

初探全基因體序列分析技術於結核病防治的運用

■ 疾病管制署結核病研究中心 周如文



生醫發展的六大關鍵技術，包含：次世代定序(next generation sequencing, NGS)、蛋白質體學、液態生物檢體(liquid biopsy)、CRISPR 基因修飾技術、3D 生物材料列印(bioprinting)及大數據分析，結合資訊及各類疾病工具之嶄新健康促進模式，可望讓醫療進入「即時醫學」和「預防醫學」的時代。其中，運用 NGS 技術完成的全基因體定序(whole genome sequencing, WGS)資料，利用生物資訊加以整合分析，使得各類遺傳性疾病、慢性疾病或感染性疾病，都可進行即時診斷、療效評估及公衛管理，可達到有效疾病防治及保健的願景。

結核病係因為感染結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC)之後，所導致的慢性傳染病。世界衛生組織(WHO)於 2019 年出刊的全球結核病年報中，指出 2018 年結核病造成全球約 145 萬人死亡(包含 25 萬人類免疫缺乏病毒共同感染者及愛滋病患)，但是在全球所有約 1,000 萬新結核病人中，仍有約三分之一的病患未被診斷或未被通報。另外，估計 2018 年全球約有 21.4 萬人死於多重抗藥性結核病(multidrug-resistant TB, MDR-TB)與 rifampin 抗藥性結核病(rifampin-resistant TB, RR-TB)，2018 年 RR/MDR-TB 個案估計共約 48.4 萬例，其中新確診個案與再治療個案各佔 3.4%與 18%；雖然世界衛生組織將抗藥性結核病個案，納入重點照護及防治項目，但是也僅有約 49.4%個案被確診。至於 2018 年，臺灣確診的新結核個案有 9,180 例，發生率已降至每 10 萬人口 39 例。世界衛生組織建議有效降低結核病發生率的方法，主要可由三方面介入：即早發現病人、提供適當治療及阻斷結核病傳播。

實驗室細菌學檢測在結核病防治上甚為關鍵，然而基於病原特性、醫療照護及公共衛生管理的需求，各式檢測方法、流程及生物安全皆具複雜性及挑戰性。世界衛生組織陸續推薦的一般常用細菌學檢測方法，可分為兩大類：(1)傳統檢驗技術，如：1882 年德國柯霍(Koch)博士所發現結核菌顯微鏡抗酸菌檢測方法至今仍廣為使用，及另一

搭配固及液態細菌培養、以簡易側向流量免疫層析檢測法(immunochromatographic test, ICT)鑑定結核菌與表現型藥物敏感性試驗(drug susceptibility testing, DST)；(2) 分子生物技術，全球廣為運用的商用試劑如：美國 GeneXpert MTB/RIF Ultra 及德國 GenoType 試劑等，可同時檢測結核菌鑑定及檢測一或二線藥物的抗藥性；日本開發的 EikenTB-LAMP 為快速(<1 小時)恆溫結核菌鑑定方法；至於目前正於驗證階段的側流式尿液脂化阿拉伯甘露聚糖(lipoarabinomannan, LF-LAM)快速(<25 分鐘)試紙檢測方法，如：Fujifilm SILVAMP TB LAM 是唯一真正結核病定點診療(point-of-care, POC) 工具，可運用於結核菌鑑定。有鑑於近年來全基因體定序分析技術的快速進展，勢必在結核病防治所須檢驗，包括：分子抗藥性檢測、菌株基因分型、聚集事件調查、抗藥性監測及藥物開發等發揮有效的助益。緣此，世界衛生組織更於 2019 年重申在全球各階層的臨床參考實驗室中，NGS 於快速診斷抗藥性結核病具有運用潛力。由於，NGS 可較快速及詳細提供結核菌多個基因區域或全基因體定序資料，足以克服執行傳統表型藥物敏感性試驗相當耗時的限制，及改善設計上較不完整之分子測試方法檢測不準度的問題。

總之，結核病防治相關檢驗，需要在不同層級實驗室依檢驗分類原則下，除精進各項傳統檢驗方法外，並建立新型高階分子診斷工具(如 NGS 分析的全基因體序列)及檢測流程。隨著全基因體定序技術成功運用於結核菌的特性分析，國際間逐步利用全基因體定序技術於例行結核病之鑑定與抗藥性檢測(如：英國等)；並利用全基因體定序分析，精準判定結核病傳播的網絡。以下簡要說明 WGS 在結核病防治上，抗藥性檢測監測及疾病傳播的運用：

一、結核菌抗藥性檢測及監測

抗藥性監測部分：世界衛生組織自 1994 年開始進行全球結核病抗藥性監測，但是受限於藥物敏感性試驗方法的施行，需要高度經驗的專業技術人員及高防護的安全設施與設備，造成全球抗藥性監測資料仍未能達全面覆蓋目標。因此，世界衛生組織開始導入分子生物檢測方法(如：GeneXpert 等)，以檢測抗藥相關基因的方式監測結核菌抗藥性。例如：早期有先導性研究，評估藉由分析全基因體序列分析



pncA、*gyrA* 及 *gyrB* 基因序列，運用於監測 pyrazinamide (PZA)及 fluoroquinolone (FQ)類藥物抗藥性可行性，發現 PZA 抗藥性偵測敏感性(sensitivity)為 80-90%及特異性(specificity)達 99%。此外，亦有研究利用 *rpoB*、*inhA* 及 *katG* 基因，分別監測 rifampicin (RIF)及 isoniazid (INH)抗藥性，亦證實運用全基因體序列分析方法於監測多重抗藥性結核病的適用性。

