

計畫編號：DOH98-DC-2025

行政院衛生署疾病管制局九十八年度自行研究計畫

多重與超級抗藥性結核病實驗室檢驗與監測整合型計畫

子計畫一：建立多重與超級抗藥性結核病實驗室檢驗與監測系統

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：周如文

協同主持人：吳玫華

研究人員：余成益、張永麟

執行期間：98年1月1日至98年11月15日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

| | 頁 碼 |
|----------------------------|-------|
| 封面 | |
| 目錄 | |
| 壹、中英文摘要 | (3) |
| 貳、本文 | |
| 一、前言 | (8) |
| 二、材料與方法 | (13) |
| 三、結果 | (18) |
| 四、討論 | (23) |
| 五、結論與建議 | (28) |
| 六、計畫重要研究成果及具體建議 | (30) |
| 七、參考文獻 | (32) |
| 八、圖、表 | |
| 圖一 MDR-TB 複驗及報告流程 | (34) |
| 圖二 MDR-TB 臨床檢體快速鑑定與抗藥性試驗流程 | (35) |

| | |
|---------------------------|------|
| 表一 2009 年 MDR-TB 複驗結果分析 | (36) |
| 表二 2009 年結核菌藥物感受性試驗能力測試結果 | (37) |
| 表三 痰臨床檢體快速檢驗結果分析 | (39) |

壹、摘要

研究目的 配合疾管局「結核病十年減半計畫」，及針對多重抗藥性(MDR-TB)與超級抗藥性結核病(XDR-TB)建置之「MDR醫療照護體系」，協助快速確診MDR-TB病人，排除因非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)所造成之誤判，建立有時效及準確之實驗室檢驗與監測系統，以做為供病人納入醫療照護體系判定參考依據；並藉此計畫參與跨國合作計畫。

研究方法 依一般防疫檢驗送驗流程分送菌株或送驗臨床檢體至分枝桿菌實驗室進行複驗，包含分子試驗、傳統檢驗及包括抗結核一線藥及二線藥測試。另為確保臨床實驗室抗藥性試驗(drug susceptibility testing, DST)品質，依國際標準程序與指引進行全國抗藥性試驗能力測驗。

主要發現 (1) 截至 2009 年 10 月，224 名送複驗之疑似MDR-TB個案中經分子快速檢測及傳統藥敏確認後，MDR佔 199 名(88.8%)、非MDR佔 13 名(5.8%)及NTM或其他病原佔 12 名(5.4%)；若以菌株數統計，總共 310 株菌株送達疾管局複驗：其中MDR佔 273 株(88.1%)、非MDR佔 14 株(4.5%)及NTM或其他病原佔 23 株(7.4%) (表一)。報告時效性上(未排除休假日)，MDR菌株分子複驗平均可於 6 (範圍 1-21)天內(含假日)完成，非MDR則需經基因序列分析平均約為 10.7 天；若需以傳統藥敏方法再複驗則需時約 38 天。另外，NTM因為需加上其它方法(PCR-RFLP及基因序列分析)才得以判定至菌類(species)，因此所需要判定日數平均為 9.6 天；(2) 2009 年DST之品管評估共有 36 家實驗室參加，能力測驗結果顯示，isoniazid正確率為 99.7%、rifampin為 99.5%、ethambutol為 97.2%及streptomycin為 97.5%；並公告 32 家(88.9%)合格實驗室；(3) 截至 2009 年 10 月，完成 224 名疑似MDR個案的複驗，共有 88.8% (199/224)確認為MDR。MDR個案之一線藥物的聯合(含primary

