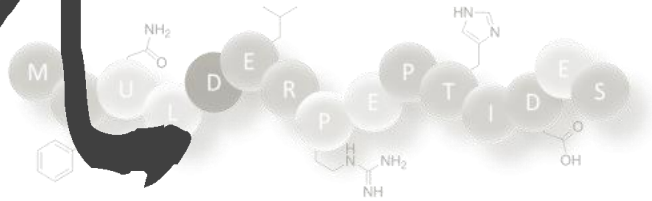


雙北



檢驗醫學雜誌

Greater Taipei Journal of Laboratory Medicine

雙北

ISSN 2313-3015

台北市醫檢師公會 | 新北市醫檢師公會

雙北檢驗醫學雜誌 Greater Taipei Journal of Laboratory

宗旨

雙北檢驗醫學雜誌主要報導檢驗醫學相關的學術刊物,包含原著,綜說,臨床案例報告,檢驗新知,檢驗技術及實驗室管理等,提供檢驗醫學相關之學術交流平台

發行人 劉兆偉 | 廖皓宏

主編 彭成立

副主編 高全良 湯惠斐

編輯委員 洪經勝 顏瓊姿

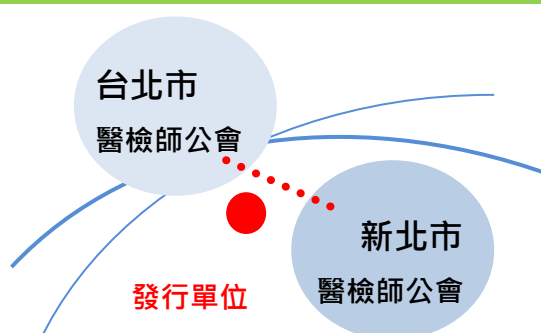
林重昌 余芳蘭

執行編輯 陳瑞川 楊美娥 謝芷霖

編審委員

朱益民 呂旭峰 李詩益
林亮音 林淑華 施勇綸
胡忠怡 張錦標 湯勝輝
楊雅倩 鄧麗珍 洪忠志
何祥齡 林榮俊

改版創刊發行日期 2014 年 3 月 30 日



ISSN 2313-3015



97 年 6 月	創刊號	醫檢會刊	月刊
100 年 1 月	名稱改版	醫檢學術會刊	月刊
101 年 1 月	出刊改版	醫檢學術會刊	雙月刊
103 年 3 月	名稱改版	雙北檢驗醫學雜誌	雙月刊

聯絡處 台北市中正區羅斯福路二段 70 號 6 樓之 2

聯絡電話 TEL : 02-2322-5455/FAX : 02-2322-4530

雜誌網址 <http://www.mt.org.tw/taipeicity/periodical.php>

聯絡方式 taipeimt@ms31.hinet.net

目 錄

醫檢學術專題

題目	第一作者	頁次
■改善檢驗流程提昇醫病照護安全與降低實驗室成本	劉秋菁	4
■CellaVision DM96 和 Beckman Coulter DxH 800 與手工計數法針對白血球低下分型之比較	何羿嫻	10
■找尋適當的引子(primer)以偵測侵入性麴菌症(Invasive Aspergillosis)感染	張富傑	17
■探討不同引子於偵測肺炎黴漿菌(<i>Mycoplasma pneumoniae</i>)的臨床應用	張富傑	21

附錄

■「雙北檢驗醫學雜誌」投稿須知	編輯部	26
-----------------	-----	----

改善檢驗流程提昇醫病照護安全與降低實驗室成本

Improving laboratory workflow to promote medical care safety and reduce laboratory costs

劉秋菁、黃俊凱、盧錫潤、何羿嫻、洪經勝

Liu Chiu-Ching; Huang Chun-Kai; Lu His-Jui; Ho Yi-Hsien; Hung Ching-Sheng

臺北市立萬芳醫院-委託財團法人臺北醫學大學辦理 醫學檢驗科

Department of Laboratory Medicine, Taipei Municipal Wanfang Hospital managed by Taipei Medical University.

摘要

如何改善檢驗流程在兼顧病人安全與品質，又能降低實驗室成本，提昇醫病照護安全，是醫院病安及經營管控追求的目標。除了原舊有硬體及軟體設備外，持續改善問題，以縮短整體服務流程及時間、提昇病患滿意度、減少成本負擔及增加收益。自 107 年 11 月起設立目標加入資訊改善問題，進行條件式抽血自動備管系統併管併單、檢驗單免貼病患資訊 Barcode 貼紙、推行安全針具及單拋 Holder，以期縮短抽血服務時間、減少試管用量、抽血量與貼紙用量；推行安全針具後針扎事件降低，整體流程的改變，更能減少人員在整個流程動線操作重複步驟，無形中讓同仁減少實驗室中動線路程，減少工作負荷量。簡化就醫流程，提供病人安全的醫療照護，有賴實驗室的不斷持續改善。

關鍵詞：病人安全、檢驗流程、醫病照護、實驗室成本、針扎

前言

提供以病人為中心的卓越全人醫療健康照護之服務，有效監督及提升醫療服務品質與病人安全，促進醫學檢驗第一線服務品質的提昇，有效營造醫療照護品質及病人安全，減少醫療糾紛，在檢驗科門診病患採檢等候時間等問題，幾乎是各醫院一直以來存在的課題，為了如何縮短等候採檢時間及有效的管控成本，又能達到良好的醫病照護，進行本研究之改善方案。抽血是侵入性檢查，往往久候又加上空腹過久飢餓難耐，很容易會有負面情緒。根據衛福部的統計，台灣近 5 年進入醫審會鑑定的醫療糾紛，每年都有大約 5 百件左右[1]，顯示台灣醫病關係緊繃，加上社會

人口走向高齡化，怎麼做好醫病照護及建立良好的醫病關係，讓醫院永續經營，提昇醫療品質及病人安全是我們需要努力的目標。

由於生活水平的提升，病人對健康照護及醫療服務品質的期望與要求愈來愈高，服務品質與滿意度的提升是衡量醫院的指標，也是就醫選擇考量的因素，醫療服務品質早期狹義來說係指病人只注重醫師或醫事人員的技術及專業能力，現今則廣義涵蓋以顧客為導向的服務，唯有實施顧客滿意經營，以病患的滿意度為依歸，抽血櫃台是面對病人最直接的服務，也是病人對醫院服務品質重要的觀感之一，研究發現醫院抽血服務有良好的環境設施，

通訊作者：洪經勝

連絡電話：02-29307930#2585

電子郵件：oryx@w.tmu.edu.tw

連絡地址：台北市文山區興隆路三段 111 號 1 樓醫學檢驗科

民國 108 年 03 月 05 日受理；民國 109 年 03 月 16 日接受刊登

能吸引病人踴躍抽血檢查，並信任檢查結果的準確性[2]。

但因高齡化就醫人口增加、檢驗業務量增加、人員異動頻繁、增加兩年 PGY 訓練教學工作、二次健保核刪以及大環境經營困難問題下，本院已在 104 年 5 月完成實驗室內部軌道自動化、一線服務抽血櫃台改建(升降桌面方便長者、輪椅者及行動不便的患者)、輸送帶傳送抽血檢體、人工智慧抽血報到系統改良等措施。但後續如何再簡化抽血流程、縮短病患等候抽血時間、減少實驗室流程、提昇病人及醫護人員安全、進而降低成本、增進醫病關係等議題為持續改善之重點。為了能達到改善現況分析中的問題，縮短整體抽血流程時間、簡化實驗室自動化操作、病人安全、病患滿意度、降低實驗室成本及錯誤率等[3,4]，本院自 107 年 11 月起，利用資訊系統改善抽血自動備管系統，進行併管併單、免除抽血檢驗單上貼 Barcode 貼紙、降低試管用量、病患抽血量、以及貼紙用量成本，達到縮短時效性，降低等待抽血時間。同時，啟用安全針具降低針扎事件，簡化實驗室自動化流程，減少人員重複步驟，改善檢驗流程又兼顧病人安全與品質[5,6]，並能降低實驗室成本，也讓同仁減少在實驗室中走動之路程，減少工作負荷量。

材料與方法

在 104 年 5 月實驗室改建後，針對目標改善議題推行各項配合工作，整體持續改善排程時間，如圖 1。

先前改建雖有愛心櫃台，但標示及動線不夠明確，在 107 年 5 月在愛心抽血櫃台上加設明確圖文並茂及地上大型標示，讓 80 歲以上長者及行動不便者，一目了然，櫃位寬敞且具備升降桌面，動線規劃有專門出入口，寬敞通道方便通行，提升病人安全，如圖 2A。

智慧化人工報到系統改良：舊系統僅接受用檢驗單掃描報到，常造成民眾操作

步驟順序錯誤、未刷到條碼、報到未成功等問題，尤其在年長者操作上更是困難，107 年 10 月 20 日起改為可使用插健保卡報到系統，省去舊系統須掃描檢驗單等待時間，利用健保卡自動辨識區別 80 歲(含)以上長者，方便民眾操作，並能將該次檢驗需領取容器者一併給號，減少民眾再度重複操作步驟及縮短時間(圖 2B)。

抽血自動備管系統併管併單：一般件檢驗共通紅頭管或綠頭管檢體(無抗凝劑、sodium citrate 試管)，例如緊急生化與一般生化共用、生化一般件及生化免疫檢體，減少病人抽血量，並降低試管使用量。

系統改善：簡化抽血檢驗單上貼 Barcode 貼紙，以備管系統上試管 Barcode 為主，科內發報告系統可用檢驗單號連結查詢病患相關資訊，縮短抽血服務時間，提升整體抽血操作時效。

併管併單的單一管軌道化操作，減少重複步驟時間：流程簡化單一檢體自動化軌道直接上機操作，免除分裝分管步驟，改善檢驗流程，減少實驗室工作人員重複動線奔走，縮短檢體簽收後至上機操作時間，後續進入軌道冰箱儲存，日後方便尋找檢體及補單加驗項目。

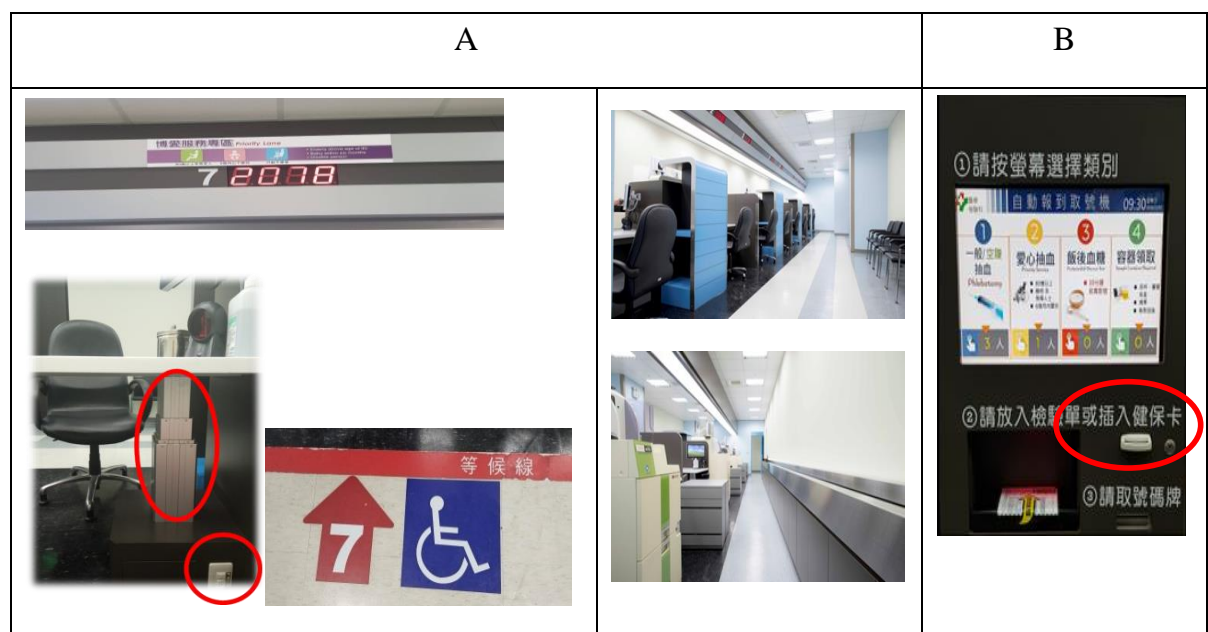
安全針具及拋棄式持針器(英文叫做 HOLDER)推行使用：減少醫護人員因工作中所造成的針扎問題，拋棄式 HOLDER 也降低因抽出時，試管血濺出在 HOLDER 上的生物汙染，自 107 年全院使用安全針具，一線抽血人員全面換用，期間配合人員教育及使用，讓針扎次數降至 0，推行醫院政策也降低醫護人員針扎風險。

