

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-123131

衛生福利部疾病管制署 106 年委託科技研究計畫

計畫名稱：結核病之抗藥性試驗、監測及流行病學研究

## 年度/全程研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：吳玫華

協同主持人：周如文

研究人員：林宛璇、詹馨嬋

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 158.6 萬元整

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應  
事先徵求本署同意\*

## 目錄

### 目次

壹、中英文摘要	(4)
貳、本文	
一、前言	(7)
二、材料與方法	(10)
三、結果	(13)
四、討論	(19)
五、結論與建議	(22)
六、重要研究成果及具體建議	(23)
七、參考文獻	(24)
八、圖、表	
<u>圖次</u>	
圖一 2014-2017 常規檢體送驗量，個案別	(26)
圖二 2014-2017 計畫測試菌株與常規送驗菌株的比例	(26)
圖三 RMP 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布	(27)
圖四 INH 對 MDR-TB 菌株的抑菌濃度分布	(27)
圖五 Amikacin 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布	(28)
圖六 Kanamycin 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布	(28)
圖七 Moxifloxacin 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布	(29)
圖八 EpiCenter TB eXiST 藥敏試驗生長曲線	(29)
圖九 快速液態培養藥敏試驗報告時效	(30)

## 表次

表一 2014 至 2017 年複驗菌株及本計畫操作菌株數	(31)
表二 RMP 與 Rifabutin 交叉抗藥比率	(31)
表三 Rifapentin 及 Rifampin 藥敏型態分析表	(31)
表四 INH 及 Ethionamide 藥敏型態分析表	(32)
表五 INH 及 Prothionamide 藥敏型態分析表	(32)
表六 Amikacin 及 Capreomycin 藥敏型態分析表	(32)
表七 Amikacin 及 Kanamycin 藥敏型態分析表	(32)
表八 Kanamycin 及 Capreomycin 藥敏型態分析表	(33)
表九 Levofloxacin 及 Moxifloxacin 藥敏型態分析表	(33)
表十 液態及固態藥敏試驗一致率分析	(33)

## 壹 中英文摘要

**研究目的：**本研究蒐集 2014 年至 2017 年的 MDR-TB 及 RR-TB 個案菌株，以藥物濃度定量方法分析 4 年期間，二線針劑類藥物及 fluoroquinolones 類藥物的濃度分布變化趨勢，以利評估治療處方設計。

**研究方法：**複驗菌株進行藥敏結果確認及二線藥物敏感性檢驗，含 2014 至 2017 年 MDR-TB 395 株及 RR-TB 180 株。藥物敏感性試驗使用 MYCOTBI plate (Sensititre®)、瓊脂比例法藥物感受性試驗培養基及 MGIT 960 儀器配置 EpiCenter TB eXiST 軟體。

**主要發現：**藥物效力連續 4 年監測，觀察到 2014 年的抑菌濃度偏向高濃度分布，然後曲線逐年往低濃度分布移動，2017 年與前 3 年比較時，有較少的高濃度分布個案及較多的低濃度分布個案。對 RMP 抗藥的 MDR-TB 及 RR-TB 菌株，其與 Rifapentin 交叉抗藥比率的機率達 86.2% 以上。在 INH 與 Prothionamide 的交叉抗藥比例則為 71.1%，比與 Ethionamide 的交叉抗藥比例 27% 高。Amikacin 與 Capreomycin 交叉抗藥比率當 Amikacin 抗藥時，有 28.6% 的 Capreomycin 敏感。傳統藥敏法在 Capreomycin 的臨界濃度 10 µg/mL 可能偏高，本計畫 Amikacin 抗藥時，仍有部分 Capreomycin 敏感，其臨界濃度是否適當需進一步研究及蒐集基因型資料進行比對。Kanamycin 與 Amikacin 的交叉抗藥比率顯示當 Kanamycin 抗藥時，仍有 27.6% 的 Amikacin 為敏感。由 Moxifloxacin (0.5µg/mL) 與 Levofloxacin 交叉抗藥比率得知當 Moxifloxacin 抗藥時，仍有 13.6% 的 Levofloxacin 敏感，Moxifloxacin 加入高濃度 2.0µg/mL 測試有其必要性。藉由商用二線藥軟體 TB eXiST 進行藥物濃度定量試驗，90% 以上的藥敏報告可以在第 10 天發出，相較於固態瓊脂法的 21 天，約縮短 10 天的檢驗時效。

**結論及建議事項：**分析 2014 至 2017 年的藥物效力變化趨勢，了解全

國抗藥菌株的藥敏型態現況。藉由同類藥物交叉抗藥的比例，提供臨床醫師設計處方的參考。建立快速液態培養方法，測試最低抑菌濃度，提供抗藥個案更快速的藥敏試驗報告結果。

關鍵詞 藥物敏感性試驗、最低抑菌濃度、抗藥趨勢監測

Abstract

Purpose

Materials and Methods

Results and Discussion

Conclusion and Suggestions

Key Words

## 貳 本文

一 前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。

多重抗藥性結核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)是指病人感染對於目前最有效的第一線抗結核藥物 isoniazid 及 rifampin 同時具有抗藥性之結核菌株【1-2】。由於 MDR-TB 的案例逐年增加，已威脅到全球結核病的控制。依據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO)指出，2012 年粗估全球約出現 45 萬 MDR-TB 個案，共佔總結核病案例的 3.6%，其中約有 20.2%是先前治療過結核病的個案；值得注意的是，約有 50%的 MDR-TB 個案集中在亞洲地區。因 MDR-TB 的治療困難度高與效果不佳，於 2012 年已造成 17 萬病患死亡，這些個案其中有些包括與 HIV 共病。且治癒率僅達 46%-56%【3】。

此外，防堵廣泛抗藥性結核病 (extensively-drug resistant TB, XDR-TB)的傳播更是當務之急。因為 XDR-TB 除了對一線抗結核藥物 isoniazid 及 rifampicin 抗藥外，並同時對二線藥中任一種 fluoroquinolone 及至少一種注射型二線藥物 (capreomycin、kanamycin 及 amikacin)產生抗藥性。因為對第一線與第二線藥物都產生抗藥性，可選擇的治療藥物受到嚴重的限制，藥物治療處方設計是依據實驗室藥物敏感性試驗結果，設計至少合併 4 種有效抗結核藥物【4-6】，所以在治療 XDR-TB 時，須在有限的可用藥物中，為病患設計個人化的藥物處方【7】。

標準藥物敏感性試驗方法自 1963 年經國際專家會議建立後【8】，長期以來廣泛應用於結核菌實驗室，並有可明確遵循的標準操作程序【9】：其方法學主要為比例法藥敏試驗，判讀基準依據臨界濃度(critical concentration)及臨界比例(critical proportion)，判定該藥物為抗藥或敏感。有一些藥物除臨界濃度外，亦設定較高測試濃度，但是高濃度的

藥物敏感結果，僅提供臨床醫師調整藥物劑量的參考。結核菌比例法藥敏試驗與一般細菌藥敏試驗方法的定量法最低抑菌濃度不同，結核菌藥敏測試並不提供中間值「intermediate」藥敏結果。已知臨界濃度會依據使用之培養基種類不同而產生不同濃度，臨界比例則會依不同藥物及不同培養基而不同。其方法學屬於定性，而非定量實驗，由比例法藥敏試驗結果得知之抗藥百分比，即該檢體內抗藥結核菌佔總菌量的百分比，此訊息提供臨床醫師參考是否繼續使用或調整藥物劑量。在臨界濃度及臨界比例方法學的基準上，(1)藥敏結果若為抗藥性，意指如果該藥物使用於該病患治療，臨床治療反應差；(2)藥敏結果若為敏感性，意指該藥物的藥物感受性試驗結果與野生株無相異，該藥物如果使用於該病患，臨床治療反應佳，成功率高【9】。

