

出國報告（出國類別：研究）

2018 美國疾病管制及防治中心 肺炎鏈球菌實驗室

服務機關：高雄榮民總醫院 兒童醫學部

姓名職稱：劉伯彥主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：2016.12.30-2018.01.21

報告日期：2018.2.10

摘要

本人至美國疾病管制及控制中心 鏈球菌實驗室進修。該實驗室目前工作的重點為 Whole Genome Sequencing (全基因體定序)。特別是肺炎鏈球菌的定序。該單位在全美國有十個收集檢體的地點。所以研究已經累積大量的資料。此次將高雄榮總過去一年來所收集的侵襲性肺炎鏈球菌檢體運送至美國 CDC 進行定序。並進一步與美國的檢體做比較。發現兩國之間的血清型並不一致。並且臺灣的 MIC 遠高於美國的相同血清型。而在基因定序方面也不一致，目前正在繪製 phylogenetic tree，預計六月在美國微生物學會年會發表此一成果。

關鍵字

肺炎鏈球菌，全基因體定序

目次

一 目的.....	4
二 過程.....	4
三 心得.....	18
四 建議.....	19

一 目的

此次至美國疾病管制及控制中心 鏈球菌實驗室學習全基因體定序 Whole Genome Sequencing。這項技術改變了過去我們對細菌的認知。可以應用在疫情爆發的調查，細菌演化的趨勢，和細菌抗藥性機轉。

二 過程

本人為小兒感染科醫師。所以在尋找進修研究機構時就是以小兒感染領域的機構醫院為優先選擇。最後以美國疾病管制及防治中心之肺炎鏈球菌實驗室為最後的研究單位。

美國疾病管制及防治中心簡介：

美國疾病管制與預防中心（英語：Centers for Disease Control and Prevention，縮寫為 CDC）是美國衛生及公共服務部所屬的一個機構，總部設在喬治亞州亞特蘭大。作為美國聯邦政府行政機構，為保護公眾健康和 safety 提供可靠的資料，通過與國家衛生部門及其他組織的有力的夥伴關係，以增進健康的決策，促進公民健康。該中心的重點在於發展和應用疾病預防和控制、環境衛生、職業健康、促進健康、預防及教育活動，旨在提高人民的健康。



鏈球菌實驗室簡介：

CDC 鏈球菌實驗室自 1949 年以來一直在運作。這個實驗室提供主動監測美國的侵襲性鏈球菌疾病實驗室支援。監測的範圍包含了 3000 萬美國人以上（參見活性細菌核心監測（ABC）網站）。幾十年來，CDC 實驗室為鏈球菌疫苗的開發和評估提供了廣泛的侵入性和非侵入性監測支持。主動在獲得許可的肺炎球菌疫苗監測。我們的國家鏈球菌實驗室監測數據在繼續努力抗擊鏈球菌病原體方面發揮著重要作用。我們的實驗室數據以及這些 ABCs 鏈球菌分離株為外部研究人員提供了寶貴的資源。

該實驗室為整個美國的衛生部門提供鏈球菌分離物的特徵以支援疫情和

其他公共衛生問題，並且在國際上也非常活躍。該實驗室是識別和鑑定鏈球菌和其他革蘭氏陽性過氧化氫酶陰性球菌的公認參考中心。

除了我們的監督和參考活動，我們還積極參與與公共衛生相關的專業鏈球菌研究項目，並與學術界和工業界的眾多合作者合作。

一月

由於 CDC 為美國聯邦機構，所以其組織機構也較為嚴謹。一月三日報到後，幾乎花了一個月的時間進行職前作業。其中包含了實驗室安全操作須知及測驗。聯邦機構資訊安全職前訓練及測驗。職前背景調查。識別證製作以及指紋建檔。同時因為本院對於過去一年來的侵襲性肺炎鏈球菌也有做菌株保留的動作。所以也開始著手進行臺灣疾病管制局的檢體輸出申請作業。



CDC Museum



Smart Card (Badge)