結果

門診抽血滿意度調查：統計自 104 年至 107 年度門診抽血滿意度，發現到院抽血民眾對於檢驗科的環境(動線)、自動報到系統、報到取號流程、抽血等候時間、獲知報告結果的速度皆一致性提昇，尤其在抽血等候時間滿意度提昇 26% (表 1)。

	104年/5月	105年	106年	107/01	107/02	107/03	107/04	107/05	107/06	107/07	107/08	107/09	107/10	107/11	107/12	108/01	108/02	108/03	108/04
抽血櫃台重新整建流程、自動備管																			
持續每年抽血安全教育																			
推廣使用安全針具																			
全面安全針具																			
推廣拋棄式HOLD																			
抽血改採用健保卡報到																			
併管併單(生化一般件與免疫併管)																			
簡化檢驗單貼Barcode貼紙																			

▲圖 1：改善排程



▲圖 2：(A)愛心抽血櫃台上加設標示、升降桌面、寬敞通道；(B)健保卡報到系統

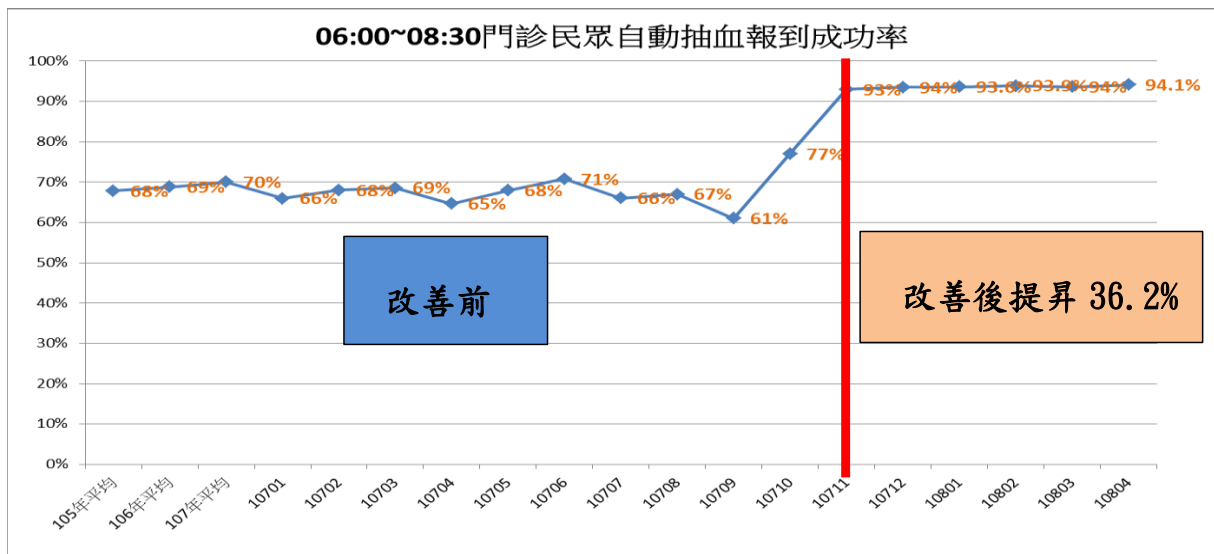
表 1 門診抽血滿意度調查

問卷題目	104 年(%)	105 年(%)	106 年(%)	107 年(%)
◆ 您覺得檢驗科的環境(動線)是否滿意?	86	87	85	90
◆ 您對使用自動報到系統抽取號碼是否滿意?	本年度無此題	86	89	93
◆ 您是否瞭解報到取號流程?	本年度無此題	是(92)	是(93)	是(98)
◆ 您對抽血等候時間是否滿意?	59	69	59	75
◆ 您對獲知報告結果的速度是否滿意?	87	89	85	94

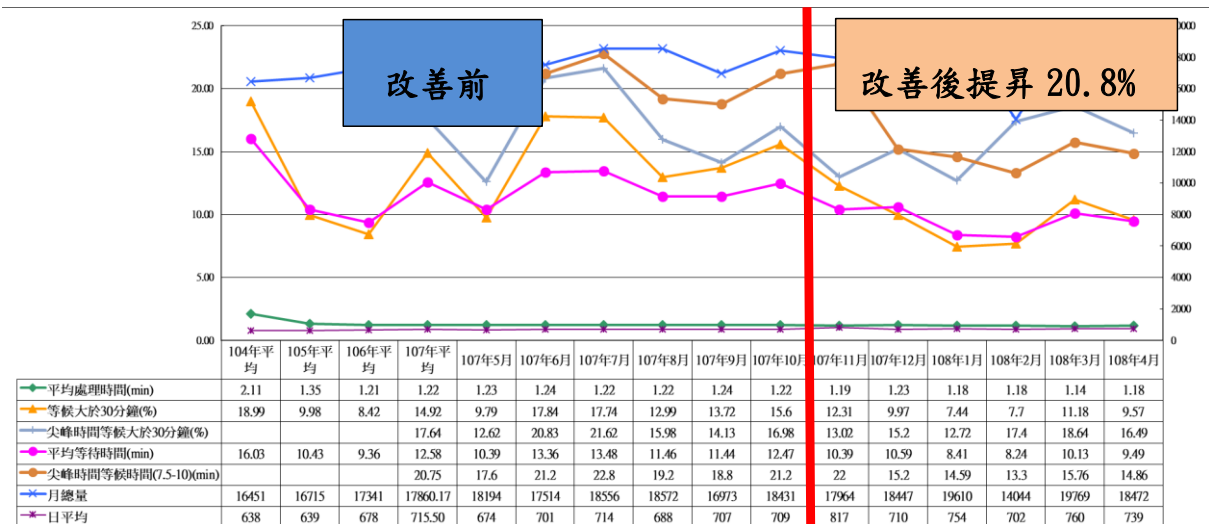
民眾報到成功率提昇：107 年 11 月後抽血報到系統改使用健保卡報到，自動辨識區別 80 歲(含)以上長者，方便民眾操作，省去刷檢驗單子報到時間，並能將該次檢驗需領取容器者一併給號，減少民眾再度重複操作步驟，增進病人正確辨識，避免人員疏失造成核對錯誤。自 106 年平均報到率 69%，提升至 94%約上升 36.2%，因民

眾報到率提高，相對於門診抽血病人辨識上能更有效率，如圖 3。

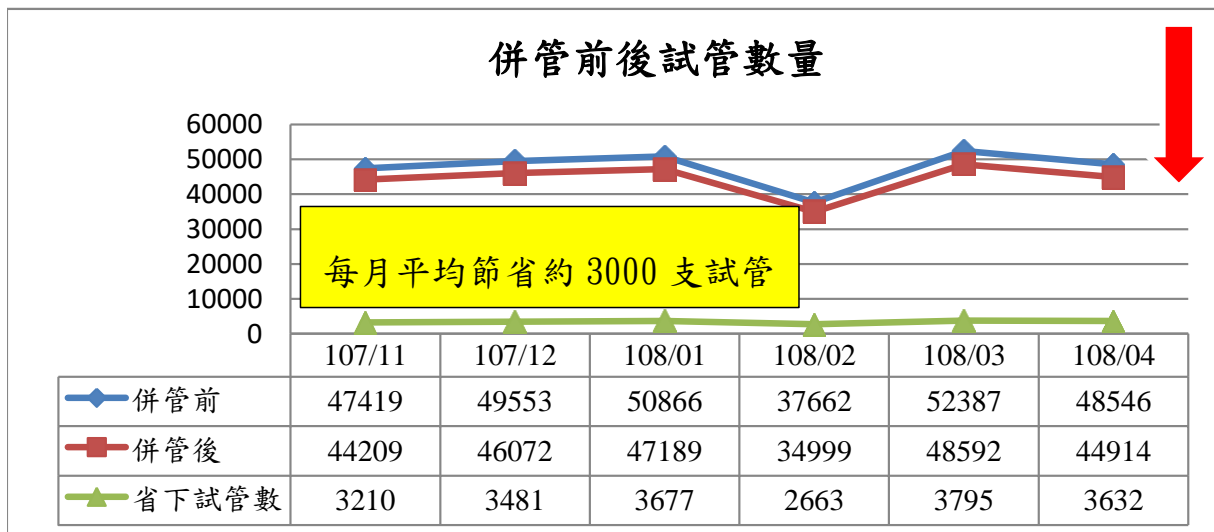
縮短抽血時間時效性：因執行併管併單及簡化抽血檢驗單免貼 Barcode 後，縮短處理抽血流程準備，統計 107 年 5 月至 108 年 4 月止，比較尖峰時間，早上 7:30 至 10:00 的等待時間，以改善前 107 年



▲圖 3：民眾報到成功率



▲圖 4：抽血時間時效性



▲圖 5：併管前後試管用量

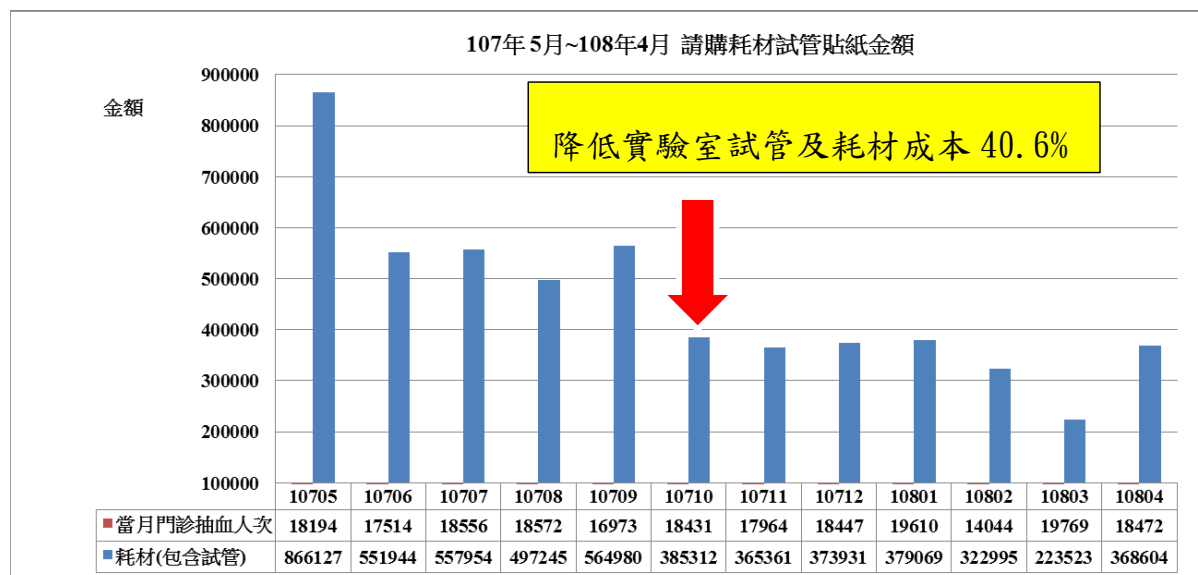
5月至10月平均尖峰等待時間：20.13分鐘、改善後107年11月至108年4月平均尖峰等待時間：15.95分鐘，縮短4.2分鐘、時效提昇20.8%，如圖4。

