

出國報告（出國類別：進修）

結核感染之早期快速診斷及風險預測

服務機關：臺北榮民總醫院胸腔部呼吸感染免疫科

姓名職稱：潘聖衛主治醫師

派赴國家/地區：美國/加州大學聖地牙哥分校

出國期間：110年11月01日至111年10月31日

報告日期：111年11月28日

摘要（含關鍵字）

結核病仍是全球重要的傳染性疾病，美國有許多跨國研究致力於了解結核病盛行地區的結核病流行病學，並發展相關的診治工具。加州大學聖地牙哥分校胸腔、重症、睡眠醫學暨呼吸生理科(Division of pulmonary, critical care, sleep medicine and physiology)研究風氣盛行，包括許多結核病的跨國及跨領域合作，故選擇赴美出國進修學習結核感染之早期快速診斷及風險預測研究方法。

研究參與方面，主要是鑑別肺結核及潛伏結核感染相關之診斷生物標記，進行跨國合作之臨床資料分析；實驗室方面，則加入一項新型之結核病診斷晶片的驗證及發展研究。臨床見習方面，雖適逢新冠肺炎變異株流行期，進修研究員到醫院見習不易，仍積極爭取參與胸腔科門診見習，觀摩該院在非結核分枝桿菌肺病的診療模式，依然收穫良多。

關鍵字：

肺結核(pulmonary tuberculosis)

潛伏結核感染相關(latent tuberculosis infection)

生物標記(biomarkers)

血液結核菌抗原(Mycobacterium tuberculosis antigen CFP10 in serum)

非結核分枝桿菌肺病(Nontuberculous Mycobacterial lung disease)

目次

一、	目的	p3
二、	過程	p3
三、	心得	p6
四、	建議事項	p7
附錄		p9

一、目的

據估計，全球約有三分之一的人口感染結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)，但大多數受感染的人仍然健康，維持在潛伏結核感染的狀態(Latent tuberculosis infection)，並沒有發病為活動性結核(active tuberculosis)。然而，接觸到肺結核病患而得到潛伏結核感染者，終身約 5-10%的發病機會，尤其是剛感染的前幾年，所以在結核病的接觸者篩檢有無潛伏結核感染，並及早提供預防性治療便有其重要性。全血丙型干擾素檢驗(Interferon-gamma (IFN- γ) release)是現有用來檢測有無潛伏結核感染的測試，但仍無法有效區別潛伏結核感染及活動性結核，或做為接觸者未來發病風險的預測工具。臨床上，非結核分枝桿菌肺病(nontuberculous mycobacterial lung disease)和活動性結核也不易區別，需等待耗時的培養結果做為鑑別，除了對非結核分枝桿菌肺病的臨床診治方法，國內相關照護的經驗也相對少於美國外，相關可以快速輔助鑑別診斷結核及非結核分枝桿菌肺病的血液生物標記目前也不多。所以，探索有潛力的生物標記來區別結核病及其他診斷或預測發病風險，甚至發展新型的檢測工具來診斷結核病或預測治療反應，是目前結核病研究的重點。

美國加州大學聖地牙哥分校(University of California, San Diego)位於加州南部，為全美公立大學排名前十分之一的大學，其醫學中心之醫療評比也位居加州排名第五名。其中，加州大學聖地牙哥分校的生醫研究是全美排名第 7，醫院的胸腔科評比更是位居全美國之第 9 名。加州大學聖地牙哥分校胸腔、重症、睡眠醫學暨呼吸生理科(Division of pulmonary, critical care, sleep medicine and physiology)研究風氣盛行，包括有許多結核病的跨國及跨領域合作。其中 Timothy Rodwell 教授及 Antonino Catanzaro 資深教授的研究團隊，在美國結核病的研究領域中表現傑出，近十年來每年都有 1-2 項的美國國家衛生研究院同時進行當中，有常年執行多國及跨領域結核研究的經驗。此次於 110/11/1-111/10/31 期間公費出國進修一年，目的即學習國外結核病相關的醫學合作研究，故選擇跟隨 Timothy Rodwell 教授，進行相關臨床研究及檢測晶片的實驗，旨在學習結核感染之早期快速診斷及風險預測。此外，於進修期間經由 Antonino Catanzaro 教授推薦，參與非結核分枝桿菌相關研究討論會議，並在 Wael ElMaraachli 醫師之非結核分枝桿菌肺病門診見習，觀摩其臨床醫療診治模式。