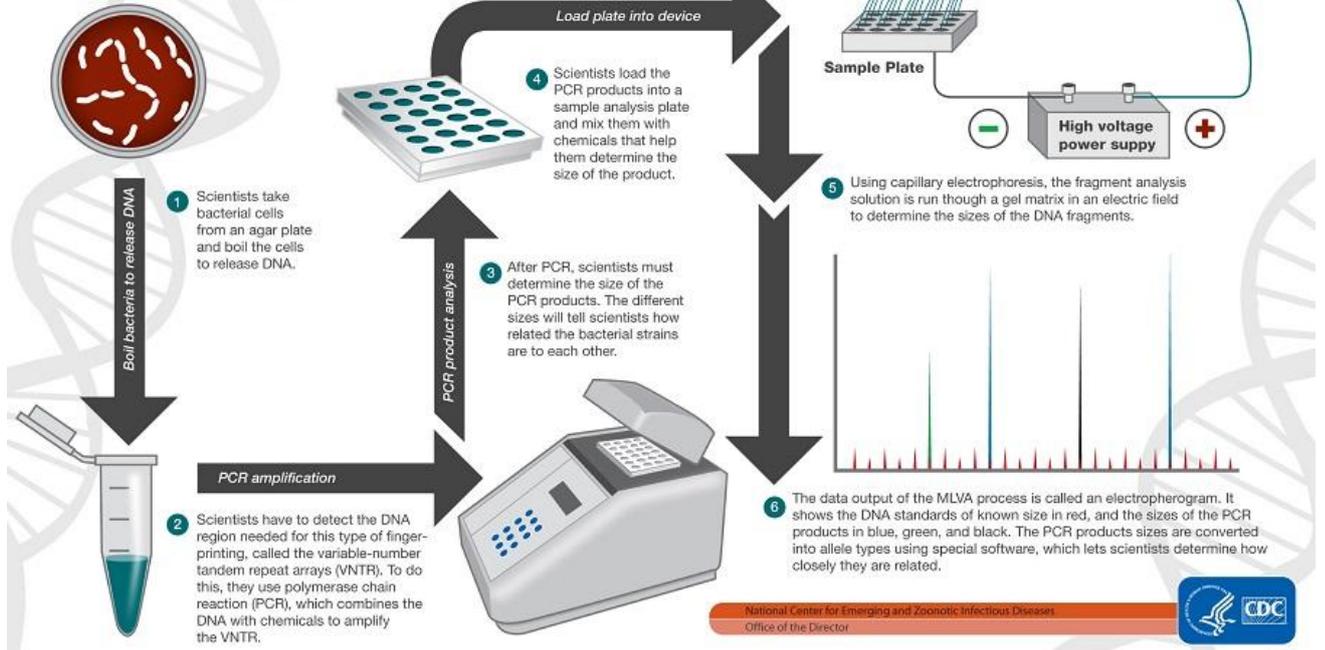
二月

完成了職前作業之後，該實驗室安排我先熟悉實驗室的作業。特別是整個作業流程。以下為整個 WGS 的 pipeline 流程。下列兩個圖示為美國 CDC 所提供的。

MLVA Process

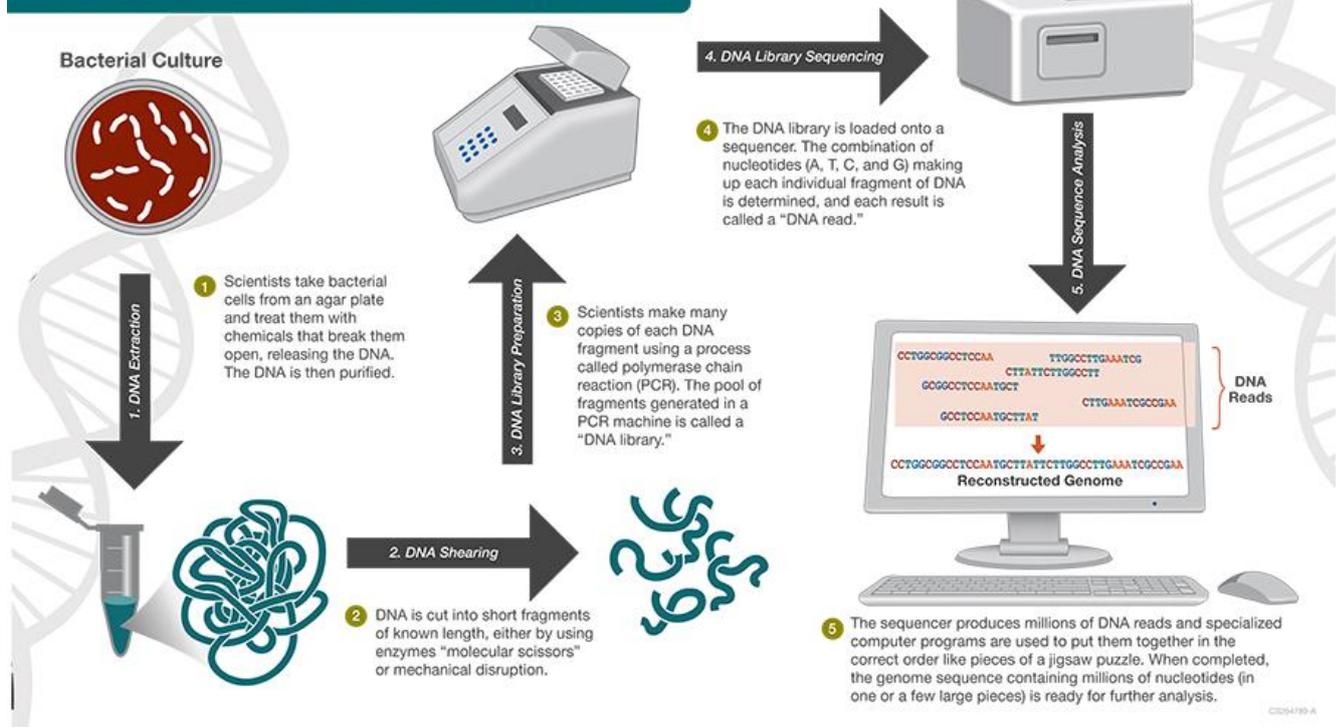
(Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)