降低檢驗成本：以併管併單一般件檢驗共通紅頭管或綠頭管檢體，以試管上Barcode為主，省下檢驗單上貼Barcode試紙時間及用量。計算實施前半年107年5月至10月及實施後半年107年11月至108年4月，併管前後試管數量減少3千多支試管量(圖5)。計算實施前半年107年5月至10月及實施後半年107年11月至108年4月，平均每月量試管及耗材金

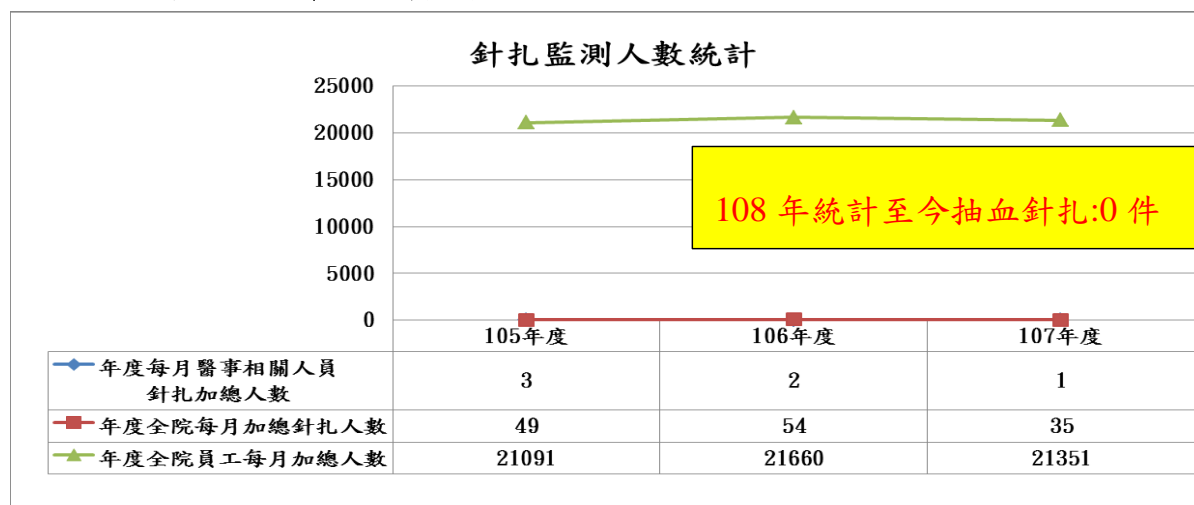
額，減少23萬多元約降低實驗室試管及耗材成本40.6%，如圖6。

討論

藉以改善抽血檢驗及實驗室自動化流程、提昇病人安全，在縮短抽血等待時間及得到病患信賴滿意度，能維持良好醫病關係、降低成本也是讓醫院永續經營，為了能讓病患就醫安心、流程操作簡化，各項標示圖文並茂，減少抽血量，無形中對於實驗室整體滿意度提昇，先前因規畫不健全而動線不良，導致工作人員重複工作路線，人為原因改善後無形中減少體力



▲圖6：試管用量及請購相關耗材金額



▲圖7：全院針扎人員比率

負荷，降低實驗室成本，也讓目前醫院在大環境經營困難下，能少些支出多些收入，而後更有能力規劃更多利於病患之服務。未來目標期望在高齡化社會致力友善醫療醫院，「病人安全」是醫療品質的根本，也是醫療照護提供者和病人之間最基本的共同目標。持續改善是我們需要一直進行的，在將來規劃無紙化作業，減少病患因檢驗單不見而需再重新花費時間補單，日後能以健保卡線上搜尋醫令自動給管，更能簡化就醫流程，安全目標是提供病人安全醫療照護的決心，也期待醫界先進與社會大眾齊心努力，共同致力於提昇國內醫療照護品質及建構安全醫療環境。

參考文獻

1. 台灣病人安全資訊網
(<http://www.patientsafety.mohw.gov.tw/>)
2. 王素真、洪耀釗。病患對醫院抽血技術與服務處滿意程度之調查，工程科技與教育學刊。第八卷；第一期；民國 100 年 3 月第 134~143 頁。
3. Diagnostic errors are the first reason of lawsuit in the U.S.A. IoM, 2009.
4. Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. Clin Chim Acta 2009; 404; 16-23.
5. Rana SV. No preanalytical errors in laboratory testing: a beneficial aspect for patients. Indian J Clin Biochem. 2012;27:319-21.
6. 何暄惠。利用六標準差管理提升醫院服務品質-以台北某地區教學醫院抽血檢驗流程為例。天主教輔仁大學國際經營管理碩士學位學程論文。2015 年出版。
(<https://hdl.handle.net/11296/ag74zp>)

CellaVision DM96 和 Beckman Coulter DxH 800 與手工計數法針對白血球

低下分型之比較

何昇嫻、洪經勝

臺北市立萬芳醫院-委託財團法人臺北醫學大學辦理 醫學檢驗科

摘要

白血球的計數與分型是許多疾病診斷的重要輔助工具，過去多以人工方式進行計數與分型，但其過程耗時又費力。近幾十年來，由於血液自動化分析儀器日新月異，使得血液常規檢查更為普及，然而自動化分析儀器並無法適用於所有的病人，特別像是白血球低下的病人，此時就須仰賴人工的方式進行計數與分型。因此在本篇研究中，我們自本院收集的 198 位白血球低下($< 4.0 \times 10^9/\mu\text{L}$)之病人血液抹片，並分別利用 Beckman Coulter DxH 800、CellaVision DM96 和人工方式進行白血球的分型比較。而其結果顯示，數位影像分析的 CellaVision DM96 和人工方式所計數分型的結果並沒有差異性，即便是在數量較少的 Basophil 也是如此。相較之下，雷射分析的 Beckman Coulter DxH 800 則與二者在 Monocyte 有所差異。因此，CellaVision DM96 將有潛力作為血液抹片的輔助工具。

關鍵詞：白血球低下、Beckman Coulter DxH 800、CellaVision DM96、人工計數分型

前言

血液中的細胞計數在臨床上已被廣泛接受與應用，當中也包含白血球(white blood cell)的分型與計數(WBC differential count)。白血球為免疫系統的一部分，正常情況下能幫助身體對抗外來造成疾病的微生物，但當白血球太少、太多或是分化不成熟對人體都會造成危險。正常人白血球可被分為五類，包括嗜中性球(Neutrophil)、嗜酸性球(Eosinophil)、嗜鹼性球(Basophil)、淋巴球(Lymphocyte)和單核球(Monocyte)，不同白血球的增減可能反應出人體不同的情況[1]。

白血球的分型與計數是臨床上最常

做的檢查之一，因其是在診斷各種血液疾病或是全身性疾病的重要輔助診斷的方式之一[2]。在過去，以人工的方式將白血球分類計數是需要經過長時間訓練的人員與分析的時間才有其準確性，特別是在當細胞數量很少的時候更是如此。近幾十年裡，自動化的血液分析儀器不斷日益精進，也可因應不同的需求來設定不同的參數，這使得常規檢查包含血球計數與分型等已經普遍應用於各個實驗室[3,4]。雖然自動化的分析方便，但常會因病人的不同情況，例如新生兒或是受到寄生蟲感染等，而造成當下的參數設定不合適進而造成結果的異常[5,6]。結果異常的檢體就會需

通訊作者：洪經勝

聯絡電話：(02) 2930-7930 ext.2585

電子郵件：oryx@w.tmu.edu.tw

聯絡地址：116 台北市文山區興隆路三段 111 號

民國 108 年 03 月 05 日受理；民國 109 年 03 月 16 日接受刊登

要人工的方式利用週邊血液抹片(Peripheral blood smear, PBS)再去分析是否有問題，這最終導致勞動力成本增加，這在實驗室中會是成本花費的主要問題之一。若是能有好的血球型態自動判讀系統來協助分析週邊血液抹片，將可提昇工作效率[7]。

CellaVision DM96 系統(CellaVision AB, Lund, Sweden)是作為分析週邊血液抹片的自動圖像分析系統而開發的。CellaVision DM96 細胞形態數位分析儀器是一個有活動接物鏡焦點的固定 XY 台直立式光學顯微鏡，具備一個電動操作 5 段位置接物鏡轉塔以及一個 100W 的鹵素燈照明系統。這個顯微鏡以電動方式操作，可在檢驗過程中全自動定位玻片及進行對焦。並具高品質漸近掃描 CCD 彩色攝影機，以利產生最大的影像品質和進行高速取像。過去已有幾篇研究指出在一般常規檢查當中 CellaVision DM96 和人工方式進行白血球分型的結果沒有太大的差異[8-14]。在時間方面，過去有研究指出 CellaVision DM96 比人工方式要節省時間(30 片血液抹片：CellaVision DM96 80 分鐘；人工 174 分鐘)[13]。但在針對異常的檢體特別像是白血球低下(leukopenia)卻是少有研究[15]。儘管 CellaVision DM96 可經由設定來計算超過 100 顆白血球(最多 300-500 顆)以達到更高的準確性，但在臨床上的比較卻是需有更多佐證；以及是否適用於台灣需要加以評估。因此，在本研究中，我們針對異常檢體中白血球低下的檢體分別進行原有的 Beckman Coulter DxH 800 自動血液分析儀、CellaVision DM96 和人工方式來進行白血球分型，以利能在白血球異常低下的檢體中來得到可靠的結果。

方法

分析儀器

使用測定的儀器為貝克曼庫爾特血液分析儀 Beckman Coulter DxH 800 自動

血液分析儀(Beckman-coulter, Brea, California)(衛署醫器輸字第 021536 號)處理檢體和 CellaVision DM96 細胞形態數位分析儀器。

檢體收集和週邊血液抹片製備與計數

檢體是從全靜脈血檢體收集在 K₃EDTA vacutainer 管(BD diagnostics Franklin Lakes, NJ USA)中。本院於 2017 年 04 月 03 日至 2017 年 05 月 10 日期間，經由 Beckman Coulter DxH 800 分析常規全血血球計數和分類計數(Complete blood count and differential count)後，收集了 198 位其白血球(white blood, WBC)計數結果 $< 4.0 \times 10^9/\mu\text{L}$ 歸類為低白血球數之病患。再利用 Beckman Coulter DxH 800 所製備的週邊血液抹片進行 Wright-Giemsa 染色，再由同一人藉由顯微鏡進行白血球手工分類計數(manual differential count)；同一個週邊血液抹片也利用 CellaVision DM96 進行白血球分類計數以利同步評估，每個血液抹片計算 200 顆白血球。

