

結核菌藥物感受性試驗 判讀標準的省思

結核病抗藥情形日益嚴重，導致治療時可使用的藥物越來越受限。2010年，全球至少有650,000多重抗藥性病例，對於最有效的第一線藥物都具有抗藥性。到了2012年，甚至在印度出現對目前所有藥物都具抗藥性的菌株。

由於這種多重抗藥性或廣泛抗藥性結核菌株日益增加的情況，臨床上必須在治療前得知藥敏試驗的結果，以確保治療的效果，也避免篩選出對更多藥物具有抗藥性的菌株。同時，藥敏試驗的正確性及再現性也非常重要。可惜，根據世界衛生組織跨國的研究結果發現，streptomycin及ethambutol的一致性非常低，只有92%，世界衛生組織也因此對ethambutol, pyrazinamide及大多數的二線藥物提出警告。而這樣的結果可能是因為目前廣泛採用的藥敏試驗分界點(breakpoint)原則是有問題的。

藥敏試驗分界點(breakpoint)是用來將細菌分類為SIR的系統，亦即「敏感性(S, susceptible)，臨床可能有效機率高」(wild-type MIC distribution內)、「中間值(I, intermediate)臨床使

用可能有效」以及「抗藥性(R, resistant)臨床使用有效機率低」。在結核菌，一般都不用「I」。

肺結核菌的藥敏試驗分界點(breakpoint)一般稱為「critical concentration」，定義為「在野生型(從未暴露於藥物)的細菌中，能抑制95%(或pyrazinamide是90%)的最小濃度，同時不能抑制抗藥性菌株(從對該藥物治療無效之病人分離的菌株)」。這樣的定義本身就存在兩個問題：1. 自動將5%野生型菌株歸類為抗藥性菌株(如果是pyrazinamide就是10%)。2. 結核病的治療準則是「結合多種藥物治療」(combination therapy)，因此無法得知使用單一種藥物的臨床效果。因此，對於目前常用的藥物，藥敏試驗breakpoint大多由臨床共識而來，並無實證醫學的證據支持。目前世界衛生組織說明「由於藥敏試驗breakpoint大多非常接近最小抑菌濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)，敏感或抗藥類別歸類錯誤機率增加，導致藥敏試驗再現性不佳」。

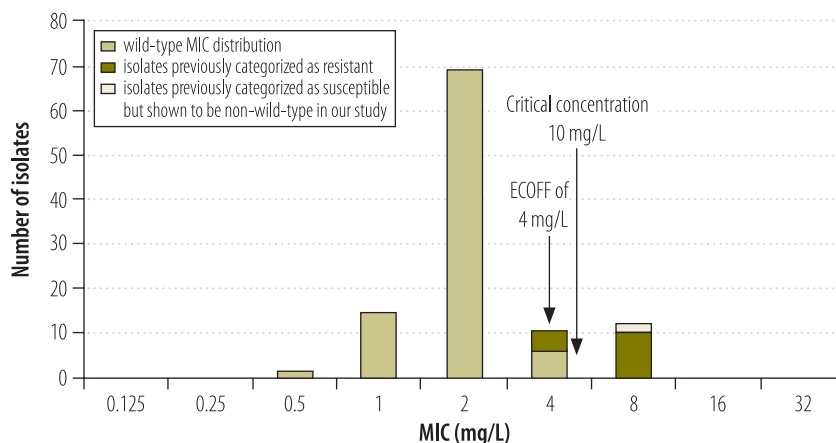
藥敏試驗breakpoint最好由臨床

試驗及藥理學、藥物動力學、流行病學、抗藥性為生物學等專家共同組成委員會決定，目前全球有兩個這樣的委員會，分別是歐洲的 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 及美國的 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)。最新的原則，breakpoint 是參考野生菌株最小抑菌濃度分佈 (wild-type MIC distribution)，亦即無已知抗藥性機轉菌株的最小抑菌濃度 (MIC) 分佈。無已知抗藥性機轉菌株是指無任何抗藥性的「表現型」或「基因型」，所以如果一株細菌的 MIC 測定結果是在 wild-type MIC distribution 範圍之外，都應該懷疑有抗藥性存在，不管臨床表現是否吻合。Wild-type MIC distribution 範圍中最大的 MIC 稱為 epidemiological cut-off (ECOFF)，最新的原則是以此取代

