

出國報告（出國類別：研究）

## 結核菌基因流行病學、免疫學及快速診斷研究

服務機關：臺北榮民總醫院

姓名職稱：馮嘉毅，主治醫師

派赴國家：美國，加州大學舊金山分校

出國期間：102年6月1日至104年5月24日

報告日期：104年6月15日

## 摘要（含關鍵字）

結核病到目前為止仍是全球重要的感染性疾病，台灣地區也仍是結核病的疫區。此次在加州大學舊金山分校進行結核病相關研究進修，目的在參與美國目前主流的結核病研究課題，增進結核病基因流行病學的知能，同時學習先進的結核菌相關研究技術。主要的研究項目包括多重抗藥性結核菌傳播能力研究、結核病基因流行病學研究方法與使用質譜儀及恆溫性核酸擴增技術發展結核菌及抗藥性快速診斷工具。藉由此次進修，除了學習相關的結核菌研究課題與技術外，同時可以在國內建立類似的結核菌研究平台，更重要的是建立參與國際研究的管道，以增進國內在結核病研究的國際能見度。

關鍵字：結核菌、抗藥性、快速診斷工具

## 目次

一、 目的	( 3 )
二、 過程	( 6 )
三、 心得	( 19 )
四、 建議事項 (包括改進作法)	( 22 )

## 一、目的

到目前為止，我們已經擁有有效的抗結核藥物超過五十年，結核病仍是世界上最嚴重的感染症，根據統計，目前全球有將近三分之一的人口-約為 20 億人-曾有過肺結核的感染，而每年有超過八百萬人發病。而在台灣，雖然醫療水準與公共衛生持續的進步，台灣仍然是結核病的流行地區，每年約有一萬五千個結核病新通報個案，我們的研究更顯示治療中的死亡率約接近 20%，代表結核病在台灣仍然是公共衛生與防疫最大的挑戰。過去五年，由於政府『十年減半』的目標與努力，加上都治計畫與接觸者檢查的落實，台灣肺結核的盛行率與發生率都在逐年穩定的下降，但近年來結核病盛行率下降的趨勢卻出現減緩的情形，這一方面與接續的潛伏結核感染的診治有關，另外一方面也是因為近年來我們對活動性結核菌的快速診斷始終缺乏突破性的發展有關。

過去的研究顯示，健康成人在吸入飛沫中的結核菌之後，70%的人會利用物理性防衛機轉或是先天免疫能力將結核菌排除，約有 1.5%病人會在接觸的當下立刻發病成為活動性肺結核，有另外其他約 28~30%的病人會利用後天免疫能力將結核菌侷限在肉芽腫組織內而不發病，亦即所謂的潛伏結核感染狀態。一個有效的肉芽腫組織是讓肺部的結核菌處於潛伏狀態的重要關鍵，人體內獨特的免疫反應更是決定接觸結核菌後是否發病與病人接受治療後治療反應的關鍵。結核病相關的免疫反應其實是人體與病原體的交互反應，不同的人體針對不同的結核菌株，可能就會引發不同的免疫反應。過去的全球研究顯示不同的人種感染結核菌後的臨床表現與治療反應不盡相同，

這可能與不同人種間引發的不同免疫反應有關，或與感染到不同的結核菌品系 (lineage) 或亞型 (sublineage) 後引發人體不同的免疫反應有關，究竟人種間的免疫反應差異與不同結核菌品系，何者扮演較重要的角色，目前仍缺乏廣泛的研究，這也反映出結核菌相關免疫反應的複雜性。

另外一方面，傳統的結核菌診斷依賴微生物學的診斷工具，也就是抗酸性染色與結核菌培養，即使這些微生物學的診斷方法始終都有缺乏時效的問題，這仍然是目前臨床上最常使用的診斷工具，即便是近年來已經相當普及的聚合酶連鎖反應

(Polymerase Chain Reaction, PCR)，在敏感性與特異性的方面仍然有其限制而無法完全取代抗酸性染色與結核菌培養。無法針對結核菌進行快速診斷的問題不只是無法及早治療病人，更是延長了病人疾病傳播的時間，而使結核病的防治出現漏洞，因此如何在既有的分子生物基礎上繼續努力，研發出新的診斷工具，一直都是結核病研究上的重要課題。

