

出國報告（出國類別：進修）

## 分枝桿菌實驗室的最新發展趨勢

服務機關：衛生福利部桃園醫院胸腔科

姓名職稱：林倬睿 胸腔科醫師

派赴國家：美國

出國期間：108-07-08 至 108-08-16

報告日期：108-11-05

## 摘要

台灣近幾年在結核病防治上的努力成效卓著，我國的結核病發生率已經顯著下降。隨之而來的，就是臨床上來自非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacterium, NTM)的挑戰更為顯著，不止發生率增加，診斷與治療上的困難也是臨床醫師頭痛的課題。

近幾年來，世界各地都注意到這個現象，也開始嘗試透過大規模的病人註記系統(patient registry)來了解這個疾病;尤其是NTM與支氣管擴張之間的關連和病程表現。NTM的治療雖然和美國胸腔醫學會(American Thoracic Society, ATS)於2007年所推出的診治指引差異不大，但在診斷上這幾年卻有許多進步;不論是發現新的NTM種類或是利用分子生物做更進一步的鑑定，都讓醫界增加了對於NTM的認識。

2015至National Jewish Health(NJH)進修後，陸續將呼吸道清除治療及肺部復原治療導入臨床照護，但對於NTM的正確鑑定一直是臨床上一大障礙，期待能利用再次回到全美數一數二的NTM治療機構，學習未來鑑定NTM的新趨勢。

# 目次

摘要.....	1
本文	
一、目的 .....	3
二、過程 .....	3
三、心得 .....	3
四、建議事項 .....	7

## 本文

### 一、 目的：

筆者曾於 2015 年至 National Jewish Health (NJH) 參訪六週，對於 NJH 在治療 NTM 的發展與投入-尤其是團隊照護的模式-留下深刻印象;因此在回國後透過參訪台灣其他醫學中心的臨床照護模式，於桃園醫院協助成立肺部復原中心，開始提供慢性呼吸道疾病的病患更完善的呼吸道照護，得到許多病人正面的回饋。但呼吸道的清潔-不論是否涉及 NTM 的感染-只是這類病患最基本的臨床照護，若談到 NTM 的治療，最先面臨的困境就是如何得到正確的細菌學診斷，包括菌株的鑑定和抗藥性的判定。此次再度前往 NJH，透過再次參訪全美第一的呼吸道醫院，深入了解 NTM 目前的治療準則及實驗室最新發展的資訊，以期能對提升台灣目前針對 NTM 的治療及診斷盡一分心力。

### 二、 過程：

1. 出發：搭乘加拿大航空公司 ACI8 號班機於 108-07-01 下午 15:55 出發至溫哥華機廠轉機，搭乘加拿大航空 AC8108 號班機於 108-07-01 晚上 18:30 抵達美國丹佛國際機場，同日晚上抵達旅館。
2. 進修內容：加入 National Jewish Health (NJH) 分枝桿菌與呼吸道感染部門(division of mycobacterial and respiratory infections)日間病房的工作，透過照顧從全美各地轉診至此醫院的分枝桿菌感染症病人，了解目前美國各大實驗室鑑定分枝桿菌的水準現況，並至 NJH 的分枝桿菌實驗室參訪，透過實地了解並與實驗室主持人討論，學習分枝桿菌鑑定的挑戰與未來趨勢。
3. 返台：108-08-24 早上 07:00 自美國丹佛國際機場搭乘加拿大航空 AC8107 號班機飛至溫哥華機場，轉機搭乘加拿大航空公司 ACI7 班機於 108-08-25 日下午 14:15 返抵國門結束行程。