二、過程

此次出國進修共計一年，相關研究內容依實際赴美後的進度分成三個面向敘述：

(一) 報到、初期研究及實驗訓練：

於 111 年 10 月底到美國加州大學聖地牙哥分校，安排好住宿事宜，隨即向醫學院胸腔科 Timothy Rodwell 教授實驗室報到。Rodwell 教授的實驗室成員共有臨床醫師三位、助理教授研究人員二位、技術人員二位、研究護士與研究生各一位，每一個

成員有至少一個以上的獨立研究計畫。此次出國進修因為適逢新冠肺炎盛行期間，所以實驗室相關的研究人員進出實驗室多所限制，需每週進行新冠肺炎 PCR 檢測陰性證明才能入實驗室，因此在到達美國進修之前，便和 Rodwell 教授討論進修計畫並多次修訂，所以報到後的前半年，主要進行的生物標記資料分析及基本的實驗操作技術學習。

首先，職將在國內進行分析中研究帶來 Rodwell 教授實驗室求教，該研究是在分枝桿菌感染者進行粒腺體之游離去氧核糖核酸檢測，研究假設粒腺體之游離去氧核糖核酸是一個發炎反應指標，可能可用來區別活動性結核及潛伏結核感染與非結核分枝桿菌感染。開始三個月，就在 Rodwell 教授主持每週例行的研究會議報告及實驗室團隊討論中收到很多建議，針對粒腺體之游離去氧核糖核酸與結核病診斷的相關性有了更好的分析成果。此外，新增細胞實驗，證實細胞在受到結核菌抗原刺激後粒腺體之游離去氧核糖核酸分泌會增加。Rodwell 教授指導下，也分析出結核治療前粒腺體游離去氧核糖核酸濃度與治療反應的相關性。這研究看到了粒腺體游離去氧核糖核酸是有潛力可區別結核病及其他診斷的生物標記，也能預測治療反應，目前研究也順利發表(Front. Immunol., November 2022, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1040947>)，期待後續能在國內做多中心的驗證研究。

經由上面這個研究跟實驗室討論互動之後，Rodwell 教授正式分配一項結核病跨國研究的題目給我。Rodwell 教授於 2018 年開始和歐洲國家摩爾多瓦(Moldova)的國家結核病研究計畫中心合作，針對肺結核病患及其接觸者進行收案追蹤，至 2021 年底已有約 1500 名收案數。摩爾多瓦是結核盛行率高的國家，目前結核接觸者沒有例行做潛伏結核檢測及給予預防性用藥的國家方案，而本研究為結核病患及接觸者，以第四代的全血丙型干擾素檢驗 QuantiFERON-TB Gold Plus 做接觸者的潛伏結核檢測。在 Rodwell 教授指導之下，前半年的進修研究，即著重於分析 QuantiFERON-TB Gold Plus 檢測中 CD4 及 CD8 細胞之丙型干擾素的反應和結核接觸者臨床特徵的相關性，及結核接觸者在一開始及 6-12 個月後的檢測結果的變化。更重要的是，在一開始潛伏結核檢測陰性的接觸者(即沒有被感染者)，也發現到的初始的 CD4 及 CD8 細胞丙型干擾素反應，可以預測後續 6-12 個月後的檢測由陰性轉陽性，而丙型干擾素反應由陰性轉陽性正是結核病發病的超高風險族群，該研究的發現指出新一代的 QuantiFERON-TB Gold Plus，在納入 CD8 細胞丙型干擾素反應後，有預測未來發病風險的潛在價值。目前已將此研究資料都分析完成，職擔任第一作者並在返國前一個月完成論文書寫，目前已在投稿出去送審中。

因上述二個研究，有包括定量即時聚合酶鏈鎖反應(Quantitative polymerase chain reaction)及酵素連結免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，在能進實驗室的時間都把握來學習相關驗技能，資深的技術人員 Dr.