個人自擔任臺北榮總胸腔部研究醫師以來，即專注於結核病相關研究，不論是臨床或是基礎研究皆有涉獵，自 99 年升任胸腔部主治醫師後，同年亦考入國立陽明大學臨床醫學研究所博士班進修，並以肺結核免疫相關研究為博士班之主要研究方向，但由於國內學界對於結核病相關基礎研究投入有限，因此常有研究資源不足及缺乏研究同儕之感。感謝院方與部內長官的愛護與栽培，有幸於 102 年 6 月 1 日至美國加州大學舊金山分校舊金山總醫院進行為期一年的進修與研究。

舊金山總醫院是美國西岸重要的結核病服務與研究重鎮，除了臨床的病人照護

外，也進行非常多的結核病基礎研究，尤其是在結核菌基因表現與快速診斷，更是重點的發展項目，我前往舊金山總醫院學習的重點除了在參與該醫院結核病實驗室的研究計畫外，同時觀摩其結核病人臨床之照護。

## 二、過程

### A. 加州大學舊金山分校舊金山總醫院及肺結核實驗室簡介

加州大學舊金山分校(UCSF)舊金山總醫院(SFGH)前身成立於 1850 年，最早是 City-County Hospital，於 1873 年加入加州大學體系，成為加州大學舊金山分校的院區之一。最初成立時的舊金山總醫院，是以治療肺結核為成立宗旨的，當時的美國仍然是結核病的盛行區，而且當時的結核病並無任何藥物可治療，只能鼓勵病人補充營養，呼吸新鮮空氣及多曬太陽，由於加州地區氣候溫暖良好，陽光充足，因此在 19 世紀末 20 世紀初全美國大批的結核病人湧向加州，使加州成為全美結核病人最多的地區，也因此促成了舊金山總醫院的成立。現今的美國雖然早已不是結核病的盛行區，也不再有人會為了治療結核病特別前來加州，但由於加州地區有廣大的來是中南美洲與亞洲地區的移民，他們都來自結核病的疫區，加上舊金山地區本身有相當多的愛滋病患與遊民，這些也都是結核病的高危險族群，因此目前加州地區仍然是美國結核病盛行率最高的地區之一。

目前的舊金山總醫院仍是全美治療結核病的重鎮，也治療了舊金山地區絕大部分的結核病人。目前的舊金山總醫院約有 400 張急性病床與 100 張精神病床，除了結核病外，醫院其他發展的重心為感染症(尤其是愛滋病)與創傷重症，目前也是舊金山地區唯一的一級創傷中心。

我所研習的實驗室是舊金山總醫院胸腔重症科的結核病實驗室，它們又分成兩個

實驗室：結核病分子生物實驗室 (Tuberculosis biomolecular lab) 與結核病生物標記實驗室 (Tuberculosis biomarker lab)，結核病分子生物實驗室的指導教授是 Dr. Midori Kato-maeda，主要進行的實驗包括結核菌的基因型研究與分子生物快速診斷。結核病生物標記實驗室的指導教授是 Dr. Payam Nahid，主要進行的是結核病人血清中生物標記與免疫學研究。兩個實驗室有些 project 是互相合作的，也分別獨立執行各自的研究。我這次前來所接洽的指導教授是 Dr. Payam Nahid，但他建議我也同時在 Dr. Midori Kate-maeda 的實驗室進行學習，執行一些計畫。這兩位老師都是我的指導教授，也提供我許多實驗上，生活上，與論文寫作上的幫助。

值得一提的是，舊金山總醫院的結核病實驗室有獨立的 P3 實驗室，因此不論是結核菌的種菌培養到相關的活菌實驗都是獨立進行，這讓我有接受 P3 實驗室操作訓練的機會，除了熟悉相關的操作技術，也可以觀摩到 P3 實驗室運作的實務經驗，像是 SOP 的建立，負壓系統的檢測維護，美國 CDC 的每年定期檢測等，這都是非常難得的實務經驗，對回國後在榮總院內發展 P3 實驗室都是非常大的助益。