Bacterial Culture



The Whole Genome Sequencing (WGS) Process

WGS is a laboratory procedure that determines the order of bases in the genome of an organism in one process. WGS provides a very precise DNA fingerprint that can help link cases to one another allowing an outbreak to be detected and solved sooner.

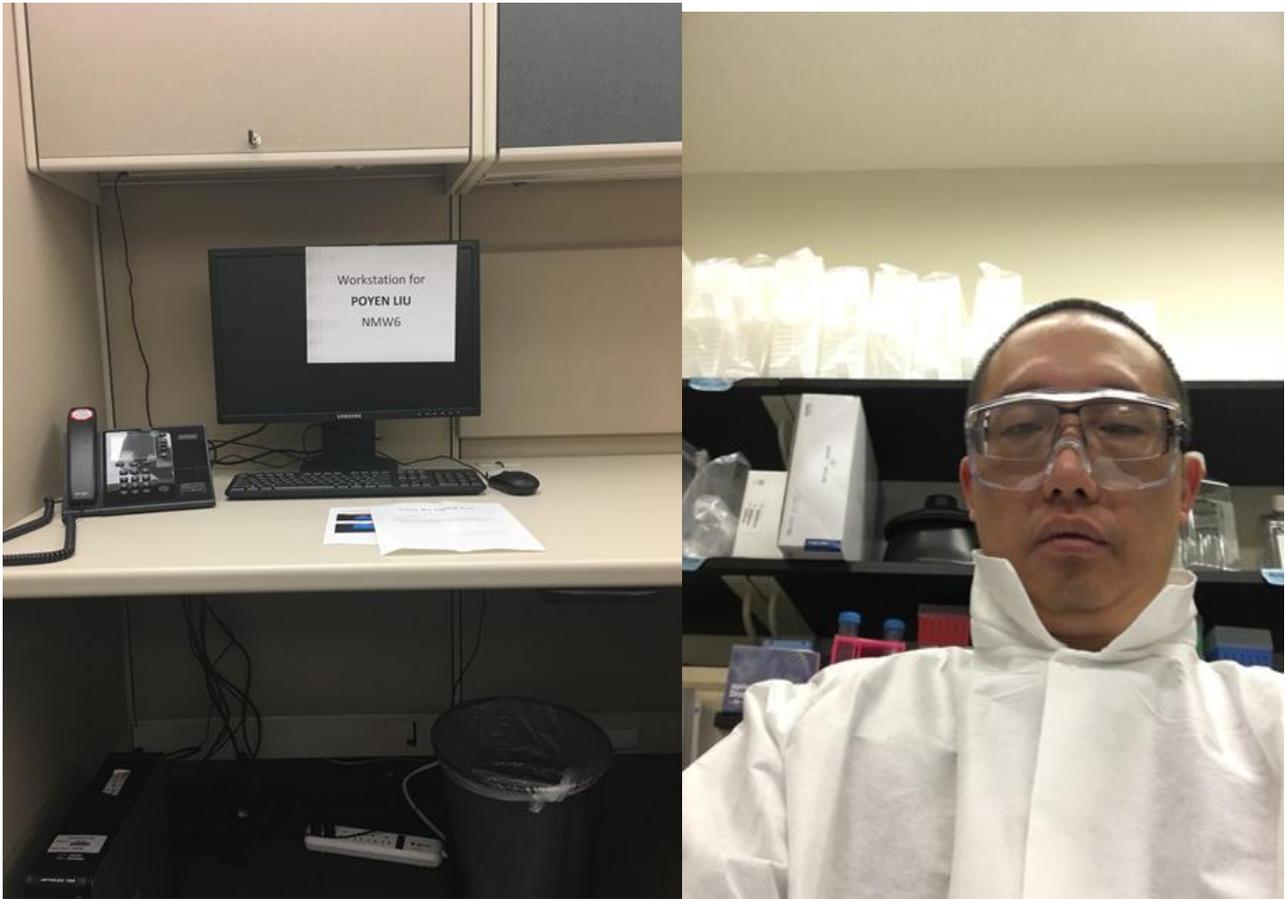


關於整個流程在這裡做簡單的敘述。

1. DNA extraction:我們從 agar plate 取出細菌。加上化學製劑破壞細胞膜，讓 DNA 遊離出來。
2. DNA Shearing: 把 DNA 切成小段的長度。CDC 目前採用 mechanical disruption.
3. DNA Library Preparation: 用 PCR 的方式複製這些小片段的 DNA。
4. DNA Library Sequencing: 把 DNA Library 放到 Sequencer 裡面，開始讀取 DNA 的序列。
5. DNA Sequence Analysis:用電腦軟體用像拼圖的方式再把這些小片段組合成原來的一條 DNA。

雖然這些步驟看起來非常簡單。其實需要技術員一個星期的時間。通常星期一進行 DNA extraction。星期二進行 shearing。星期三進行 library preparation。星期四或星期五進行 sequencing。因為本人是醫師，對於實驗室的一些基本技術並不是那麼熟悉。所以花費了一段時間才逐漸上軌道。我覺得他們的安排是合理的。因為如果回到高雄榮民總醫院要發展此項技術，而我對於實驗室流程不熟悉的話，還是沒有辦法發展此項技術。

逐漸熟悉的同時，另一項工作則是進行尋找運送檢體的廠商。因為肺炎鏈球菌是生物危險微生物。我們需要尋找具有此項服務專案的運送公司。這個尋找的過程花費了許多時間。



三月

