

出國報告（出國類別：進修）

包氏不動桿菌之毒力因子分析及疫苗發展

服務機關：臺北榮民總醫院
姓名職稱：李怡姿主治醫師
派赴國家：美國及加拿大
出國期間：2016/12/11-2017/12/10
報告日期：2018/01/18

摘要（含關鍵字）

包氏不動桿菌為一新興病原菌，不但會造成加護病房中免疫不全病患的嚴重伺機性感染，造成社區型感染時死亡率亦相當高。因為此菌對 carbapenem 的抗藥性已遍佈全球，使本來就有限的治療藥物選擇更少。因此尋求抗生素以外的治療方法是勢在必行，疫苗即為對抗此種病菌的嶄新治療方式。發展疫苗需考慮細菌多樣性，須選擇最具臨床重要性、代表性及毒力最強之菌株作為多價疫苗之組合。本次出國進修利用全基因體定序方法分析毒力相關基因的序列，以作為未來發展疫苗之參考依據。並學習使用動物肺炎模式來評估包氏不動桿菌的毒力強弱及評估疫苗的保護效果。

關鍵字：包氏不動桿菌、全基因體定序、毒力、動物肺炎模式、疫苗

目次

一、 目的.....	3
二、 過程.....	6
三、 心得.....	9
四、 建議事項.....	12
附錄.....	14

一、目的

包氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*)為一新興病原菌，不僅會造成加護病房中免疫不全病患的嚴重伺機性感染，當它造成社區型感染時病情嚴重度及死亡率亦相當高。本人與急診部研究團隊於 2017 年發表於 *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 的研究指出，社區型包氏不動桿菌菌血症的病患，和同樣性別年齡分布的院內感染包氏不動桿菌菌血症的病患相比，菌血症發生時 APACHE II 分數顯著較高，休克的比例也明顯較高，且在所有包氏不動桿菌菌血症的病患(包括社區型包氏不動桿菌菌血症的病患和院內感染包氏不動桿菌菌血症的病患)，病患若是在社區感染包氏不動桿菌，為菌血症發生後十四天死內死亡的獨立危險因子(*J Microbiol Immunol Infect.* 2017 Jun 29. pii: S1684-1182(17)30106-8)。根據這個臨床研究的結果，我們推測這些在本院急診收集到的社區型包氏不動桿菌菌血症菌株，可能帶有某些和院內感染包氏不動桿菌菌血症菌株不同的高致病因子。

對臨床醫師而言，處理包氏不動桿菌感染十分棘手，因為此菌對 carbapenem 的抗藥性已遍佈全球，使本來就有限的治療藥物選擇更少。目前僅有 colistin 和 tigecycline 兩種藥物對 carbapenem 抗藥性的包氏不動桿菌有效，但兩者治療上皆有其缺點，colistin 具腎毒性且在血中要達到高濃度需要時間，而 tigecycline 因其藥理特性不容易在血中達到高濃度，因此不適合用於治療包氏不動桿菌菌血症的病患。更重要的是，對急診醫師來說，這兩種

藥物屬於相當後線的抗生素，在急診對於懷疑敗血症病患幾乎不可能使用 colistin 和 tigecycline 作為經驗性抗生素的治療。因此尋求抗生素以外的治療方法是勢在必行，疫苗即為對抗此種病菌的嶄新治療方式。疫苗的研發已成功預防許多感染症。發展疫苗需考慮細菌多樣性，須選擇最具臨床重要性、代表性及毒力最強之菌株作為多價疫苗之組合。

為達成發展包氏不動桿菌的疫苗這個目的，我曾經與國家衛生研究院感染症與疫苗研究所助研究員級主治醫師郭書辰合作發展小鼠不動桿菌肺炎(氣管內投菌)的動物模式，並與中央研究院生化所吳世雄教授與楊鳳玲博士共同合作研發包氏不動桿菌莢膜多醣體的疫苗，我們選取了一株包氏不動桿菌的臨床菌株 SK44，分離並純化此菌株的莢膜多醣後，製備對抗此莢膜多醣的多株抗體，並以被動免疫之小鼠肺炎模式(氣管內投菌)分析 SK44 莢膜多醣的多株抗體保護力何如，結果發現 SK44 莢膜多醣的多株抗體對小鼠的保護效力為 55%。

