

第六章 分枝桿菌的藥物感受性試驗

前言

結核菌(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)的藥物感受性試驗，主要有三個目的：1)決定最初的用藥選擇。2)確定抗藥性的發生，而選擇進一步的用藥。3)估計社區內抗藥性原發與後天的感染率。結核菌的藥物感受性試驗，必須對於所有病人，初次分離到的菌株都做。而且，當病人接受治療後 3 個月仍呈現陽性培養，或臨床證據顯示治療反應失敗，則藥物感受性試驗需要重覆進行。為了確保在最快時間內得知抗藥性的偵測，快速的藥物感受性試驗需與快速的培養和鑑定結合。因此，對大部份分離菌株，藥物感受性試驗結果，需要在收取檢體 28 天內提出報告。

有別於結核菌，非結核分枝桿菌(*nontuberculous mycobacteria*, NTM)的藥物感受性試驗僅需考慮於臨床重要分離菌株。例行的藥物感受性試驗對此菌是不予推薦的。為了確定從呼吸道培養出 NTM 的臨床重要性，美國胸腔協會(ATS)建議以下標準：①三次培養陽性、抹片抗酸性染色陰性；或②兩次培養陽性和一次抹片陽性，足以確認臨床的重要性；或者③有一次支氣管的沖洗液培養陽性，或④抗酸性染色 $\geq 2+$ 也足夠建立臨床重要性。此外，從一般無菌的檢體，如血液、腦脊髓液或組織分離出者都被認為有臨床重要性。目前，足夠的資料支持對於快速生長的分枝桿菌(*Mycobacterium fortuitum* group, *M. abscessus*, *M. chelonae*)；*M. avium* complex, 和 *M. kansasii*，有暫時性的藥物感受性試驗方法。

第六章

一、結核菌的藥物感受性試驗

介紹

目前檢驗 MTBC，即 *M. tuberculosis*，*M. bovis*，*M. africanum*，*M. microti*，*M. canetti* 的藥物感受性試驗是依據 Canetti 等人所建立的標準方法比例法(proportion method)。此比例法被全球性地使用。多年來，此比例法（以 Middlebrook 7H10 Aga r為基質）在美國被認定為標準測試方法。

瓊脂比例法(agar proportion method)和放射計量方法(radiometric method)的抗藥性定義為大於 1%的細菌出現在抗結核菌的藥物臨界濃度中。此抗藥物的臨界濃度，經國際組織採用，代表未層暴露在藥物實驗下的 95%廣泛

結核菌菌株。當用來測試的臨床分離菌株生長超過 1%，則該藥物即將不予繼續當作抗結核治療藥物。使用第一線的抗結核菌藥物(isoniazid, rifampin, ethambutol 和 pyrazinamide)，體外試驗結果與臨床的結核菌病人有效度有好的關連性。第二線抗結核菌藥物的資訊就相當有限。對於大部份緩慢生長的非結核分枝桿菌的臨床與體外試驗結果，關連性也少有報告。當然也有少數例外，如測試 *M. kansasii* 對 rifampicin 的感受性，*M. avium complex* 對 clarithromycin 的感受性在臨床上的效用有很好的關連性。

測試結核菌藥物感受性的第一線藥包括 isoniazid (INH) 兩個濃度(臨界濃度和高濃度)、rifampin (RIF), ethambutol (EMB) 和 pyrazinamide (PZA)。

MTBC 菌株僅對 INH 產生抗藥性時，不必再做第二線藥物的測試。當結核菌分離菌株對 RIF 或任何兩種第一線藥物產生抗藥性時，一系列完整的藥物感受性試驗，包括所有第二線藥物，增加高濃度的第一線藥物需進行。

瓊脂比例法

結核菌在含藥的培養基生長菌落數比在不含藥的培養基生長菌落數超過 1%，即代表對該藥產生抗藥性。不含藥的培養基菌落數(colony-forming units, CFU)必須是分開，可數的。建議用 7H10 瓊脂培養基，7H11 瓊脂培養基有利於 INH 抗藥性的結核菌生長，是可接受的變通。用 7H11 的實驗室應注意某些藥需不同的濃度。

藥物

藥品應有標籤記錄藥名，效力(通常以 $(\mu\text{g})/\text{mg}$ 來表示)，以及有效期。且藥物保存在原廠建議的方式或在 -20°C 或在乾燥器(最好是真空)保存。將乾燥器從冰箱取出後，最好先回室溫才打開(避免水氣凝集)