Peter Chiles 很用心指導，在前半年把重要的操作技能都訓練起來，為下半年的實驗打下基礎。

(二) 檢測晶片實驗進行：

Rodwell 教授實驗室在 2021 年即有前導研究(pilot study)發表，指出檢測血中之結核菌特定抗原 CFP10 (10kDa culture filtrate protein)，可以輔助診斷是否為結核菌感染，而這個後續驗證實驗是要看結核病治療過程 CFP10 的濃度變化。如大家所知，診斷活動性肺結核需要痰液或肺部檢體的培養結果作為依據，但培養需耗時數週，在小孩或無法咳痰者也不易取痰化驗，所以若能檢驗血液中是否有結核菌特定抗原將是一大利器。但 CFP10 在血中濃度極低，為克服檢測的敏感度，Rodwell 教授和該校奈米工程研究所(Department of Nanoengineering)的 Joseph Wang 教授開發了一項在晶片上進行三明治酵素連結免疫吸附法(Sandwich ELISA)檢測 CFP10，利用 bioelectronic tuberculosis antigen (BETA) assay 晶片原型(prototype)，測得有否微量電流變化來定量每個血清檢體中的 CFP10 濃度，希望用生物電化學方法來提高其敏感度。

據 Joseph Wang 教授在其實驗室進行實驗的結果，職與研究團隊首先在 Rodwell 教授實驗室嘗試重現實驗結果，首先由 Joseph Wang 教授部門印製晶片供我們測試，經歷二個月的操作化學藥品配製、優化晶片上的反應膜(self-assembled monolayers)及添加檢測液(包括 Capture antibody、配製標準品或血清樣本及 Detecting antibody)的學習，才能利用研究的晶片原型做出標準區線(standard curve)及重現部份實驗結果。其次，職與研究團隊發現，其前置作業需為每個晶片固定導線，但可能造成晶片刮傷而影響電流，更有檢測耗費大量人力及相關操作流程不順暢等問題，所以重新設計晶片成為可直接讀取而不需一個一個固定導線的晶片。所以在最後四個月，共計完成檢測約 15 位患者在其治療 6 個月內各 9 個採血時間點的血清樣本，即樣品三重覆 ($15 \times 9 \times 3 = 405$)及每次對應的標準區線($15 \times 5 \times 3 = 390$)的檢測操作共有近 800 次操作。但初步分析結果看到 CFP10 濃度與各個時間點帶菌量相關性不如預期良好，可能是納入研究個案是多重抗藥性結核患者，CFP10 濃度下降在前 6 個月不明顯，另外是該晶片印製設計端仍有品質的差異，後續有待團隊同仁再接再勵修改相關的反應材料及實驗流程。回國之後會再與 Rodwell 教授聯繫，預計和國內生醫材料科系合作，使用不同的檢測材質及方式，做其他體液的 CFP10 電化學反應的檢測分析。

(三) 臨床見習及會議參與

Antonino Catanzaro 教授除了是美國加州大學聖地牙哥分校胸腔科帶領結核研究的資深教授，更對非結核分枝桿菌臨床診治的課題很有研究，他曾是非結核分枝桿菌診治指引的作者群，也帶領 Wael ElMaraachli 醫師專門做非結核分枝桿菌肺病患

者的照護，因為職在臨床上對非結核分枝桿菌臨床診治很有興趣，所以赴美之前就有計畫要來參加相關的門診見習。但赴美期間適逢新冠肺炎變異株流行期，進修研究員要到醫院見習不易，直到下半年才有機會爭取到參與胸腔科門診之見習。ElMaraachli 醫師每週一下午的非結核分枝桿菌肺病門診一般預約 8-9 人，看診前會在醫師討論室和住院醫師討論病人此前的檢驗報告及治療情況。接著他會領著住院醫師及醫師助理到診間看已在診間內等候的患者，除了傳統的口服藥物治療，也會安排吸入型藥物治療(3% NaCl 或 Antibiotic Inhalation)及肺復原與運動計畫，也會安排助理說明相關可能有幫助的臨床試驗。看完患者後醫師回討論室，大家再一起分享討論，職在觀摩該院在非結核分枝桿菌肺病的診療模式，收穫良多。