為了繼續研發保護力更佳的包氏不動桿菌的多價疫苗，我希望能就兩大方面著手。第一方面就是尋找社區型及院內感染包氏不動桿菌可能的毒力因子以作為未來疫苗的新標的，第二方面就是對疫苗的製備、輔劑、以及評估疫苗效力的方法進行更深入的研究。透過國立陽明大學生物醫學資訊研究所楊永正老師的引介(楊老師的研究領域專長為致病基因與致病機制之生物資訊分析)，認識美國國家衛生研究院(NIH)神經異常暨中風研究中心(NINDS)

IT 部門主任范揚政教授，決定前往美國國家衛生研究院進行包氏不動桿菌全基因體定序分析毒力相關基因的序列。另外，素聞加拿大國家研究院生物科學研究所研發首席主任陳王學教授為包氏不動桿菌疫苗的專家，經國家衛生研究院感染症與疫苗研究所疫苗專家莊再成研究員的引薦，決定前往加拿大國家研究院跟陳教授學習疫苗的製備、輔劑、以及評估疫苗效力的方法。

二、過程

首先前往加拿大國家研究院生物科學研究所，跟陳王學教授學習疫苗的製備、輔劑、以及評估疫苗效力的方法。陳教授的實驗室十多年來建立一套十分完整及穩健的小鼠不動桿菌肺炎感染(鼻腔內投菌)的動物模式平台，此平台正好與本實驗室和郭書辰醫師合作發展的小鼠不動桿菌肺炎感染(氣管內投菌)動物模式不同，事實上，根據過去文獻我們也曾經嘗試過鼻腔內投菌的肺炎模式，但是發現很難控制鼻腔內投菌的菌量一致，後來才改走小鼠不動桿菌肺炎(氣管內投菌)的動物模式。這次跟著陳王學教授實驗室學習鼻腔內投菌的肺炎模式，才發現原來有許多實驗上要注意的細節，包括在鼻腔內投菌前的麻醉深度的拿捏需恰到好處，麻醉深度要夠，從鼻腔滴入菌液時小鼠才不會將菌液嗆出，麻醉深度亦不能太深，以免影響到小鼠呼吸造成缺氧，同理，麻醉劑的選用要選擇速效且作用時間短的，以免作用時間太長影響到小鼠呼吸造成缺氧，在麻醉及鼻腔內投菌的過程都要密切注意小鼠的呼吸及生理狀況。鼻腔內投菌時也有許多細節需要注意，小鼠麻醉保定後保持垂直於水平面之姿勢，並使鼻孔氣管成垂直於水平面之一直線，使用 pipetman 並使用 200 μ l 的 tip 從小鼠鼻孔滴入十滴菌液，滴入後密切注意小鼠的狀況，若滴入時小鼠有咳嗽反射或嗆到的情形，表示麻醉深度不夠，若滴入時菌液從小鼠嘴巴流出則表示菌液未流到呼吸道而是流到胃腸道，因此判定為鼻腔內投菌失敗。陳王學教授不僅從事包氏不動桿菌毒力及包氏不動桿菌疫苗相關

的研究，也同時在研發其他病原菌的疫苗及新的輔劑成分，如腦膜炎球菌及百日咳疫苗，此外陳教授實驗室評估疫苗的效力的參考指標也更多元，尚包含小鼠血清的 IgA 及 IgG，未來我們實驗室也可參考陳教授實驗室評估疫苗的效力的指標。