稱重

$$\text{體積 (mL)} \times \text{濃度 } (\mu\text{g/mL})$$

$$\bullet \text{重量 (mg)} = \frac{\text{體積 (mL)} \times \text{濃度 } (\mu\text{g/mL})}{\text{分析的效力 } (\mu\text{g/mg})}$$

或

$$\text{重量 (mg)} \times \text{分析效力 } (\mu\text{g/mg})$$

$$\bullet \text{體積 (mL)} = \frac{\text{重量 (mg)} \times \text{分析效力 } (\mu\text{g/mg})}{\text{濃度 } (\mu\text{g/mL})}$$

例如：準備 100 mL 的保存液含 1,280 $\mu\text{g/mL}$ 的抗生素用 750 $\mu\text{g/mg}$ 效力的藥（如 streptomycin），如果最後稱重是 182.6 mg，那麼最終稀釋的體積是

$$\begin{aligned} \text{體積 (mL)} &= \frac{(182.6 \text{ mg}) (\text{重量}) \times (750 \mu\text{g/mg}) (\text{效力})}{(1,280 \mu\text{g/mL}) (\text{需要的濃度})} \\ &= 107.0 \text{ (mL)} \end{aligned}$$

抗結核菌藥物的濃度與選擇 (Middlebrook 7H10 and 7H11 瓊脂培養基)
濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

一線藥	7H10 agar	7H11 agar
INH	0.2	0.2
RIF	1.0	1.0
Ethambutol hydrochloride	5.0	7.5
	10	10
Pyrazinamide	不建議	不建議
二線藥		
Capreomycin	10.0	10.0
Ethionamide	5.0	10.0
Kanamycin (amikacin)	5.0	6.0
Ofloxacin	2.0	2.0
p-Aminosalicylic acid	2.0	8.0
Rifabutin	0.5	0.5
	(1-2)	(1-2)
Streptomycin	2.0	2.0
	10.0	10.0

二、兩種配製藥物培養基的方法：瓊脂稀釋法和紙錠浸出法

瓊脂稀釋法，將藥溶入瓊脂中，有一格不加藥當對照組每格倒 5 mL 培養液，(應含 10% OADC)，讓瓊脂厚度約 3-4 mm，使用瓊脂應完全乾，如置於放生物安全操作櫃數小時或隔夜更好，瓊脂表面乾後，立刻用，或置入有封口的塑膠袋 4 到 8°C，勿超過 28 天，避免光照。

紙錠浸出法，先將 5 mL 不含藥的 7H10 agar 倒入四分格培養皿中，再投入含固定劑量的抗結核菌藥物紙錠，讓紙錠中的藥浸出到瓊脂中，得到所需的最終濃度培養基。紙錠儘量放入瓊脂中央位置。每一四分格應確實分裝 5 mL 的培養液，以達到正確的最終藥物濃度。

三、間接藥物感受性試驗

以培養分離出的菌株，調製標準的接種量，用瓊脂比例法測試。接種菌落必須新鮮，勿超過 4~5 星期老的菌落，小心取，勿刮到培養基。儘可能用原始培養的菌落，勿用次培養的菌落。菌株置入含有 6-10 顆塑膠珠，3-5 mL Tween-albumin 液態培養基或者 Middlebrook 7H9，之有蓋無菌(16×125 mm)試管子中。充份震盪 1 到 2 分鐘，勿生氣泡。管子放置 30 分鐘讓大顆粒沈降，與減少可能產生的氣霧(aerosol)。上清液吸到另一支無菌管，並用肉湯(如 7H9)調濃度到 Mc Farland 1 的標準值。

培養基的接種和培養

準備 10^{-2} 和 10^{-4} 的標準懸浮液的稀釋濃度，用 Tween-albumin 肉湯，7H9 或無菌的生理食鹽水，或無菌的水都可。接種 0.1 mL 的 10^{-2} 稀釋液到對照組的四分格，以及含藥的其他四分格各種 0.1 mL (此量也可以 3 滴的量來做)。同樣做法，再種一組 10^{-4} 稀釋液。如果菌落太老或生長不足夠，可以用較低稀釋倍數(如 1:10, 1:1000)或者直接做肉湯取菌的次培養。肉湯次培養的製作，是從固態培養基取菌，種到肉湯中，放 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 每天用手搖，直到濃度達到 McFarland 1.0 的標準。接種好的平板放室溫，直到接種菌液吸入瓊脂中(亦即點變乾)。將各平板分別封入 CO_2 可通透的塑膠袋中。培養時，培養基那邊在下面，在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ，5 到 10% CO_2 培養。在提高環境中 CO_2 對抗結核藥物效力並沒有影響，反而會使菌落長得更大。平板培養過程，應防光照。