統計分析

利用 Microsoft Excel 2010 進行統計圖的製作以及 GraphPad Prism 6 進行 t test 統計分析其相關係數[Correlation coefficient (r)]和顯著水準(P value)。相關係數 1-0.8 高度相關；0.8-0.4 中度相關；0-0.4 低度相關。

結果

進行人工計數者為資深檢驗人員，並在過程中，我們也擷取了病患不同的白血球型態作為紀錄(圖 1)。在收集並分析完 198 位白血球低下病患的血液抹片後，利用軟體製圖並分析其統計上的意義(表 1 和圖 2-4)。在人工技術與 CellaVision DM96 方面，Neutrophil、Lymphocyte、Monocyte 和 Eosinophil 其相關係數都有 0.8 以上 (0.9704-0.8795)呈現著高度相關；而在 Basophil 則是數量較少所以呈現中度相關(0.5693)(圖 2E)。而在顯著水準方面，

表 1. 比較 Manual、CellaVision DM96 和 Beckman Coulter DxH 800 的相關係數和 *p* 值

	Manual vs. DM96		Manual vs. DxH 800		DxH 800 vs. DM96	
	Correlation coefficient (r)	<i>P value</i>	Correlation coefficient (r)	<i>P value</i>	Correlation coefficient (r)	<i>P value</i>
Neutrophil	0.9704	0.5836	0.9533	0.2695	0.9451	0.0999
Lymphocyte	0.9384	0.8329	0.9345	0.8446	0.9297	0.9772
Monocyte	0.9166	0.1109	0.8690	0.0366	0.8732	0.0003
Eosinophil	0.8795	0.8876	0.8849	0.7806	0.9225	0.9023
Basophil	0.5693	0.0980	0.1284	0.4889	0.1193	0.5933

表 2. CellaVision DM96 與 Manual 方法的時間比較

Staff	CellaVision DM96	Manual method
A	3	4.5
B	3.5	5.1
C	3.2	3.2
D	3.6	5.6
E	3.3	5.8
F	3.3	4.8
mean	3.3	4.8

這五種白血球在兩種計數方式下整體而言並沒有顯著的差異性，其 *P value* 值皆大於 0.05 (0.098-0.8876)。

而同樣的檢體我們也同時分別比較了手工計數與 Beckman Coulter DxH 800 和 Beckman Coulter DxH 800 與 CellaVision DM96 之間的相關係數與顯著水準，作為我們這次的比較結果的參考(表 1)。這兩組的比較結果也與人工技術與 CellaVision DM96 相似，Neutrophil、Lymphocyte、Monocyte 和 Eosinophil 其相關係數都有 0.8 以上 (0.9533-0.8690)，呈現著高度相關；而在 Basophil 也可能是因數量較少使得相關係數只有低度相關 (0.1283 和 0.1193) (圖 3E 和 4E)。而在顯著水準方面，這五種白血球在不同計數方式下，除了 Monocyte 在 Manual V.S. DxH 800 和 DxH 800 V.S. DM96 整體的 *P value* 值分別為 0.0366 和 0.0003 有顯著的差異性之外，其餘四種白血球的 *P value* 值皆大於 0.05 (0.0999-0.9772) 沒有顯著的差異性(表 1)。

除了準確性之外，我們也請不同檢驗人員進行血液抹片閱片將白血球分類並

與 CellaVision DM96 進行比較(表 2)。由結果可以看出，DM96 確實比大部分的檢驗人員要來的快，只有一位時間是相同的，而整體平均而言則是快了 1.5 分鐘。

討論

在現今的血液學檢查中，白血球的分類評估已是一項必要的項目，不同種類白血球的數量增減都可能象徵人體內不同的生理狀況，包含細菌或病毒的感染和寄生蟲感染等等。白血球的人工分類計數需要長期訓練有素的人員其結果才可信，此外人工計數也相當耗時，當中包含血液抹片的製作和染色等過程，而在白血球低下的檢體更是需要更多時間來分析。CellaVision DM96 系統是為血液抹片所開發的自動細胞分類系統，在系統擷取染色的細胞圖片後再與先前輸入的白血球分型資料庫進行比對來分類。而 Beckman Coulter DxH 800 系統的白血球數用電子阻抗法分析細胞的體積(Volume)、高頻電導性(Conductivity)和雷射散射(Scatter)這三種(簡稱 VCS)方式來將白血球進行計數

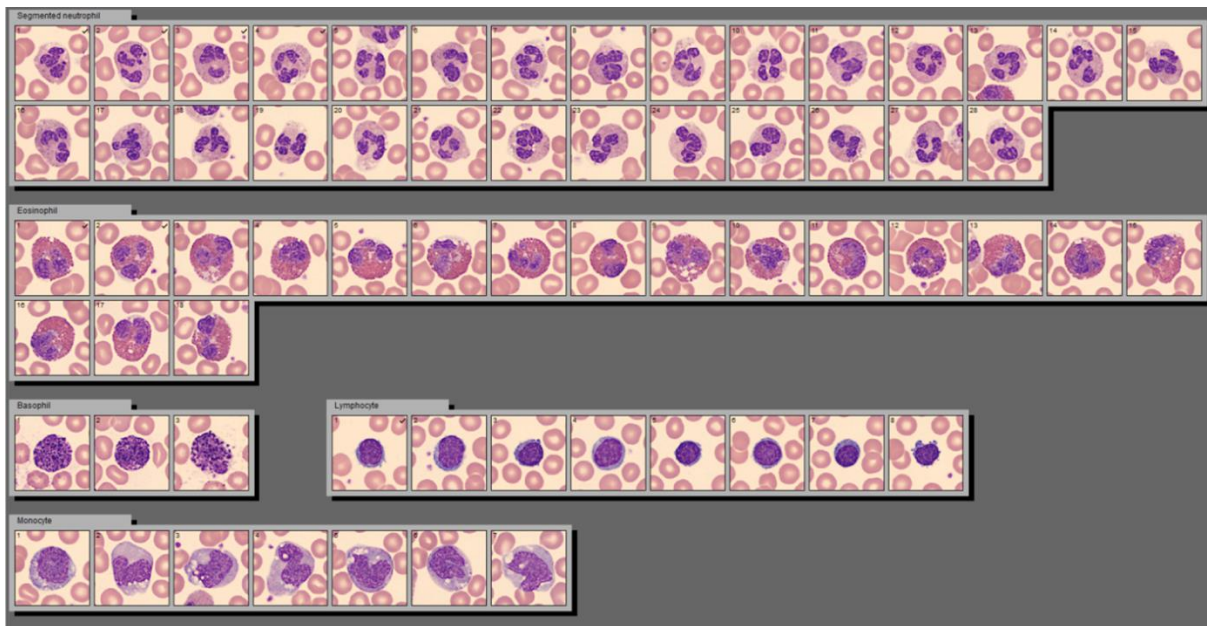


圖 1. 低白血球患者的白血球圖例

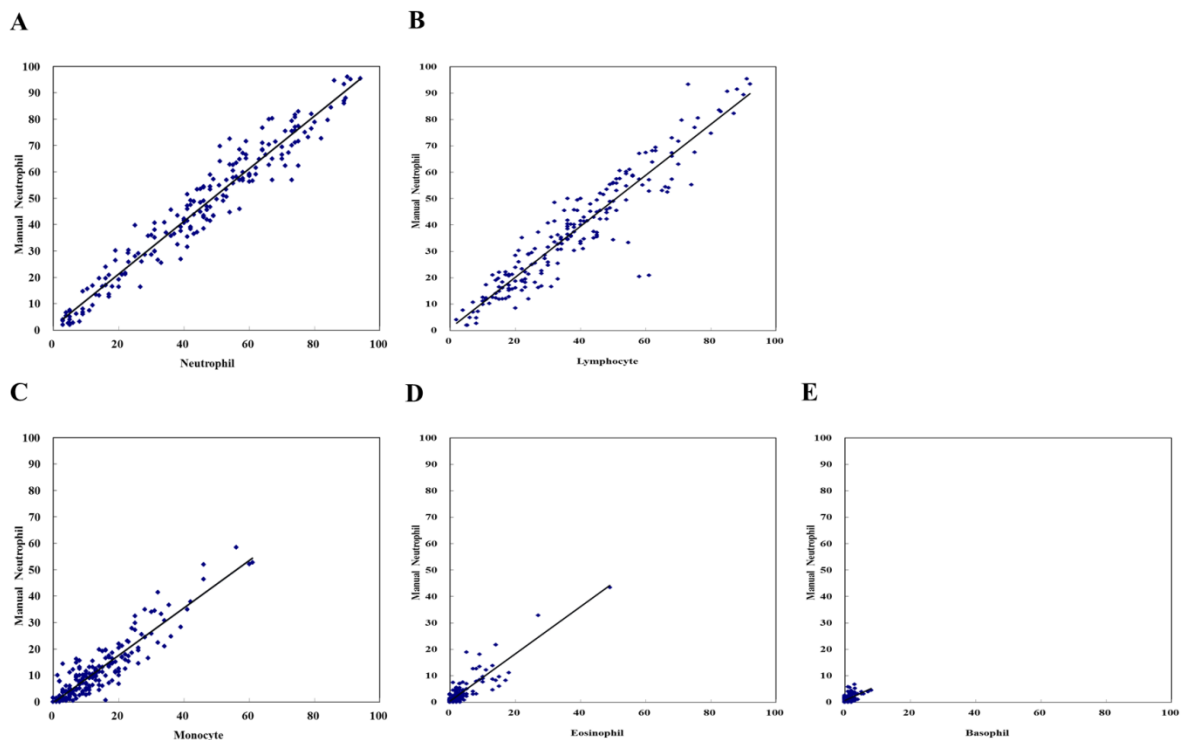


圖 2. 依據 CellaVision DM96 和 Manual 方法進行白血球差異計數之相關性分析。 A. Neutrophil. B. Lymphocyte. C. Monocyte. D. Eosinophil. E. Basophil.