此外，職也參與 Antonino Catanzaro 教授主持的每月一次的非結核分枝桿菌肺病研究會議，並多次在會議中報告在台灣進行的非結核分枝桿菌肺病研究成果。職也利用於美國進修期間，參加 2022 年美國胸腔醫學會於加州舊金山舉辦之胸腔醫學年會 (American Thoracic Society-2022 in San Francisco, May 13-18, 2022)，並在會中口頭報告非結核分枝桿菌肺病相關研究成果，獲得大會頒發 International Trainee Scholarship Award (May 14, 2022)。在會議會中，也有機會和許多研究結核病及非結核分枝桿菌肺病的學者交流，收穫甚豐。

三、心得

在美國加州大學聖地牙哥分校進修期間，觀察到 Timothy Rodwell 教授實驗室一直有研究成果並非偶然，因美國大體上結核盛行率低，而為了要有個案可收案研究，Rodwell 教授積極利用跨國合作研究，在結核病盛行率高的國家收案，包括歐洲國家摩爾多瓦及美洲的墨西哥等國，再把檢體送回美國國內作實驗檢測，故可累積大量的結核病患檢體。接者，透過不同實驗室的分工合作，把檢體送到不同學校及不同州的合作實驗室，擴大收案後的研究量能。而視訊會議中，皆有固定負責記錄及追蹤的技術人員，加上 Rodwell 教授有效率的主持會議，總是能抓住重點並分工追蹤進度，在一小時內常完成多項討論，值得學習。此次，職參與的檢測晶片實驗因有獲得一些寶貴的實驗經驗，團隊尚有後續研究要進行，Timothy Rodwell 教授及計畫主持人 Marva Seifert 教授，也邀請參與美國國家衛生研究院計畫的申請，可見他們對訪問學者持著開放的心態來合作，值得讚許。

這次有幸也能參與臨床門診的見實，了解其胸腔科門診個案預約一個下午約 8-9 位患者，有助理會打理看診後的檢查單安排，主治醫師相對有時間討論個案，審視治療計畫。和 ElMaraachli 醫師相討論也才知道，胸腔科主治醫師工作採輪替制度，一年約有十幾周的時間至加護病房輪值，所以其他時間除了門診外，則可以專注在研究事務上。反觀國內醫師臨床及行政工作繁重，每日可以進行研究的時間相對是片斷的時間，更常要犧牲家庭時間，相信這是留在醫學中心的主治醫師們共同的挑戰。

此次出國進修期間，適逢新冠肺炎全球流行，來到美國後又遇到變異株流行，所以剛赴美時的環境適應真的不太容易。在防疫方面，一開始有每週要 PCR 檢測陰性才能進實驗室的要求，所以需利用得來速的方式開車去醫院特定的停車場，進行在車內的採檢。動線明快，一般早上採檢，下午就可以利用學校的 app 檢到檢測結果，全部免費，算是十份便民的做法。在實驗室則全年全程戴口罩，要用午餐則要到戶外，或單獨一人在室內。雖然在異鄉要隨時做防疫的心情壓力也不小，所幸進修期間一切平安健康，也順利把握住了機會全時學習。

四、建議事項

首先，在美國加州大學聖地牙哥分校進修期間，感受到國外學術及臨床單位之間的跨院、跨國甚至跨領域的合作風氣很盛，這樣才有機會有效率地收集個案及檢體以進行研究，更能加速醫學的臨床應用度。以國內的結核研究為例，因為全國病例數在下降之中，個別醫院進行收案研究有其難度，若能多院合作，例如北區醫院和花東地區醫院合作，相信案例累積會更快。但目前有關跨院合作的方法及進行方法，少有學者之分享介紹，期待有更多學者能分享相關經驗，讓好的研究題材有機會快速入列，提升國內的跨院甚至跨領域的合作量能。職也期待能和 Rodwell 教授實驗室保持聯繫，有機會進行跨國的合作，例如針對住院結核病患是否能檢測尿液中的 CFP10 做為治療應的評估，在加州大學聖地牙哥分校醫學中心可能少有這類患者，但在台北榮總的結核病負壓病房，則有能力收案來執行這項研究，是一個互惠的合作機會。