及secondary)抗藥性結果為：100% (199/199)對INH、100% (199/199)對RMP、50.8% (101/199)對EMB、48.7%(97/199)對SM具有抗藥性。此外，有151名MDR個案的菌株完成pyrazinamide (PZA)試驗，29.1% (44/151)具抗藥性。有160名MDR個案具有完整二線藥物抗藥性資料可供分析，26.3% (42/160)對ofloxacin、16.9% (27/160)對kanamycin、8.1% (13/160)對capreomycin、50.6% (81/160)對ethionamide、12.5% (20/160)對para-aminosalicylate、8.8% (14/160)對amikacin及88.1% (141/160)對rifabutin具抗藥性。共有8.8% (14/160)是XDR-TB個案；(4)快速抗藥性評估：以世界衛生組織推薦GenoType®MTBDRplus試劑組評估臨床檢體，評估試驗至9月22日止，共收91件痰檢體。發現仍以抹片陽性的檢測成效較佳，計66件(72.5%)可初判為TB，其中16件(17.6%)可初判為MDR；(5)執行PETTS國際合作之計畫，協調整合國內TB研究架構，2008年至2009年10月20日止共66名符合收案規格之MDR-TB病例。

結論及建議事項 MDR-TB & XDR-TB實驗室檢驗與監測之執行，除(1)協助病人順利轉往專責醫療體系，避免因NTM感染產生誤判及由非MDR-TB判定，使病人可以得到有效治療及公衛管理；(2)證明分子技術可協助特殊TB個案菌株及臨床檢體判定，大幅提昇時效性；(3)藉由複驗及品管機制，可改善臨床實驗室MDR-TB確認能力及監控其鑑定及抗藥性檢驗品質；(4)若病患符合下列3項條件，則其痰檢體之GenoType測試報告可視為MDR確診報告，做為收案依據：為痰抹片陽性且臨床診斷為結核病；至少2次採檢痰檢體GenoType結果一致；與多重抗藥性結核病確認病人有密切接觸史；(5)更積極藉由國際合作計畫之執行提昇TB團隊整體研究能量，參彰顯臺灣在TB防治作為與成效。

關鍵詞：結核病、多重與超級抗藥性、實驗室監測

Abstract

Purpose: Taiwan CDC implemented a DOTS-plus program for the management of multiple-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients in May 2007. All MDR-TB patients cared in the program had to be confirmed by Taiwan-CDC. To establish an accurate and timely diagnosis and surveillance program, MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates were sent to the reference laboratory of mycobacteriology for confirmation and drug susceptibility testing (DST).

Methods: An algorithm for MDR-TB rechecking, including strain identification, DST confirmation was established. From January to October 2009, a total of 310 isolates of patients intended to enroll in the program were analyzed. The DST methods applied in this study were liquid (BACTECTM MGITTM 960 SIRE and PZA Kits) and agar proportion methods. In addition, a DST proficiency testing was conducted to evaluate the quality of DST services in 36 clinical TB laboratories.

Results: (1) Of the 224 MDR-TB cases, 199 (88.8%) were MDR cases, 13 (5.8%) non-MDR and 12 (5.4%) nontuberculous mycobacteria or other pathogens infected cases. The turnaround time for MDR confirmation was 6 days (range 1-21 days). Weekends and holidays were not excluded. (2) There were 36 laboratories participated DST Proficiency test in 2009. In 2009, the mean accuracy in detecting resistance to INH was 99.7% and to RMP 99.5%, EMB 97.2%, and that to SM to 97.5%. Overall, there were 4 (11.1%) laboratories did not fullfilled the competent criteria for all four drugs. (3) The drug resistance survey demonstrated that the combined first-line anti-TB drug resistance rates of 199 MDR *M. tuberculosis* isolates were: 100% for isoniazid, 100% for rifampin, 50.8% for ethambutol, 48.7% for streptomycin. Of the 151 isolates tested for pyrazinamide, 29.1% were resistant. Of the 160 MDR isolates, combined second-line anti-TB drug resistance rates were 26.3% for ofloxacin,

16.9% for kanamycin, 8.1% for capreomycin, 50.6% for ethionamide, 12.5% for para-aminosalicylate and 88.1% for rifabutin. Furthermore, 8.8% (14/160) were extensively drug-resistant TB.