### 三、 心得：

NTM 實驗室診斷的發展史：

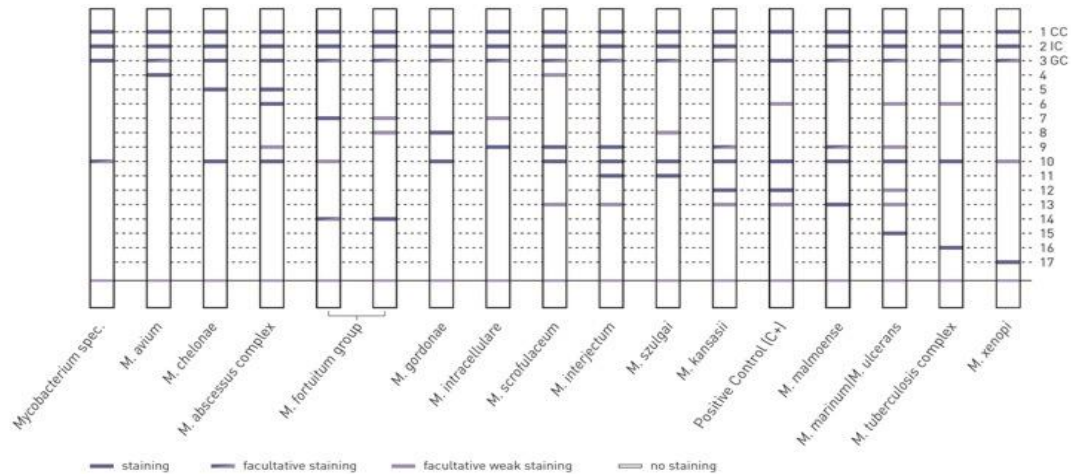
- 大約在 1990 年代前，大部分的實驗室在診斷鑑定 NTM 靠的是菌株培養的表現型 (phenotypic culture, 包括生長速度，是否產色，菌落型態等), 或者靠高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 藉由分析分枝桿菌細胞壁的成分來達到菌株鑑定。前者需要花費時間等菌株培養出來，後者則是對於鑑定相似的分枝桿菌或快速生長的分枝桿菌間定力不夠，大大侷限了臨床的運用。
- 近 20-30 年來快速發展的主要是透過聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 或基因定序 (gene sequencing) 來鑑定分枝桿菌，尤其後者已成為現在分枝桿菌鑑定的參考方法。也因為這些方法學的進步，近年來增加了許多新的分枝桿菌菌株或亞種的發現。可惜的是，分子生物檢驗方法雖徹底改變我們對分枝桿菌的認識及看法，這樣的技術和設備卻是大部分的一般臨床實驗室無法有能力建置的。再者，要能正確鑑定出菌種需要先建立正確的分枝桿菌資料庫，而分枝桿菌的基因型別有其地域性的不同，這也大大增加了將這類技術快速推廣普及化的難度。
- 透過實驗室診斷技術的進步，我們了解了分枝桿菌有先天產生抗藥性的能力，而且有些重要的抗藥性並不能透過傳統的最小抑菌濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 被檢測出來，而辨認並克服這樣的先天抗藥性會是將來實驗室發展的主要目標。

NJH 目前採用的分子生物鑑定方法：

- Line probe assays (GenoType Mycobacterium CM/AS):  
此項技術主要利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 將固態或液態培養得到的菌株再利用不同的探頭 (probe) 放大特定的基因片段 (在此主要是分枝桿菌的 23SrRNA 基因)，透過反轉核酸雜合 (reverse hybridization) 呈現出不同的條狀色帶，藉此辨認出不同的菌種 (如圖一)。此方法的極限在於它雖能針對常見 NTM 菌株提供正確的診斷，但對於某些類似的菌

株（例如 *M. intracellulare* / *M. chimaera*, *M. marinum* / *M. ulcerans* 等）則無法鑑別。不過，重要的一個優點是，這個方法目前尚未被報告有誤判結核病為 NTM 的情況發生。

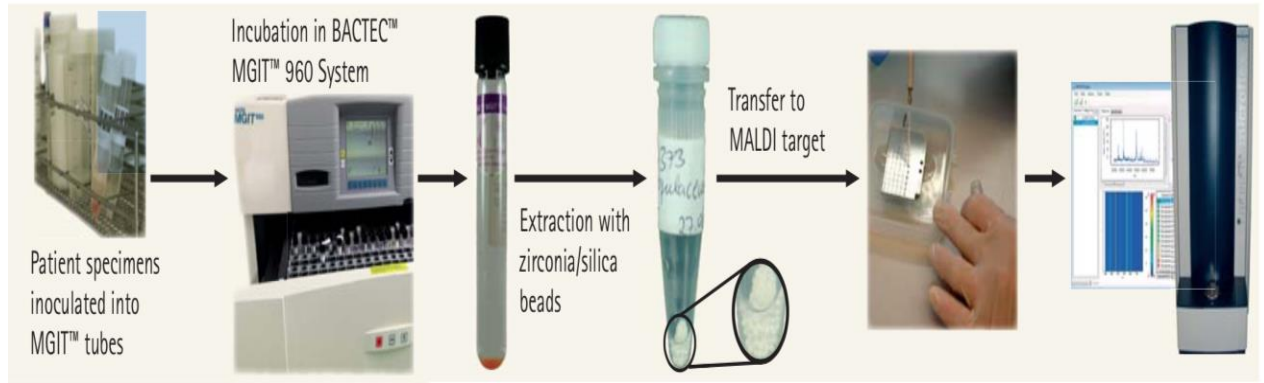
值得一提的是，這個方法也是目前國內疾管署研檢中心用來診斷並確認抗藥結核的主要分子生物的方法。



(圖一) line probe assays 對常見分枝桿菌的判讀結果參考。

- MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) 質譜儀：

主要原理為將培養所得菌株與試劑（基質）混合於盤狀構造上，以鐳射光激發菌株形成氣相之離子，透過偵測此氣相離子之質量與電子比將其轉換為圖譜呈現，利用相同物種圖譜內容一致的特性，將樣本圖譜與已知圖譜比對完成微生物菌株鑑定（圖二）。此方法的優點為速度快而且準確性高，雖然儀器本身較為昂貴，但單次檢驗成本卻是大幅降低，已被廣泛運用於一般細菌的鑑定，現在也刻意提供分枝桿菌的鑑定。

