣式必須有所統一，才能在分享平台上有共同的語言並共同比對。因此當全基

因體序列分析完成之後，必須統一確認如：(1)呈現的序列資料為所有 sequence？或是僅 SNP 組合？或僅 non-synonymous SNP？；(2) 組合的基因順序又為何？；(3) 若有 nucleotide insertion 或 deletion 又該如何表示？因此在全基因體序列分析技術日趨成熟之際，相對應的資料庫建置及基因資料語言統一也是重要的一環。

參、心得及建議

由於全基因體序列分析技術於近年的快速進展，也因為所需時間與費用已大幅下降，包括對分子快速檢測、藥物開發、抗藥性監測、菌株基因型監測、群聚事件調查等勢必有很大的助益。在世界衛生組織與 FIND 的支持下，最急需解決的抗藥性問題，若能如預計在 2018 年建立抗藥性相關基因 sequencing gold standard，預期對抗藥性的即時監測有很大的助益。由於全基因體序列分析所需時間與花費的大幅減少，相對可進行大規模的檢體基因分析，並進行 phenotype 及臨床治療結果與 genotype 的比對，以更加確定分子抗藥性快速診斷的正確性與重要性，也才能達到世界衛生組織全球即時抗藥性監測的目的。

全基因體序列資料庫的建置也是刻不容緩的議題。儘管目前全基因體序列資料增加的速度較過去加快許多，資料也越來越龐大，在 FIND 尚未與 CPTC 聯手建立基因資料分享平台前，各式各樣的開放式資料庫確實難以真正達到共同資料比對的目的。這些線上資料庫也多為研究單位建置與維護，可發現及時更新的速度較慢，且資訊也不完整。因此期望在 FIND 的推動下，這個共享的開放式基因資料平台是確實可行的且是完整與一致的。

菌株的全基因體序列分析可提供菌株所有基因的全貌，相較於現行的 MIRU 基因分型技術進行群聚事件分析，仍需配合疫調資料才可進行最後判定。因此在疫調難以完整進行或是需耗費大量人力與時間執行的情況下，全基因體序列分析可直接呈現所有的基因資料，並同時提供抗藥性、免疫性、毒性或其他病原體特性的資訊，可加速結核病的積極防治、診斷試劑開發與藥物的發展。因此期望在不久的將來，也可擬訂將全基因體序列分析檢驗技術及應用納入實驗室檢驗或研究的策略，並評估對抗藥性與群聚事件監測的可行性。

藉由本次研習，建議事項如下：

1. 為縮短檢驗時程，建立 sequencing gold standard 並以分子診斷取代

傳統費時的 **culture DST**，已為全球一致的共識。因此在人力與資源有限的情況下，應積極並審慎評估，選擇最有效益的分子診斷工具，協助結核病的防治工作。

2. 全基因體序列分析已為未來的檢驗趨勢，不僅可應用於群聚事件的調查，也可輔助抗藥性的分析，建議應培育兼備生物資訊與公共衛生專業人才，並協助公衛防治人員逐步瞭解實驗室檢驗工具所提供的意義及防治作為上的應用。