舊的 critical concentration 為 breakpoint。

Wild-type MIC distribution 測定方法如下：用 Middlebrook 7H10 培養基上生長的肺結核菌株，以 96-stick replicator 兩倍序列稀釋，以稀釋 100 倍的菌液放在不加藥培養基中為對照組。所有測定的藥物，以及每一次實驗皆以 H37Rv (對藥物皆為敏感性) 及臨床多重抗藥性菌株為品管菌株。不同次實驗之間最小抑菌濃度的差異非常小(小於正負一個兩倍稀釋)。

雖然 ECOFF 與目前大家熟知的 critical concentration 相差不多，但仍有些藥物差異較大。舉例說明，ethambutol 的藥敏試驗一向再現性不好，原因就可能是目前的 breakpoint 包含在 wild-type distribution 裡面。如圖一，由結核菌定序結果可知，MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$ 的菌株中，大約有 50% 有抗



圖一 Wild-type minimum inhibitory concentration (MIC) distribution for ethambutol

資料來源：British Society for Antimicrobial Chemotherapy

藥性基因突變存在，MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$ 菌株就完全沒有，MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$ 就全部都有。目前 critical concentration 是 5 $\mu\text{g/ml}$ ，因此是在 wild-type distribution 裡面。正常情況下，不同次實驗之間，最小抑菌濃度在加減 1 倍的稀釋倍數之間是屬正常範圍。因此若 MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$ 的菌株，在上下 1 倍的稀釋倍數之間浮動，就會造成有時結果是 S，下次就變成 R 這種再現性不佳的狀況。

除了 ethambutol 之外，capreomycin, rifabutin 也有類似的狀況。因此目前慣於用來判讀結核菌 critical concentration 應該用新的原則，全面重新審視，特別是用以上所提之 wild-type MIC distribution 及 ECOFF，並且依據藥理學、藥物動力學，甚至可以參考文獻上已知的臨床治療效果。

【譯者評】使用 wild-type MIC distribution 來決定藥敏分類的方法已經使用在厭氧菌、*Helicobacter*、*Listeria*，還有真菌（包括 *Candida* 及 *Aspergillus* spp）。雖然地區對於菌株的 wild-type MIC distribution 的影響未知，但是在結核菌，目前尚無證據顯示不同地區會有差別，反而在別的細

菌已證實地區不是影響的因素。

重新審視結核菌藥敏試驗的 breakpoint 對於臨床是非常重要的。最重要的是可以確保 breakpoint 是在 wild-type MIC distribution 範圍之外，並且不要太靠近，這樣才能使用有效的藥物來治療，避免造成菌株對更多藥物產生抗藥性。並且，在不同次實驗之間，正常情況下會產生些微誤差，如果 breakpoint 太靠近 wild-type MIC distribution，容易使得藥敏試驗再現性不好。因此，不只是新的抗結核藥物，甚至目前正在使用的藥物都該如此重新審視。【高雄榮民總醫院黃采菽 摘評】

參考文獻

1. Ängeby K, Juréen P, Kahlmeter G, et al: Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. Bull World Health Organ 2012;90:693-8.
2. Werngren J, Sturegård E, Juréen P, et al: Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and pncA gene sequencing. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:1253-7.
3. Arendrup MC, Kahlmeter G, Rodriguez-Tudela JL, et al: Breakpoints for susceptibility testing should not divide wild-type distributions of important target species. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1628-9.