接著前往位於美國馬里蘭州貝賽斯達的美國國家衛生研究院神經異常暨中風研究中心(National Institute of Neurological Disorders and Stroke; NINDS) Intramural IT and Bioinformatics Program 主任范揚政教授的實驗室，進行包氏不動桿菌全基因體定序分析毒力相關基因的序列。范揚政教授主要的研究領域含蓋生物資訊、大數據、電腦運算、資料庫、網頁技術及程式語言、臨床試驗資訊架構、精準醫療等等，同時范教授也是美國國家衛生研究院會計報帳系統的建構者。范教授指派 NINDS 生物資訊部門的 Staff Scientist Kory R. Johnson 博士指導並協助我進行包氏不動桿菌全基因體定序分析。Kory R. Johnson 博士是 Bioinformatics 的專家，他帶著我從最初的全基因體定序資料的初步處理，品質控制、進行到序列重組、最後和目前已知的細菌(不分菌種)毒力相關基因資料庫做比對，找出社區型及院內感染包氏不動桿菌臨床菌株所帶有毒力相關的基因。這些包氏不動桿菌臨床菌株全基因體定序分析毒力相關基因的資訊相當重要，我將這些結果與菌株所感染之病人的臨床資料做比對，並找出和病人預後相關性最高的毒力相關基因。目前已經找到數個和病人預後相關性最強的毒力相關基因。除此之外，在 Kory R.

Johnson 博士的協助及指導下，我也利用這些包氏不動桿菌臨床菌株的全基因體定序分析資料完成了它們的基因分型，使用全基因體定序分析作細菌的基因分型已是微生物學界未來的趨勢，此次到美國國家衛生研究院進修，完成九十三株包氏不動桿菌臨床菌株的全基因體定序基因分型及毒力因子分析可謂是走在此研究領域的前端了。

綜合在加拿大及美國進修的學習成果，我下一步將針對這幾個和病人預後相關性最強的毒力相關基因做後續的研究，首先，會將帶有這幾個目標基因的包氏不動桿菌臨床菌株做基因剔除(gene knockout)及基因補回(gene complement)，然後運用在加拿大國家研究院學習到的小鼠不動桿菌肺炎感染(鼻腔內投菌)的動物模式平台及我們自己的小鼠不動桿菌肺炎感染(氣管內投菌)動物模式，去比較原臨床菌株、毒力相關基因剔除株及基因補回株的毒力如何。確定那些目標基因真的影響包氏不動桿菌的毒力後，我們可將這些基因的蛋白質產物打到兔子等實驗動物體內以產生抗體，再重新運用小鼠不動桿菌肺炎感染(鼻腔內投菌及氣管內投菌)的動物模式，去驗證某毒力相關基因抗體的有效性，若此抗體保護小鼠的效果佳，未來可做為包氏不動桿菌疫苗的組成成分。

三、心得

關於小鼠不動桿菌肺炎(鼻腔內投菌)的動物模式平台，若非直接到陳王學教授實驗室學習，單靠自己摸索，恐怕無法快速有效率地掌握這些訣竅，這也是出國進修才能獲得的寶貴經驗。因為陳王學教授建立的這個小鼠不動桿菌肺炎(鼻腔內投菌)的動物模式平台十分穩健，許多美國研究包氏不動桿菌的學者及醫師紛紛與陳教授合作，委託陳教授進行包氏不動桿菌毒力及引發宿主免疫反應相關的研究，成果斐然，也因此因緣際會我們得以從陳教授的實驗室獲得一株在美國洛杉磯市造成群突發，多名病患死亡，毒力極高的包氏不動桿菌臨床菌株，未來將在我方進行進一步的小鼠不動桿菌肺炎(氣管內投菌及鼻腔內投菌)動物模式研究，與台灣其他包氏不動桿菌臨床菌株作一比較。除了和美國所有研究包氏不動桿菌的學者皆有互動，陳教授亦與中央研究院生化所吳世雄教授及中國大陸學界保持良好的合作關係，陳教授與國際間廣泛的合作模式亦是我學習的榜樣。

在美國國家衛生研究院進修過程中，跟著 **Bioinformatics** 的專家 **Kory R. Johnson** 博士學習全基因體定序分析，發現到雖然全基因體定序分析屬於 **dry lab**，但若是能靈活運用全基因體定序分析，對於許多我們研究微生物的學者亟需了解的資訊可獲得一個解答，包括更為精準的微生物基因分型、毒力相關基因的資訊等等，過去因為全基因體定序的費用昂貴，臨床菌株的數量又多，研究學者往往無法負擔大批臨床菌株全基因體定序的費用，但近年來隨