與分類。在這三種分類計數下，由表 1 的結果顯示出 CellaVision DM96 vs. Manual 方式整體而言並沒有太大的差異性 (P value > 0.05)。而在相關係數方面只有

Basophil 是呈現中度相關。我們推測可能是和 Basophil 在一般人體內數量本來就不多 (0-1%)，因此容易造成相關性比較低，在過去也有研究得到類似的結果[16]。若

是要更加準確地確認 CellaVision DM96 和人工分類的相關性，後續可收集 Basophil

升高，例如慢性骨髓性白血病(Chronic Myelogenous Leukemia, CML)、水痘或是

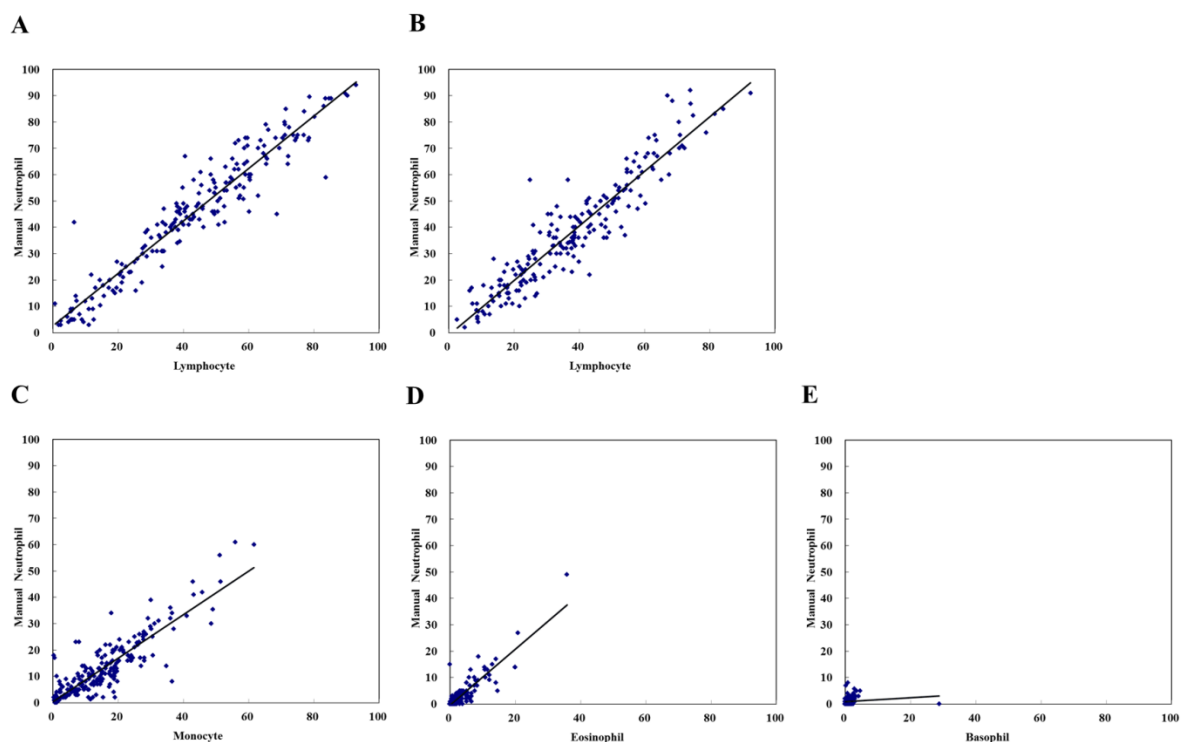


圖 3. 依據 Beckman Coulter DxH 800 和 Manual 方法進行白血球差異計數之相關性分析。 A. Neutrophil. B. Lymphocyte. C. Monocyte. D. Eosinophil. E. Basophil.

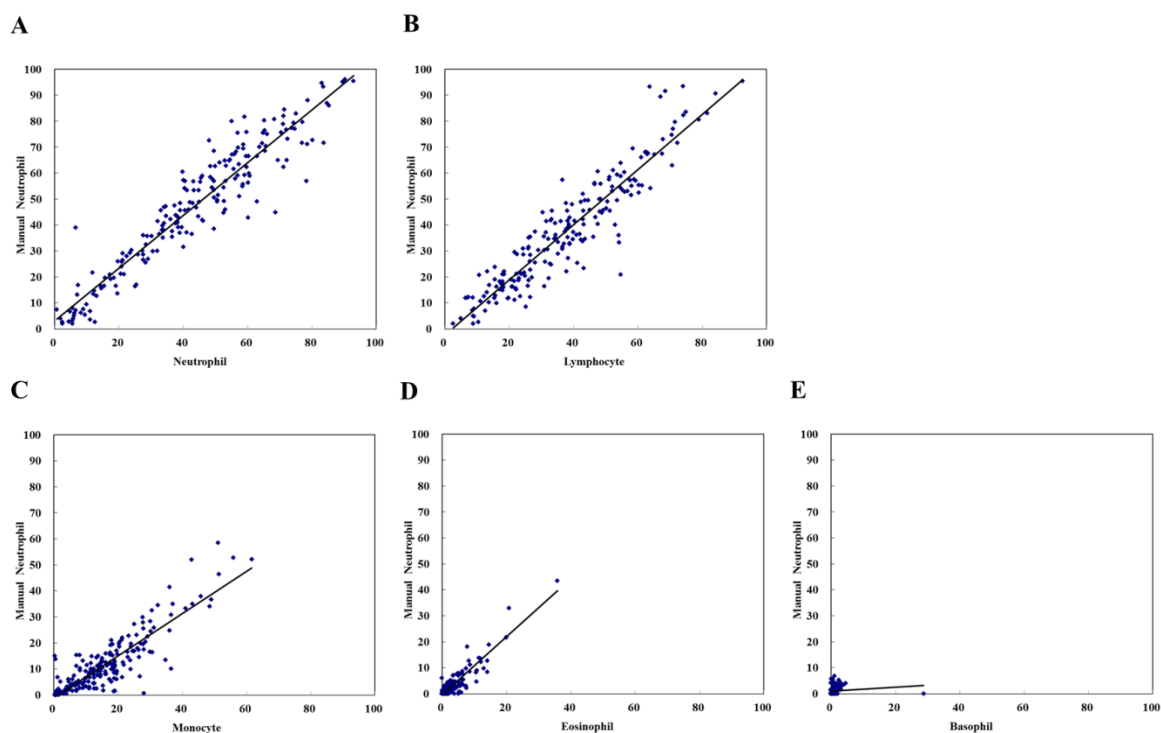


圖 4. 依據 CellaVision DM96 和 Beckman Coulter DxH 800 方法進行白血球差異計數之相關性分析。 A. Neutrophil. B. Lymphocyte. C. Monocyte. D. Eosinophil. E. Basophil.

Hodgkin 氏病等的病人檢體來加以驗證。

在 Beckman Coulter DxH 800 分別與 CellaVision DM96 和人工分類比較的情況下，相關係數方面與 CellaVision DM96 vs. Manual 相似，Neutrophil、Lymphocyte、Monocyte 和 Eosinophil 都呈現高度相關性；但在數量較少的 Basophil 則是兩組都呈現低度的相關性(表 1)，比 CellaVision DM96 vs. manual 的中度相關性要差；此外在 Monocyte 的顯著水準方面，不論是 Manual vs. DxH 800 或是 DxH 800 vs. DM96 整體而言都呈現有顯著的差異性(P value < 0.05)，當中 DxH 800 vs. DM96 顯著差異性更是只有 0.0003，過去也有文獻指出 DxH 800 在 Monocytes 分類上較容易有出現誤差[17]。我們推測因 DxH 800 是利用 VCS 的方式將白血球分類，不同於 DM96 是經染色後由圖像去比對，也因此對於像 Monocyte 的細胞核容易有多種形狀或是易於與大 Lymphocytes 搞混的情況下，DxH 800 可能就較容易有較大的誤差[18]。

在閱片速度方面，過去的文獻指出，DM96 每個血液抹片約 2.7 分鐘[13]。而在這次的比較當中，平均每片則是 3.3 分鐘，比過去的研究要多了 0.6 分鐘。我們推測其原因可能是因為本次選用血液抹片都是白血球低下的檢體，而過去文獻中則是使用一般人的檢體，其白血球較多使得 DM96 閱片速度能較快完成。在人工閱片的部分則是比該文獻要快 1 分鐘，這部分的差異我們較難推論比較，畢竟人員的訓練與經驗會影響很大。

雖然現階段 CellaVision DM96 並無法完全取代人工計數閱片，除了因有疑問的檢體仍須醫檢人員重複判別確認外，DM96 分類的白血球細胞仍須經醫檢師進行確認或重新分類後才能發出報告，並無法直接使用 CellaVision DM96 所分類的結果。但整體而言，我們認為 CellaVision DM96 系統針對血液抹片判讀的準確性和速度對於臨床檢驗實驗室的工作流程和

成本都有很大的幫助；此外 CellaVision DM96 系統亦有顯微鏡的功能可以將照片存取出並製成人員教育訓練檔案資料，對於醫檢人員和臨床醫師間的教育訓練與提升人員鑑別血球型態能力的判讀正確率和降低時間都能有所幫助。未來我們也將會利用 CellaVision DM96 為輔助工具，以提升人員工作的效率；同時也會收集更多不同低白血球檢體來驗證 CellaVision DM96 的準確性。

參考文獻

1. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M., *et al.* Leukocyte functions and percentage breakdown. molecular biology of the cell 2005.
2. Tatsumi, N.; Pierre, R.V. Automated image processing. Past, present, and future of blood cell morphology identification. Clinics in laboratory medicine 2002, 22, 299-315, viii.
3. Meintker, L.; Ringwald, J.; Rauh, M.; Krause, S.W. Comparison of automated differential blood cell counts from abbott sapphire, siemens advia 120, beckman coulter dxh 800, and sysmex xe-2100 in normal and pathologic samples. American journal of clinical pathology 2013, 139, 641-650.
4. Tan, B.T.; Nava, A.J.; George, T.I. Evaluation of the beckman coulter unice dxh 800, beckman coulter lh 780, and abbott diagnostics cell-dyn sapphire hematology analyzers on adult specimens in a tertiary care hospital. American journal of clinical pathology 2011, 135, 939-951.
5. Lawrence, S.M.; Eckert, J.; Makoni, M.; Pereira, H.A. Is the use of complete blood counts with manual differentials an antiquated method of determining neutrophil composition in newborns? Annals of clinical and laboratory science 2015, 45, 403-413.
6. Becker, P.H.; Fenneteau, O.; Da Costa, L. Performance evaluation of the sysmex

- xn-1000 hematology analyzer in assessment of the white blood cell count differential in pediatric specimens. International journal of laboratory hematology 2016, 38, 54-63.
7. Robertson, D.; Schimelfenyg, D.; Merritt, P.; Chaves, F. The unice dxh 800 coulter cellular analysis system demonstrates good performance reporting differential counts on leucopenic samples.: 813. International journal of laboratory hematology 2011, 33, 129-130.
8. Kratz, A.; Bengtsson, H.I.; Casey, J.E.; Keefe, J.M., *et al.* Performance evaluation of the cellavision dm96 system: Wbc differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network. American journal of clinical pathology 2005, 124, 770-781.
9. Yu, H.; Ok, C.Y.; Hesse, A.; Nordell, P., *et al.* Evaluation of an automated digital imaging system, nextslide digital review network, for examination of peripheral blood smears. Archives of pathology & laboratory medicine 2012, 136, 660-667.
10. Rollins-Raval, M.A.; Raval, J.S.; Contis, L. Experience with cellavision dm96 for peripheral blood differentials in a large multi-center academic hospital system. Journal of pathology informatics 2012, 3, 29.
11. Cornet, E.; Perol, J.P.; Troussard, X. Performance evaluation and relevance of the cellavision dm96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. International journal of laboratory hematology 2008, 30, 536-542.
12. Ceelie, H.; Dinkelaar, R.B.; van Gelder, W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of diffmaster octavia and cellavision dm96. Journal of clinical pathology 2007, 60, 72-79.
13. Briggs, C.; Longair, I.; Slavik, M.; Thwaite, K., *et al.* Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the cellavision dm96 automated image analysis system. International journal of laboratory hematology 2009, 31, 48-60.
14. Amundsen, E.K.; Urdal, P.; Hagve, T.A.; Holthe, M.R., *et al.* Absolute neutrophil counts from automated hematology instruments are accurate and precise even at very low levels. American journal of clinical pathology 2012, 137, 862-869.
15. Park, S.H.; Park, C.J.; Choi, M.O.; Kim, M.J., *et al.* Automated digital cell morphology identification system (cellavision dm96) is very useful for leukocyte differentials in specimens with qualitative or quantitative abnormalities. International journal of laboratory hematology 2013, 35, 517-527.
16. Lee, L.H.; Mansoor, A.; Wood, B.; Nelson, H., *et al.* Performance of cellavision dm96 in leukocyte classification. Journal of pathology informatics 2013, 4, 14.
17. Genc, S.; Dervisoglu, E.; Erdem, S.; Arslan, O., *et al.* Comparison of performance and abnormal cell flagging of two automated hematology analyzers: Sysmex xn 3000 and beckman coulter dxh 800. International journal of laboratory hematology 2017, 39, 633-640.
18. Hoffman, R.; Benz Jr, E.J.; Silberstein, L.E.; Heslop, H., *et al.* Hematology: Basic principles and practice. Elsevier Health Sciences: 2013.