抗結核一線藥物 isoniazid 及 rifampicin 在不同實驗室，不同方法學的一致率比 streptomycin 及 ethambutol 高【10】。在二線藥的部份，其可信度及再現性則仍受執疑及討論中【11, 12】。藥物敏感性試驗實驗室流程繁複，檢驗結果影響結核病人治療用藥及全國抗藥盛行率監測的準確性。本署自 2006 年開始，即針對結核菌實驗室實施每年一次藥物敏感性試驗【13】，截至目前已進行 11 次藥物敏感性能力試驗，歷年來，全國有操作結核菌的本署認可實驗室，均有優異的能力試驗表現，顯示在經過世界衛生組織為達同儕比對一致率，歷年送出的能力試驗菌株是經篩選及重覆送出，無論在基因型別及表現型別上，均能達到實驗結果明確及再現性良好的藥敏能力試驗結果。然而，臨床菌株則無論在基因型別及表現型別上的多樣性，僅以臨界濃度，簡單區分抗藥或敏感，尤其在最低抑菌濃度接近臨界濃度時，實驗結果的準確性及再現性變差，而無法實際預期使用該藥物能反映臨床預後結果【11】，更無法提供需量身訂制的多重抗藥病患，正確而且足夠數量的



有效藥物，供個人化治療設計，以更符合個別病患抗藥型態的最合適處方。總之，現行的比例法藥敏試驗方法，無論在方法學的最適臨界濃度及臨界比例的制定上，原本存在相當的困難度而不易制定【11】，但又是目前全球大多數實驗室用於常規的藥敏檢驗方法【10, 14】，因此亟待確立，以嘉惠病患。

本研究蒐集 2014 年至 2017 年的 MDR-TB 及 RR-TB 個案菌株，以藥物濃度定量方法分析 4 年期間，二線針劑類藥物及 fluoroquinolones 類藥物的濃度分布變化趨勢，以利評估治療處方設計。

使用商用液態培養 (MGIT 960TM) 自動化培養系統，其原理為培養管底部置入含螢光化合物矽膠，螢光化合物對培養液內的氧氣含量具敏感性，高氧含量會抑制螢光化合物自矽膠內釋出，此時培養管內的培養液尚無法偵測到有螢光反應，稍後隨著培養基內的結核菌生長，消耗培養液內的氧氣，因氧含量的降低，致使矽膠內的螢光化合物自矽膠釋出至培養液內，MGIT 960 儀器每小時以 UV 光讀取培養管內的螢光量，偵測到的螢光量，藉由儀器設備內建的電腦系統，換算成 Growth Unit (GU)，以 EpiCenter® 軟體輸出圖形及數據，一般認為，GU 值與 colony forming unit (CFU) 有相關【15】。

本研究預期成果為完成結核病抗藥性監測，藉由同類藥物交互作用的探討，提供臨床處方設計參考，建立快速液態培養方法，提高檢驗時效及藥敏結果判讀的正確性及一致性。

## 二 材料與方法

### (一) 材料

1. 結核菌株：由醫療院所結核病實驗室分讓結核菌株至疾病管制署，進行藥敏結果確認及二線藥物敏感性檢驗，含 2014 至 2017 年 MDR-TB 395 株及 RR-TB 180 株。
2. 品管菌株：H37Rv (ATCC® 27294™ )標準菌株。
3. 藥敏試驗盤：
  - (1) MYCOTBI plate (Sensititre®)
  - (2) 瓊脂比例法藥物感受性試驗培養基(Sancordon Inc.)。
  - (3) MGIT 960 儀器配置 EpiCenter TB eXiST 軟體。

### (二) 實驗方法

#### (一) 藥物敏感性試驗

- (1) 最低抑菌濃度藥物敏感性試驗 (minimum inhibitory concentrations)
  - 甲、 使用 MYCOTBI plate (Sensititre®)操作步驟：
    - (a) 挑選固態或液態培養基培養出之新鮮初代(primary)結核菌做為測試菌，於 BSL-3 實驗室中調製 MacFarland 0.5 菌液；接種 100  $\mu$  L 菌液入 MYCOTBI plate，同時接種至 Sheep blood agar(BD®)做無菌測試。
    - (b) 接種完畢之 MYCOTBI plate 用塑膠袋封好，置入 35-37 °C 溫箱培養。
    - (c) 培養 7-21 天後，觀察不含藥控制組生長至少 2 價，接著肉眼觀察含藥小格是否有結核菌生長而混濁則判定為抗藥，含藥小格未生長而如同陰性控制組培養基清澈判定為敏

感，最低的藥物敏感濃度即為最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

(d) 將 Sheep blood agar(BD®)置入 35°C-37°C 溫箱中，培養 48 小時觀察有無污染菌生長。

乙、 使用 MGIT 960 操作步驟：

- (a) 挑選固態或液態培養基培養出之新鮮初代(primary)結核菌做為測試菌，於 BSL-3 實驗室中調製 MacFarland 0.5 菌液，
- (b) 檢體接種準備菌液 (AST 菌液)：1：5 倍稀釋。
- (c) 取菌液作 1：100 倍稀釋。
- (d) 接種至 MGIT 含藥培養管。

## (2) 瓊脂比例法藥物感受性試驗

甲、 菌株培養

將待測試之臨床多重抗藥(MDR 及 Rifampin 單一抗藥結核菌株，次培養於 Löwenstein-Jensen 或 MGIT® 培養基，進行增菌與純化。

乙、 調製 MacFarland 1.0 測試菌液

挑選固態或液態培養基培養之新鮮初代(primary)結核菌做為測試菌，於 BSL-3 實驗室中調製 MacFarland 1.0 測試菌液。再將菌液以 0.85%生理食鹽水稀釋為 1:100 ( $10^{-2}$ ) 及 1:10000 ( $10^{-4}$ )，然後分別接種三滴 (0.1 mL) 稀釋菌液，至含藥及不含藥控制組固態培養基。

丙、 培養箱中靜置培養

接種完成之培養基，先置於室溫中，待接種菌液吸入瓊脂中。再將平板分別封入 CO<sub>2</sub> 可通透的塑膠袋中，於 35-37°C 之 5-10% CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱中靜置培養 21 天。

#### 丁、 結果判讀

結果判讀為每四分格生長量記錄如下：>500 菌落 4+、200-500 菌落 3+、100-200 菌落 2+、50-100 菌落 1+，<50 菌落則記錄實際菌落數目。比較含藥與不含藥控制組培養基之生長菌落數：高於 1% 為抗藥，反之為敏感【34】。

#### (3) 菌種鑑定

將結核菌液，利用 IS6110 是存在於結核菌群的專一性插入序列 (insertion sequence, IS) 特性，以即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 為技術平台，設計具有對結核菌群 IS6110 專一性的引子，並針對 IS6110 產物設計具有專一性的 Taqman® 核酸探針，進行聚合酶連鎖反應與螢光標記核酸探針的雜交反應，以鑑定為結核菌或非結核分枝桿菌。

#### (三) 統計分析

利用 excel 及 SAS 9.4 版軟體進行計算及圖表製作。

### 三 結果

#### (一) 測試菌株藥敏型態：

本署昆陽實驗室 2014 年至 2017 年常規送驗菌株中，經本實驗室以分子及傳統藥敏檢驗確認，2014 年有 MDR-TB 121 株，RR-TB 63 株，2015 年有 MDR-TB 124 株，RR-TB 46 株，2016 年有 MDR-TB 118 株，RR-TB 53 株，2017 年截至 11 月 28 日，有 MDR-TB 97 株，RR-TB 45 株，4 年合計 667 株(圖一、表一)。

本計畫抗藥監測及新方法測試以 MDR-TB 及 RR-TB 菌株為主要評估對象，2014 至 2017 年隨機選取共測試 575 個案(1 菌株/個案) MTBC 菌株，其中傳統一線藥型態 MDR-TB (multidrug-resistant TB) 佔 68.7%，RR-TB (rifampicin-resistant TB) 佔 31.3%，進行測試的 MDR-TB 及 RR-TB 的菌株數合計占率為 4 年總菌株數的 86.2%。