其次，藉由參訪該院胸腔科的非結核分枝桿菌肺病門診，認知道非結核分枝桿菌肺病患者也有需要一個完整的團隊來照護。目前台灣的非結核分枝桿菌肺病患者發生率逐年增加，但診斷治療都有其很大的限制，如分枝桿菌菌種的鑑定及抗生素的敏感試驗都不是例行作業，因為不像結核會傳染，醫師對患者有否非結核分枝桿菌肺病的關注度也不高，但長期不治療下來，患者肺部的併發症會一一出現而預後不良。如果能有一個分枝桿菌診治中心，有胸腔科醫師及感染科醫師參與照護，討論誰的病程惡化風高需要開啓治療，加上微生物科或胸腔科進行菌種及抗藥基因的檢測、臨床藥師做藥物副作用評估、呼吸治療師投入肺復原及吸入性藥物的使用教學等及個案管理師的追蹤，也許能提升非結核分枝桿菌肺病的照護品質，是職返國後和科內師長應共同努力的目標。

再者，出國進修一年需要的準備作業很多，初次出國常需要有經驗的前輩經驗分享，如果國內能有個資訊網站可以提供給需要出國進修的學者參考，知道某研究機構的某位前輩也是去過拿個單位進修，就能直接以電子郵件詢問聯絡，也許可以事半功倍。以職為例，是到學校宿舍知道有台灣來進修學者也在加州大學聖地牙哥分校，可以請教生活的大小事，如果早有此類資訊，也許會縮短初到國外的適應時間。最後，十分感謝院方針對出國進修期間的薪資補助在近年有所增加，對進修醫師於國外生活

開銷有一定的幫助，期望能夠貢獻所學，回報醫院國家的栽培，以嘉惠結核病及非結核分枝桿菌肺病的病友們。

附錄

Prof. Timothy Rodwell 實驗室成員合照



參與美國胸腔醫學會(ATS-2022 in San Francisco)口頭發表(Oral Presentation)並獲得 International Trainee Scholarship Award (2022-05-14)



加州大學聖地牙哥分校醫學中心胸腔科非結核分枝桿菌肺病特別門診參訪見習



研究論文獲得接受刊登發表

 Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 15 November 2022
DOI 10.3389/fimmu.2022.1040947

 Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Esaki M. Shankar,
Central University of Tamil Nadu, India

REVIEWED BY
Vignesh Ramachandran,
University of Kuala Lumpur, Malaysia
Vladimir M Pisarev,
Federal Research and Clinical Center
of Intensive Care Medicine and
Rehabilitation, Russia

*CORRESPONDENCE
Jia-Yih Feng
peterofeng@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 09 September 2022
ACCEPTED 31 October 2022
PUBLISHED 15 November 2022

Circulating mitochondrial cell-free DNA dynamics in patients with mycobacterial pulmonary infections: Potential for a novel biomarker of disease

Sheng-Wei Pan^{1,2,3}, Rehan R. Syed⁴, Donald G. Catanzaro⁵, Mei-Lin Ho^{6,7}, Chin-Chung Shu^{8,9†}, Tsung-Yeh Tsai^{1,2}, Yen-Han Tseng^{1,2}, Jia-Yih Feng^{1,2*†}, Yuh-Min Chen^{1,2}, Wei-Juin Su¹⁰, Antonino Catanzaro⁵ and Timothy C. Rodwell⁵

¹Department of Chest Medicine, Taipei Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan, ²School of Medicine, National Yang-Ming Chiao Tung University, Taipei, Taiwan, ³Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Department of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA, United States, ⁴Division of Infectious Diseases and Global Public Health, University of California San Diego, La Jolla, CA, United States, ⁵Department of Biological Sciences, University of Arkansas, Fayetteville, AR, United States, ⁶Department of Chemistry, Soochow University, Taipei, Taiwan, ⁷Department of Chemistry and Biochemistry, University of California San Diego, La Jolla, CA, United States, ⁸Department of Internal Medicine, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, ⁹College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ¹⁰Division of Chest Medicine, China Medical University Hospital, Taipei Branch, Taipei, Taiwan