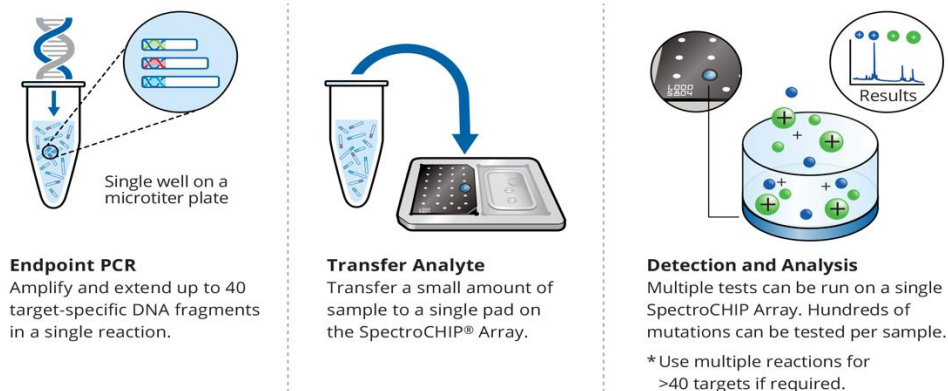


(圖二) MALDI-TOF 用來鑑定 NTM 的工作流程圖

- The MassARRAY® system by Agena Bioscience:

這個系統主要是利用了 PCR 大量複製核酸片段的能力合併 MALDI-TOF 的快速精確，來提供新的實驗室診斷方式（圖三）。這類方法目前台灣最常被運用的臨床情況是癌細胞的液態生物檢體（liquid biopsy）。利用已經設計好的增幅子 (amplicon)，放大所偵測目標 DNA 續列的突變，然後利用質譜儀快速鑑定突變基因的有無。但若是利用在分枝桿菌的鑑定上則還有一些困難要突破；因為這不是全基因序列的鑑定，只是片斷序列的資訊，如果要正確鑑定出菌種，必須要有足夠完整的資料庫，才能做出正確的推斷，再加上 NTM 的基因變化有著區域性的不同，必須要經過完整的測試才能真正運用到臨床 NTM 的鑑定（圖四）。

### Sample Process Journey



(圖三) MassARRAY system 的原理



(圖四) MassARRAY system 的工作時間表

值得注意的是，在菌株鑑定方面，即使有上述這些新穎快速的檢驗方式，NJH 的實驗室還有其他更詳細但相對較耗時也昂貴的基因序列的分析，包括 16S gene sequencing 及 whole genome sequencing(WGS)，目的是為了截長補短，參考各項檢驗方式的優缺點以設計完整的流程，除了確保不會遺漏或誤判任何的結核分枝桿菌之外，也能隨時更新且提高對於新的分枝桿菌菌株或亞種的鑑定度。此外，這個實驗室也保留了傳統的以培養皿為主的固態培養及藥物敏感測試，以提供與分子生物檢驗方法結果的交叉比對，及更全面的臨床資料，包括每一次培養的菌落數 (colony count) 和其他常見呼吸道細菌的培養。尤其因為實驗室就位於分枝桿菌成人日間病房的同一棟大樓，地理位置上的相近更是大大提升實驗室與臨床醫護人員的聯繫和互動，培養了絕佳的團隊默契。

#### 四、建議事項：

- 增加實驗室與臨床端的互動

針對肺部慢性感染症的診斷與治療，尤其是關於結核病或非結核分枝桿菌的鑑定，臨床醫師其實非常需要仰賴實驗室的幫助。問題是臨床醫師往往不熟悉實驗室的最新進展，實驗室則常常未被告知這些結果的臨床意義與衝擊。如果能夠保持密切且良性的互動，彼此之間一定更能理解對方所面臨的挑戰和自己所能提供的協助及扮演的角色。長期下來，才能藉著分享臨床經驗打造出專業的團隊。



- 跨團隊的臨床合作

除了實驗室之外，在面對分枝桿菌的治療上，更是需要許多臨床科室的協助；例如外科醫師的手術協助，營養師的諮詢衛教，藥師針對藥物副作用的監測與建議，及呼吸治療師的評估教育等。這些團隊的成員需要時常一起討論合作，才能在站在同一個基準點往同一個方向繼續為病人努力。

- 跨院際的合作

在健保的體制下，每個醫院都有其規模與經費上的限制。若是要提供分枝桿菌感染病患更完整的服務與照護，實在不太可能只靠一個醫院就能獨立包辦所有實驗室的設置並建立完整的臨床團隊。值得高興的是，近幾年來不只世界上許多地方開始重視分枝桿菌及支氣管擴張的疾病負擔，台灣也在今年在台灣胸腔暨重症學會及結核病醫學會的支持下，開始成立分支桿菌工作小組，舉辦臨床研討會及講座，期待透過集中大家的力量，能夠為台灣的這一群病人提供更完善的照護。