利用二月熟悉了整個鏈球菌實驗室流程。接下來就是的工作就是等待台灣的檢體送來美國。在這個過程中還好有微生物科組長的配合幫我把高雄榮總微生物科的保留菌株包裝送來台灣。台灣疾病管制局的申請通過之後。其實最困擾我們的是運送廠商。具有輸送生物危險性檢體的運輸公司不多。因為我們的數量不多，一般來說對於我們的配合度皇帝。這個月花了超多時間在進行細菌菌株輸出的行政作業。



Tuesday Morning Seminar

四月

因為檢體輸送的問題無法解決。本人在美國聯繫非常不方便。所以本人於四月初特地回到台灣一趟。親自與運輸公司溝通。解決了許多行政程式。在四月底回到亞特蘭大。剛好是美國疾病管制中心舉辦的一年一度的 Epidemiology Intelligence Service Conference. 因為本人是感染科醫師曾經參與過兒科的感染管制工作。所以就跟主管請了一個星期的假來參與此次大會。



實驗室同仁

五月

最後終於找到一家廠商願意運送生物危險性檢體。但是因為細菌運送過程需要全程低溫運送。但是在亞特蘭大機場 clear custom 花了許多時間，而廠商並沒有在這段時間進行冷凍。所以當我們在美國 CDC 收到檢體時，是徹底解凍的。在我們的努力下，24 株檢體最後有 14 株存活。我們需要第二次運送檢體。鑒於第一次失敗的教訓，我們這次先運送一種特殊的 swab 過去臺灣。這種 swab 允許細菌在常溫下輸送。但是成本非常高。所以第一次運送我們沒有先空運次 swab 去臺灣。在最後我們順利收集到高雄榮民總醫院在過去一年的 24 株檢體。

六月

接下來我們開始進行臺灣菌株的 WGS。這當中發生了一個插曲。其實臺灣的檢體中有一株根本不是肺炎鏈球菌。這個事件有待我回國後與醫院微生物科對於該菌株在做一次確認動作，以確定本院的檢體品質。因為美國 CDC 要求我自行操作所有的流程，並且提供一位元技術員從旁協助我。我們大概花了一個月的時間處理本院的檢體。這個作業時間遠遠長於他們正常作業流程所需要的一個星期時間。這是因為我的技術努力比不上技術人員熟練。所萃取出來的 DNA 濃度不足。無法進行到 Sequencer 機器裡面讀取序列。但是 CDC 要我重複實作這些程式。直到我能夠有自主能力萃取足夠量的 DNA。技術人員從旁一再的協助我反復練習。

