

出國報告（出國類別：訓練）

# 生物資訊應用於 病原菌和抗藥性快速鑑定

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：李佳昂

派赴國家：瑞士

出國期間：113 年 6 月 4 日至 113 年 7 月 17 日

報告日期：113 年 9 月 24 日

## 摘要

細菌感染和抗生素抗藥性每年在全球直接造成無數死亡個案，衍生之醫療負擔相當可觀。有鑑於此，檢驗醫學部一直以來致力於優化菌種及藥敏性鑑定流程，以利臨床照護團隊根據檢驗報告精準用藥。然而，新興病原菌層出不窮，抗藥性與日俱增，且部分新型抗生素難以使用目前常規測試來得知藥敏測試結果，若能盡早鑑定菌種與抗藥機制，對於病人照顧將有極大助益。有鑑於此，全基因定序等生物資訊方法應用於臨床微生物診斷的可能性逐漸受到關注。藉由住院醫師短期出國進修的機會，赴瑞士日內瓦大學綜合醫院和蘇黎世大學醫院兩間機構訓練，學習生物資訊應用於病原菌和抗藥性快速鑑定的發展經驗。瑞士部份醫院已將困難培養的病人臨床檢體使用生物資訊方式進行分析，雖然還不是任何醫師都可以開立的正式檢驗項目，但在檢驗部門的負責醫師評註、簽核後已將最終報告提交給照護團隊參考，對於臨床治療有所助益。從檢驗流程、結果分析、報告評註、團隊分工乃至於設立過程曾經遇到的困難，瑞士已具備充分經驗，對於臺灣未來的發展有許多可借鏡之處。因此，利用住院醫師出國訓練的機會，赴瑞士學習。

## 目次

### 本文

壹、目的.....	1
貳、過程.....	1
參、心得.....	10
肆、建議事項.....	10

## 壹、目的

本次出國的主要目的是學習、觀摩包含生物資訊在內的新式檢驗技術運用於微生物診斷，並且建立未來雙方學術交流、資訊分享的合作管道。

病原菌感染和抗生素抗藥性 (Antimicrobial resistance, AMR)每年在全球直接造成超過百萬人死亡，而間接造成之死亡案例和衍生性醫療支出更是不計其數。有鑑於此，檢驗醫學部一直以來希望加快菌種及藥敏性鑑定流程，以利治療方針之擬訂。目前，血液培養的作業流程是將血瓶放置於螢光偵測培養系統 (BD Bactec™ FX40)，以菌血症為例，依菌量不同，大約 20 小時可以偵測陽性。接著進行次培養，依菌種不同，約耗時 20-40 小時。次培養菌落形成後，以 Maldi-Tof 鑑定菌種，再以 Vitek 2 進行藥敏測試。亦即，從病房血瓶送至檢醫部起算，到完成菌種暨藥敏報告所需之總時間最快為 36-48 小時，有時達到 72-96 小時甚至更久，而這段等待期間臨床醫師以經驗性抗生素先行治療。然而，抗藥性與日俱增且新型抗生素難以使用目前常規測試來得知藥敏測試結果，若能盡早鑑定菌種與抗藥機制，對於病人照顧以及感控措施及時介入將有極大助益。

此外，本院病人的病程較為複雜，以往曾經遇到許多難以利用傳統實驗室方式鑑定病原，如非結核分枝桿菌以及絲狀黴菌等，需藉由分子鑑定做進一步確認，依目前分子鑑定流程往往不具時效性，因此需引進逐漸成熟的全基因定序流程以協助臨床實驗室提供即時且完整的報告。最後，全基因定序有助於更全面的追蹤疫情，例如若發生院內感染、群聚時，有助於釐清來源，密切監控。