#### (二) 藥物效力測試

##### 1. Rifampicin

##### (1) 2014 年至 2017 年藥物效力趨勢分析：

測試傳統藥敏結果為抗藥的 MTBC 菌株，RMP 定性結果為抗藥的菌株，其在 MDR-TB 及 RR-TB 的定量最低抑菌濃度分布如圖三。結果顯示在低濃度範圍藥物濃度 0.12 至 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的分布比例逐年上升趨勢，高濃度 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的分布比例逐年下降趨勢，以卡方檢定結果  $P < 0.0001$ ，結果顯示年份與最低抑菌濃度分布有關，檢視校正殘差(adjusted residual)，顯示分布在低濃度(0.12-0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的菌株，2017 年顯著較多；分布在高濃度(16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的菌株，2017 年顯著較少。

(2) RMP 與 Rifabutin 交叉抗藥比率：

395 株 MDR-TB、177 株 RR-TB 及其他藥敏型態的 RMP 敏感臨床株 6 株及抗藥株 4 株，合計 582 株，其 Rifabutine 在傳統定性藥敏試驗有 502 株抗藥，RMP 抗藥時，Rifabutin 抗藥的機率為 86.98%。Fisher's Exact Test P 值 < 0.05，顯示 RMP 為抗藥時與 Rifabutine 也抗藥有關聯。統計檢定比例差異為 0.70，P < 0.05，達顯著差異，RMP 為抗藥時，Rifabutine 也抗藥的比例，比 RMP 為敏感而 Rifabutin 抗藥的比例高 70%，表二。

(3) RMP 與 Rifapentin 交叉抗藥比率：

以商用 MGIT 960 液態培養藥敏試驗測試 Rifapentin 抑菌濃度分布範圍，結果如表三。初期隨機選取 29 株 RMP 抗藥株，以 Rifapentin 濃度 0.12、0.25、0.5、1、2、4 及 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  進行藥敏測試，顯示在 29 株 RMP 抗藥株中，Rifapentin 濃度 0.12 至 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的藥敏結果均為 6 株敏感及 23 株抗藥，直到 Rifapentin 濃度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，增加 1 株合計共 7 株敏感、22 株抗藥。考慮 Rifapentin 臨床用藥可能劑量範圍，正式測試則選用 0.12 及 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  二種濃度進行測試。合計測試 67 株，結果顯示 RMP 抗藥時，Rifapentin 抗藥的機率為 84.6%至 86.2%。

2. INH：

(1) 2014 年至 2017 年藥物效力趨勢分析：

測試傳統藥敏結果為抗藥的 MDR-TB 菌株，操作菌株數合計 305 株，與送驗總菌株數的佔率在 MDR-TB 菌株中，與 RMP 相同，INH 定性結果為抗藥的菌株，其在 MDR-TB 的定量最低抑菌濃度分布如圖四。卡方檢定結果 P < 0.0001，結果顯示年份與

最低抑菌濃度分布有關，檢視校正殘差(adjusted residual)，顯示主要差異在分布於濃度 0.3-0.6 µg/mL 及濃度 0.12-0.25 µg/mL 的菌株，分別在 2016 年及 2017 年顯著較多，高濃度的部分則沒有因年份不同而有顯著較多或較少。

(2) INH 與 Ethionamide 交叉抗藥比率：

測試 395 株 MDR-TB、177 株 RR-TB，合計 572 株，INH 抗藥時(即 MDR-TB)，Ethionamide 抗藥的機率為 27%，INH 敏感時(即 RR-TB)，Ethionamide 抗藥的機率為 0.6%如表四。Fisher's Exact Test P 值 < 0.0001，顯示 INH 抗藥時，與 Ethionamide 也抗藥有關聯。統計檢定比例差異為 0.27，P < 0.0001，達顯著差異，MDR-TB 的 Ethionamide 抗藥比例，比 RR-TB 的 Ethionamide 抗藥比例高 27%。

(3) INH 與 Prothionamide 交叉抗藥比率：

Prothionamide 以液態 MGIT 依世界衛生組織建議測試濃度 0.25 µg/mL 測試 45 株 MDR-TB、31 株 RR-TB，合計 76 株，INH 抗藥時，Prothionamide 抗藥的機率為 71.1%，INH 敏感時，Prothionamide 抗藥的機率為 19.4%如表五。卡方檢定 P 值 < 0.0001，顯示 INH 抗藥時，與 Prothionamide 也抗藥有關聯。統計檢定比例差異為 0.518，P < 0.0001，達顯著差異，INH 抗藥時，Prothionamide 也抗藥的比例，比 INH 敏感而 Prothionamide 抗藥的比例高 51.8%。

3. Amikacin：

(1) 2014 年至 2017 年藥物效力趨勢分析：

Amikacin 敏感的 MDR-TB 337 株及 RR-TB 114 株，合計 451

株，定量最低抑菌濃度分布如圖五。卡方檢定結果  $P < 0.0001$ ，結果顯示年份與最低抑菌濃度分布有關，檢視校正殘差(adjusted residual)，顯示在抑菌濃度 0.12 及 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株數顯著逐年上升，在抑菌濃度 0.5 及 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株數顯著逐年下降。

(2) Amikacin 與 Capreomycin 交叉抗藥比率：

測試 395 株 MDR-TB、177 株 RR-TB，合計 572 株，Amikacin 抗藥時，Capreomycin 抗藥的機率為 71.4%，Amikacin 敏感時，Capreomycin 敏感的機率為 99.6%如表六。Fisher's Exact Test  $P$  值  $< 0.0001$ ，顯示 Amikacin 的藥敏型態分布，與 Capreomycin 的藥敏型態分布有關聯。

(3) Amikacin 與 Kanamycin 交叉抗藥比率敘述於下一段落 4。

#### 4. Kanamycin：

(1) 2014 年至 2017 年藥物效力趨勢分析：

Kanamycin 敏感的 MDR-TB 329 株及 RR-TB 114 株，合計 443 株，定量最低抑菌濃度分布如圖六。卡方檢定結果  $P < 0.0001$ ，結果顯示年份與最低抑菌濃度分布有關，檢視校正殘差(adjusted residual)，顯示在抑菌濃度 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株數顯著逐年上升，在抑菌濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株數顯著逐年下降，抑菌濃度在 1.2 及 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的歷年菌株數無顯著差異。

(2) Kanamycin 與 Amikacin 交叉抗藥比率：

測試 395 株 MDR-TB、177 株 RR-TB，合計 572 株，Amikacin 抗藥時，Kanamycin 抗藥的機率為 100%，Kanamycin 抗藥時，Amikacin 敏感的機率為 27.6%如表七。Fisher's Exact Test  $P$  值  $< 0.0001$ ，顯示 Amikacin 的藥敏型態分布，與 Kanamycin 的藥敏型態分布有關聯。



(3) Kanamycin 與 Capreomycin 交叉抗藥比率：

測試 395 株 MDR-TB、177 株 RR-TB，合計 572 株，Kanamycin 抗藥時，Capreomycin 抗藥的機率為 51.7%，Kanamycin 抗藥時，Capreomycin 敏感的機率為 48.3%如表八。Fisher's Exact Test P 值 < 0.0001，顯示 Capreomycin 的藥敏型態分布，與 Kanamycin 的藥敏型態分布有關聯。

5. Moxifloxacin

(1) 2014 年至 2017 年藥物效力趨勢分析：

Moxifloxacin 敏感的 MDR-TB 316 株及 RR-TB 115 株，合計 431 株，定量最低抑菌濃度分布如圖七。卡方檢定結果 P < 0.0001，結果顯示年份與最低抑菌濃度分布有關，檢視校正殘差(adjusted residual)，顯示在抑菌濃度 0.12 及 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株數顯著逐年上升，在抑菌濃度 1 及 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株數顯著逐年下降，抑菌濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的歷年菌株數無顯著差異。