Conclusions and suggestions: Resistance to anti-TB drugs is a serious concern in this preliminary survey. A strengthened strategy for MDR TB management has to be instigated more thoroughly to improve the treatment outcome.

Key Words: multiple-drug resistance, tuberculosis, laboratory surveillance

貳、本文

一、前言

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 於 2007 年 8 月 23 日出版「The World health Report 2007-A Safer Future- Global Public Health Security in the 21st Century」第二章「大眾健康安全威脅 (Threats to public health security)」中，指出微生物對抗感染藥物產生抗藥性之演化結果，是造成新興及再浮現感染疾病最重要因素 (1)。更在第四章「學習課題預先思考 (Learning Lessons, thinking ahead)」中，探討 XDR-TB 在 TB 防治上需要有強力健康系統以改善大眾健康安全。其中，應變準備強調實驗室須具備抗藥性測試能力、TB 病患早期診斷及充足的高品質二線 TB 治療藥物供給等。

事實上，基於結核菌抗藥性問題日趨嚴重，WHO 及國際抗癆聯盟 (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, IUATLD or the UNION)，已於 1994 年推出治療結核病藥物抗藥性全球監測計畫 (Global Project of Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance)，使用統一之規範進行全世界 35 個地區 (geographical setting) 正確、標準及具代表性抗藥性數據之收集，並已於 1997 年發表第一期結果報告 (2)。依據結論，繼續推出「DOTS-Plus」，以進一步研究使用第二線抗生素治療抗藥性結核病之可行性。於第二期計畫 1996-1999 年期間，包括全世界 58 個地區總共有 100 多家實驗室加入此抗藥性監測計畫 (3)。世界衛生組織第三期全球抗藥監測計畫 2004 年報告指出：新個案 (new cases) 與再治療個案 (previously treated cases) 的抗藥性盛行率中位值分別為：5.9%及 14.4%對 isoniazid (INH)，6.3%及 11.4%對 streptomycin (SM)，1.4%及 8.7%對 rifampin (RMP)，

0.8%及 3.5%對 ethambutol (EMB)。新個案有 0-13.7%而再治療個案有 7.0% 中位值，為至少對 INH 與 RMP 同時具有抗藥性，即所謂之 MDR 病患 (4)。抗藥性結核病是結核病治療失敗的重要因素之一，如何預防並克服抗藥性已成為全球公共衛生急切的課題。發生抗藥性的原因很多，除了少部分病患是因為直接被具有抗藥性的結核菌株感染致病以外，大部分是人為因素所造成，主要為病患的服藥順從性、處方錯誤、藥物供應不規律、藥物品質不良及個案管理不佳等。發生因素尤其是和病患的服藥順從性與規律性關聯性最大。例如：不規則服藥、服藥期間未滿即自行停藥或選擇性服藥等，都可能是造成結核菌產生抗藥性的導因。除了病患本身的問題之外，醫療人員的治療與處理觀念與方式的正確性，也會影響到抗藥性的發生。而至少對 INH 與 RMP 同時具抗藥性之 MDR 的產生，最常發生的錯誤就是一次只加單種藥物至一個已治療失敗的處方中，進而造成新的抗藥性發生。其次是醫生一開始治療病患時使用的處方藥物劑量不足，或是對活動性結核病的誤判而僅施予不當的 INH 預防性治療等，都足以對後來進入真正療程時，可能因為已經導致的 INH 抗藥性而造成用藥困擾。所以，在處置已證實或懷疑為 MDR 的病人時，臨床醫師必須竭盡所能地蒐集病人之結核病史與治療史，以判斷及調整處方的藥物組合再加入多種二線藥物。但是，由於二線藥物的療效差且副作用也多，加上服藥的期間長，病人常無法依醫囑完成療程。所以，MDR 的治療目前仍未得到理想的成果。