著全基因體定序儀器的普及化，全基因體定序儀器的價格下降，大批臨床菌株全基因體定序已不再是遙不可及的夢想，但是更重要的是，完成全基因體定序後，對這些資訊的進一步分析。將全基因體定序轉化成為對學者有用的資訊，仰賴我們醫師與 **Bioinformatics** 的專家之間良善的溝通與合作，未來我將與 **Kory** 博士繼續保持良好的互動關係，將這些全基因體定序資訊做最有效的發揮，並期待未來有新的研究主題再次共同合作。

感謝醫院給我這個機會，此次出國進修有幸至加拿大及美國最高的研究機構加拿大國家研究院及美國國家衛生研究院進修，得以將兩者做一比較。加拿大國家研究院的現況是，由於國家政策的關係，主要重心都轉向 **industry**，所以做純基礎研究，若沒有 **collaboration**，是不可能向國家拿到經費的。令人驚訝的是，其實加拿大國家研究院近五年來人員只出（退休、離職、解雇）不進，目前沒有一位員工待在這裡少於五年！想當然爾，員工的衝勁也不會太強，不過好處是員工素質當然是大部分都在水準之上（經過時間的汰換及訓練），並且他們也都已經有 **well organized protocols**，所以實驗都是蠻順利在進行。這樣極度偏向產業化的情形下，興趣導向的科學性研究生存空間便被極度壓縮了，也是一種悲哀。至於美國國家衛生研究院則是整體經費較為充裕的研究機構，硬體設備及軟體都很齊全且還在增設新的硬軟體設備中，各個實驗室主持人也能有足夠經費從事基礎及臨床研究，對於來自各國的訪問學者和學生來說，不但可觀摩到新的科學技術，還有各式定期課程可參與

學習，是難能可貴的學習場所。

與加拿大國家研究院相形之下，我覺得在台灣我們還是非常幸運的！

因為以目前台灣的現況來看，還不至於完全以 **industry** 為導向，我們尚能做自己有興趣的研究主題！看看別人，再看看自己，有許多要學習的，也有許多要感恩的。

四、建議事項

感謝此次醫院給予我機會至加拿大國家研究院及美國國家衛生研究院進修，使我所帶領的包氏不動桿菌研究團隊向國際學界伸出觸角。我認為就某些研究技術的部份，若是已有相關基本實驗能力者，可考慮用短期進修的方式(一至三個月)使院內同仁出國學習實驗室技術。至於像全基因體定序分析這種需要昂貴軟體，或是需要大型貴重儀器的實驗，而本院短期內尚無足夠經費可購置此軟體或儀器的情形下，我們在國外學習後，和國外專家建立起良好的溝通管道，未來可將資訊或實驗材料寄到國外委託國外專家代為分析，當然若我方有對方所欠缺的技術，也歡迎對方將資訊或實驗材料寄到台灣，我方代為分析研究，如此一來一往，不但提升彼此專業領域研究的水準、深度和廣度，更重要的是建立和國際學界良好的互動關係，未來更有機會完成國際性高水準的醫學研究。

美國國家衛生研究院是隸屬於美國聯邦政府的國家級研究機構，美國國家衛生研究院有自己的臨床醫院(Clinical Center)，有病房可收治進行臨床試驗的病人，也有門診可讓病人做抽血檢驗、心電圖等等的檢查，而我的辦公室就在 Clinical Center 內，許多美國國家衛生研究院的活動也是在 Clinical Center 舉行。Clinical Center 每日熙熙攘攘的人群穿梭，藝術走道懸掛著各式油畫，大廳常有音樂現場演奏，其實和榮總很相似，一樓的大講堂常常舉行專題演講，多是當領域的大師發表精采演說，除此之外，美國國家衛生研究