(2) Moxifloxacin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )與 Levofloxacin 交叉抗藥比率：

測試 395 株 MDR-TB、180 株 RR-TB，合計 572 株，Moxifloxacin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )抗藥時，Levofloxacin 抗藥的機率為 86.4%，Moxifloxacin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )敏感時，Levofloxacin 敏感的機率為 100%如表九。Fisher's Exact Test P 值 < 0.0001，顯示 Moxifloxacin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的藥敏型態分布，與 Levofloxacin 的藥敏型態分布有關聯。

### (三)快速液態藥敏試驗方法學評估：

主要評估商用快速液態藥物敏感試驗顯示結果為 100%一致率

1. 商用二線藥軟體自動判讀螢光值換算為生長單位(growth unit)達到閾值後，與不含藥生長控制組比較達到閾值的時間在之前則判定為抗藥。軟體呈現藥敏試驗生長曲線如圖八。
2. 操作藥物 Amikacin、Kanamycin、Capreomycin、Moxifloxacin、Levofloxacin、Ethionamide 及 Clofazimine。與標準固態瓊脂藥敏試驗為標準，Ethionamide 的一致率 79.2%，其他二線針劑類藥物及 fluoroquinolones 類的藥物方法學間的一致率在各藥物定義的臨界濃度下，均達 100%如表十。
3. Moxifloxacin 除了臨界濃度外，同時也操作高濃度 2.0，與標準固態瓊脂藥敏試驗結果比較，在 48 株 MDR-TB 及 32 株 RR-TB 中，一致率 99%，因為合計 93 株測試菌株有 1 株(MDR-TB)的固態瓊脂藥敏試驗結果抗藥，而快速液態藥敏試驗結果為敏感。
4. 報告時效如圖九，在的 10 天即有 91%的報告可發出，到第 12 天則有 94%的報告發出。

#### 四 討論

本計畫操作菌株數未達送驗菌量的 100%的原因為有部分操作最低抑菌濃度的檢體因生長不良，致無法有判讀結果，快速液態方法的各藥物測試菌株數目略有不同，是因為方法學於今年初次建立，人員需熟悉方法及二線藥軟體操作，因此各藥物乃逐步加入測試。

藥物效力以最低抑菌濃度由低(左)到高(右)的連續 4 年監測，隨著筆數的增加及時間推移，觀察到 2014 年的抑菌濃度偏向高濃度分布，然後曲線逐年往低濃度分布移動，2017 年與前 3 年比較時，有較少的高濃度分布個案及較多的低濃度分布個案。以卡方檢定的 P 值檢視年份與最低抑菌濃度分布的關聯，並對細格逐一比較觀察值與期望值，藉由值的差異，確認各年份的各抑菌濃度菌株數分布與預期值的差異程度達顯著差異。抑菌濃度分布曲線向低濃度移動的現象，可能原因需進一步蒐集個案資料如性別年齡及病史等，探討不同年份的個案，分析造成濃度分布變化的可能解釋變數，或是僅僅是因為在初期實驗室方法學建立、人員經驗建立及微量最低抑菌濃度方法學本身的一致性、再現性的限制，造成定量結果浮動的因素。

Rifabutin 於世界衛生組織並未有建議濃度，而是根據美國 CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute)制訂的標準方法建議之濃度，由本實驗室之常規操作提供臨床服務，因限制於複驗菌株為 MDR-TB 及 RR-TB，缺乏足夠的 RMP 及 INH 敏感株供最低抑菌濃度結果評估，因此在觀察藥物效力趨勢變化時，較難對檢驗結果的專一性做推論。而二線藥物則因本土二線藥抗藥個案相對於敏感個案仍佔極少數，因此以各藥物的敏感株來觀察抑菌濃度分布，則較難評估其敏感性。

Rifapentin 使用於潛伏感染的治療，仍因受限於測試檢體均為 RMP

抗藥株，如果要進行方法學建立藥敏臨界濃度，仍需有足夠數量的敏感株綜合分析。本計畫發現在 RMP 抗藥的菌株其隨著抑菌濃度的 2 倍提高 Rifapentin 濃度順序，而有漸增的敏感株數目。但是，又由數據結果，當 MDR-TB 及 RR-TB 這些對 RMP 抗藥的菌株，其與 Rifapentin 交叉抗藥比率的機率達 86.2% 以上。

截至 2017/11/30 止，由本署監測系統之「結核病每日疫情指標綜覽」訊息可知，抗藥性結核病(RMP 單一抗藥) 管理中人數 88 人，多重抗藥性(MDR-TB)管理中人數 (其中 XDR-TB) 155 人( 1 人)，潛伏感染(LTBI) 治療中人數 4,013 人，在傳染源仍具有 RMP 抗藥株的風險存在下，對於已發生的菌陽個案，需提供更快速的藥敏報告，因此，本實驗室於本(2017)年建立快速液態藥敏試驗，藉由商用二線藥軟體 TB eXiST 進行 Rifapentin 藥物濃度定量試驗，結果在第 10 天可發出 90% 以上的藥敏報告，相較於固態瓊脂法的 21 天，約縮短 10 天的檢驗時效。惟快速液態方法學的限制是商用培養基成本高，無法符合臨床實驗室對成本的考量，並且目前商品化的藥物除了全部的一線藥物外，二線藥物的部分只有二線藥針劑及 fluoroquinolone 類的藥物，如要測試其他二線藥物或新藥如 Delamanid，實驗室需自行配製，配製過程為確保試劑不會在配製過程受到汙染，需有配套的配置空間及實驗室人力負荷。因此，定量藥敏試驗仍受限於參考實驗室為主，提供治療困難個案個別化的藥敏試驗服務及藥物測試最適化濃度評估。

由 INH 與 Ethionamide 的交叉抗藥比例得知，當 INH 抗藥時，仍有大部分的 Ethionamide 為敏感株。在 INH 與 Prothionamide 的交叉抗藥比例則為 71.1%，比與 Ethionamide 的交叉抗藥比例 27% 高，是否因為 Prothionamide 的藥物效力不如 Ethionamide，或只是因為 Ethionamide 使用固態瓊脂法，造成實驗室人員往往因為微小菌落的判定難以一致

判定為抗藥或敏感，導致 Ethionamide 藥敏報告提供臨床的可應用性降低，此由 Ethionamide 的最低抑菌濃度分布觀察到，定性結果為 Ethionamid 敏感或抗藥的菌株，其在定量最低抑菌濃度時，結果呈現的是濃度分布與定性結果無法有明確區分抗藥株及敏感株的抑菌濃度界線。然而，使用液態藥敏試驗是由儀器設備藉由螢光值的換算及閾值的設定，可以較客觀的判定，使重複試驗相同菌株仍有穩定的再現性結果。Ethionamide 使用液態藥敏法的表現性，仍需有更多的菌株試驗進行評估。

商用二線藥軟體是以時間及螢光值換算的生長單位綜合得到的結果，本研究發現當達到生長單位的閾值時，決定最終結果為抗藥或敏感的唯一因素是達到閾值的時間先後，BACTEC™ MGIT™ 960 儀器的設計為每小時自動掃描 1 次螢光值，結果回報 TB eXiST software 進行換算，由儀器報表知，仍有部分檢體其不含藥生長控制與含藥的閾值時間相差僅有 1 小時，儀器設計仍依傳統定性藥敏將要敏結果判為抗藥或敏感二選一，而沒有設計中間值，其商用軟體廠商的閾值設定依據亦未知，因此，需進一步與故態瓊脂法或分子生物檢測結果比對，以確定時間先後的基準範圍。