找尋適當的引子以偵測侵入性麴菌症(Invasive Aspergillosis)感染

張富傑^{1,2,3}、林志錚^{1,4}

¹ 感染管制中心，馬偕紀念醫院台北與淡水院區

² 管理所，元智大學

³ 馬偕醫護管理專科學校

⁴ 感染科，馬偕紀念醫院台北與淡水院區

摘要

麴菌(*Aspergillus species*)為常見的黴菌，少數人對於麴菌會產生過敏的現象，稱之為過敏性支氣管肺部麴菌症，免疫力低下的族群，則會造成侵入性麴菌症。目前實驗室可以診斷麴菌感染的檢驗方法以 Galactomannan 血清學檢驗為主，再搭配細菌培養作為輔助判斷的診斷工具，搜尋各醫院的網站，有執行 *Aspergillus* PCR 的醫院非常的少，傳統上診斷黴菌的種類，主要偵測的目標基因為 18S rRNA 基因，但隨著時代的變遷，對於黴菌的分子學分型有更多的瞭解，逐漸將偵測基因更改為 ITS (Internal Transcribed Spacer)作為黴菌鑑定的依據，所以，如何設計一組引子，可以診斷多種 *Aspergillus* 的感染，就是本篇實驗的研究目的與重點。本篇實驗收集 32 個呼吸道沖出液檢體 (Galactomannan 血清學抗原檢驗為陽性)，將該檢體進行核酸萃取，並進行 PCR 實驗，最後透過電泳與定序分析後，進行最後判讀。此 32 個呼吸道檢體都可以被這三組引子檢驗出來，代表此三組的引子可以有效的檢驗 *Aspergillus species*。

關鍵詞：麴菌(*Aspergillus species*)、Galactomannan 血清學檢驗、18S rRNA 基因、引子

前言

麴菌(*Aspergillus species*)為常見的黴菌，在環境中大量存在著，通常此黴菌不太會造成感染，甚至在一般人的鼻腔中都可以偵測到該菌株[1-7]。但是，少數人對於麴菌會產生過敏的現象，稱之為過敏性支氣管肺部麴菌症(allergic bronchopulmonary aspergillosis; ABPA) [8,9];而更少數的人，如免疫力低下的族群，則會因為該黴菌感染後，造成侵入性麴菌症(Invasive Aspergillosis; IA)，且根據過往的研究，若無法快速且準確診斷，則侵入性麴菌症造成的死亡率非常的高[10-12]。

根據先前的研究，針對黴菌感染的診斷可以透過放射醫學(X-ray 或 CT)、檢驗醫學(血清學、微生物學與分子生物學)、還有臨床症狀診斷做判斷[13-19]。而目前實驗室可以診斷麴菌感染的檢驗方法以 Galactomannan 血清學檢驗為主，再搭配細菌培養作為輔助判斷的診斷工具[20-23]。然而，我國對於侵入性麴菌症相關的文獻並不多，推測可能的原因是因為我國可以診斷黴菌感染的工具也不多，以北部某醫學中心來說，2016 年才開始引進 Galactomannan-血清學檢驗方法，2017 年才由血液腫瘤學會提供 *Aspergillus*

通訊作者：張富傑

聯絡電話：(02)2543-3535#3091

電子郵件：maple0711@gmail.com

聯絡地址：台北市中山區中山北路二段 92 號

民國 108 年 8 月 28 日受理；民國 109 年 8 月 9 日接受刊登

表 1. 本篇實驗所使用的引子，針對不同的目標基因作檢測。

Location	Sequence	Product size (bp)	target
18S rRNA	F: 5'-CCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' R: 5'-GCTTGATCCTTCTGCAGGTT-3'	~1800	General eukaryotic
18S rRNA	F: 5'-CGGCCCTTAAATAGCCCGGTC-3' R: 5'-ACCCCCCTGAGCCAGTCCG-3'	~362	<i>Aspergillus</i> species
ITS1-5.8S-ITS2	F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3'	600~650	<i>Aspergillus</i> species

specific-LFD kit 作快速判定，而到目前為止，搜尋各醫院的網站，有執行 *Aspergillus* PCR 的醫院也非常的少。

此外，並非所有的醫師或醫檢師對於檢驗 *Aspergillus* 的分子診斷方法都很了解，甚至有些分子生物學專家對於此菌株的分子型態也不太了解，因為，傳統上診斷黴菌的種類，主要偵測的目標基因為 18S rRNA 基因，但隨著時代的變遷，對於黴菌的分子學分型有更多的瞭解，逐漸將偵測基因更改為 ITS (Internal Transcribed Spacer) 作為黴菌鑑定的依據。但是，*Aspergillus* 不易診斷的原因就在這，如果把目標基因定在 18S rRNA 上，則其 PCR 產物序列長度會過長，但若是針對 ITS 作鑑定，則敏感性會不佳。推測造成此狀況的原因，乃是因為 *Aspergillus* 的種類太多，雖然臨床上感染到人類的 *Aspergillus* 大多為薰煙麴菌(*Aspergillus fumigatus*)、黃麴菌(*Aspergillus flavus*) 及其他黑麴菌(*Aspergillus niger*)、小巢狀麴菌(*Aspergillus nidulans*)、土麴菌(*Aspergillus terreus*)等，但是，臨床上還是有很多其他種類的 *Aspergillus* 會造成感染，而無法被鑑定出來。此外，再加上傳統的培養不易養出 *Aspergillus*，也就更難判斷不同的菌株。所以，如何設計一組引子，可以診斷多種 *Aspergillus* 的感染，就是本篇實驗的研究目的與重點。

實驗方法與材料

本篇實驗收集 32 個呼吸道沖出液檢體(Galactomannan 血清學抗原檢驗為陽性)，將該檢體進行核酸萃取，並進行 PCR 實驗，最後透過電泳與定序分析後，進行

最後判讀。本篇實驗最重要的引子設計，參考了過往的文獻，採用了三組引子，一組引子針對所有的黴菌的 18S rRNA 作 PCR，另外兩組針對 *Aspergillus* 作鑑定檢驗，一組設計在 18S rRNA，一組設計在 ITS1-5.8S-ITS2 上，如表 1。

實驗結果

本篇實驗結果顯示，此 32 個呼吸道檢體都可以被這三組引子檢驗出來，代表此三組的引子可以有效的檢驗 *Aspergillus* species。但是，比較有問題的是透過 DNA 定序後發現，全部都是 *Aspergillus fumigatus*，換句話說，本次實驗有其限制性，所以，是否可以檢驗出所有的 *Aspergillus* species，本團隊將持續收集相關檢體後，再作相關的報告。但是根據學理的推測，這三組引子理論上是可以檢驗出大部分的 *Aspergillus* species。

討論

根據本篇研究，*Aspergillus* species 的種類有一百多種，目前根據文獻的報導，大多數都是 *Aspergillus fumigatus*，本篇實驗結果也都是該菌株。可是，還是有其他的文獻報導其他 species 的 *Aspergillus* 會造成 Invasive Aspergillosis，因此，找尋適當的引子檢驗是非常重要的。

此外，根據國外的文獻，*Aspergillus* 的抗藥性有逐年上升的趨勢，幸運的是，目前台灣的 *Aspergillus* 抗藥性並沒有很嚴重，所以，根據台灣自己的多中心研究 (SMART study)，可以發現最常見的 *Aspergillus fumigatus*，對於 Voriconazole 的 MIC 50% 為還不錯的 0.25 mg/mL。而

Aspergillus flavus 的 susceptibility 看起來比 *Aspergillus fumigatus* 差一些，Itraconazole、Voriconazole、Amphotericin B 的 MIC 50%，都是 *Aspergillus fumigatus* 的兩倍，Azole 抗藥性的部分，則依據國衛院、成大醫院與台大醫院的研究顯示，台灣的 *Aspergillus fumigatus* azole 抗藥性，在臨床菌株為 7.9% [24]。

所以，能夠快速診斷 *Aspergillus* 感染，就可以快速的給予藥物，避免抗藥性的產生，此外，目前臨床上也可以執行 Voriconazole 血中濃度監測 (Therapeutic Drug Monitoring; TDM)，可避免抗藥性的產生。

參考文獻

1. Bongomin, F., *et al.* A Review of Onychomycosis Due to *Aspergillus* Species. *Mycopathologia*, 2018. 183(3): p. 485-493.
2. Gabrielli, E., *et al.* Osteomyelitis caused by *Aspergillus* species: a review of 310 reported cases. *Clin Microbiol Infect*, 2014. 20(6): p. 559-65.
3. Hedayati, M.T., S. Mayahi, and D.W. Denning, A study on *Aspergillus* species in houses of asthmatic patients from Sari City, Iran and a brief review of the health effects of exposure to indoor *Aspergillus*. *Environ Monit Assess*, 2010. 168(1-4): p. 481-7.
4. Slack, G.J., *et al.* Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol Res*, 2009. 113(Pt 4): p. 480-90.
5. Collazos, J., *et al.* Prosthetic vascular graft infection due to *Aspergillus* species: case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001. 20(6): p. 414-7.
6. Gordon, G. and N.A. Giddings, Invasive otitis externa due to *Aspergillus* species: case report and review. *Clin Infect Dis*, 1994. 19(5): p. 866-70.
7. Motte, S., *et al.* Vascular graft infection caused by *Aspergillus* species: case report and review of the literature. *J Vasc Surg*, 1993. 17(3): p. 607-12.
8. Gupta, R.K., A. Chandr, and P.B. Gautam, Allergic bronchopulmonary aspergillosis-a clinical review. *J Assoc Physicians India*, 2012. 60: p. 46-51.
9. Wardlaw, A. and D.M. Geddes, Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review. *J R Soc Med*, 1992. 85(12): p. 747-51.
10. Shirley, M. and L.J. Scott, Isavuconazole: A Review in Invasive Aspergillosis and Mucormycosis. *Drugs*, 2016. 76(17): p. 1647-1657.
11. Ohashi, T., *et al.* Invasive epiglottic aspergillosis: A case report and literature review. *Auris Nasus Larynx*, 2015. 42(6): p. 501-4.
12. Belousov, D. and O.A. Maneshina, Therapy of invasive aspergillosis: review. *Antibiot Khimioter*, 2006. 51(3-4): p. 26-46.
13. Borys, M., *et al.* Early diagnosis and treatment of invasive aspergillosis as a main determinant of outcome - review of literature according to the presented case report. *Ann Agric Environ Med*, 2017. 24(1): p. 100-103.
14. Heng, S.C., *et al.* Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Microbiol*, 2015. 41(1): p. 124-34.
15. Xu, X.Y., *et al.* Diagnosis of airway-invasive pulmonary aspergillosis by tree-in-bud sign in an immunocompetent patient: case report and literature review. *J Mycol Med*, 2013. 23(1): p. 64-9.
16. Avni, T., *et al.* Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for

- diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(11): p. 3652-8.
17. Sun, W., *et al.* Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate meta analysis and systematic review. *PLoS One*, 2011. 6(12): p. e28467.
18. Mengoli, C., *et al.* Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2009. 9(2): p. 89-96.
19. Tuon, F.F., A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol*, 2007. 24(2): p. 89-94.
20. Sun, K.S., *et al.* Clinical outcome and prognostic factors associated with invasive pulmonary aspergillosis: An 11-year follow-up report from Taiwan. *PLoS One*, 2017. 12(10): p. e0186422.
21. Sun, K.S., *et al.* Correction: Galactomannan Testing and the Incidence of Invasive Pulmonary Aspergillosis: A 10-Year Nationwide Population-Based Study in Taiwan. *PLoS One*, 2016. 11(6): p. e0156566.
22. Sun, K.S., *et al.* Galactomannan Testing and the Incidence of Invasive Pulmonary Aspergillosis: A 10-Year Nationwide Population-Based Study in Taiwan. *PLoS One*, 2016. 11(2): p. e0149964.
23. Hsiue, H.C., *et al.* Culture-positive invasive aspergillosis in a medical center in Taiwan, 2000-2009. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012. 31(7): p. 1319-26.
24. <http://transplant-id.blogspot.com/2016/02/epidemiology-of-invasive-aspergillosis-in-taiwan.html>

探討不同引子於偵測肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)的臨床應用

張富傑^{1,2,3,4}、張龍^{1,2,5}、紀鑫^{1,2,5}、邱南昌^{1,2,5}

¹ 感染管制中心，馬偕紀念醫院台北與淡水院區

² 感染管制中心，馬偕兒童醫院

³ 管理所，元智大學

⁴ 馬偕醫護管理專科學校

⁵ 感染科，馬偕兒童醫院

摘要

肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)為常見的社區性肺炎(Community association pneumoniae)之致病菌，根據文獻的報導，該菌株在全球的盛行率約為4~15%，人類終其一生都可以被該菌株感染到，且並非感染後就不會再被感染。隨著時代的變遷與醫學發達，有文獻開始建議臨床可以使用分子生物學檢驗肺炎黴漿菌。根據過往研究，利用分子生物學檢驗肺炎黴漿菌感染，可以針對肺炎黴漿菌的目標基因(Target gene)做檢驗，目前臨床上大多針對肺炎黴漿菌的P1 gene、16S rRNA gene 或 16S-23S rRNA 做為分子檢驗的偵測目標，再根據不同的檢驗學原理做判讀，現行臨床檢驗肺炎黴漿菌的主要關鍵因素是目標基因的選擇。本實驗收集了40個已經鑑定為肺炎黴漿菌的臨床菌株，與1支標準菌株，針對肺炎黴漿菌的P1 gene、16S rRNA 與 16S-23S rRNA 做為目標基因，挑選了專一性與特異性較高的引子。使用P1 gene為目標的引子，可以檢驗出38個檢體(含標準菌株)，使用16S rRNA 與 16S-23S rRNA 為目標的引子，均可以檢驗出41個檢體(含標準菌株)。根據本篇研究的結果，建議單位可以設置兩種不同目標基因的分離檢驗方法，可以選擇使用P1 gene作為初步篩檢，這也是目前坊間最常見的檢驗試劑，但是若是治療的結果不好或是懷疑有抗藥性的肺炎黴漿菌產生的時候，可以偵測16S-23S rRNA，再透過序列比對的結果，再決定是否需要更改抗生素。此外，比對16S-23S rRNA 也可以做黴漿菌(*Mycoplasma species*)物種的鑑定，同時也可以判斷是否為兩種以上的黴漿菌感染。

關鍵詞：肺炎黴漿菌、社區性肺炎、P1 gene、16S rRNA、16S-23S rRNA

前言

肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)為常見的社區性肺炎(Community association pneumoniae)之致病菌[1]，根據文獻的報導，該菌株在全球的盛行率約為4~15%，人類終其一生都可能被該菌感染，

且並非感染後就不會再被感染[2]。根據我國的研究，肺炎黴漿菌感染的族群大多以小兒科病人為主，其感染盛行率約為10%左右[3,4]。臨床上感染到肺炎黴漿菌的病人，大多數的症狀為咳嗽、流鼻水與發燒[5]。根據過往的研究，鮮少有因為肺炎黴

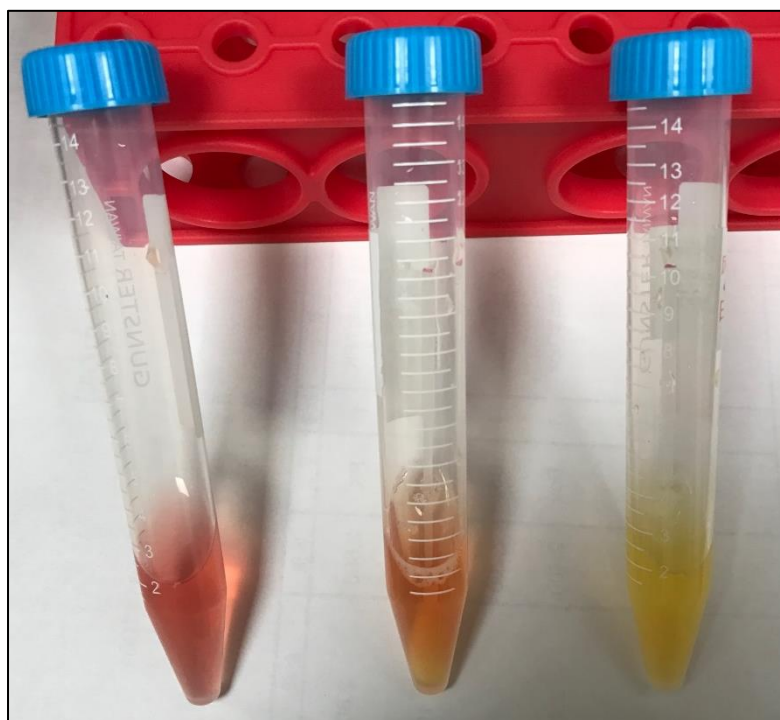
通訊作者：張富傑

聯絡電話：(02)2543-3535#3091

電子郵件：maple0711@gmail.com

聯絡地址：台北市中山區中山北路二段92號

民國108年8月28日受理；民國109年8月9日接受刊登



(圖一)將所有的肺炎黴漿菌轉殖於 SP4 broth 做增殖。左邊的是未添加任何細菌的 SP4 broth (Blank)，中間為添加大腸桿菌的 SP4 broth(negative control)，右邊為有生長的肺炎黴漿菌(positive sample)。

表 1. 本篇實驗所使用的引子，針對不同的目標基因作檢測。

No:	Target gene	Forward (5'->3')	Reverse (5'->3')	Product (bp)
1	P1 gene	CCCTCGACCAAGCCAACCTC	TGCGCGTTGTTCTTGTGGTG	340
2	16S rRNA	AAGGACCTGCAAGGGTTGT	CTCTAGCCATTACCTGCTAA	277
3	16S-23S rRNA [†]	ACACCATGGGAGYTGGTAAT	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT	499

[†]Y: T/C; W: A/T

漿菌感染而致死的案例，也因此，近年來，肺炎黴漿菌的相關研究已經越來越少，顯少有相關的文獻發表。

然而，因為本院為兒童醫院，所以，本團隊著手於相關的研究。在進行相關研究之前，整理目前臨床上診斷肺炎黴漿菌感染後，可以使用的檢驗方法包含血清學的檢驗：檢驗血液中的 *Mycoplasma pneumoniae* IgM/IgG/IgA 抗體與冷凝集素、病原體的抗原快篩(Rapid test)檢測、傳統的細菌培養法，與現在最夯的分子診斷法，例如 PCR、real-time PCR、Nested PCR 與 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) [6,7]。綜觀每種方法都有其優缺點，建議可以根據各個醫院的屬性，選擇適當的檢驗方法。而根據調查，目前各醫

療院所所使用的檢驗方法大多還是以血清學的檢驗為主[8-10]。

但是，隨著時代的變遷與醫學發達，有文獻開始建議臨床可以使用分子生物學檢驗肺炎黴漿菌。根據過往研究，利用分子生物學檢驗肺炎黴漿菌感染，可以針對肺炎黴漿菌的目標基因(Target gene)做檢驗，目前臨床上大多針對肺炎黴漿菌的 P1 gene、16S rRNA gene 或 16S-23S rRNA 做為分子檢驗的偵測目標，再根據不同的檢驗學原理做判讀，目前分子醫學檢驗肺炎黴漿菌的時間約為 30~240 分鐘，時間差異係因使用不同檢驗平台[11]。

不過，無論使用哪種檢驗平台，影響分子檢驗專一性與特異性的最大關鍵為

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain M129-2002, complete genome	9020	33972	100%	0.0	100%	CP017343.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain FL8, complete genome	9020	33944	100%	0.0	100%	CP017331.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain S91-tet-R, complete genome	9020	33974	100%	0.0	100%	CP020693.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain S55-tet-R, complete genome	9020	33972	100%	0.0	100%	CP020692.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain S68-tet-R, complete genome	9020	33972	100%	0.0	100%	CP020691.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain FH-tet-R, complete genome	9020	33974	100%	0.0	100%	CP020690.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae 85138, complete genome	9020	33952	100%	0.0	100%	CP010545.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae 85084, complete genome	9020	33952	100%	0.0	100%	CP010544.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae PI 1428, complete genome	9020	33961	100%	0.0	100%	CP010538.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae M129-B7, complete genome	9020	33979	100%	0.0	100%	CP003913.2
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae P1 cytidhesin (P1).gene, complete cds	9020	9020	100%	0.0	100%	AF286371.1

圖 2. 比對不同肺炎黴漿菌的 P1 gene 序列，可以發現大多數的 P1 gene 是一樣的，其序列一致性都是 100%。

<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae 19294, complete genome	5049	32869	100%	0.0	98%	CP010539.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 23ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4433	4433	49%	0.0	100%	MF668991.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 19ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4433	4433	49%	0.0	100%	MF668990.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 13ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4433	4433	49%	0.0	100%	MF668988.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 7ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4433	4433	49%	0.0	100%	MF668985.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 11ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4427	4427	49%	0.0	99%	MF668987.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 10ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4427	4427	49%	0.0	99%	MF668986.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 1ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4427	4427	49%	0.0	99%	MF668983.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae strain 17ADH34 P1 cytidhesin RepMP2/3 (adh34).gene, partial cds	4405	4405	49%	0.0	99%	MF668989.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae isolate ON-C61505 cytidhesin P1 (P1).gene, partial cds	4041	4041	44%	0.0	99%	KF154740.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae isolate ON-R28435 cytidhesin P1 (P1).gene, partial cds	4032	4032	44%	0.0	99%	KF154744.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae isolate ON-C1072055 cytidhesin P1 (P1).gene, partial cds	4026	4026	44%	0.0	99%	KF154745.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae isolate ON-N223472 cytidhesin P1 (P1).gene, partial cds	4026	4026	44%	0.0	99%	KF154741.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae isolate ON-C942178 cytidhesin P1 (P1).gene, partial cds	4013	4013	44%	0.0	99%	KF154743.1
<input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae isolate ON-C34887 cytidhesin P1 (P1).gene, partial cds	3991	3991	44%	0.0	99%	KF154746.1