## 貳、過程

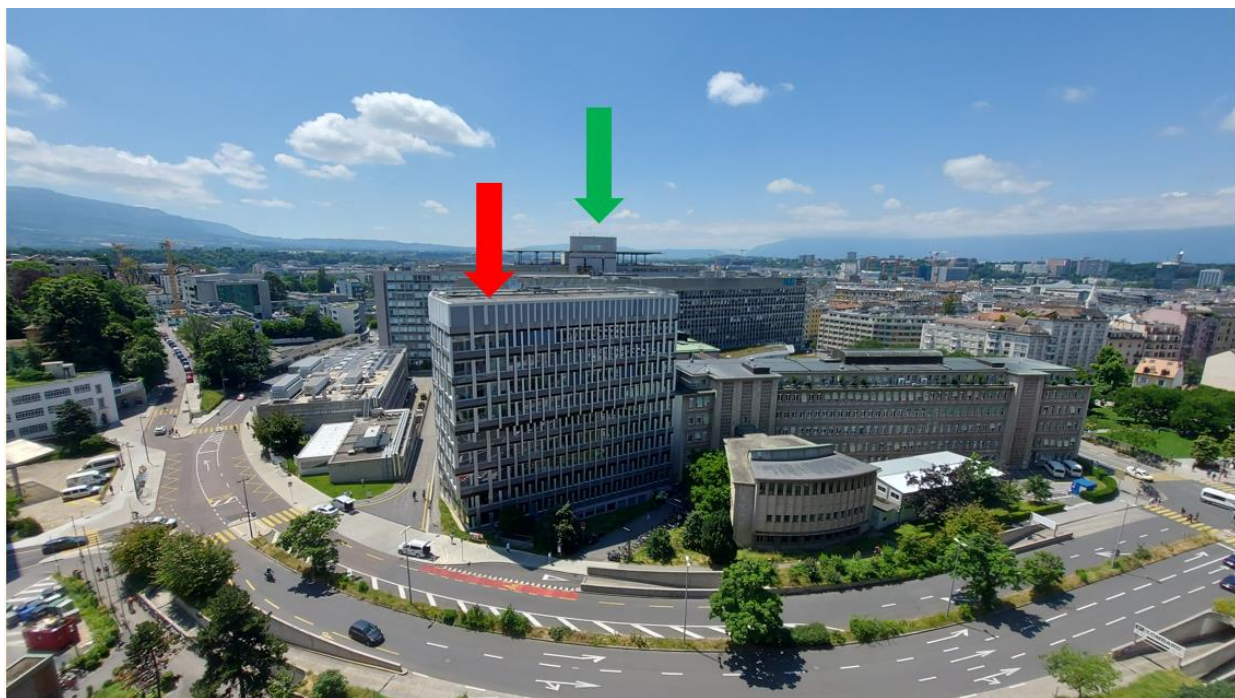
### 一、訓練醫院簡介

第一家訓練醫院為日內瓦大學綜合醫院 (Hôpitaux Universitaires de Genève, HUG, 可譯為日內瓦大學醫院、日內瓦大學附設醫院等)，是瑞士最大的醫學中心，創立於 1535 年，於日內瓦單一地區之總床數超過 1900 床，其規模在歐洲來說亦屬名列前茅。第二家訓練醫院為蘇黎世大學醫院 (University Hospital Zurich)，是瑞士德語區規模數一數二的醫學中心。兩家醫院和歐洲感染暨微生物學會均有密切的合作與交流，每年接來自受歐洲、美國、加拿大等世界各地的醫師長、短期見習，故院內會議、教學、學術活動的英語普及性高。

### 二、醫院進修

日內瓦大學綜合醫院的檢驗醫學部負責院內所有檢體的常規性診斷，是一棟獨棟的大樓，即檢驗醫學大樓 (法文原名 bâtiments des laboratoires, 見圖一)。該大樓除了臨床檢驗單位，也有院內其他單位進駐，而每個部門均有專業領域相關之負責人。一樓 (ground floor) 包括檢體受理處、血液組、生化組等檢體量最大的幾個