## B. 多重抗藥性菌株傳播力研究

多重抗藥性結核菌係指同時對 Rifampin 與 Isoniazid 兩種一線抗結核藥物具抗藥性的菌株，是目前全球對抗結核病最需要克服的難題，感染多重抗藥性結核菌的結核病人不但需要使用多種二線藥物進行治療，治療的時間也會從原本的六個月，增加到 18 個月以上，治療期間因藥物發生副作用的機會較高，治療的成功率也偏低，而



目前台灣地區的多重抗藥性結核菌約佔所有結核病人的 6~8%，如何多重抗藥性結核菌的傳播更是公共衛生防疫上的重要課題。

多重抗藥性結核菌與 Rifampin 抗藥相關的抗藥性基因是 *rpoB* gene，過去的研究顯示 95% 以上的多重抗藥性菌株會合併有 *rpoB* 基因突變，*rpoB* 基因的主要產物是 RNA polymerase 的 beta subunit，*rpoB* 基因發生突變時，Rifampin 會無法結合到結核菌的 RNA polymerase，失去抑制 RNA polymerase 的效果，因而發生抗藥。但由於 RNA polymerase 本身也是結核菌製造蛋白的重要酵素，因此 *rpoB* 基因發生突變時，雖然可以對 Rifampin 具有抗藥性，但結構改變的 RNA polymerase 也會影響結核菌本身生長或存活的能力，因此具有 *rpoB* 基因突變的結核菌本身的生長能力是較差的，這種情形我們稱之為 fitness cost，也就是結核菌為了適應有 Rifampin 存在的環境而必須付出的代價。

但 RNA polymerase 除了  $\beta$  subunit 外，還有  $\alpha$  subunit 與  $\beta'$  subunit，分別由 *rpoA* 與 *rpoC* 基因所分別製造。有學者猜測，*rpoA* 與 *rpoC* 基因突變可能是一種 compensatory mutation，可以改變 *rpoB* 基因突變後製造的 RNA polymerase，減少 *rpoB* 基因突變所帶來了 fitness cost。過去的研究也顯示，同時合併 *rpoA* 或 *rpoC* 基因突變的 Rifampin 抗藥菌株對環境的適應能力，比沒有合併 *rpoA* 或 *rpoC* 基因突變的 Rifampin 抗藥菌株要好。基於這樣的觀察，我們假設，合併 *rpoA* 或 *rpoC* 基因突變的多重抗藥性結核菌株，致病力與傳播力較強，也比較容易造成續發的個案 (secondary case)。

為了證明我們的假設，我們收集加州地區與德州地區 2008~2012 年的多重抗藥性結核菌株，使用 PCR 方法擴增 rpoA 與 rpoC 基因的突變好發片段(hot spot)，再進行定序，以評估每一株多重抗藥性菌株的 rpoA 與 rpoC 基因突變情形。另外一方面，我們使用 spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats (MIRU-VNTR)方法，為所有的多重抗藥性結核菌株進行基因分型，如果有相同的 spoligotyping 與 MIRU-VNTR 基因分型，我們會再利用 IS6110-Restriction fragment length polymorphism (RFLP)的方法，以判定結核菌株的基因分型。有相同的 spoligotyping, MIRU-VNTR 與 IS6110-RFLP 基因分型的結核菌株，會被定義為群聚型個案(clustered cases)，而 spoligotyping, MIRU-VNTR 與 IS6110-RFLP 基因分型不完全一致的結核菌株，則會被定義為獨立型個案(isolated cases)。本研究的 primary endpoint 是比較 clustered cases 與 isolated cases 的 rpoA, rpoC 基因突變的比例有無差異，並使用 multivariate analysis 方法，分析合併 rpoA, rpoC 基因突變是否是與 clustered cases 相關的臨床獨立危險因子。本研究的 secondary endpoint 則是分析合併 rpoA, rpoC 基因突變的多重抗藥性結核菌株的臨床特色，如胸部 X 光表現是否合併開洞，病人痰液抹片的菌量多寡、是否合併肺外結核等。

本研究共分析 137 株來自加州地區與 40 株來自德州地區的臨床多重抗藥性菌株，有 92 位男性與 81 位女性(4 為性別不明)，平均年齡為 38 歲，病人中 106 位 (59.9%) 為亞洲人，64 位為白人，其中有大多為拉丁裔，46 人曾經有結核病治療病史，5 人