觀察到 Amikacin 抑菌濃度分布曲線向低濃度移動的現象。Amikacin 與 Capreomycin 交叉抗藥比率可知當 Amikacin 抗藥時，有 28.6% 的 Capreomycin 敏感，查閱文獻得知 ( ) rrs A1401G 的抗藥位點與 Capreomycin 表現型結果不一致而提出傳統藥敏法在 Capreomycin 的臨界濃度 10 µg/mL 可能偏高，本計畫 Amikacin 抗藥時，仍有部分 Capreomycin 敏感，其臨界濃度是否適當需進一步研究及蒐集基因型資料進行比對。

同樣觀察到 Kanamycin 抑菌濃度分布曲線逐年向低濃度移動的現

象。Kanamycin 與 Amikacin 的交叉抗藥比率顯示當 Kanamycin 抗藥時，仍有 27.6% 的 Amikacin 為敏感。本實驗限制於二線藥物抗藥的筆數較少，如果要了解藥敏試驗的陽性預測值，仍需蒐集較多的抗藥株進行分析。

Moxifloxacin 抑菌濃度分布曲線也是逐年向低濃度移動的現象。由 Moxifloxacin (0.5  $\mu$ g/mL) 與 Levofloxacin 交叉抗藥比率得知當 Moxifloxacin 抗藥時，仍有 13.6% 的 Levofloxacin 敏感，13.6% 共計 6 筆菌株，檢視其 Moxifloxacin 高濃度 (2.0 $\mu$ g/mL)，其中 1 筆結果為敏感，另外 5 筆則未測試高濃度，檢視其最低抑菌濃度分布在 0.5-2  $\mu$ g/mL 低濃度的範圍，因此，Moxifloxacin 加入高濃度測試有其必要性。

Moxifloxacin 高濃度 2.0  $\mu$ g/mL 測試結果在液態與固態方法學比較，傳統固態培養抗藥，而液態培養敏感，造成不一致的可能原因為結核菌在液態培養下生長比固態培養快，當檢體內同時含有敏感株及抗藥株時，往往敏感株會先達到對數期，因儀器判讀螢光值的敏感性，而大約 10 天使得生長達到閾值即停止偵測，此時檢體內的抗藥株可能尚未大量生長，因此藥敏結果為呈現為敏感的表現型。因為本實驗僅有 4 株 Moxifloxacin 高濃度抗藥，又只有一株進行液態藥敏結果比較，關於液態培養在 Moxifloxacin 高濃度的檢驗性能，需蒐集較多的抗藥株進行分析。

## 五 結論與建議

藥物效力利用最低抑菌濃度由低(左)到高(右)的連續 4 年監測，隨著筆數的增加及時間推移，觀察到 2014 年的抑菌濃度偏向高濃度分布，然後曲線逐年往低濃度分布移動，2017 年與前 3 年比較時，有較少的高濃度分布個案及較多的低濃度分布個案，可能原因需進一步蒐集資

料進行後續分析。

在傳染源仍具有 RMP 抗藥株的風險存在下，對於已發生的菌陽個案，應提供更快速的藥敏報告，在表現型的藥敏試驗方法學中，儀器自動判讀提供快速及避免人為主觀判斷微小菌落造成藥敏結果得不一致性。

儀器設計仍依傳統定性藥敏將要敏結果判為抗藥或敏感二選一，而沒有設計中間值，其商用軟體廠商的閾值設定依據亦未知，因此，需進一步與故態瓊脂法或分子生物檢測結果比對，以確定時間先後的基準範圍。

傳統藥敏法在 Capreomycin 的臨界濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  可能偏高，本計畫 Amikacin 抗藥時，仍有部分 Capreomycin 敏感，其臨界濃度的適當需進一步研究及蒐集基因型資料進行比對。

由 Moxifloxacin (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與 Levofloxacin 交叉抗藥比率得知當 Moxifloxacin 抗藥時，仍有 13.6% 的 Levofloxacin 敏感，Moxifloxacin 加入高濃度測試有其必要性。

## 六 重要研究成果及具體建議

- (一) 分析 2014 至 2017 年的藥物效力變化趨勢，了解全國抗藥菌株的藥敏型態現況。
- (二) 藉由同類藥物交叉抗藥的比例，提供臨床醫師設計處方的參考。
- (三) 建立快速液態培養方法，測試最低抑菌濃度，提供抗藥個案更快速的藥敏試驗報告結果。

## 七 參考文獻：

1. Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, et al. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. *JAMA* 2000;283:2537-45.
2. Quy HT, Lan NT, Borgdorff MW, et al. Drug resistance among failure and relapse cases of tuberculosis: is the standard re-treatment regimen adequate? *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:631-6.
3. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014.
4. Burman WJ. The value of in vitro drug activity and pharmacokinetics in predicting the effectiveness of antimycobacterial therapy: a critical review. *Am J Med Sci* 1997;313:355-63.
5. Pietersen E, Ignatius E, Streicher EM, et al. Long-term outcomes of patients with extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa: a cohort study. *Lancet* 2014;383:1230-9.
6. WHO. Guidelines for the Programmatic Management of Multidrug Resistant Tuberculosis. Geneva: WHO; 2011.
7. Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, Matthys V, Hoffner S, Richter E, Perez Del Molino ML, Cirillo DM, van Soolingen D, Bottger EC. 2015. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 70:686–696.
8. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA, Sula L. 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ* 29:565–578.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: approved standard, vol 23. M24-A. National Committee



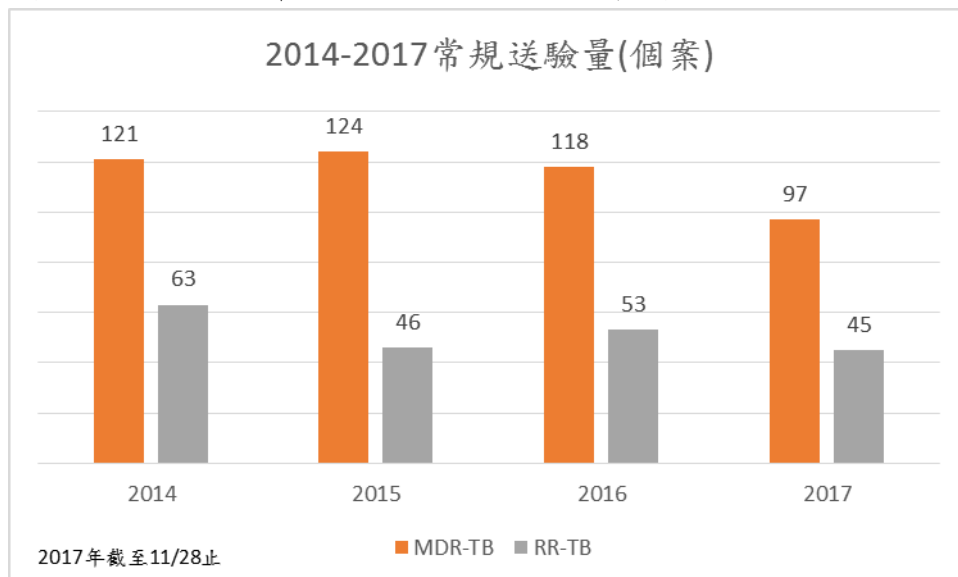
for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

10. Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M (2002) Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994–1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 748–756.
11. Kim S-J. Drug susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J* 2005; 25: 564–569.
12. Horne DJ, Pinto LM, Arentz M et al. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 393–401.
13. Wu MH, Chiang CY, Deng YM, Wang TF, Jou R. 2013. Proficiency of drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan, 2007-2011. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 17:113–119.
14. WHO. 2008. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. Report WHO/HTM/TB/ 2008.392. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
15. Nora S. Morcillo, Belén R. Imperiale, Ángela Di Giulio, Martín J. Zumárraga, Howard Takiff, Ángel A. Cataldi, Fitness of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and the impact on the transmission among household contacts, *Tuberculosis*, Volume 94, Issue 6, December 2014, Pages 672-677