組別 (圖二)，使用的自動化機臺和本院相似，檢體傳送方式亦有相似之處，例如人工送檢和氣送並行 (圖三)。



圖一：醫院院區，包括檢驗醫學大樓（紅色箭頭）、直升機停機坪（綠色箭頭）。拍攝地點為醫學院校區，地下樓層有連通道連結醫院院區和醫學院校區



圖一之一：日內瓦大學綜合醫院

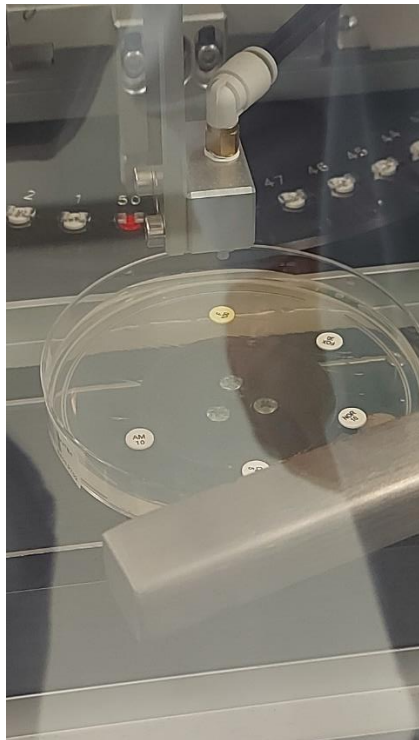


圖二：檢體受理處



圖三：氣送管

四樓則是細菌檢驗組（法文直譯為細菌學實驗室），也是本次進修主要訓練場所之一。指導教授和該組資深同事帶我觀摩了已經實施四年的全自動化系統 (automation)，了解其機臺運作模式和檢驗流程。自動化系統負責初始檢體的分配、運輸、菌落接種、塗盤和後續培養等。在細菌生長後，機器拍攝照片，並且添加藥敏紙錠以進一步進行抗生素感受性測試 (圖四)。總的來說，自動化系統簡化了工作流程，提供了即時的訊息並且降低了人工操作的錯誤機率。本院檢驗醫學部細菌組稍早也採用了同一家公司生產的自動化系統，能夠與經驗豐富的自動化系統使用者建立聯繫，並就相關課題進行交流，是一次難能可貴的經歷。



圖四 (左)：細菌自動化檢驗流程之一，用機器手臂添加藥敏紙錠於培養盤



圖五 (右)：病毒檢驗組，圖中央的小型機臺為 SARS-CoV-2 point-of-care PCR Liat



圖六 (左)：病毒檢驗組行政辦公室，和實驗區域同一樓層但不同位置

圖七 (右)：連通醫院不同大樓的通道，兩旁為讓醫護人員和病人休息的戶外花園

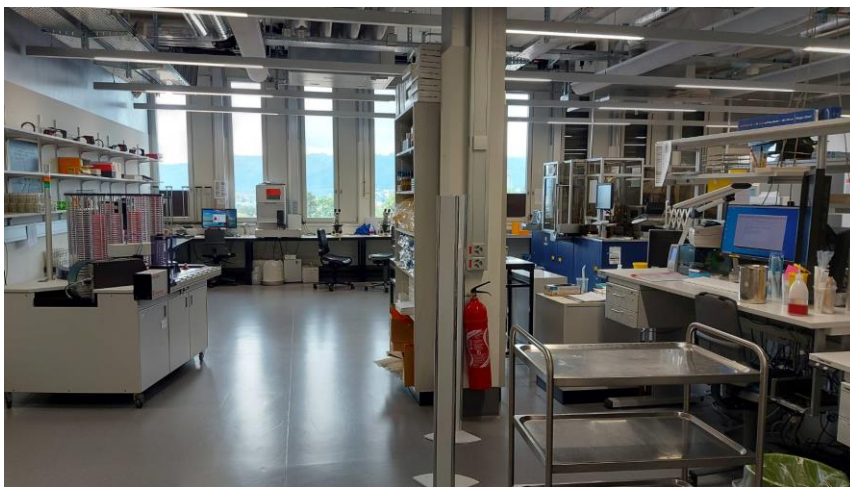
除了細菌檢驗組，訓練期間也拜訪了負責臨床病毒學的醫師 Manuel Schibler 博士，前往位於五樓的病毒檢驗組（法文直譯為病毒學實驗室，圖五 ~ 圖七），了解業務概況，並且就包括分子檢驗在內等較新式的病毒檢驗之使用經驗進行交流。在此，簡單說明日內瓦的城市定位和國際交流情況，以及對於日內瓦大學綜合醫院檢驗醫學旗下單位產生的影響。日內瓦位在瑞士的法語區，緊鄰法國，每日有眾多上班族和學生通勤往返瑞士、法國兩地。除此之外，日內瓦的國際交流非常頻繁，有數十個國際組織將總部或區域分部設在日內瓦，例如世界貿易組織、世界衛生組織、國際勞工組織、聯合國歐洲總部、歐洲核子研究組織、無國界醫師瑞士分部、紅十字會總部、聯合國高級難民總署等。也正因此，醫院的工作人員時常應對來自全球的新興傳染病、各區域流行的病毒。而病毒檢驗組處於最前線，負責的醫師和檢驗團隊必須隨時警惕這些潛在的威脅，準備好各式的檢驗試劑和平臺及相關量能，以備不時之需。Schibler 醫師和我討論了前幾年的經驗，包括瑞士和臺灣在 SARS-CoV-2 疫情來襲時的防範措施、檢驗量能擴充、序列分析和相關研究等。我們也交流了後疫情時代各類病毒的防疫資訊與相關檢驗方法，包括猴痘、流感、登革熱和腸病毒等。