小心地觀察平板，可用低倍顯微鏡幫助。每星期觀察，勿超過 3 星期才觀察。若對照組的菌落已長成熟，則抗藥性試驗結果可以提早在 3 週報告。但是，若感受性的結果應該觀察到第 3 個星期，則要觀察 10^{-2} 或 10^{-4} 稀釋液接種的培養平板上何者的對照組菌落是可數的結果。

判讀

對每一個測試的藥，報告上必須包括測試的藥名，臨床有用的解釋如“感受性” Susceptible，“抗藥性” resistant 或“邊界值” boderline，邊界值只用於 PZA。如果實驗室要報告藥物測試的濃度，也應該註明所使用的培養基或者所使用測試的方法，而且註明所測試相當於參考方法(Equivalent Reference Method)的濃度。

藥物	濃度 (μ g/mL)	方法	% 抗藥性	判讀
Isoniazid	0.2	瓊脂比例法	0	感受性

藥物	濃度 (μ g/mL)	方法	判讀
Isoniazid	0.2	瓊脂比例法	抗藥性
Isoniazid	1.0	瓊脂比例法	感受性

藥物	濃度 (μ g/mL)	方法	% 抗藥性	判讀
Isoniazid	0.2	瓊脂比例法	20	抗藥性
Isoniazid	1.0	瓊脂比例法	0	感受性

以兩種 INH 的濃度測試，而對低濃度產生抗藥性，對高濃度是感受性時，此結果，指出對 INH 低濃度抗性，甚至有些證明指出，病人感染此一 INH 抗性的菌株，如能持續 INH 治療，還能從中得到好處。以下是一些情況以及報告的幾種選擇。

在 7H10 瓊脂平板的判讀

每四分格生長的量記錄如下：

>500 菌落	4+
200-500 菌落	3+
100-200 菌落	2+
50-100 菌落	1+
<50 菌落	計錄實際菌落數

- 1、 兩組對照組中至少一組應可計數的菌落數（至少 50 個），否則結果無效。
- 2、 如果對照組已長 3+ 或 4+，而含藥的四分格沒有長，則可以報此藥是感受性的。
- 3、 有研究報告指出，大部份的菌株，用瓊脂比例法做 EMB 的感受性試驗會出現微小菌落(microcolonies)，因為微小菌落在不同的實驗室可能會改變，每個實驗室應決定如何來報告。
- 4、 第一星期（7 天）判讀是否有污染的細菌或黴菌或任何快速生長的分枝桿菌。甚至緩慢生長的分枝桿菌也可能在 2 星期的培養出現。感受性結果不能在此時報告有效，因為有些較具抗藥的菌株，比有效的菌株長得慢。除非抗藥的菌株在 2 星期已出現，可報抗藥性。最後判讀的時間在培養後 3 星期。如果對照組在 3 星期仍未長，則再培養 3 星期，成 6 星期時間。當對照組有長足夠量時，只能報有效的藥

$$\text{抗藥性}\% = \frac{\text{在含藥的四分格的菌落數}}{\text{在不含藥的四分格之菌落數(對照組)}} \times 100\%$$

例一

藥物/濃度	生長		
	10 ⁻²	10 ⁻⁴	%抗藥
對照組	4+	50 菌落	—
Isoniazid (0.2 μg/mL)	2+	10 菌落	10
Rifampin (1.0 μg/mL)	0	0 菌落	0
Ethambutol (50 μg/mL)	0	0 菌落	0

$$\text{抗藥性}\% = \frac{10}{100} \times 100\% = 10\%$$

例二

藥物/濃度	生長		
	10 ⁻²	10 ⁻⁴	%抗藥
對照組	4+	100 菌落	—
Isoniazid (0.2 μg/mL)	100 菌落	0 菌落	2
Rifampin (1.0 μg/mL)	0	0 菌落	0
Ethambutol (50 μg/mL)	0	0 菌落	0