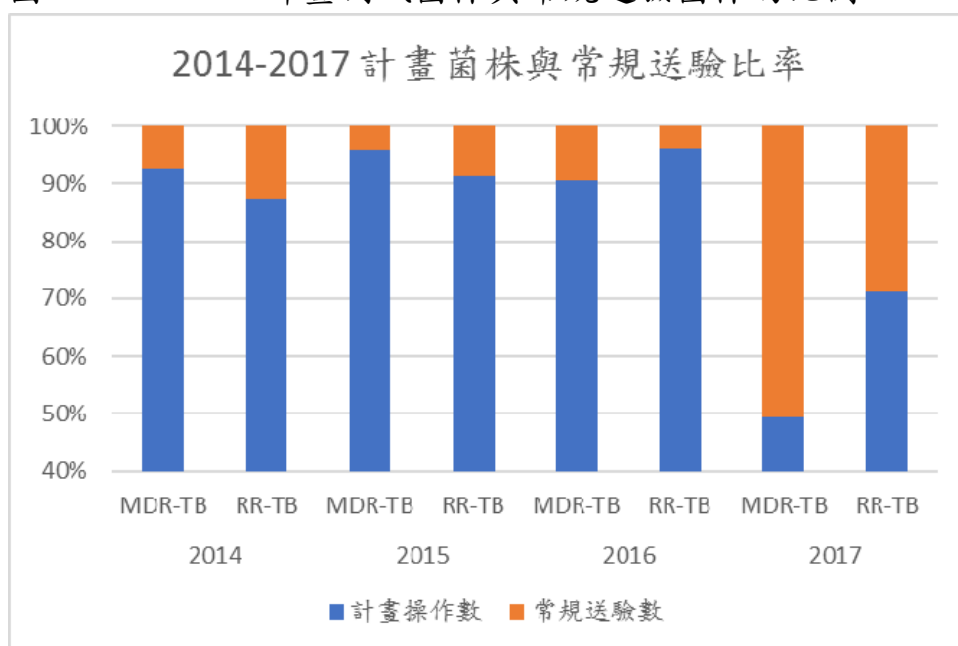
### 三、圖、表

#### 圖次

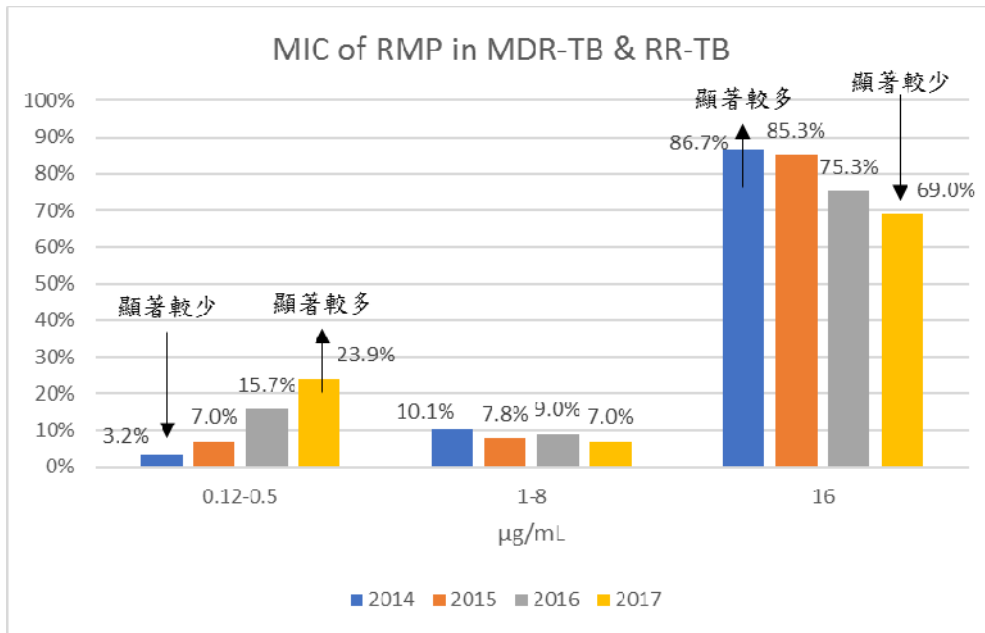
圖一 2014-2017 常規檢體送驗量，個案別



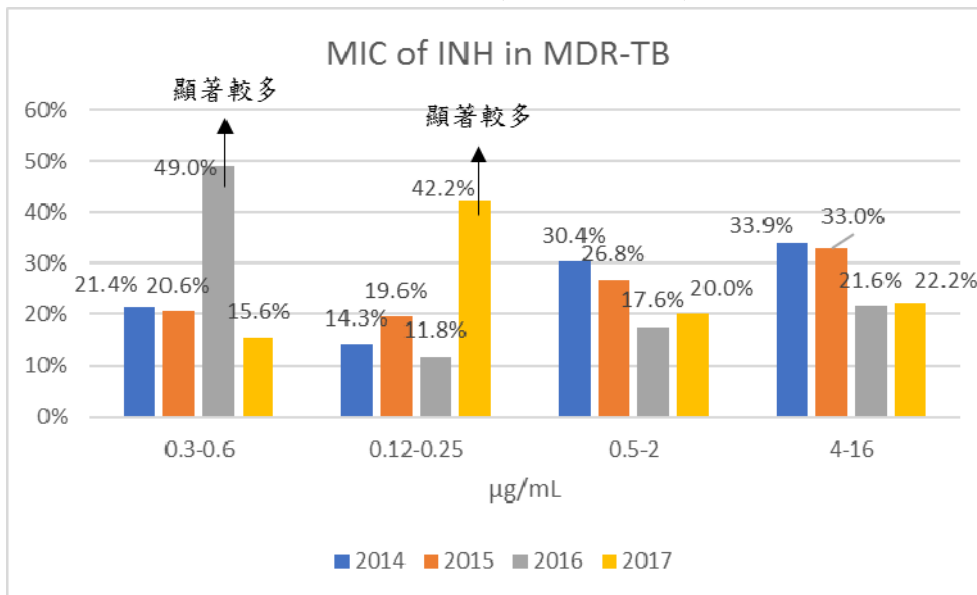
圖二 2014-2017 計畫測試菌株與常規送驗菌株的比例



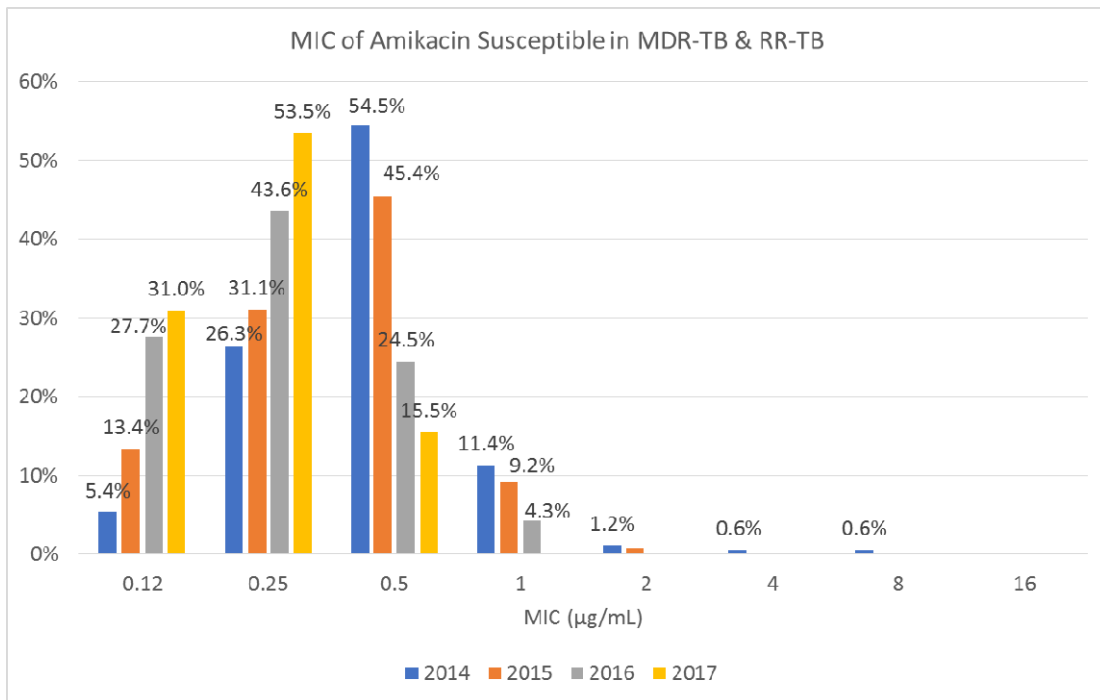
圖三 RMP 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布