台灣地區施行全國結核病防治計畫 (National Tuberculosis Program, NTP) 已經超過五十年，疾病盛行率和死亡率已有明顯的下降，然而每年仍有許多新的病例產生。根據民國九十四年資料顯示，台灣有 22,663 件通報及 16,472 件確診的結核病個案，發生率為每十萬人中有 72.47 例個案 (5)。結核病在我國仍是一項急待解決的公共衛生問題。目

前，台灣結核病的抗藥性監測，除了能進行抗藥性試驗之實驗室有限外，仍缺乏整體性與系統性之全國性整合報告系統，無法區別原發性 (primary) 及獲得性 (acquired) 抗藥性。因此，也無從真正透視台灣地區結核病治療成效與抗藥性趨勢。

2006 年 3 月 MMWR 文獻報導全球 XDR-TB 的問題，引起全球之關切 (6)。最初提出 XDR-TB 的定義為：MDR-TB 對 6 類二線 TB 治療藥物 (aminoglycosides、polypeptides、fluoroquinolone、thioamides、cycloserine 及 para-aminosalicylic acid) 中之其中 3 項以上產生抗藥性。稍後，10 月重新定義 XDR-TB 為：MDR-TB 除對任一 fluoroquinolone 抗藥外，至少對任一 3 種針劑 capreomycin、kanamycin 及 amikacin 產生抗藥性。XDR-TB 共同感染 HIV 時，死亡率高，造成 HIV/AIDS 控制上嚴重的威脅。世界衛生組織遂於 2007 年 2 月出版「The Global Task Force on XDR-TB, Update」，提出 8 項防治建議。目前，預估全球每年約有 424,000 MDR-TB 個案，其中 25,000 為 XDR-TB 個案。Global Plan to Stop TB 建議於 2015 年應可診治 1,600,000 MDR-TB 個案。世界衛生組織更於 2007 年 7 月 23 日，發布「Policy guidance on TB drug susceptibility testing (DST) of second-line drugs (SLD)」，重申實驗室於 MDR/XDR-TB 防治之重要性。為達成 2015 年目標，實驗室必須具備第一、二線 TB 治療藥物 DST 及使用分子方法之量能 (7)。

台灣結核病抗藥性，雖然近十幾年來雖然已有不少台灣結核病的抗藥性文獻報告，但是由於各醫院相關實驗室所用抗藥性試驗方法並不一致，INH 抗藥判斷基準不同，醫院所診治之病人性質有差異，發表的年代也不相同，因此數據有所差異無法相互比對與整合，以致長期以來缺乏全國性代表數

據。

台灣於 1957 及 1978 年，分別開始使用 INH 及 RMP 於結核病治療上。綜合 1960 年至 2004 年抗藥性相關報導，得知聯合抗藥性比率分別為：13.9-31.5%對 INH，8.3-28.6%對 SM，4.9-18.2%對 RMP，4.1-15.7%對 EMB 及 3.9-17.3%對 MDR (8-15)。但是，前述數值多為單一醫院的各別統計結果。由 2002-2003 年，全台 28 家地區醫院資料分析顯示，單一抗結核藥物之聯合抗藥性為 23.4%，而 MDR 之抗藥性則為 3.8%。以 2003-5 年，台灣 10 家疾病管制局分枝桿菌合約實驗室，由 3,699、3,885 及 4,219 個案病例所分離結核菌株之聯合抗藥性檢驗結果則為：9.5-11.3%對 INH，6.4-7.5%對 RMP，2.1-5.8%對 EMB，9.6-10.6%對 SM，18.1-20.0%對單一抗結核藥物有抗藥性，而 MDR 為 4.0-5.3%。

進一步，本實驗室依據例行進行二線抗結核藥物測試之 3 家實驗室所提供之資料分析，顯示 2004 及 2005 年，各所測試之 185 與 194 MDR 結核菌中，XDR-TB 結核菌各佔 9.7%及 8.2%。其中，有 1 家醫院 XDR-TB 佔 14.5%；但是 fluoroquinolone 抗藥性竟然高達 41.6%。因此，建議需限制 fluoroquinolone 在臨床上的使用(16)。