有 HIV，22 人有過量飲酒的情形。在基因突變分析的部分，我們在 56 個菌株發現 62 個 rpoC 基因突變，全部都是 point mutations，其中包含 25 個 synonymous mutations 與 37 個 non-synonymous mutations，容易發生突變的熱點(hot spot)包括 codon 542 (23 株)、codon 483 (13 株)與 codon 466 (6 株)，不過在 condon542 所發生的突變都是 synonymous mutations，我們也發現了三個 point mutation: D271G、A466V 與 L507V 是之前的文獻未曾報告過的。rpoA 的部分，我們在 4 個菌株中發現 4 個 rpoA 基因突變，全部都是 non-synonymous mutations，4 個突變分別發生在不同的位點，其中 T127A 是之前的文獻未曾報告過的。整體而言 rpoA 基因突變的比例並不高，而 rpoC 基因突變的機會雖較高，但有相當比例為 synonymous mutation，而且沒有特定的基因突變熱點。

我們也針對這 177 株菌株進行 spoligotyping 與 RFLP 基因分型。根據 spoligotyping，這 177 株菌株中有 70 株(39.5%)為 EastAsian lineage、70 株(39.5%)為 EuroAmerican lineage、35 株(19.8%)為 IndoOcenic lineage。我們定義有完全相同的 spoligotyping 與 IS-6110 RFLP 基因分型的菌株為群聚菌株，也就是代表有新近的結核菌傳播，根據這個定義，我們共發現 24 個菌株分布在 7 個群聚(cluster)中，其中有 5 個群聚是來自加州的菌株，有 2 個群聚是來自德州的菌株，共有 5 個群聚包含 4 個菌株，另外有 2 個群聚包含 2 個菌株。整體的 clustering rate 是 13.6%，而新近傳播指數(recent transmission index 則為 0.096)。

我們進一步分析 rpoA, rpoC 基因突變與群聚多重抗藥性結核菌株的相關性，我

們發現在 24 株群聚菌株中，12 株(50%)合併有 rpoC 基因突變，沒有 rpoA 基因突變，而在 153 株非群聚菌株中，44 株(28.8%)合併 rpoC 基因突變，4 株(2.6%)合併 rpoA 基因突變，rpoC 基因突變與結核菌株的群聚有顯著的相關性( $p=0.042$ )。

我們分析病人的臨床特色，發現與結核菌株群聚相關的臨床因子包括過去結核病史 ( $p=0.211$ )，過量酒精使用 ( $p<0.001$ )，與群聚相關的臨床因子除了 rpoC 基因突變外，EastAsian lineage ( $p=0.005$ )也是顯著的危險因子。在多變項分析中，我們發現與多重抗藥性結核菌新近傳播相關的獨立危險因子有 rpoC 基因突變 ( $p=0.009$ )，EastAsian lineage ( $p<0.001$ )，與過量酒精使用 ( $p=0.001$ )。

本研究的結果證實了我們的臨床假設：compensatory mutation 有可能彌補多重抗藥性菌株因為抗藥性基因突變所導致的 fitness cost，增加抗藥性菌株生長的能力，進而使得抗藥性結核菌傳播的能力上升，因此相關的 compensatory mutation 將是我們將來進行結核病傳播研究是必須一同考量的因素。此外，我們也發現 EastAsian lineage 是抗藥性結核菌新近傳播非常重要的危險因子，這在以北京株為主的台灣地區也將是非常值得我們重視的問題。

### C. EuroAmerican lineage 對結核病接觸者感染的影響

EuroAmerican lineage 是歐美地區最主要的結核菌基因型，不過根據我們在臺北榮總研究，台灣地區大約也有 20~25%的結核菌株屬於 EuroAmerican lineage。在 EuroAmerican lineages 之中，我們又可以根據 RD219, RD145, RD183, RD115, RD122,

