

核酸擴增技術在結核病診斷的應用與進展

中國醫藥大學附設醫院 台北分院胸腔內科主治醫師 蘇維鈞 教授
中華民國防癆協會 理事

目前我們正面臨新冠肺炎嚴峻的疫情，在安全有效的疫苗與藥物治療下，快速篩檢確診個案是防疫最重要的一個關鍵，而目前通用的方法以 real-time RT-PCR 核酸檢測為主。這項技術即是分子診斷的一種，在結核病的診斷方法中也是最主要的診斷方法之一。談到結核病的分子診斷，大家一定先想到聚合酶鏈反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，早期還曾經被人誤稱為 CPR (心肺復甦術)，讓人啼笑皆非。然而，今日 PCR 已廣泛應用於結核病的診斷，且被疾病管制署在結核病診治指引中推薦的標準流程，建議所有高度懷疑的個案，初痰必須同時送檢 PCR，以及早發現具感染性的個案。

PCR 是什麼時候成為診斷的工具？

在 1980 年代中期，Erich 博士、Kary Mullis 博士和他們的 Cetus 同事率先開發了聚合酶鏈反應 (PCR)，簡化了對基因組信息的獲取，促進了基礎研究和從臨床診斷到法醫分析的各種應用，該技術應用於鎌狀細胞性貧血的診斷，於 1985 年底首次發表在《科學》雜誌上，並在 1986 年首次使用 PCR 進行 DNA 檢測在法醫學應用。在獲得適當的專利後，經過多年來取得的進展，例如自動寡核苷酸合成儀的發明，PCR 終於可以轉化為實用的實驗室方法。羅氏分子系統公司最終以 300,000,000 美元的價格從 Cetus 購買了 PCR 專利和相關技術。1989 年 1 月 15 日，開發 PCR 技術的體外人體診斷產品和服務。

PCR 何時開始應用在結核病診斷？

在聚合酶鏈反應 (PCR) 技術問世後，由於其速度、特異性和敏感性，人們對開發核酸擴增的診斷技術給予了最大的關注。針對特定結核菌基因片段，利用自動化和半自動化分枝桿菌 DNA 檢測儀，使用 PCR 可以擴增細菌或病毒的核酸，即使它們的濃度很低，也可以不經培養檢測到它們的存在，有助於早期發現傳統診斷工具無法實現的疾病。誰是第一位使用 PCR 診斷結核病的人無法考證，搜尋文獻紀錄大約在 1990 年開始有相關論文發表¹。PCR 檢測是迄今為止可用於診斷從臨床疑似結核病患者獲得的所有類型標本中的高度敏感和特異性工具，無論是肺部還是肺外，並且可以可靠地用於快速鑑定結核菌。

PCR 在台灣的進展

我踏入結核病的領域就從 PCR 開始，時間拉回 1990 年代，當時在台灣分子生物技術尚未廣為人知，在一次與北榮同事閒聊他在美國進修的心得時，意外地談到了 PCR，經進一步請教後，得知此項技術即體外的核酸複製，主要應用於致癌基因的研究，當下突然一個念頭閃過腦海，是否此項技術也可以應用到結核病的診斷？當時有關 PCR 診斷結核病的研究資料不多，最早在台灣發表這方面研究是長庚醫院團隊，在 1990 年使用自行設計的 PCR 引子與探針，證實利用 PCR 技術可以準確鑑定結核菌 (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*) 與 NTM2，可惜他們沒有持續相關的研究報告，台灣也沒有人從事相關的研究。於是，在 1991 年我到美國哈佛大學公衛學院開始我的 PCR 之旅，學習 PCR 的理論與實驗室操作，將相關技術帶回台灣，經多次的測試後，1996 年在台北榮總首次開放臨床診斷結核病，並在 2000 年發表自行設計的「巢式 PCR」(Nested PCR)³，2001 年運用結合等位基因特異性 PCR (allele-specific polymerase chain reaction; AS-PCR) 與多重 PCR 檢測，利用引子與模板之間的鹼基錯配可以有效地抑制 PCR 反應，進而達到鑑定結核菌 (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium*

bovis) 及卡介苗 (BCG) 的目的 (圖一)³。然而，這段期間推廣 PCR 診斷並不是一帆風順，在當時台灣結核病發生率偏高 (72.5/105, 2005)，記得每次在學會報告時，許多前輩認為傳統塗片鏡檢與培養便宜又好用，做 PCR 太貴，偽陽性又高，無法取代傳統微生物檢驗。早期 PCR 檢測因核酸萃取、擴增核酸標的、設計的引子、偵測方法缺乏統一標準，導致檢測結果差異性大。直到商用套組問世後，提升技術品質，經不斷的改進，目前在台灣較常用的核酸擴增 (NAA, Nucleic acid amplification) 檢測有包括 Roche Cobas Amplicor 結核分枝桿菌檢測 (Amplicor) (Grenzach-Whylen, Germany) 和 Xpert MTB/RIF 檢測 (Xpert) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)。Amplicor 以結核菌 16S 核糖體 RNA 為擴增標的基因片段診斷 MTBC，它可以鑑定結核菌與 NTM，但無法偵測抗藥菌。Xpert 檢測 *rpoB* 基因的 81 bp 片段診斷 TB，並同時進行利福平 (Rifampicin) 抗性決定區域內的突變以檢測利福平抗藥性。在台灣 NAA 通常用在痰塗片陽性病例以排除 NTM。2013 年世界衛生組織推薦 Xpert，結合傳統初痰塗片與培養作為診斷的標準流程，台灣疾病管制署也將此策略在「結核病診指引」中建議。最近台灣發表的一項多中心研究，比較三種 NAA (Amplicor, Xpert, In-house PCR) 的表現，發現各種測試 NAA 整體