若由細菌學的角度來探討，抗藥性菌株之基因歧異 (genetic diversity) 度，可能與某些宿主因素及與不同地理區域所分離結核菌株品系之演化有關。若針對疾病管制局目前已收集之台灣地區抗藥性結核菌株，分析其基因突變機率及多型性，可推斷菌株演化關聯性和傳染動態。結果發現，台灣地區 RMP 抗藥或 MDR 結核菌的盛行，可能較傾向於病患感染結核菌後，基因才陸續發生突變而造成抗藥性，而非由 MDR 結核菌的直接傳播所導致。目前，並未有在社區出現 MDR 結核菌株的散佈而造成大流行的

報告出現 (17)。

此外，本局已加入由美國 CDC 主導之跨 9 國之 MDR-TB 治療長期追蹤研究 Preserving Effective TB Treatment Study (PETTS) 計畫。PETTS 計畫主要希望瞭解，多重抗藥結核病患於接受治療時：(1)對二線結核病治療藥物產生抗藥性及不會產生抗藥性的比例分別為何?(2)不會產生抗藥性的原因為何?(3)使用二線藥治療之結果為何?(4)對二線治療藥物產生抗藥性後，對治療結果的影響為何?(5)如果依照世界衛生組織對多重抗藥結核病患的治療指引，是否能預防病患對二線治療藥物產生抗藥性等主題。因此，將依 PETTS protocol 內容，利用本 MDR 檢驗與監測計畫之便，選擇適合研究收案病例，除每月收集檢體進行結核菌檢驗外，亦進行相關臨床治療及菌株臨床抗藥資料變化情形，以做為日後 DOTS-Plus 方案執行成效實證。

二、材料與方法

依據疾病管制局於 2007 年 3 月始邀集台灣 5 個專業 TB 醫療照護團隊，啟動之「MDR 醫療照護體系」，進行 MDR-TB 及 XDR-TB 實驗室監測。

1. 病人選擇 (patient intake) 策略與菌株檢體之收集

研究族群包括正發病病人、連續發病病人或檢體已經過標準化程序分離且確認之結核菌株，以電腦建檔菌株之流病資料。菌株收集對象將以醫療院所通報之確定 MDR 病例所分離出結核菌株為主。臨床檢體送驗對象以再治療個案(失敗再治、失落再治、復發及其它)及新案(有無接觸史、不規則服藥、醫生懷疑 MDR 及其它)。PETTS 個案則為開始使用二線藥物前後一個月內，具有 baseline 菌株及簽署完成同意書之個案。但是，列入以下條件的 MDR 病患則不適合納入 PETTS 計畫：(1) 肺部外結核病患者；(2) 被其他結核病患者傳染的再次感染者；(3) 入獄監禁者、孕婦及小於 18 歲之兒童。至於，臨床檢體快速確定為 TB 及/或 INH/RMP 抗藥評估方面，

2. 菌株流行病學資料電腦檔之建立

將由以電腦軟體 EXCEL 建立菌株之流病基本資料，儘可能包括：菌株分離者與單位；採檢與菌株分離日期病人之姓名、年齡、性別、地址、國籍；發病日期；其它疾病歷史及其他相關流病資料等。由結核分枝桿菌實驗室負責菌株與流病資料之彙集與建檔工作。PETTS 個案資料則依國際間標準病人資料表(patient data form)填寫。

3. MDR 結核菌之複驗

(1) 以分子方法複驗

1.1 結核菌群之確認：以 16S rRNA 即時聚合酶連鎖反應陽性確認送驗菌株屬於結核菌群。若實驗結果為陰性，則進行聚合酶連鎖反應酵素切割片段多型性分析 (PCR-RFLP) 及 16S rRNA 定序確認菌株種類(species)。