七月

當我們的序列都已經完成後。這個時候需要我們單位元主管審核才能把結果給我。這個時間大概進行了三個星期。在這段期間，我和該單位同仁討論我們該如何利用臺灣的檢體資料發表一些文章。初步討論的結果為把臺灣的菌株和美國的菌株做各方面的比較。可以發表一系列的文章。這個月臺中榮總排了一個團體來美國 CDC 參觀。我陪同他們並且聚餐。



台中榮總感染科一行人參觀 CDC

八月

在這個空擋，我學習了一些生物統計的軟體。例如 R 語言。這是為了之後的資料處理做準備。另外，因為 CDC 這個部門缺少臨床醫師，各個 ABC sites 送來的檢體，他們比較無法就臨床資料做分析。所以他們給了我肺炎鏈球菌腦膜炎的資料做分析。這些都是屬於高抗藥性的菌株。希望可以找到臨床上有無意義的地方。

九月

基本上這個月，我繼續研究各種生物統計軟體。美國疾病管制中心的軟體資源非常多。例如 R 以及 SAS 這些生物統計軟體。在 CDC 都是免費提供的。只要你在 CDC 內部網路上提出申請，就會免費替你安裝。在台灣臨床醫師傾向於依賴研究助理來完成臨床研究的統計工作。但是模式會有一些缺點。研究助理對於臨床數據的敏感度沒有臨床醫師高。所以有許多資料沒有把他的臨床價值返回到極大值。所以我現在有這個機會使用這些軟體來利用 CDC 的大數據。應該利用這個機會好好學習。而且在台灣可能沒有機會有這麼大的數據庫讓我操作這些統計軟體。



十一月

該單位主管終於審核完畢來自臺灣的資料並且跟我解釋了該資料的意義。臺灣與美國的血清型大不相同。MIC 也比美國高出許多。另外 MLST 的分佈也不相同。所以有其發表文章的意義。我和該單位李博士討論了這些資料。我們初步先朝 phylogenetic tree 的方向作為我們這一系列文章的第一篇。並且在美國微生物學會年會發表。所以我們趕在摘要截至日前投稿。Phylogeny 這個領域對於我這個臨床醫師來說非常陌生。所以我利用這段時間學習了如何利用軟體輸入序列來畫出 trees。



十二月

這個月下載了 phylogenetic tree 的繪圖軟體。並大量收集了最近今年關於這個領域的文獻。



操作 DNA 萃取的實驗室同仁

一月

搜尋臺灣有關於肺炎鏈球菌在疫苗施打前後的血清型變遷，並且和美國的變遷做比較。並且使用 phylogenetic tree 來比較兩國的菌株。



大雪紛飛的 CDC

三 心得

1. 這次檢修的機構並不是醫院機構而是美國聯邦機構：美國疾病控制及防治中心。這是全世界公共衛生的一流機構。我一直思考什麼東西是臺灣目前所欠缺的，而我需要學習什麼東西帶回來臺灣。我回來歸納出臺灣目前醫師做研究比較缺乏的東西。臺灣醫師由於英文寫作能力和母語者相比還是有一段很大的差距。所以或許已經有研究成果了，但是因為英文寫作能力較差，所以文章發表的速度被影響了。另外就是目前是 big data 的時代，臺灣目前流行的健保資料庫也是大資料的一種。CDC 也是掌握許多大資料的機構。目前臺灣醫師對於生物統計語言的運用因為臨床工作繁忙，所以大都交給助理執行。如果醫師自己本身有操控資料的能力，那麼對於這些大資料的掌控能力會大為提升。
2. 有了這兩個初步目標，我就朝著這兩個目標前進。我的心態立刻調整為自己是 CDC 的正式員工。我基本上早上八點半準時到達辦公室上班，儘量融入這個單位。過去一年，我請假沒有去上班的天數應該小於 5 日。儘量把自己沉浸在全英文的環境裡面。我發現這樣英文會進步非常快速。達到我預期的目標。接下來，我努力的學習統計軟體。在臺灣臨床工作非常繁忙，很難靜下心來專心學習。CDC 有充足的資源和諮詢對象。應該好好利用這段時間充實才是不會浪費時間。

四 建議

- 醫院在我出國的前夕更改在國外期間補助辦法，其實可以讓臨床醫師出國進修的意願大衛提升。我覺得目前比較大的問題是許多臨床醫師很難找到進修機構。往往寫了一大堆信到各個醫院，但是往往石沉大海。我目前的層級還沒有想到解決的辦法。
- 目前出國進修需要通過語言認證才能出國。輔導會目前規定為通過託福考試。但是有些人並不是到英語系國家進修，例如日本。他們已經學習日文一段時間了，卻被要求通過英文託福測驗，其實有不合理的地方。應該是以目標國語言的認證為標準。