在蘇黎世大學醫院進修期間，指導教授 Professor Brugger 和醫院微生物檢驗部門有緊密的合作關係，很高興 Professor Brugger 協助安排訓練與交流，了解臨床微生物檢體處理與分析的實際運作情形，並且和該部門的主管討論未來的合作機會（圖九）。以細菌檢驗而言，現階段蘇黎世大學醫院整體的自動化程度不及日內瓦大

學綜合醫院，未來會持續朝向全自動化的目標邁進。在新式診斷技術方面，分子檢驗是積極發展的項目之一，例如多重聚合酶鏈式反應 (Multiplex PCR panel)。細項部分，蘇黎世大學醫院有提供臺大醫院尚未採用的菌血症套組 (FilmArray Blood Culture Panel)，也有臺大醫院已經採用的鼻咽檢體套組 (FilmArray Respiratory Panel) 和針對下呼吸道檢體的肺炎套組 (FilmArray Pneumonia Panel) 等。進修過程，和蘇黎世大學醫院醫師交流各個套組的使用經驗。而上述 Multiplex PCR 檢驗在臺灣仍屬自費項目，因此檢驗量並不多，開立的情形在不同醫院、或同一間醫院之不同病房有所差異。

生物資訊的部分，研究團隊成員由專門負責研究規劃和收案的研究醫師 Willy (MD thesis, research medical doctor，不參與第一線臨床照護，專注於研究的醫師)、生物統計分析師、微生物實驗技術人員等組成。我觀摩的其中一項計畫是針對燒燙傷加護病房病人的菌叢研究，這是瑞士國科會補助約新臺幣七千多萬元的全國性、多醫學中心之前瞻性研究，蘇黎世大學醫院是其中一間參與的醫院，而 Professor Brugger 為蘇黎世大學醫院的負責人。在獲得倫理委員會核准並且取得知情同意書之後，研究團隊將燒燙傷病人不同部位的傷口檢體利用生物資訊進行菌叢分析，試圖找出燒燙傷病人復原過程不同階段之菌相變化，例如急性感染發生時、復健過程中、康復後等，進而評估治療策略。總得看來，該實驗室不同專業成員之間的合作很密切，時常互相幫忙，也會跨領域、跨實驗室來共同完成較大規模的研究計畫。





圖八 (左)：參加蘇黎世大學醫院學術會議

圖九 (右)：赴蘇黎世大學微生物檢驗部門，獨棟大樓負責全院的細菌和黴菌檢體

圖九之一 (下)：蘇黎世大學微生物檢驗部門內部，光是單一細菌檢驗的空間就十分寬敞

### 三、醫院和醫學院附屬研究單位、實驗室進修

研究單位的進修，以日內瓦大學醫學院的實驗室為開端，觀摩了應用 iSeq (Illumina NGS) 和 GridION (即 Nanopore) 進行臨床樣本分析，經歷了 DNA 萃取、純化、定序以及生物資訊方式的清理和分析等處理過程。

日內瓦大學綜合醫院的臨床檢體類別十分多樣，讓人印象深刻。例如，研究團隊處理過許多不同類型樣本的經驗，如骨頭（骨髓炎）、大腦（例如腦膿瘍等中樞神經感染）和血液（菌血症、敗血性休克等）、生殖泌尿道分泌物等。在將近一個月的訓練期間內，我全程參與了一名 90 多歲的病人死後進行屍體捐贈的心臟瓣膜檢體的處理與分析。該病人過世前，醫師懷疑心內膜炎感染，但尚未符合 Duke criteria 且多次送檢血液培養均呈現陰性，在同意書完備之後，由心臟外科團隊取其瓣膜樣本進行送檢，且 GridION 和 iSeq 併行。Professor Schrenzel 和我討論了 GridION 和 iSeq 兩者在 DNA 萃取和純化過程中的差異、檢驗報告所需時間、讀數

(reads) 的質、量與長度之不同，以及其限制。兩項方法除了前處理的試劑和實驗步驟不同，後端的生物資訊處理方式也不一樣，我們充分討論了臨床應用的優缺點。此外，也探討了抗藥性基因的辨認過程。最後，Professor Schrenzel 展示了檢驗部門的醫師評註完畢後，提供臨床團隊參考的 NGS 和 GridION 報告介面。在交叉比對後，該病人的瓣膜帶有 *Streptococcus gordonii* 的可能性極高，很可能是造成本次病程之感染源。