1.2 抗藥基因位點之確認：進行 Genotype[®] MTBDR *plus* 檢測，原理係利用第一線抗藥 (如 RMP 及 INH) 之 *rpoB*、*katG*、*inhA*r，選擇抗藥性菌株基因突變位點最常發生者，設計引子對並進一步將突變基因位點合成相對應之核酸序列，鑲結於已知位置之長型纖維紙片上，利用聚合酶連鎖反應後之核酸產物，與長型纖維紙片上之核酸序列進行雜交，若有相對應之抗藥位點即可在此紙片上呈色。檢測結果並配合抗藥基因位點定序實驗，確認送驗菌株於分子複驗階段是否屬於多重抗藥性菌株。由於分子複驗準確率介於 85-90%，若分子複驗結果與臨床實驗室結果不一致，本實驗室稍後會再發出第一線藥物複驗結果報告。

(2) 以傳統藥敏試驗(drug susceptibility testing, DST)方法複驗

2.1 MGIT[™] 960 間接藥物感受性試驗

2.1.1 抗生素藥物配製－藥物最終濃度分別：INH為0.1及0.4 µg/ml；SM為1.0及4.0 µg/ml；RMP為1.0 µg/ml；EMB 為5.0及7.5 µg/ml。另外，測試培養管需先行加入0.8 ml OADC至每一培養管中。

2.1.2 菌液調製－原則上，以L-J培養基培養出之新鮮初代培養結核菌做為測試菌，於負壓實驗室中調製測試菌液：調製

McFarland 0.5 菌液；配製 1:5 及 1:50 稀釋菌液。

2.1.3 測試方式

2.1.3.1 接種管擺放於測試架之位置次序依序為

growth control, SM at 1.0 $\mu\text{g/ml}$, SM at 6.0 $\mu\text{g/ml}$,
INH at 0.1 $\mu\text{g/ml}$, INH at 0.4 $\mu\text{g/ml}$, RMP at 1.0 $\mu\text{g/ml}$,
EMB at 5 $\mu\text{g/ml}$, and EMB at 7.5 $\mu\text{g/ml}$.

2.1.3.2 接種 0.5ml 1:500 稀釋菌液加入 SIRE control MGIT 960

培養管。接種 0.5 ml 1:5 稀釋菌液於含不同待測試抗生素
SIRE MGIT 960 培養管中。再將 MGIT 960 培養管，置於
MGIT 960 主機中 37°C 靜置培養。

2.1.4. 結果判讀

含藥試管之螢光強度即 GU 值大於 100 之臨界值，判定
為陽性，反之為菌株對該藥物為敏感之陰性結果。

2.2 7H10 及 7H11 瓊脂平板法 DST 複驗及二線藥物試驗

2.2.1 藥物濃度

一線藥: INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$, RMP 1.0 $\mu\text{g/ml}$, EMB 7.5 $\mu\text{g/ml}$,
SM 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

二線藥: Ofloxacin (OFX) 2.0 $\mu\text{g/ml}$, *p*-Aminosalicylic acid
(PAS) 8.0 $\mu\text{g/ml}$, Ethionamide (EA) 10.0 $\mu\text{g/ml}$,
Capreomycin (CAP) 10 $\mu\text{g/ml}$, Kanamycin (KM) 6.0 $\mu\text{g/ml}$
及 Amikacin (AK), Rifabutin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2.2 菌液調製—原則上，以 L-J 培養基培養出之新鮮初代結
核菌做為測試菌，於負壓實驗室中調製測試菌液。接種
量需固定，以免影響測試結果。(a) 調製 MaFarland 1.0

菌液。(b)配製 1:100 (10^{-2})及 1:10000 (10^{-4}) 稀釋菌液。

2.2.3 測試方式

(a)接種 三滴(0.1mL)之 1:100 稀釋菌液入 Agar plate。

(b)接種三滴(0.1mL)之 1:10000 稀釋菌液入 Agar plate。

(c)接種完成之 Agar plate，置於室溫中，直到接種菌液
吸入瓊脂中（亦即點變乾）。

(d)將平板分別封入 CO₂ 可通透的塑膠袋中，並於 37°C 恆
溫培養箱中靜置培養。

2.2.4 結果判讀

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+及<50 菌落則
計錄實際菌落數。

(a)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。

(b)如果對照組已長3+或4+，而含藥的四分格沒有長，則可
以報告此藥是感受性的。

(c)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。

(d)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，加長至6 星期培養時間。當對照組有長足夠量時，只能報告有效的藥。

