

生物標記的進展 以輔助結核病的診斷

■ 樹金忠 台大醫院創傷醫學部、台大醫學院醫學系內科

✦ 摘要

即使許多實驗室方法已經開發，用以加速活動性結核(TB)的診斷，但是結核病的延遲診斷在臨床醫學中仍然是一個重要的問題。在臨床上，若遇到有疑似活動性結核但都沒有決定性的檢驗結果或是仍在等待漫長的培養報告時，生物標記可能有助於給予臨床診斷上支持或排除的輔助。要能妥善應用這些生物標記，良好的理解以及熟知其限制是非常重要的。本綜述以當前有用及有驗證的的生物標記加以探討，並著重於潛伏性結核感染、活動性肺結核、和結核胸腔積液的應用為主。

✦ 緒論

結核病仍然是世界上最致命的傳染病之一，據世界衛生組織估計，在2013年有900萬新發病例和150萬病人死於結核。雖然實施直接觀察治療能迅速減少患者活動性結核病的感染，但患者仍然會在治療前造成傳染。此外，延誤診斷更會使得TB的預後不良。但是，診斷總是很不容易，特別是在早期階段，因為臨床的變化大和非特異性的表現，這在塗片陰性的結核患者早期檢測是更困難的，因為他們的臨床檢體是低菌量的，但卻也不可忽略是因為塗片陰性的結核患者也會造成一部份的接觸者感染。

這些年實驗室檢驗的進步，從臨床標本快速分離結核菌，能縮短診斷時間的等待是一個重要的里程碑。此前，結核病診斷的黃金標準 - 結核菌培養，是利用固體培養基，一般需要四到八週的生長時間。目前利用螢光BACTEC技術(BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube [MGIT] 960系統)，結核菌培養的結果可以較早就有報告，但仍需要一至三週。這種自動系統能夠培養和同時檢測960個檢體，大大減少了常規的實驗室工作。

然而，無論是結核菌或非結核分枝桿菌都可以在MGIT系統培養呈現陽性。這強調了MGIT960系統檢測的螢光信號僅意味著一些微生物生長。這並不一定意味著結核菌存在於臨床檢體中。因此，當患者的臨床檢體在MGIT960系統培養陽性時，仔細的臨床判斷和進一步鑑定的結核菌的抗原或核酸擴增檢測是要考慮。

另一個檢驗的里程碑，是從臨床標本快速檢測結核菌。結核菌的去氧核糖核酸、核糖核酸和蛋白質都可被用作為標靶進行檢測。因為結核菌的任何臨床標本的數量通常比任何檢測方法中的閾值要低得多，”放大”應始終為快速和直接檢測的第一步。目前，核酸增幅試驗(Nucleic acid amplification test, NAATs)是從臨床標本快速檢測結核桿菌的常用方法。在一般情況下，NAATs對於塗片陽性的呼吸道標本具有高度的陽性和陰性預測值。因此，它們經常被用來確認或排除結核病的診斷。至於塗片陰性呼吸道標本的患者，NAATs只使用在肺結核被高度懷疑時。目前用於檢測結核菌基因的多重巢式聚合酶鍊式反應已被合併到免疫色層分析，可如驗孕棒般方便地測試痰液並且有98%的特異性。此外，GeneXpert為直接痰液的分子測定，可提高結核病的診斷率，提早抗藥性結核的治療，尤其是建議在HIV病友或塗片陰性但培養陽性的族群，文獻認為可降低不必要的經驗治療。但是在臨床使用上，NAAT可能會被標本不足、實驗室污染、不適當的處理等因素影響其效果。

因此，光靠快速分離和快速偵測結核菌的工具仍是不足的，在懷疑結核病但仍在等待檢驗結果或是所有結核檢驗結果皆呈陰性時，生物標記在這臨床的窘境下提供進一步的臨床輔助(圖1)。生物標記代表了人體對致病菌的宿主反應，可以讓臨床醫師判斷是否支持結核病的可能性，並提醒是否進一步的檢查是需要的。在此，我們主要針對生物標記對於潛伏性結核感染、活動性肺結核、和結核胸腔積液的應用討論。