RD193, RD174, RD231, RD724, RD761 的有無，將 EuroAmerican lineages 分成許多不同的 sublineages。根據過去 UCSF 針對舊金山地區有關 EuroAmerican sublineage 對結核病傳播的研究，他們發現 sublineage RD183 較易出現結核病群聚(clustering) 的現象，顯示不同的 EuroAmerican sublineages 對疾病的傳播性可能並不一樣，另外一個由美國 CDC 所進行的多國結核病藥物研究也發現，EuroAmerican sublineages RD724 的治療反應較其他的 EuroAmerican sublineage 與其他 main lineage 來得差，痰液陰轉率較低，這些證據顯示不同的 EuroAmerican sublineages 不論是在臨床表現或是在疾病傳播的致病性上可能都是有差異的。因此，我們收集了舊金山地區感染 EuroAmerican lineages 的活動性結核病人的接觸者檢查資料，研究的目標是分析不同的 sublineages 是否對造成接觸者感染的機會有差異，同時也分析感染不同 EuroAmerican lineages 的活動性結核病人的臨床差異。

我們回溯性收集了舊金山地區從 2008 年到 2012 年共計 173 位感染 EuroAmerican lineages 的活動性結核病人，以及這些病人的接觸者共 3956 人，其中有 6 位活動性結核病人跟與其相關的 122 位接觸者因為感染的 EuroAmerican sublineage 是 mixed infection 所以被排除。病人的新近感染(recent infection)是使用 TST 或是 IGRA 進行檢測，同時我們定義病人必須過去曾經有過陰性的 TST 或 IGRA 檢測紀錄，而這次接觸過後呈現陽轉的情形，我們才定義為新近感染。在所有的接觸者中有 2346 人因為缺乏完整的新近感染檢查結果而被排除。因此最後進入我們統計的病人包括了 134 位活動性結核病人以及與其相關的 1488 位接觸者。

在 134 位結核病人中，感染 RV-like sublineage 的病人數最多，其次是 RD219。黑人有較高比例感染 RD183 sublineages，白人較高比例感染 RV-like 與 RD115 sublineages，亞洲人則是較高比例感染 RV-like 與 RD145 sublineages。此外，RD183 sublineages 有較高比例出現群聚的情形。在接觸者中，有 569 位接觸到 RD219 的病人，有 426 位接觸到 RV-like 的病人。在全部 1488 位接觸者中有 79 位出現 TST 或是 IGRA 陽轉的情形，符合新近感染的定義，整體的新近感染率是 5.3%。不同 sublineage 的新近感染率有很大的差異，RD145 的新近感染率最高，達 15.7% (11/70)，RD183 其次，達 10.3% (19/185)，RD174 的新近感染率是 0，但是只有 21 位接觸者，可能代表性不足，RD219 的新近感染次低，是 1.8% (10/569)。若以單變數廣義估計方程式 (Generalized estimating equation, GEE) 進行分析，RD145 會顯著增加新近感染的機會 ( $p=0.011$ )，而 RD219 則顯著下降新近感染的機會 ( $p=0.042$ )。

我們也分析與新近感染相關的臨床因子，使用 Univariate GEE 分析下，我們沒有找到任何指標個案相關因子與新近感染有顯著的相關，而在接觸者的部分，我們發現男性、抽菸者、飲酒過量者、有接觸一個以上活動性結核病患者以及接觸時間較長者，都與新近感染有顯著的相關。

我們接著使用 Multivariate GEE 進行分析，除了前述的顯著相關因子外，我們也加入了活動型結核病人的痰液抹片結果進行分析，從我們的多變數分析發現，與接觸者新近感染顯著相關的因子包括 RD219 感染 ( $p=0.018$ ) 男性 ( $p=0.046$ )、接觸一個

以上活動性結核病患者 ( $p=0.003$ )、接觸時間超過 30 天( $p<0.001$ )、抽菸 ( $p<0.001$ ) 與過量飲酒 ( $p=0.042$ )。

我們的研究檢視不同的 EuroAmerican sublineage 確實在臨床表現上會有相當程度的差異，我們也發現不同的 sublineage 對疾病傳播的影響是不一樣的，RD219 感染所造成的新近傳播顯著低於其地的 sublineages。另外一個值得注意的部分是雖然 RD183 較易造成群聚，但卻沒有顯著的增加感染的機會，顯示潛伏結核感染與活動性結核病發病可能是經由不同的致病機轉，值得我們更進一步的研究。