抗藥性檢測部分：新診斷試劑開發基金會(Foundation for Innovative New Diagnostics, FIND)亦揭示，將建立結核病治療藥物的抗藥相關基因序列分析黃金標準(gold standard)，期望能據以一次性試驗，即可完整判定所有治療藥物的抗藥性，以縮短需等待傳統藥物敏感性試驗的時間。目前，預估全球各區已建置超過 5 萬筆的結核菌全基因體資料大數據，可藉由分析各抗藥性相關基因變異點資料與臨床治療結果相關性，大幅提升分子檢測抗藥性結果的正確性。利用全基因體定序進行的抗藥性檢測，係藉由使用線上工具或套裝軟體(如:TGS-TB 等)，分析已確知的相關抗藥性基因，如：RIF (*rpoB*)、INH (*katG*、*inhA* promoter)、PZA (*pncA*)、FQ (*gyrA*、*gyrB*)及二線針劑藥物(*rrs*)等為主，抗藥性敏感度及陽性預測值會受分析工具的資料是否更新或是否完整影響外，也與新發現的基因位點與藥物作用機制關聯性是否已確立相關。因此，仍有全球跨國(包括臺灣疾病管制署)合作計畫，系統性持續累積更大規模的全基因體定序資料，搭配標準化定量藥物敏感性試驗結果、治療實際用藥及臨床治療結果，期以釐清基因突變與抗藥性關係。此外，由於全基因體定序預測抗藥性的敏感度遠較第一代的桑格(Sanger)基因定序方法高，因而比較有可能偵測到普遍存在的異質性抗藥性(hetero-resistance)，因而可提供更細緻及更適當治療用藥參考。2018 年，世界衛生組織也發布運用結核菌全基因體定序於抗藥性偵測的指引，加強基因變異在抗藥性預測的說明，導入抗藥基因變異與抗藥性強弱的對應性概念，做為抗藥性實證依據。

例行性使用結核菌群最佳化散置重複單元分子分型法(MIRU-VNTR)加上結核菌群間隔寡核酸分子分型法(spoligotyping)的基因型分析，也僅有分析 1%的全基因體；因此，所發現的差異，並不足以解釋結核菌基因體於傳播動態過程中，感染個案自體內及感染個案間產生的變異，因此鑑別力相對也會受到限制，亦難免會造成個案公共衛生調查的關聯性，與菌株間的基因型相關性無法契合。其實自 2010 年起，國際上的結核病防治方案，陸續開始引用 NGS 技術解析結核菌的全基因體序列，以進行結核病傳播與聚集事件的調查。原理上，大都藉由基因序列上發生地單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)改變具有時序性，除可以得知不同菌株間基因 SNP 差異外，也可瞭解疾病傳播的空間方向性與時序性，以追蹤指標個案(index case)或判定可能的超級傳播者(super spreader)。再者，因為國際間人口流動而發生的跨境結核病

傳播，也可利用全基因體定序分析資料，確切掌握傳染來源及境外移入後的傳播途徑，釐清境外人士對疾病發生率等的影響，以制定有效的防治策略與行動方案。雖然，現行國際上已同意以全基因體做為可能的群聚(cluster)分析依據，並最常使用 SNP 差異個數做為判定依據。雖然研究初步指出，SNP 差異個數切點設定在 5 或 12 個 SNPs，可用來區分是否具有流行病學相關性及辨別是否為近期傳染導致的群聚個案。然而，SNP 差異數切點的適合度，會隨著結核病盛行率或菌株基因型演化率的不同而變動，如：在結核病低盛行率的區域以 SNP 差異數 ≤ 5 作為群聚感染判定，中盛行率則以 ≤ 12 個 SNP 作為切點；而高盛行率的地區(國家)則需要用 20 個 SNP 以上的差異，協助執行公共衛生上個案關聯性調查，然而整體標準至今全球尚未有一致性標準及共識。

隨著國際間持續廣為運用結核菌全基因體序列分析，證據支持全基因體序列分析能夠應用於臨床照護及公共衛生防治工作上。臨床端，透過全基因體序列分析，提供更全面的抗藥性報告，能提供適合的治療方案，以提高治癒率；公共衛生端，利用全基因體序列分析建構更精確的傳播網絡，能有效進行監測、精準的投注防疫資源及施行介入措施，有效確認感染源及控制疾病的傳播。有藉於定序技術持續的精進，使具規模性的執行結核菌全基因體序列分析得以施行。而近幾年生物資訊的蓬勃發展，基因體序列的準確分析能力及效率也有改善。然而，由於國際間對於結核菌全基因體序列分析分析流程，尚未訂定標準化的分析流程，且有關菌株親緣分析所須的 SNP 切點數目，也尚無明確的定論，建議藉由自行建立合適的分析流程，契合國際初步整合的全基因體序列分析技術至結核病防治工作中。當然毋庸置疑，藉由全基因體序列分析



所發現新基因資訊，可同時提供抗藥性、免疫性、毒性或其他病原體特性的相關資訊，可以提供研究開發機構，從事抗藥機制研究及診斷試劑、新疫苗或新藥物開發，加速根除結核病最終目標。