4. 複驗結果報告

結果上傳至登錄系統及傳真至疾管局各分局，提供權責單位及臨床照護團隊分析及參考。

5. DST 能力試驗外部品管評估

選取本局參加 WHO/UNION 國際跨國(supernational)實驗室 DST 能力測驗結核菌組，大量增殖製備 30 株菌後分裝；經內部 DST 及品質測驗合格，再以亂碼編組後，依生物安全運送規範分送參加測試的實驗室。能力測驗合格標準設定為 INH 及 RIF $\geq 95\%$ ；EMB 及 SM $\geq 90\%$ 。

6. 建立抗藥性結核菌株庫：

菌株以含 10% OADC、0.2%甘油之 7H9 培養基，保存於-70°C 中冰櫃中，先存放於疾管局分枝桿菌檢驗實驗室。PETTS 個案菌株則須另外分送至美國 CDC。

三、結果

一、 建立抗藥性實驗室監測流程，含臨床資料之收集與分析

(一) 已建立整體監測流程(圖一 MDR 為菌株複驗及圖二為臨床檢體快速檢驗)，又配合權責組 2008 年 5 月函文修正檢驗及報告流程，並逐月與權責及分局進行 MDR 醫療照護收案病人勾稽確認。另外，臨床資料之收集及建置，則配合本實驗室主持並經過各 MDR 醫療照護倫理委員會核准之 PETTS 國際合作之計畫個案與格式。目前，PETTS MDR 菌株基因型、DST 與臨床表現資料，正由美國 CDC 團隊分析及準備撰寫報告中。

(二) 抗藥性複驗流程及機制方面，已建立最適及標準化抗藥性複驗技術，含分子技術(新商用試劑及基因序列分析)及傳統技術(第一及二線藥物抗藥性試驗)。依檢體或個案特性，循用不同機制流程。為了提高報告時效性，2009 年修正為送驗菌株若是以 GenoTypeDR*plus* 判定為 MDR，則不再經過基因序列分析及第一線藥物抗藥性試驗的複驗程序。截至 2009 年 10 月，224 名送複驗之疑似 MDR-TB 個案中經分子快速檢測及傳統藥敏確認後，MDR 佔 199 名(88.8%)、非 MDR 佔 13 名(5.8%)及 NTM 或其他病原佔 12 名(5.4%)；若以菌株數統計，總共 310 株菌株送達疾管局複驗：其中 MDR 佔 273 株(88.1%)、非 MDR 佔 14 株(4.5%)及 NTM 佔 19 株(6.1%)及其他病原佔 4 株(1.3%) (表一)。報告時效性上(未排除休假日)，MDR 菌株分子複驗平均可於 6 (範圍 1-21 天)天內(含假日)完成，非 MDR 則需經基因序列分析平均約為 10.7 天；若需以傳統藥敏方法再複驗則需時約 38 天。另外，NTM 因為需加上其它方法(PCR-RFLP 及基因序列分析)才得以判定至菌類

(species)，因此所需要判定日數平均為 9.6 天。但是，必竟分子基因技術與方法在 *Mycobacterium tuberculosis* 抗藥性檢測上敏感性仍顯不足。表一中列出分子檢驗及傳統藥敏試驗判定 MDR 間之差異：以個案數來看，有 34 位(15.2%)仍需進入傳統藥敏試驗複驗判定，而最終判定只排除 14 位(6.3%)為 MDR。進入傳統藥敏試驗複驗階段，則需耗時約 1 個月才得終判。因為，連使用現行基因序列分子檢驗仍無法偵測 20 位(8.9%) MDR-TB。此外，造成誤判的 19 件 NTM 為 *M. abscessus* 3 件、*M. intracellulare* 3 件、*M. fortuitum* 3 件、*M. chelonae* 2 件、*M. trivivale* 2 件、*M. gordonae* 1 件、*M. kansasii* 1 件、*M. mucogenicum* 1 件、*M. shimoidei* 1 件及其他 *M. spec* 2 件。因此，實驗室顯然仍需發展更具敏感與正確性的分子檢驗方法，供臨床鑑定及抗藥性監測。