### C. 使用 SMAP 與 RPA 進行結核菌快速診斷與抗藥性偵測研究

使用分子生物技術進行致病原的快速檢測已經目前臨床檢驗的主流，其中使用聚合酶連鎖反應 (PCR) 更是目前最常使用的方法，其快速準確的優點已經不需贅述。但傳統 PCR 方法最大的缺點是需要建置與維護 thermocycler，同時由於傳統 PCR 方法需要反覆的升降溫以進行核酸的 denature, annealing 與 elongation，因此一個完整 30~40 個 cycle 的 PCR 反應往往需要 3~4 小時的反應時間，在時效上仍然有相對不足之處。近年來，所謂的恆溫式核酸擴增反應(isothermal nucleic acid amplification)逐漸發展，已經有多種的 isothermal PCR 逐漸進入臨床應用。Isothermal PCR 的好處有三，首先是因為是在恆溫的環境下進行擴增反應，不需要反覆加溫減溫，因此可以在一般的水域槽內進行反應，不需要特別購置 thermocycler。第二個好處是由於少了反覆加溫降溫的過程，整個核酸擴增的反應時

間縮短許多。第三個好處則是由於 isothermal PCR 的核酸產物會成為類似花椰菜的結構，因此敏感性與特異性都會比傳統的 PCR 反應更佳。我這次在 UCSF 的進修期間，也有幸參與實驗室中正在進行的兩種 isothermal PCR 方法。

恆溫式圈環形核酸增幅法(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)，藉由作用溫度於 60-65°C 與具高 DNA strand 置換能力的 DNA 聚合酶，整個 DNA 擴增可以在 60-65°C 的溫度下持續進行，其恆溫擴增的特性使得操作步驟變得簡單，作用時間較短，約只需使用 35-60 分鐘，由於特殊的引子設計會形成環型構造類速花椰菜結構的 PCR 產物，因此可以獲得更高的專一性與敏感性，還可以利用 magnesium pyrophosphate 產生沈澱的方式，或利用 SYBR Green I 螢光顯色的方式，來使用肉眼判定核酸擴增結果，比起傳統 PCR 需使用跑膠方式判讀結果便利許多。但仍然有其專一性的限制。近年來在改良 LAMP 的引子設計後，又發展出了所謂的 SMAP (Smart Amplification Process)，在進行恆溫擴增時使用一種特殊的蛋白質：TaqMuts，TaqMuts 會辨識並附上 mismatch 的 DNA 序列並阻止其發生 dissociation，使 DNA 聚合酶無法進行後續的 DNA 聚合反應，達到減少不必要的背景核酸擴增的目的。此外，使用不對稱的內引子(inner primer)，包括 turn-back primer (TP)與 folding primer (FP)，其中 turn-back primer 的設計與 LAMP 是類似的，但 folding primer 的 5' 端則會因為 self-annealing 而形成髮夾狀，此外還需要設計 booster primer (BP) 以及兩個 outer primers (OP1, OP2)，因此一個完整的 SMAP 共需要五個引子。

我們與 Livermore National Laboratory 合作，收集不同類型的分枝桿菌菌株，



包括常見的非結核分枝桿菌 (non-tuberculosis mycobacterium): 如 *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium marinum*, 以及不同基因型的標準結核菌株 (*Mycobacterium tuberculosis*), 包括 H37Rv, CDC1551, HN878, 以及臨床收集的多重抗藥性結核菌株, 我們目前針對結核菌的鑑定, 已設計 12 組不同的引子, 並已測試其中 9 組引子組合對偵測與鑑別結核菌與非結核分枝桿菌的能力, 我們使用 real-time PCR 方式進行核酸產物偵測, 一次完整的核酸擴增反應須時約 90 分鐘。在目前所測試的引子設計中約有半數的引子可以準確的區分結核菌與非典型結核菌, 但是還需要多次反覆的測試更多的臨床結核菌株與非典型分枝桿菌, 以找出診斷效果最一致的引子, 整合出符合臨床需求的快速檢驗方法。由於目前都還是使用結核菌培養後經萃取的 DNA 進行實驗, 因此 DNA 量較多, 有利於方法學的建立, 等到確認具潛力的引子後, 接下來還要使用臨床病人的臨床檢體, 如痰液、腦脊髓液、肋膜液等進行測試, 以評估臨床的應用價值。

我另外一個有參與的 isothermal PCR reaction 實驗是 Recombinase Polymerase Reaction (RPA)。RPA 的主要特色是在反應的過程中除了原本的 polymerase 外, 另外還加入 recombinase 與 single strand DNA binding protein(SSB)三種 enzyme。Recombinase 的功用主要是去連接 primer 並協助打開 double strand DNA, 使 primer 可以順利接上 target region, 而被分開的 template 會形成 D-loop single strand