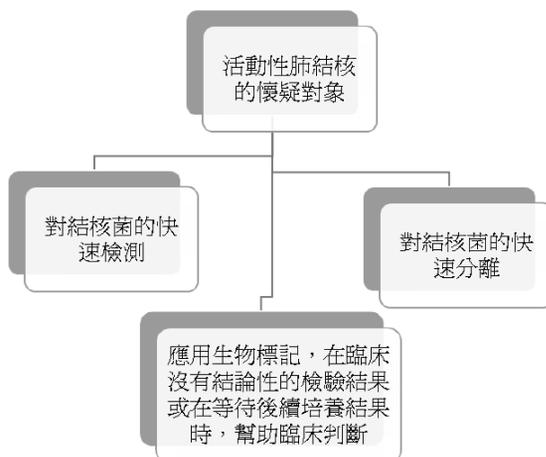


圖1
生物標記對於疑似活動性肺結核患者的使用角色。

✦ 應用在潛伏結核感染的生物標記

為防止進一步結核病傳播，控制應著重於潛伏結核感染(latent tuberculosis infection, LTBI)。以前的研究顯示，大約10%的潛伏結核感染患者會發展為活動性結核，這在免疫受損的宿主身上將是更高。在人類中，T細胞是針對結核菌最重要的防禦機制，目前以皮膚結核菌測驗(tuberculin skin test, TST)和丙型干擾素釋放分析(interferon-gamma [IFN- γ] release assay, IGRA)，是目前應用檢測T細胞對結核菌反應來診斷潛伏結核感染普遍使用的方式。

在最近十年中，兩種IGRAs已被開發並商業化，用結核菌特異抗原刺激T細胞，所產生的IFN- γ 反應量來作判斷。其中IFN- γ 是以酵素免疫吸附試驗(ELISA)檢測的是QuantiFERON-Gold In-tube(QFT-GIT)，或以酵素免疫點漬法測定的T-SPOT TB。所使用的兩個結核菌特異抗原，分別是ESAT-6和CFP-10，是由結核菌RD1基因所產生。RD1基因區域並不存在所有可用的卡介苗疫苗株，也沒有在大部份的非結核分枝桿菌，在台灣這施打卡介苗的地區，是可有效增加特異性。雖然IGRA是有潛力的，它是否能在臨床實用中取代TST需要進一步實證。但是IGRA在臨床上使用的重要限制是無法區分單純的潛伏結核感染或是活動性結核；另一方面，IGRA結果陰性不能完全排除活動性結核病的可能性。

✦ 應用於活動性肺結核的生物標記

血液生物標記

在一般情況下，血清炎症標記值在肺結核患者的水平是比社區型肺炎的為低。這些標記已經被報導的包括了前降鈣素(procalcitonin)、介白素(interleukin, IL)-10和C反應蛋白。雖然血清炎症標記的水平是在肺結核和一般細菌性肺炎之間有顯著不同，但是炎症的生物標記的水平低較不具特異性，不容易在臨床上應用。因此，一個整合的模型，包括潛伏性結核感染試驗，炎症反應、臨床/放射學結果的資料，可能是比單項測驗來的適當。



由於前述的潛伏結核感染是一個高危族群的代表，所以在一個潛伏結核感染族群中作生物標記的測量將更有意義，但目前的文獻仍是有限的。在結核病的發病機制，巨噬細胞是結核菌進入呼吸道的第一道防線。而結核菌在人體組織持續感染的一個重要機制，是結核菌感染的巨噬細胞的死亡是以壞死為主要形式，而不是細胞凋亡。對於相關的細胞凋亡生物標記，最

近的研究顯示了誘餌受體3(DcR3)和前列腺素E2的血清值，在由LTBI比起TB病患是會有增加的趨勢，但是脂氧素(Lipoxin)則是降低的趨勢(Shu et al., BMC Infect Dis. 2013; 13: 45)。DcR3蛋白是腫瘤壞死因子受體的家族，可結合Fas配體的受體，被認為是一種免疫調節。而兩個脂質的標記物，PGE2和脂氧素，當感染造成巨噬細胞的凋亡時，細胞凋亡相關的生物標記在血清中的改變與結核菌感染狀態的不同，有獨立預測的能力因素。