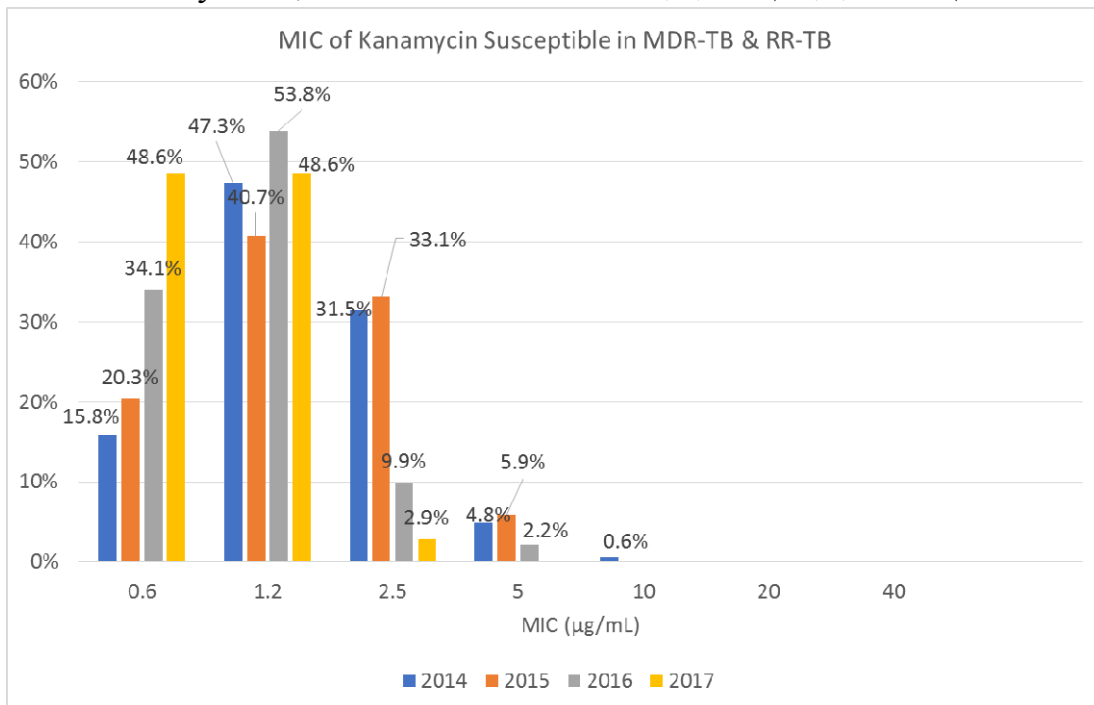
圖四 INH 對 MDR-TB 菌株的抑菌濃度分布



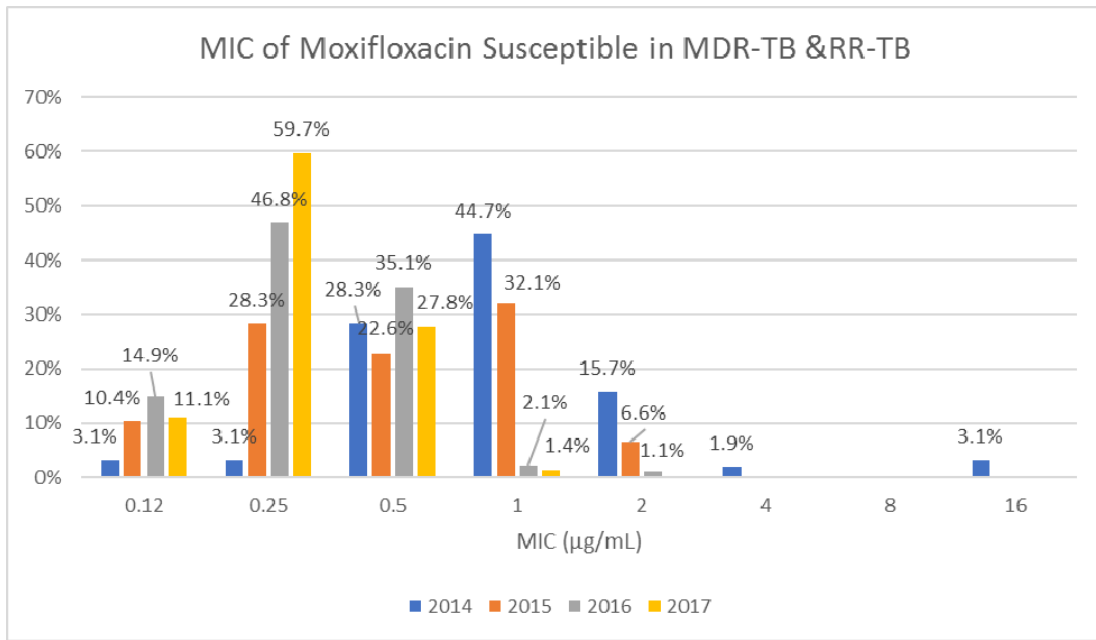
圖五 Amikacin 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布



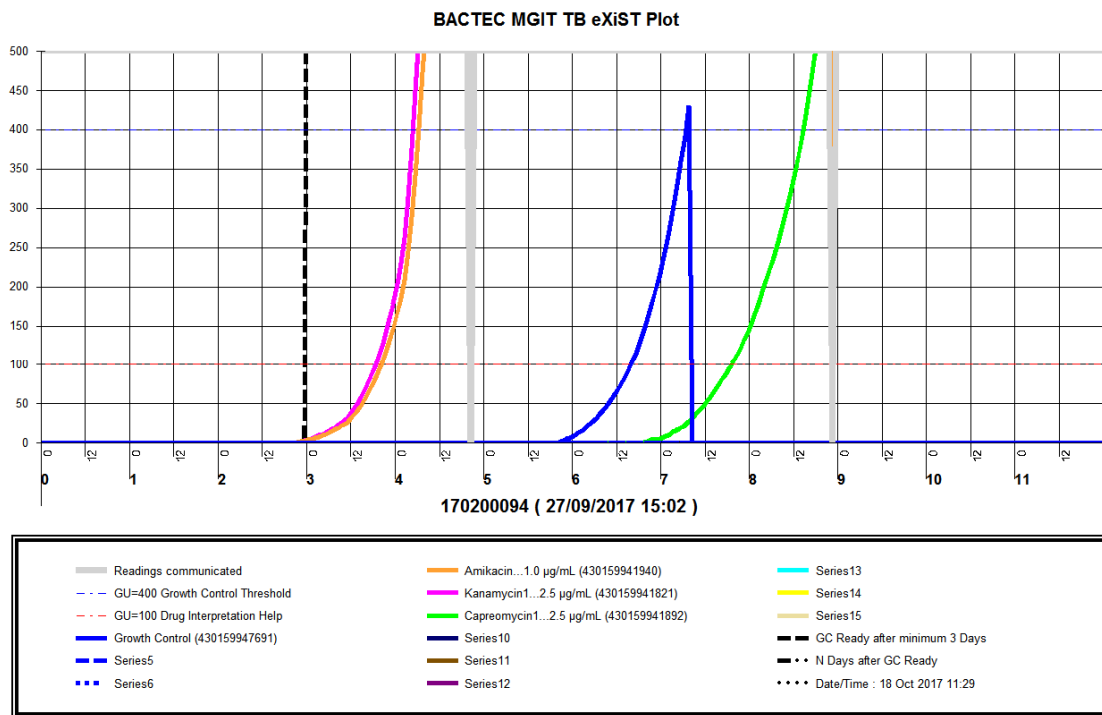
圖六 Kanamycin 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布



