

第九章 結核病的分子診斷技術

目前臨床上診斷結核病的方法，主要靠塗片耐酸性染色鏡檢及結核菌培養，方法雖然簡單，但是塗片檢查的敏感度(Sensitivity)只有 50%至 60%，通常在 1mL 的痰檢體中，需要至少一萬隻的結核菌，才可以在顯微鏡下被發現。致於結核菌培養方法，其特異性雖然很高，但是需要至少六到八週的時間才能得到確定診斷，在時效上幫忙不大，且在培養過程中發生任何變化皆可能導致無法確定診斷，而影響臨床診斷與治療。

最近發展出來的診斷方法，BACTEC，利用含具有放射性碳-14 之軟酯酸(^{14}C -palmitic acid)，代謝後產生 $^{14}\text{CO}_2$ ，可快速偵測結核菌的存在，雖然是個不錯的方法，但是由於所產生的放射性廢棄物不易處理，且仍需要藉助傳統的染色鏡檢及養菌方法以確定診斷，目前未被廣泛應用於臨床檢驗。其他如利用免疫血清反應偵測結核菌之抗原、抗體，雖然快速，但是由於結核菌感染可誘發多種不同的抗原及抗體，其敏感度與特異性仍不盡理想。此外尚有許多的新方法陸續被推出，如 MGIT 快速培養方法逐漸受到重視，雖然效果不錯，但是由於費用昂貴，目前在臺灣僅有少數醫療單位使用。因此，為有效掌握結核病患，加強結核病的防治工作，我們需要改進已使用多年的傳統塗片染色鏡檢及結核菌培養，研發更快速、準確的診斷方法，以提早發現結核病例，鑑定感染菌種，評估對藥物之抗藥性，及早給予適當的治療。近年來，分子生物學技術的發展，聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)與核酸探針(DNA probe)的應用，可直接從檢體中測出分枝桿菌的 DNA 或 RNA，大幅縮短了診斷的時間。而限制酵素片段長度多型性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)提供快速準確的菌種分型資料，對結核病之流行病學具臨床價值。利用這些方法臨床醫師可以從各種檢體中直接偵測出結核菌的感染，及早給予病人適當有效的治療。

一、PCR 在結核菌診斷的應用

將分子生物學技術應用於結核病的診斷是近十年來的事，早期利用標記放射性元素之核酸探針(DNA probe)進行雜交反應(hybridization)，需要約

至少 2×10^4 個結核菌才能偵測出來，其敏感度與一般傳統方法差不多，因此並不被重視。聚合鏈酶反應 (PCR) 是一種以核酸生物化學為基礎的分子生物學診斷技術。利用這種技術，吾人可從極少量的臨床檢體中分離出結核菌的核酸，再以特定的核酸片段作為連鎖反應的引子 (primers)，在試管內反覆進行 (1) 變性 (Denaturation)、(2) 鍛化 (Annealing)、及 (3) 延伸 (Extension) 等三個步驟，經過 30 至 40 回反應後，可複製得到約 10^6 個相同的核酸片段。這些 PCR 產物用 ethidium bromide 染色後，以電泳分離，可在洋菜凝膠上辨視出來，或以南方墨跡轉漬 (Southern blotting) 到雜交膜上，再以特定之探子進行雜交檢驗。使用 PCR 方法，吾人可以輕易的由各種檢體中偵測到結核菌的存在，這是過去用傳統方法不易作到的。PCR 自 1989 年應用於結核病的診斷以來，立即成為結核病細菌學診斷領域中備受關注的焦點。經過多年的努力累積了大量的資料和經驗，技術方法不斷改進，其反應靈敏、特異、快速的特性在多數報告中已得到肯定。目前已有許多針對各種特定結核菌核酸片段所合成的引子被運用於結核病的診斷，其中 IS6110 為結核菌特有的重複序列，在結核菌基因組中具有 10~20 個拷貝，敏感度相對地提高許多，是設計結核菌 PCR 檢測方法的首選基因。PCR 的技術操作並不複雜，但是由於對技術質量的要求很高，且因 PCR 產物的污染而導致的偽陽性率 (約 1-2%)，與因標本中抑制物質存在而導致的偽陰性等問題，以及各種 PCR 缺乏標準化等因素皆是影響 PCR 結果可信度的關鍵。雖然如此，PCR 技術的高敏感性、高特異性、高再現性、簡便、快速等優點，是診斷結核病的一項重要工具。至今已開發出許多新的高敏度和高特異性的 PCR 方法，如反轉錄 PCR 法、巢式 PCR 法、單管巢式反轉錄 PCR 法、即時螢光 PCRE、多重式 PCR 等，在一定程度上提高了 PCR 方法的敏感性和特異性，可使聚合酶鏈反應技術成為一項理想的診斷方法，造福更多的病人。