在結核菌特異性CD4+ T細胞調查，流式細胞儀檢測發現腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 單陽性之結核菌特異性CD4+ T細胞，是活動性疾病診斷的一個強有力的預測(Pollock KM et al., J. Infect Dis. 2013; 208: 952-68.)。一個驗證的研究表明，其敏感性和特異性分別為67%和92%，而陽性預測值為80%，陰性預測值為92.4%。因此，單陽性的TNF- α 在結核菌特異性的CD4 + T細胞的比例可能對於活動性結核病的快速診斷是一個新的參考。其它文獻中也顯示了相似的結果。但是，這種組合方式，現在需要大規模前瞻性研究的驗證。

其它的生物發炎指標，包括血清細胞因子如IL-2、IL-9、IL-13、IL-17、TNF- α 也已被報導作為輔助生物標誌物，但仍缺乏進一步驗證。另外，對於血清學的結核菌抗體，雖然許多商業化的抗體檢測已經開發並上市銷售，但是大部份臨床驗證通常是不存在而且目前許多的測試性能是不一致的。

痰中的生物標記

血液中的生物標記，可能容易受到全身炎症或感染的影響。而痰是來自於肺結核病灶部位，將會是更加直接。一個有吸引力的測試為痰尿素酶(urease)檢查，尿素酶的基礎診斷要點是人類缺少尿素酶，所以結核尿素酶的特異性可以增加。在其他報告，肺結核可能會改變在呼氣揮發性有機化合物；結核硬脂酸(TBSA)則可能是另一種痰中的生物標記。

尿液生物標誌物

尿代表一個臨床樣本，很容易從成人和兒童收集，並已被廣泛用於評估幾個抗原和DNA檢驗。市售測定法能夠檢測在肺結核病患尿中的脂阿拉伯甘露聚糖

(lipoarabinomannan, LAM)，雖然本測試的敏感性在非HIV感染患者是一直令人失望，但在HIV感染晚期患者卻具有中度敏感性和高特異性，雖然原因尚不明確，但這對HIV感染晚期的免疫不全宿主，卻是多了一個快速篩檢的方式。

✦ 結核性胸腔積液的生物標誌物

結核胸腔積液(Tuberculous pleura effusion, TPE)佔所有形式結核病約5%，並且是第二常見的肺外結核。早期的TPE常常是困難和延遲的。因為胸腔積液分枝桿菌培養，需要數週的時間，而且只有40-63%的TPE會培養陽性，因此在胸水內的免疫生物標記就因應被發展出來協助TPE的臨床診斷，這些標記包括了肋膜腔內的IFN- γ 和IFN-誘導蛋白-10(IP-10)，以及腺苷脫氨酶(ADA)都是已被報導對TPE的診斷有用的標記。另外，可溶性Fas配體(FasL)是從T淋巴細胞釋放對結核菌感染的巨噬細胞有細胞殺毒作用，也被報導對TPE診斷有幫助。在最近的文獻中，邏輯性回歸分析顯示IFN- γ ≥ 75 pg/ml，ADA ≥ 40 IU/ml時合併DcR3 ≥ 9.3 ng/ml和可溶性腫瘤壞死因子受體1(TNF-SR1) ≥ 3.2 ng/ml的模組，是可協助TPE的判斷，改善單一生物標記的低敏感性。根據上述四個預測的預測概率，最佳的預測值有82.9%的敏感度和86.7%的特異性(Shu et al., *Respirology*. 2015; 20: 147-54)。

✦ 結論

肺結核的診斷，近年來在結核菌快速分離和快速檢測技術發展下持續進步。然而，因為結核菌的培養仍然需要一至數週，而快速偵測則是在痰塗片陽性病例才有較大的臨床幫助，使得在肺結核這樣表現千變萬化的疾病中，延誤診斷仍然不少見。因此，生物標記在檢驗結果無結論，又不能排除結核病的模糊地帶時，具有重要的輔助作用，可幫助制定最佳的臨床決策。例如像IGRA可協助定義結核菌感染，而輔以其它生物標記判斷活動性疾病的可能性。這意味的是在診斷結核病時，整合臨床線和實驗室結果，並且輔以生物標記，將可能是比單一培養結果更實用。