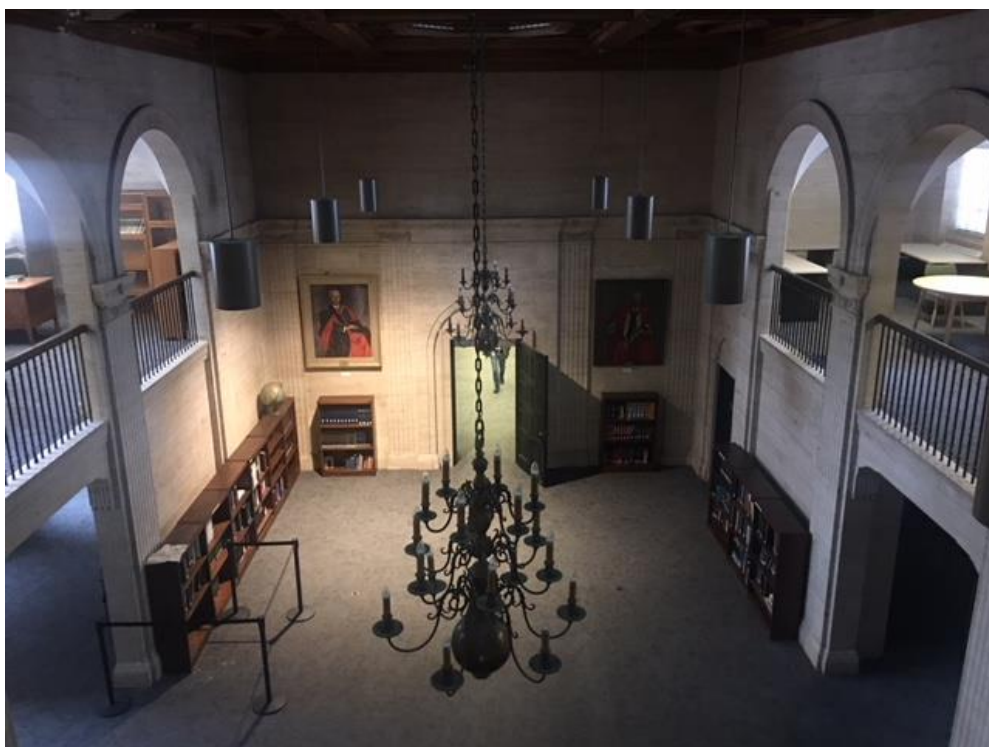
院還定期舉辦許多課程，如分子生物學、微生物學等等基礎課程，以季為單位，參訪的研究學者及學生經指導教授同意皆可報名參加。我認為美國國家衛生研究院對於有志出國進修的同仁來說是非常好的進修機構，可以見識到許多醫學研究界的最新技術及目前所進行的臨床試驗，和國際接軌，同時又可以學習基礎課程。

在美國國家衛生研究院除了可觀摩臨床試驗及參加各式演講及課程外，我觀察到兩件事是與我們榮總有些不同的。第一點，所有的行政事項都有網路系統管理，更重要的是有使用者的回饋，例如，我打電話向資訊室申請幫我的筆記型電腦連線到辦公室的公用印表機以方便掃描文件及列印，資訊室的工程師會把這個任務鍵入行政事務的網路系統，當工程師到我辦公室完成幫我的筆記型電腦連線到辦公室的公用印表機的任務後會在系統中鍵入完成任務的時間，然後行政事務網路系統會發 e-mail 給我詢問對此任務的滿意度(勾選 1-5 分)及回饋意見。第二點，美國國家衛生研究院十分重視員工的家庭生活，每個月都有一天是「帶孩子上班日」，員工可帶著自己的小孩來上班，另外不定期舉辦「消防日」「安全福利日」等等活動，員工皆可攜家帶眷參加。我認為以上兩點都是我們醫院可以借鏡之處。

附錄



加拿大國家研究院外觀



古色古香的加拿大國家研究院圖書館



加拿大國家研究院實驗室一隅



於加拿大國家研究院演講我的研究後與陳王學教授合照



美國國家衛生研究院 Clinical Center 大廳



美國國家衛生研究院 FAES 會定期舉辦各種課程



美國國家衛生研究院神經異常暨中風研究中心(National Institute of Neurological Disorders and Stroke; NINDS)中庭