二、限制酵素片段長度多型性 (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)

由於結核病的流行再次對今日的公共衛生造成不可忽視的威脅，欲有效控制結核病的流行，首先必須快速掌握感染源，確定診斷後給與有效的治療。然而，傳統鑑定菌種主要靠區別菌叢形狀及不同的生化反應，通常需要 4 到 6 週或更長的時間，且特異性不高，若使用藥物試驗方法鑑定，

則需要再等 2 至 4 週才能得到結果，不具時效性。

RFLP 方法利用限制酵素切割多變重覆序列片段旁，兩邊固定的切位(其切位不可在重覆序列內)。由於重覆序列數目不同，所產生的 DNA 片段長度就不同，經 DNA 電泳分離可在不同位置上產生不同大小的核酸片段，藉由這些電泳圖上所產生的限制酵素片段長度多型性是否相同或相似來幫助判斷不同來源之 DNA 的差異與否。最近以結核菌獨有的 IS6110 片段為標記探針之 RFLP 方法是目前應用於流行病學及院內感染的研究，最常被應用的分型方法。雖然如此，此法仍有許多地方急待改進，如缺乏專一可靠的基因片段作為分析的對象，及尚無統一的操作方法，以致無法比較不同來源的結果，其中最大的問題即需要大量的核酸才能切割出清楚的圖譜，因此無法直接分析臨床檢體。近年來，由於 PCR 的應用，吾人可以從極少量的檢體中複製出大量具特定序列的核酸以供分析，顯著地提高了 RFLP 的臨床價值。藉由 PCR-RFLP 方法鑑定各結核菌種基因序列的異同，吾人可以省略費時、費力的養菌步驟，快速準確的掌握感染原，鑑定感染原間的相關性，建立地方性的菌種資料，是控制傳染病的流行及院內感染管制不可或缺的重要方法，近來逐漸受到廣泛的重視，認為此法敏感度高，且較傳統生化方法省時、省力，對提升結核病的防治與公共衛生的品質將有極大的助益。

三、目前應用核酸擴增技術(Nucleic acid amplification, NAA)之常用分子檢驗試劑

(一) Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test 或 E-MTD

這項檢驗是利用複製 RNA 的原理，以結核菌的 rRNA 為偵測對象，採用 TMA(Transcription-Mediated Amplification)方法複製 rRNA，及 HPA (Hybridization Protection Assay)技術偵測複製出的 RNA 產物，最後再以 Gen-Probe luminometer 來測定雜交探針上 acridinium ester 所釋出的冷光信號，可直接檢測出臨床檢體中的結核菌存在。E-MTD 擁有相當不錯的敏感性和特異性，對於呼吸道檢體的敏感度可達 90.9%~95.2%，特異性約 98.8%~100%，尤其對於塗片染色鏡檢為陰性的檢體，其敏感性高達 83%~100%。檢體經過標準去污染方法處理過後，利用 E-MTD test 只須耗時 2.5 個小時即可得到結果。目前