對照組在稀釋 10⁻⁴ 長 50 個菌落，則在稀釋 10⁻²，應是 50 × 10² 個菌落（因 10⁻² 為 10⁻⁴ 的 100 倍），所以在稀釋 10⁻² 對照組為 5000 個菌落 INH (0.2) 長 100 菌落

$$\text{INH 抗藥性}\% = \frac{100}{5000} \times 100\% = 2\%$$

例三

藥物/濃度	生長		
	10 ⁻²	10 ⁻⁴	%抗藥
對照組 1	4+	50 菌落	—
Isoniazid (0.2 μg/mL)	2+		>1
Isoniazid (1.0 μg/mL)	0		0
Rifampin (1.0 μg/mL)	0		0
Ethambutol (50 μg/mL)	25 菌落		<1

$$\text{INH (0.2) R\%} = \frac{100 \sim 200}{50 \times 10^2} \times 100\% \geq 1\%$$

$$\text{EMB (5.0) R\%} = \frac{25}{50 \times 10^2} \times 100\% \leq 1\%$$

四、直接藥物感受性試驗

原理是已消化去污染而經濃縮的痰檢體，若抗酸性染色是陽性，可直接取此檢體做藥物感受性試驗，來決定病人體內結核菌抗藥情形。此試驗只用於抹片是陽性的檢體，而且是用瓊脂比例法。好處是針對主要是抹片陽性的檢體，從實驗室收到檢體到發感受性試驗報告，可在 3 星期內完成。抗藥菌株的比例更能表現病人菌株的群數。因為無法確實地控制接種的含菌量，所以有可能比對照組長得過多，或長得不足的結果。也可能污染，而使結果無法判讀。這個方法，只有用於結核菌或 *M. kansasii* 菌，而且用於試驗 RIF 藥才用。

此直接藥物感受性試驗方法，整個的失敗率為 10-15% 或以上，所以經常要用間接法試驗。

直接藥物感受性試驗是用 7H10 或 7H11 瓊脂。要用多少含藥平板，決定於僅測第一線藥或第一線第二線藥都要測。檢體經過消化，去污染處理，且確定是抗酸菌抹片陽性後，痰檢體，即可接種到不含藥(對照組)以及含藥的四分格培養基。接種量主要是看螢光染色的抗酸菌數來決定。

直接藥物感受性試驗之稀釋倍數

抗藥性數目/每 200 倍至 400 倍觀察:

螢光染色	稀釋
<25	未稀釋
25-50	未稀釋，1:10
50-250	未稀釋，1:100
>250	1:10，1:1000

每一四分格接種 0.1 mL 的檢體量，除非螢光染色每視野看到小於 5 個 AFB 即增加接種量到 0.2 mL。判讀時，在顯微鏡下，直接觀察平板的菌落而不用取下塑膠袋。在第 1，第 2，第 3 和第 6 週判讀培養結果。第 1、2 週的結果記錄到工作單，但不要報告。這個步驟用意是要檢查是否有污染，以及決定對照組長的菌量是否足夠。通常污染，以及對照組長的菌量不足夠，是導致直接試驗法失敗的原因。此時，(在第 2 週後)，可以從原始培養基取菌，來繼續做間接法的藥物感受性試驗。

報告和判讀

結果在 3 星期培養後報告。有些菌株在 3 星期培養仍不長或長不好，此時，可再放進去培養到第 6 個星期，當對照組長好，而含藥的四分格沒有長，則可報對此藥感受性，但如果是抗藥性則不能報告。因為，延長時間的培養可能是抗生素 partial degradation 的結果。

品管

品管目標是監測藥物感受性試驗操作流程，試藥的表現，操作者所作的試驗，以及判讀的正確性品管。此目標，可藉由選擇使用基因穩定性和在被控制特別方法下，實用性的參考菌株而達到。

選擇參考菌株

結核菌的藥物感受性試驗的品管，應包括一株對所測試的抗生素都是完全感受性的菌株。H37Rv (ATCC 27294) 結核菌很適合當“全感受”(“pan-susceptible”)的品管菌株且有文獻記載。相反地，結核菌 H37Ra，也可以是選擇。一些觀察者建議，實驗應考慮再同時試驗一株抗藥性的菌株。特別是對臨界濃度和高濃度的 INH，如果可以再測一株對 INH 低濃度呈抗藥性，而對高濃度呈感受性的結核菌或 NTM。然而，那一菌株可以用來操作此目的，尚未清楚。參考菌株的保存，應在一個儘可能降低因為連續次培養而發生突變的情況下保存。保存菌株的小玻璃瓶懸浮液，可由固態或液態培養製得，並分裝成幾個小瓶後冷凍在 -70°C 。