透過上述經驗可知，生物資訊運用於感染症不僅可以用於學術研究，還可以進一步評估是否能夠常規性的應用於醫院的臨床檢體，特別是針對困難培養、因故培養失敗的病原菌。時效性方面，以 NGS 為例，一個可能的作法是第一天上機、隔夜 (overnight) 運轉並且於第二天發送報告，而 GridION 則視情而定，若檢驗部門醫師有充分把握，可早一點結束運轉流程。然而，不管是哪一種機臺，由於都是根據基因定序的原理，所以難以克服抗藥性基因型和實際表現型不同之問題。



圖十 (左)：Professor Schrenzel 實驗室。左側機臺為 illumina 出產的 iSeq 100，右側機臺則是 Nanopore 的 Gridion，最多可同時運作 5 個 Flongle

圖十一 (右)：訓練期間出席日內瓦大學醫學院主辦的學術研討會

圖十一之一 (下)：筆者於日內瓦大學醫學院協助處理病人屍體捐贈之心臟瓣膜，用於後續分析



圖十二 (左)：日內瓦大學醫學院圖書館的多頭顯微鏡室



圖十三 (右)：日內瓦大學醫學院圖書館

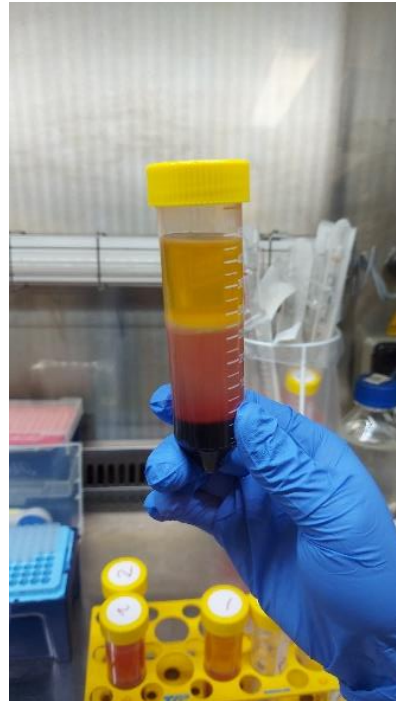
蘇黎世大學醫院的指導教授 Professor Brugger 本身兼任醫院感控實驗室(Hospital hygiene laboratory)的主管，所以進修期間，有一部分的時間在醫院感控實驗室輪訓。此實驗室的主要業務是監測醫院特殊感染源，由兩位隸屬蘇黎世大學附設醫院的員工負責操作。感控檢體來自醫院不同病房、區域之環境採樣，利用自動化系統上機進行分析，即時通報給臨床單位例如病房的負責醫師。和先前提到的細菌檢驗自動化概念相似，優勢是減少斷點，進而減少人為操作上出錯的機率 (圖十四)。

此外，Professor Brugger 在蘇黎世大學醫院的實驗室有許多研究計畫進行當中，我觀摩了偏向基礎研究的其中一項主題：微生物和宿主互動 (host-pathogen interaction)。現階段目標是藉由研究互動模式監測感染過程，未來的長期目標則是進一步探討治療對策，即 microbiota-targeted therapies。該實驗室研究微生物和宿主互動的其中一項較為獨特的方法學是擬人化 3D 組織模型 (humanized 3D tissue models)，也是本次觀摩的重點之一。擬人化 3D 組織模型正式名稱為 Three-dimensional organotypic model of the human airway mucosa，基本組成包括不同的組織分層 (tissue layer)。例如上皮細胞 (epithelial cells)、頂端層 (apical layer)、氣液介面 (air-liquid-interface)、培養基/培養液 (medium)等，不同的模型其細緻程度不同，可能呈現其他種類的細胞、年液、緊密連接、黏著型連接等。

本次海外實習很幸運能觀摩整個實驗架構和大部分的步驟。以 Professor Brugger 的實驗室為例，所謂 3D 的組成包含了纖維母細胞和呼吸道上皮細胞兩層細胞層。這兩層細胞層的細胞種類、性質不同，在細胞切片的顯微視野亦可以從組織學的角度清楚界定。之所以要建立 3D 多層細胞層，是希望盡量模擬真實呼吸道的組織樣態。而這樣的模型雖然並不算是類組織 (organoid)，但在可行性、成本、方便性等各方面有其優勢。