DNA，藉由 SSB 的幫忙，可以使 single strand DNA 保持穩定，最後再藉由 polymerase 的幫忙完成核酸擴增。由於有 recombinase 的存在，不需要高溫的環境即可打開 double strand DNA，因此可以在恆溫的環境下進行核酸擴增，反應的時間可以縮短到 20 分鐘，而作用的溫度一般是 37~39°C。RPA 產物的檢測方式可以使用 exo probe system 再藉由 real time PCR machine 偵測螢光的方式來評估反應進行的情形。

#### D. 臨床學習

舊金山總醫院是舊金山治療結核病的重鎮，也是整個加州地區治療結核病的重點醫院，在舊金山總醫院旁還有一個負責美國西岸地區結核病相關人員訓練的 Curry International Tuberculosis Center。每個星期，舊金山總醫院的結核病房都會舉行結核病例討論會，討論結核病相關的困難診斷與治療個案，以及與結核病基礎或臨床研究相關的研究討論會，還會有一次與結核病有關的期刊討論會。在 Curry International Tuberculosis Center 部分，每個月會舉行整個西岸地區的多重抗藥性結核病討論會。我由於在 UCSF 待了兩年的時間，因此也有幸能參加由 Curry Center 主辦的 Intensive TB clinical training course，連續 3 天的課程，包含了結核病在全球與美國的流行病學，active TB 以及 latent TB infection 的診斷與治療，也涵蓋了負壓實驗室與結核病門診設置與規劃的重點說明，內容可說是相當的豐富而充實。參加的人員來自美西許多重要的醫學中心與第一線的公衛人員，彼此互相分享臨床防疫工作的心得，也是很重要的收穫。

而在胸腔重症科的部分，每周也會有一次的臨床胸腔科病例報告，討論一周來特殊的胸腔科病人或重症案例，疾病包羅萬象，也有機會看到台灣地區比較少見的個案，內容可說相當有趣，此外每周也有一小時的胸腔研究報告，由各個院區的主治醫師、研究醫師與各實驗室人員報告正在進行中的臨床或基礎研究，研究範圍相當廣泛，也有機會可以聽到各個胸腔科領域如慢性阻塞性肺病、氣喘、間質性肺病、肺炎等領域最先進的基礎研究與進度，內容也是非常豐富，每次參加都有非常多的收穫。

申請人在延長進修期間，除了進行實驗室的研究外，也在加州大學舊金山分校的指導教授 Dr. Payam Nahid 與 Dr. Midori Kato-Maeda 的指導下，參加這些教學訓練活動，同時觀察結核病人的臨床治療與潛伏結核感染相關診斷及治療的過程。

### 三、心得

感謝臺北榮民總醫院提供的機會以及胸腔部的推薦，讓我有機會前來美國進修。加州大學舊金山分校是一所只有醫學院的大學，在美國也是排名前十大醫學院，舊金山總醫院雖然只是加州大學舊金山分校的一個院區，但在結核病研究有非常長遠的歷史，也營造了非常好的結核病研究環境，能夠到這裡進修，實在是很難得且寶貴的機會，在異地外國生活一段時間，對本人來說也是很特殊的人生體驗，更讓自己的語文能力有所提升。總結這次的進修，有以下幾點心得

#### 1. 研究需要團隊

舊金山總醫院雖然只有 500 床，胸腔重症科的主治醫師人數也不及臺北榮總胸腔部，但以結核病為主要研究目標的醫師就有六位主治醫師與三位研究醫師，而且形成一個強而有力的團隊，彼此的研究計劃都有參與，積極提供意見，因此研究的能量非常強大。除了醫師外，舊金山總醫院胸腔重症科本身還有專職的流行病學專家與統計學專家，也都會固定參與研究會議並進行討論，提供諮詢，協助醫生可以使用更高階的統計技巧進行分析，為研究加分，這樣的環境令人十分羨慕。