表現沒有顯著差異，惟 Amplicor 用於初痰的敏感性較第二線使用時低，三種 NAA 在診斷痰塗片陰性檢體的敏感性偏低⁴。

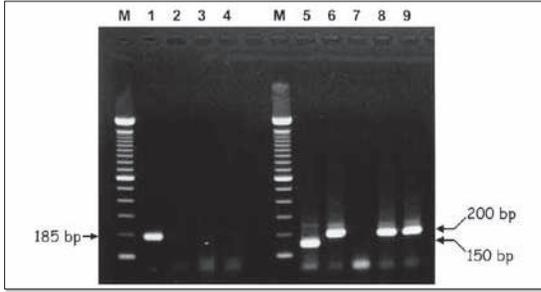
NAA 診斷結核病的困境與進展

核酸擴增技術 (NAA) 對於不易培養或培養方式複雜且作業耗時的病原體 (如結核桿菌)，可提供更快速、更靈敏且專一性更好的檢測結果，讓臨床醫師儘快得知結果以做為治療的參考，且 NAA 對於無法利用血清免疫反應檢測，甚至具高傳染風險的病原體也是一項相當理想的選擇。雖然 NAA 可提高結核病診斷的速度，但目前仍無法取代傳統的抗酸性染色鏡檢及結核菌培養方法。主要是因為目前多數 NAA 方法是針對結核分枝桿菌複合群的診斷而設計，對於鑑定多數非結核分枝桿菌 (NTM) 及藥敏試驗，仍需仰賴傳統培養方法來確定診斷，同時 NAA 無法區分測得的核酸分子是來自活菌或死菌，因此它也無法用來評估治療的效果。這些問題在 Xpert 已有大幅改善，它的操作簡單，在初痰其診斷的敏感性整體來說可以達到 85.1%，特異性 98.1%，在痰陰檢體其敏感性也有 32.1%，特異性 99%，較傳統塗片鏡檢診斷率高，適合在第一線診斷使用⁵。此外，Xpert 亦能同時偵測 rifampicin 的抗藥性，敏感性與特異性分別為 94% 與 98%。但 Xpert 仍有一些

問題，如 Xpert 陽性但是最後不是結核病，以及 Xpert 的 rifampicin 抗藥性呈現陽性但最後傳統藥敏為 rifampicin 敏感等問題，常造成診斷上的困擾，大量使用對診斷治療的影響，亟需更多的研究評估。

結語

核酸擴增技術 (NAA) 是目前最常用分子檢驗方法，可達到快速診斷、早期治療的目的，提供給臨床醫師快速且正確診斷肺結核病的參考依據。但受限於各方法的敏感性與特異性的差異，及健保給付與技術設備要求等因素，目前尚不能完全代替傳統的結核病檢驗方法，至今傳統的塗片抗酸染色法和分離培養法仍為結核病主要檢驗方法。基於 Xpert 的診斷準確性遠高於顯微鏡鏡檢且能快速獲得結果，採用 Xpert 代替塗片顯微鏡檢查，應用在第一線診斷，對結核病患者預後的影響，需要更多的經驗。不正確的結核病診斷可能導致焦慮和不必要的治療。不同的結核病 NAA 診斷技術各有特點，同時也存在各自的不足與局限，在全面衡量技術性能、生物安全和經濟能力的基礎上，發展和推廣適合各個國家和地區實際需要的分子診斷技術，才能發揮 NAA 診斷技術的優勢，讓核酸擴增技術早日成為結核病診斷的新標準。



▲ 圖一、(泳道 1 至 4) 等位基因特異性檢測 (allele-specific *pncA* method for MTB)，(泳道 5 至 9) 偵測 RD1 基因片段的多重聚合酶鏈反應 (PCR) (RD1-based multiplex PCR)。150 bp: BCG, 200 bp: Mtb/Bovis, 185 bp: Mtb



▲ 攝於哈佛大學圖書館，1993 年



▲ 攝於哈佛大學公衛學院，1992 年



▲ 獲得台北榮總醫療創新獎，2000 年

參考文獻

1. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1990;161(5):977-981.
2. Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990;28:1877-1880.
3. Su WJ, Tsou AP, Yang MH, Huang CY, Perng RP. Clinical experience in using polymerase chain reaction for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Zhonghua yi xue za zhi = Chinese Medical Journal; Free China ed*. 2000 Jul;63(7):521-526. PMID: 10934804.
4. Su WJ, Huang CY, Huang CY, Perng RP. Utility of PCR assays for rapid diagnosis of BCG infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5:380-384.
5. Huang WC, Lin CB, Chien ST, Wang JY, et. al. Performance of Nucleic Acid Amplification Tests in Patients with Presumptive Pulmonary Tuberculosis in Taiwan. *Infect Dis Ther* (2022) 11:871-885.