3D 組織模型建立好之後，該實驗室利用此模型研究宿主、呼吸道病原菌和常在菌三者之間的互動。病原菌選用的是 *Staphylococcus aureus* 或 *Streptococcus pneumoniae*，常在菌則選用 *Dolosigranulum pigrum* 或 *Corynebacterium species*。先前已經發現某些常在菌例如 *Dolosigranulum pigrum* 可能會抑制特定病原菌 (*Staphylococcus aureus*)之生長，近期的研究主題則探討其機制，例如是直接抑制或

間接抑制，而間接抑制否和免疫調控相關。在免疫調控的實驗中，實驗室團隊向捐血中心取得捐贈者的全血血袋，進一步分離出周邊單核球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC，參見圖十五)，再將單核球於特定時間點加入 3D model 中，觀察其變化並且測量免疫相關細胞激素的分泌量。



圖十四 (左)：蘇黎世大學附設醫院感控實驗室 (Hospital hygiene laboratory)

圖十五 (右)：周邊單核球分離過程



圖十六：蘇黎世大學。蘇黎世大學和蘇黎世聯邦理工學院位在同一區域，同一條路上的部份建物是屬於前者，有些則是後者，兩校師生的交流也十分密切。愛因斯坦當年離開伯恩的專利局職務後，曾經在此兩校任教。

#### 四、特別交流活動：伯恩大學附設醫院

蘇黎世大學醫院主治醫師 Professor Brugger 特別引薦，讓我和伯恩邦最大的醫院：伯恩大學附設醫院進行交流，由擔任主治醫師 10 年多的醫師 Dr. Pascal Frey 一對一帶我觀摩。我們觀摩了急診部的急診來診、急診加護病房和內科部一般內科住院病房的檢驗種類、品項、檢驗相關流程、檢驗報告和開立檢體之系統介面等。另外，Dr. Pascal Frey 也詳細介紹了自己親手打造的 INFECT platform，整合了瑞士全國多中心的細菌抗生素檢驗結果，提供臨床用藥參考，是他領導的團隊先前研究計畫的成果之一，已成為瑞士當地非常實用的公開資源。

#### 參、心得

很高興在住院醫師生涯有如此難得的機會到瑞士交流，拓展視野。本次出國短期進修達到了預定的期望，在瑞士獲得的經驗對未來評估許多新式檢驗技術及生物資訊應用有所價值。本次訓練最大的特色是在醫院端（檢驗醫學部門）和研究端（醫學院或醫院實驗室）均有接觸，機會十分寶貴。我觀察了不同臨床檢體的基因定序過程，以及常規檢體的自動化和分子檢驗等，並將資訊回饋予部門參考。在此謝謝日內瓦大學綜合醫院 Professor Schrenzel 和基因研究實驗室團隊的成員，以及蘇黎世大學醫院 Professor Brugger 團隊。而 Professor Brugger 也表示明年 (2025 年) 下半年有意願來臺灣大學和臺大醫院檢驗醫學部參訪、交流，誠摯希望未來有機會能持續進行更加深化的學術交流與合作。

#### 肆、建議事項

一、建議本院評估未來將臨床微生物檢體進行 mNGS 或 nanopore 的分析之可行性。目前較常使用臨床檢體應用於生物資訊的科別為腫瘤、血液等惡性疾病相關病症，例如急性骨髓性白血病 (AML) 的病人會送 NGS。而在微生物和感染症領域方面，院內已有相關單位使用臨床檢體用 NGS 試驗，但都還在起步與嘗試階段。短期內或許暫時無法大量使用如此多樣化的臨床檢體上機，但或許可以整合各單位的資源，評估、測試某幾種檢體的工作流程概況、可行性和穩定性，並且進一步確認其時效性和準確度。

二、不管是 mNGS 或 nanopore，現行的操作成本，例如機臺、耗材和人力花費等，

均較傳統培養方式高出許多。以血液科的 AML 骨髓檢體送 NGS 為例，截至目前為止的自費價格約需新臺幣三萬多元，所費不貲。若確認這些新的方法學在微生物領域有其臨床實用性，或可同步進行醫療經濟、成本效益之分析。

三、本院在同一年度有多位住院醫師申請出國進修，實屬難能可貴的訓練機會。若受訓職員回國後有安排科部層級之成果分享、口頭報告，或可將會議資訊分享、公布給其他科部的同事。倘若對於該主題有興趣，時間許可的情況下可以前往該科部聆聽、交流、學習，促進未來跨科部學術合作之可能。