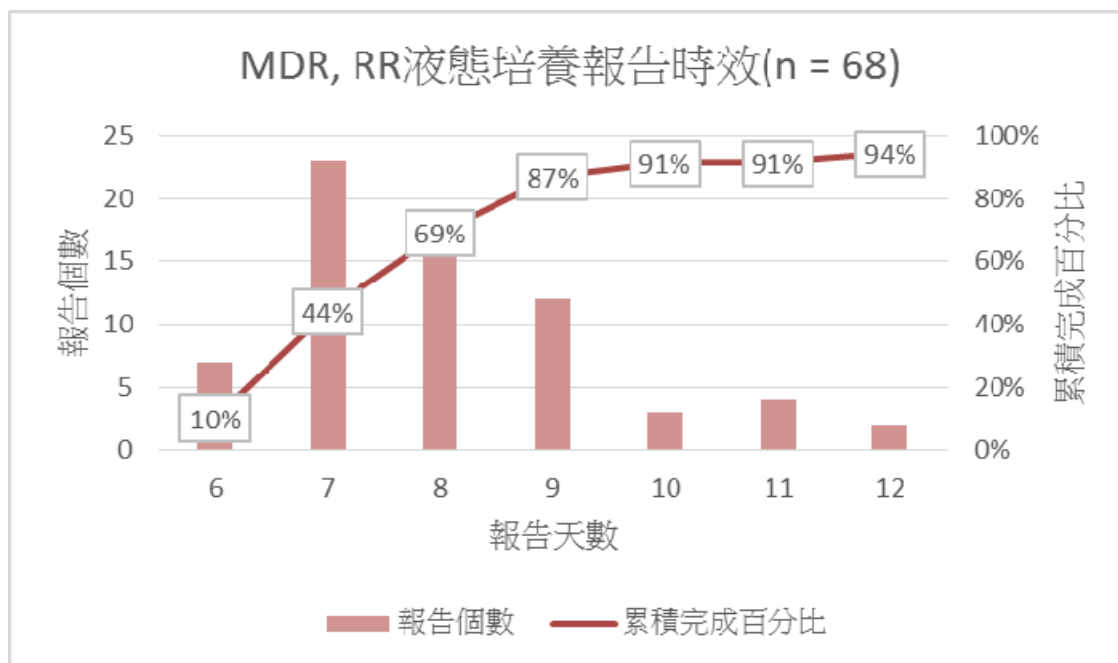
圖七 Moxifloxacin 對 MDR-TB 及 RR-TB 菌株的抑菌濃度分布



圖八 EpiCenter TB eXiST 藥敏試驗生長曲線



圖九 快速液態培養藥敏試驗報告時效



表次

表一 2014 至 2017 年複驗菌株及本計畫操作菌株數

常規送驗量	MDR-TB	RR-TB
2014	121	63
2015	124	46
2016	118	53
2017	97	45
計畫操作量	MDR-TB	RR-TB
2014	121	55
2015	119	42
2016	107	51
2017	48	32

表二 RMP 與 Rifabutin 交叉抗藥比率

		RBU_R	RBU_S	總計
RMP_R	次數	501	75	576
	列百分比	<b>86.98</b>	13.02	
RMP_S	次數	1	5	6
	列百分比	16.67	<b>83.33</b>	
總計		502	80	582

表三 Rifapentin 及 Rifampin 藥敏型態分析表

Rifampin_Agar	Rifapentin 0.12 MGIT		Total
	susceptible	resistant	
Susceptible / 列百分比	2 / 100%	0	2
Resistant / 列百分比	9 / 13.8%	56 / <b>86.2%</b>	65
Total	11	56	<b>67</b>
Rifampin_Agar	Rifapentin 0.25 MGIT		Total
	susceptible	resistant	
Susceptible / 列百分比	2 / 100%	0	2
Resistant / 列百分比	10 / 15.4%	55 / <b>84.6%</b>	65
Total	12	55	<b>67</b>

表四 INH 及 Ethionamide 藥敏型態分析表

INH_Agar	Ethionamide_Agar		Total
	Resistant	Susceptible	
Resistant / 列百分比	109 / <b>27.6%</b>	286 / 72.4%	395
Susceptible / 列百分比	1 / 0.6%	176 / 99.4%	177
Total	110	462	572

表五 INH 及 Prothionamide 藥敏型態分析表

INH_Agar	Prothionamide 2.5 MGIT		Total
	Resistant	Susceptible	
Resistant / 列百分比	32 / <b>71.1%</b>	13 / 28.9%	45
Susceptible / 列百分比	6 / 19.4%	25 / 80.6%	31
Total	38	38	76

表六 Amikacin 及 Capreomycin 藥敏型態分析表

Amikacin_Agar	Capreomycin_Agar		Total
	Resistant	Susceptible	
Resistant / 列百分比	15 / <b>71.4%</b>	6 / 28.6%	21
Susceptible / 列百分比	2 / 0.4%	549 / <b>99.6%</b>	551
Total	17	555	572

表七 Amikacin 及 Kanamycin 藥敏型態分析表

Amikacin_Agar	Kanamycin_Agar		Total
	Resistant	Susceptible	
Resistant / 列百分比	21 / <b>100%</b>	0	21
Susceptible / 列百分比	8 / 1.5%	543 / <b>98.5%</b>	551
	Resistant / 欄百分比	Susceptible / 欄百分比	
Resistant	21 / 72.4%	0	21
Susceptible	8 / <b>27.6%</b>	543 / 100%	551
Total	29	543	572



表八 Kanamycin 及 Capreomycin 藥敏型態分析表

Capreomycin_Agar	Kanamycin Agar		Total
	Resistant	Susceptible	
Resistant /列百分比	15 / 88.2%	2 / 11.8%	17
Susceptible /列百分比	14 / 2.5%	541 / <b>97.5%</b>	555
	<b>Resistant /欄百分比</b>	<b>Susceptible /欄百分比</b>	
Resistant	15 / <b>51.7%</b>	2 / 0.4%	17
Susceptible	14 / <b>48.3%</b>	541 / 99.6%	555
Total	29	543	572

表九 Levofloxacin 及 Moxifloxacin 藥敏型態分析表

Moxifloxacin0.5_Agar	Levofloxacin Agar		Total
	Resistant	Susceptible	
Resistant /列百分比	38 / <b>86.4%</b>	6 / 13.6%	44
Susceptible /列百分比	0	528 / <b>100%</b>	528
Total	38	534	572

表十 液態及固態藥敏試驗一致率分析

Drugs	MGIT No. of Strains		Agar		Sensitivity	Specificity	% Agreement
			susceptible	resistant			
Capreomycin	66	susceptible	63	0	100.0%	100.0%	100.0%
		resistant	0	3			
Amikacin	68	susceptible	64	0	100.0%	100.0%	100.0%
		resistant	0	4			
Kanamycin	66	susceptible	61	0	100.0%	100.0%	100.0%
		resistant	0	5			
Levofloxacin	28	susceptible	27	0	100.0%	100.0%	100.0%
		resistant	0	1			
Moxifloxacin	61	susceptible	60	0	100.0%	100.0%	100.0%
		resistant	0	1			
Ethionamide	24	susceptible	16	0	100.0%	76.2%	79.2%
		resistant	5	3			
Clofazimine	66	susceptible	66	0	NA	100.0%	100.0%
		resistant	0	0			

附錄：無