#### 2. 研究需要多領域參與

這次前來進修，也定期參與舊金山總醫院結核病研究團隊的研究會議，發現參與研究會議的人員不是只有舊金山總醫院的醫師，更多的是舊金山地區或加州地區負責結核病防治的公衛人員，或是 Curry International Tuberculosis Center 的相關人員，他們除了坐在台下參與，也會定期報告他們目前正在進行的計畫，徵詢大家的意

見。此外，由於灣區地區還有兩家著名的學府:UC Berkeley 與 Standford，因此與 UC Berkeley 或是 Standford 跨院校跨科系的合作非常普遍，其中也不乏與諾貝爾獎等級教授實驗室的合作，像是與電機系或是生物資訊領域的合作，都可以讓研究的範圍更寬廣，而不是落入臨床醫師狹小的視野，也讓研究的主題更先進，更具競爭性。

### 3. 研究需要時間

美國的醫學中心醫師，有所謂的研究型主治醫師制度，他們的工作以申請計畫進行研究為主，除了每個星期一次的門診外，一年內負責病房病人照顧與查房的時間約為兩周，剩下的時間都用於研究，出國進行國際研究合作的次數更是頻繁，這樣的投入，所能產出的研究成果自然不是像台灣的醫學中心醫師所能比擬的，這樣的醫師也更能產出兼具基礎與臨床的研究論文成果。以台灣目前的醫療制度，大概很難讓醫師能夠有 50%以上的工作時間用於研究，如何設計制度，讓有潛力的醫師可以減少臨床工作，也讓對臨床工作有興趣的醫學中心醫師專心做臨床服務，不必為了做研究而研究，產出量多但質不精的論文，仍然是值得我們努力的方向。

### 4. 政府機構的參與

結核病的研究中，政府其實可以扮演重要的角色，每一家所能收治的病人或收集的菌株是有限的，絕大部分的個案資料或是臨床菌株都還是掌握在政府單位，如果能夠讓醫師與政府單位成為密切合作的夥伴，對結核病的研究會是很大的助益。舊金山總醫院的研究團隊與加州地區的防疫單位，或是美國 CDC 的工作人員，就有非常好的合作關係，了解彼此所擁有的資源，聯絡管道非常暢通，溝通非常及時，美國 CDC

對於醫師所需要的菌株，也有時間進行準備與提供，不會浪費時間在所謂公文往返上，這牽涉到制度的設計，但確實可以讓研究的能量獲得很大的提升。

#### 四、建議事項

一年的進修時間其實是非常短暫的，完全沒有可以虛耗的空間，但一家人從台灣前來美國，每件事情都需要打理，前一個月的安頓，加上最後一個月的回台準備，中間可以真正專注在實驗研究的時間，又變得更少了。在舊金山這段時間，也有機會認識到其他醫院前來進修的醫師，部分醫院會支持醫師進行兩年的進修。其實對一個完整的研究計劃來說，兩年的執行時間可能都還不是很足夠，很慶幸目前醫院能夠有尹書田基金會提供經費補助，讓我們有機會可以進行兩年的進修研究，但若能在一開始的時候就確定是一年或兩年，對研究計畫的擬定會更有幫助。

也由於時間的有限，與進修醫院的指導教授的事前溝通變得非常重要，及早準備相關的背景知識，甚至在國內就先針對相關的研究技術進行初步認識與操作，都可以縮短前期的準備時間。但計畫趕不上變化，原本談定的研習計畫，也可能會因為經費的因素發生改變，如我原本設定的巨噬細胞免疫研究部分就因為經費申請未通過而無法執行，因此到了出國前才又更改研究方向，要重新準備相關的背景知識，閱讀相關的期刊資料，也會耗去一些時間，儘管如此，事前的溝通越完整，來美國後時間的運用就會越有效率。

目前在結核菌的臨床診斷與治療上，仍有許多等待突破的關鍵點，這次的進修機會，除了增進申請人在相關領域的視野與研究能力外，更重要的是針對國外目前尚在起步階段的相關研究技術進行學習，並於進修結束後將相關技術引進本院，在院內進行後續的研究發展，不但能夠提升結核病人的照護品質，也能增加臺北榮總的結核病

研究能量。因此，再次感謝院方與尹書田基金會提供我第二年延長進修的機會與補助，讓此次進修的成果更完整豐富，也能對院內與國內的結核病臨床照顧與基礎研究的進步有所貢獻。