經美國「藥物與食品管理局」(FDA)核准，配合細菌培養方法，使用於診斷臨床未接受抗結核藥物治療的病人，此法同時適用於塗片染色鏡檢為陽性及陰性的呼吸道檢體之檢測。

(二) The Roche Amplicor Test

這項檢驗試劑是利用 PCR 複製 DNA 的方法及核酸雜交技術，直接偵測臨床檢體中的結核菌。整個實驗包含了四個主要的步驟：檢體的處理、標記 Biotin 的引子來進行 DNA 複製放大、再與特定的核酸探針進行雜交、最後利用呈色反應，在波長 450 nm 下測其吸光值來偵測結果。整個試驗從處理過的檢體開始，約需 6.5 小時，其特色是利用 dUTP 代替原有的 dTTP，及添加 Uracil-N-glycosylase 酵素，可避免因實驗操作時造成污染而出現偽陽性；另外因含有 internal control，可防止在 PCR 複製過程中，因含有抑制物而影響 PCR 反應，導致偽陰性的結果出現。美國 FDA 在 1996 年核准上市至今，其臨床評價與 MTD 相近。但由於對耐酸性染色鏡檢呈陰性的檢體檢出率偏低，美國 FDA 建議 Amplicor test 的檢測目前只能用染色鏡檢為陽性的呼吸道檢體。

目前這兩種方法皆僅適用於呼吸道檢體，雖然有些文獻報告使用在非呼吸道檢體的檢驗上，但結果不盡理想。此外，由於這些分子檢驗技術敏感度高，使用者必須提供充份的臨床資料，再配合實驗室細菌學檢查的結果，才能作最後的判斷。

四、臨床上的判斷與應用

根據美國 FDA 的建議，臨床上檢測結核菌的痰檢體，需取自三個不同的採集日期，並分別做染色及培養。取第一個檢體，或第一個染色呈陽性的檢體進行核酸擴增技術(NAA)；如果有需要，則再收集另一套檢體作確認。如果第一套檢體染色及 NAA 檢查皆呈陽性，則可確認為結核感染。若塗片染色呈現陽性，但是 NAA 檢查呈陰性，則必須檢查是否因 PCR 反應中含有核酸複製的抑制物所引起。若無抑制物的影響，且重複另一套檢體的結果亦呈陰性，則可推測病人可能感染非結核性的分枝桿菌 (*nontuberculosis mycobacteria*, NTM)。若塗片染色呈陰性，但 NAA 檢查呈

陽性的情形，則必須再做另一套檢體，如果得到相同結果，則可推論此病人極可能感染結核病。最後，如果兩者皆為陰性，則表示這個病人並無感染的癥兆。然而，單靠 NAA 結果並不能將病人為活動性結核帶原者的可能性完全排除，最後診斷仍需要仔細評估臨床症狀的嚴重度與感染結核病的可能性，以及是否接受藥物治療等因素考慮進去。尤其是當分子檢驗結果與臨床症狀不一致時，病人的臨床病情是否高度懷疑結核感染是判讀 NAA 結果與決定後續處置的重要依據。

五、結論

雖然分子檢驗技術可提高結核病診斷的速度，但它仍不能取代傳統的抗酸性染色鏡檢及結核菌培養方法。主要原因是目前多數 NAA 方法只針對結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis complex*)的診斷而設計，至於其它的非結核分枝桿菌(NTM)及藥敏試驗，還是得仰賴傳統培養方法來確定診斷。由於 NAA 方法無法區別所測得的菌體為活菌或死菌，因此它也無法用來評估治療的效果，尚必須根據病人的臨床症狀，才能進一步解讀 NAA 檢驗的結果。目前診斷結核菌的分子生物學方法很多，雖然能對部份分枝桿菌進行快速診斷，但仍缺乏統一的標準化方法，致使每個實驗室之間的資料無法進行比較。今後，如何針對分枝桿菌設計出一套全面性、準確且更有效率的方法，將是未來發展 NAA 方法所要努力的方向。

分子生物技術的領域十分浩瀚，在結核病的應用多數仍屬於起步階段，本文僅介紹兩種最常用的方法，供大家作為參考，希望不久的將來，吾人可以發展出更快速、更準確的新方法，使結核病的診斷更上一層樓，則杜絕結核病的夢想即可早日實現。