圖 3. 透過序列比對也發現，有其他的肺炎黴漿菌，其 P1 gene 序列不一定是一樣的。

目標基因的選擇，故本篇將探討不同目標基因在肺炎黴漿菌檢驗中的合宜性。

材料與方法

實驗材料

本實驗收集了 40 個已經鑑定為肺炎黴漿菌的臨床菌株，並且購買標準菌株 ATCC15531-*Mycoplasma pneumoniae*，將這 41 株的肺炎黴漿菌接種在 SP4 培養液中，於 37 度溫箱內培養 168 小時，菌液提供後續實驗。

核酸萃取

將增殖後的 SP4 broth 以 QIAamp DNA Microbiome Kit (QIAGEN)進行 DNA 之純化。

引子(Primer)選定

本實驗參考了過往的研究，針對肺炎黴漿菌的 P1 gene [12-14]、16S rRNA [15] 與 16S-23S rRNA [16-19]做為目標基因，挑選了專一性與特異性較高的引子，其序列詳如表 1。

實驗平台

本實驗使用傳統 PCR 作為檢驗的平台，將核酸萃取後的產物與選定的三組引子作用，之後透過洋菜膠電泳分析進行判讀偵測結果。

實驗結果

使用 P1 gene 為目標的引子，可以檢驗出 38 個檢體(含標準菌株)，使用 16S rRNA 為目標的引子，可以檢驗出 41 個檢體(含標準菌株)，使用 16S-23S rRNA 為目

標的引子，也可以檢驗出 41 個檢體(含標準菌株)。

討論

根據過往的研究，偵測肺炎黴漿菌的 P1 gene 為最常見檢驗的方式，因為大多數肺炎黴漿菌的 P1 gene 都是相同的，參考 NCBI-blast 資料庫的比對，大多數的肺炎黴漿菌的 P1 gene 的 Ident 都是 100% (圖 2)，但也有少部分的菌株有些許變異，如圖 3。

根據 P1 gene 的 PCR 結果顯示，有 3 個菌株為偽陰性(False negative)。原因可能在引子的區域產生突變，讓引子無法與模板接合，就無法擴增出 PCR 產物。因此，本團隊的下一步，將針對 P1 gene 做定序或 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)分析，再比對資料庫，探討台灣的肺炎黴漿菌之分子學分型樣式。

此外，雖然使用 16S rRNA 與 16S-23S rRNA 為目標的引子都可以偵測出所有的肺炎黴漿菌，但是，若偵測 16S-23S rRNA，則可以再透過序列比對(sequencing)後，檢驗出是否具有抗藥性。不過，若是偵測 16S rRNA，則有機會透過序列比對後，探討是哪種黴漿菌(*Mycoplasma species*)造成感染，因為根據過往的文獻，除了肺炎黴漿菌會造成社區性肺炎感染外，其他的 species 也有機會造成社區性肺炎，例如 *Mycoplasma hominis* 與 *Mycoplasma fermentans* 等，就有機會被鑑定出來。

因此，根據本篇研究的結果，建議單位可以設置兩種不同目標基因的分子檢驗方法，可以選擇使用 P1 gene 作為初步篩檢，這也是目前坊間最常見的檢驗試劑，但是若是治療的結果不好或是懷疑有抗藥性的肺炎黴漿菌產生的時候，可以偵測 16S-23S rRNA，再透過序列比對的結果，再決定是否需要更改抗生素。此外，也根據文獻的報導，比對 16S-23S rRNA 也可以做黴漿菌(*Mycoplasma species*)物種的鑑

定，同時也可以判斷是否為兩種以上的黴漿菌感染。

參考文獻

1. Raff, M.J., *Mycoplasma pneumoniae* infection: a review. J Ky Med Assoc, 1972. 70(10): p. 781-6.
2. He, J., *et al.* Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* (Review). Mol Med Rep, 2016. 14(5): p. 4030-4036.
3. Tsai, C.S., *et al.* The association between *Mycoplasma pneumoniae* infection and speech and language impairment: A nationwide population-based study in Taiwan. PLoS One, 2017. 12(7): p. e0180402.
4. Wu, P.S., *et al.* Epidemiology and clinical manifestations of children with macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Taiwan. Pediatr Pulmonol, 2013. 48(9): p. 904-11.
5. Birrer, R.B. and C.D. Birrer, *Mycoplasma pneumoniae*: a review. Mil Med, 1980. 145(6): p. 422-4.
6. Lin, L.J., *et al.* The diagnostic value of serological studies in pediatric patients with acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. J Microbiol Immunol Infect, 2018.
7. Zhang, L., *et al.* PCR versus serology for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection: a systematic review & meta-analysis. Indian J Med Res, 2011. 134: p. 270-80.
8. Daxboeck, F., *et al.* Diagnosis, treatment, and prognosis of *Mycoplasma pneumoniae* childhood encephalitis: systematic review of 58 cases. J Child Neurol, 2004. 19(11): p. 865-71.
9. Jacobs, E., Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a critical review of current procedures. Clin Infect Dis, 1993. 17 Suppl 1: p. S79-82.

10. Edelstein, P.H., Use of DNA probes for the diagnosis of infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and legionellae--a review. *Adv Exp Med Biol*, 1990. 263: p. 57-69.
11. Serum IgM and Molecular Tests for *Mycoplasma pneumoniae* Detection: A Review of Diagnostic Test Accuracy, Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; November 9, 2015.
12. Layh-Schmitt, G. and R. Herrmann, Spatial arrangement of gene products of the P1 operon in the membrane of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun*, 1994. 62(3): p. 974-9.
13. Layh-Schmitt, G., The ORF6 gene product of the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*. *Zentralbl Bakteri*, 1993. 278(2-3): p. 287-95.
14. Su, C.J., V.V. Tryon, and J.B. Baseman, Cloning and sequence analysis of cytoadhesin P1 gene from *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun*, 1987. 55(12): p. 3023-9.
15. Han, Z., *et al.* *Mycoplasma pneumoniae* periprosthetic joint infection identified by 16S ribosomal RNA gene amplification and sequencing: a case report. *J Bone Joint Surg Am*, 2011. 93(18): p. e103.
16. Deng, H., *et al.* *Mycoplasma pneumoniae* 23S rRNA A2063G mutation does not influence chest radiography features in children with pneumonia. *J Int Med Res*, 2018. 46(1): p. 150-157.
17. Horiba, K., *et al.* Analysis of 23S rRNA of *Mycoplasma pneumoniae* detected from pediatric inpatients with community-acquired pneumonia in a regional hospital in Japan. *Kansenshogaku Zasshi*, 2014. 88(5): p. 715-6.
18. Morozumi, M., *et al.* Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(6): p. 2302-6.
19. Lucier, T.S., *et al.* Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. 39(12): p. 2770-3.

「雙北檢驗醫學雜誌」投稿須知

99/4/20 制定醫檢學術會刊
101/1/31 修訂醫檢學術會刊
102/4/28 修訂醫檢學術會刊
103/5/27 更名雙北檢驗醫學雜誌
106/12/20 修訂醫檢學術會刊

「雙北檢驗醫學雜誌」主要報導檢驗醫學之相關學術刊物，包括：原著(original study)、綜說(review article)、臨床案例報告(case report)、醫檢新知、醫檢技術、及實驗室管理等。醫檢學術會刊自 103 年 5 月更名改「雙北檢驗醫學雜誌」，為雙月刊，每月刊登 3 篇，主要以網路刊登發行。雙北檢驗醫學雜誌編輯委員對來稿有刪改權及刊載決定權，以下為本會刊之投稿須知

雙北檢驗醫學雜誌相關稿件：

1. 歡迎檢驗醫學相關報導或其他論述文章，以未曾刊登其他雜誌者為限，文稿以中文撰寫為原則。
2. 撰寫格式
 - (1) 原著：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、材料與方法、結果、討論、參考文獻。
 - (2) 綜述：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、內容(段落主題)、結論、參考文獻。
 - (3) 案例報告：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、案例報告內容、討論、參考文獻。
 - (4) 其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理等：比照綜述格式。
 - (5) 投稿文章若有使用到人體相關研究，請提供 IRB 證明。

首頁：包括題目、作者、摘要(200~300 字內)、關鍵詞(3~5 個)、服務單位、連絡作者姓名、服務單位、連絡地址及電話、e-mail 信箱網址。

本文（第二頁）：依上述各屬性文章撰寫格式撰寫主文。

表格及圖片說明頁：依本文順序置於本文之後。

3. 版面設定：上：2.54cm、下：2.54cm、左：3.17cm、右：3.17cm。文章內容規定：中文字體以標楷體、英文以 Times New Roman；字型大小 12，標題字型大小 14，行間距為二空格(double spaced)。
4. 「雜誌」內容以電腦打字黑白稿方式呈現，所附圖片及圖表必須清晰、圖、表備註說明以中文方式撰寫。
5. 「雜誌」內容引用他人資料要註明出處；參考資料按引用(參考)先後順序列出。
6. 參考資料的書寫方式，依照 CBE(Council of Biological Editors)手冊原則。期刊：請按(a)作者姓名。(b)發表年份。(c)篇名。(d)期刊名稱包括：卷數、號數及起訖頁數，依序撰寫。書籍：請按(a)著者姓名。(b)出版年度。題目，起訖頁數，編者姓名，(c)書名，卷數或版數。(d)出版商(發行所)，出版地。依序撰寫，五位作者以上時請列出前四位作者，後加上 et al.(斜體字)。作者人數在四位以內者，則全部列出。參考文獻必須標示於句尾[*]。

範例：

- (1) Benamer H, Steg PG, Benessiano J, Vicaute E, et al.1998.
 - (2) Comparison of the Prognostic value of C-reactive Protein and Troponin I in patients with unstable angina pectoris. Am J Cardiol. 82: 845-850.
 - (3) 何敏夫。2000。第七章醣類，250-258 頁，何敏夫著，臨床化學，第三版。合記圖書出版社，台北。
7. 一般稿件篇幅約為 3000 字內。
 8. 投稿稿件範例如附件。
 9. 投稿稿件經審核後，本會接受刊登，獎勵稿費 2000 元整。

附件：投稿稿件範例

首頁

投稿題目

作者

服務單位(XX 醫院 XX 科)

摘要

(200~300 字)

關鍵詞：3~5 個

通訊作者：

連絡電話：

e-mail：

連絡地址：

民國??年?月?日受理；民國??年 ? 月 ???日接受刊登

第二頁

原著：依序撰寫

前言

XXXXXX [1]

引用文獻

材料與方法

結果

討論

參考文獻

綜述：依序撰寫

前言

XXXXXX [1]

引用文獻

內容(段落主題)

主題一

主題二

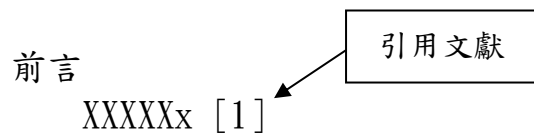
主題三

以此類推

結論

參考文獻

案例報告：依序撰寫

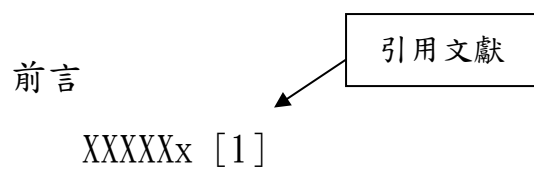


案例報告內容

討論

參考文獻

其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理：依序撰寫



內容(段落主題)

主題一

主題二

主題三

以此類推

結論

參考文獻