(三) 建立 MDR 菌株庫方面，完成送驗菌株次培養及標準方法系統性存菌、入庫及保存管理；另外，將菌株去活化後，提供另一計畫 (DOH98-DC-2501) 進行基因分型及分析。

二、 抗藥性試驗品管

(一) 通過國際抗藥性試驗能力測驗：

本實驗室參加 2008 年由世界衛生組織辦理之 Network of supranational tuberculosis laboratories (SRLN) 14th 回抗藥性試驗能力試測驗。共計執行 30 株結核菌株之一線藥，所有結果皆正確。另外，參加 2008 第一次 CAP E-survey 抗藥性試驗能力試驗，所有結果皆正確。

(二) 進行國內臨床實驗室抗藥性試驗能力測驗

1. 一線藥物抗藥性試驗能力測試：選用 WHO/UNION SRLN 抗藥性試驗能力試驗結核菌株，增殖製備計 30 株。先行發送問卷徵詢及鼓勵相關單位參加，同時進行實驗室檢驗資料收集。得知，2008 年抗藥性試驗執行量，最少為灣橋榮民醫院 33 件，而最多為芮弗士檢驗所 3,532 件。在完成菌株準備、確認及菌株異動核備後，分送國內計 36 家結核菌實驗室，進行一線藥能力測試。36 家實驗室，其中 30 家使用 7H10 瓊脂平板法抗藥性試驗及 6 家使用 MGIT™ 960 間接藥物感受性試驗。能力測驗合格標準設定為 INH 及 RMP $\geq 95\%$ ；EMB 及 SM $\geq 90\%$ 。能力測驗綜合結果列於表一。INH 及 RMP，正確率平均各為 99.7%及 99.5%，INH 及 RMP 有 1 及 2 家未達 95%合格標準；整體 EMB 及 SM 正確率平均各達 97.2% 及 97.5%，EMB 及 SM 各有 2 家及 1 家未達 90%合格標準(表二)。針對 32 家(86%) 4 種藥物皆合格的實驗室，本局除將試驗成績與結果函送原參加單位知悉與檢討外，將合格醫療院所名單公告並函轉衛生局所及各醫療院所。
2. 二線藥物抗藥性試驗能力測試：進行本局參考實驗室與 2 家委託二線藥物抗藥性試驗合約實驗室，能力測試平行比對。結果發現其中，EA 的一致性較差，正確性各為 63.7%及 81.7%。其他測試的二線藥物皆約達 90%以上。不一致者將需要以分子生物方法協助確認。

三、MDR 菌株藥物試驗結果

截至 2009 年 10 月，完成 224 名疑似 MDR 個案的複驗，共有

88.8%(199/224)確認為 MDR。MDR 個案之一線藥物的聯合(含 primary 及 secondary)抗藥性結果為：99.5% (198/199)對 INH、98.5% (196/199)對 RMP、50.8% (101/199)對 EMB、48.7%(97/199)對 SM。此外，有 151 名 MDR 個案的菌株完成 pyrazinamide (PZA)試驗，29.1% (44/151)具抗藥性。有 160 名 MDR 個案具有完整二線藥物抗藥性資料可供分析，26.3% (42/160)對 OFX、16.9% (27/160)對 KM、8.1% (13/160)對 CAP、50.6% (81/160)對 EA、12.5% (20/160)對 PAS、8.8% (14/160)對 AM 及 88.1% (141/160)對 rifabutin 具抗藥性。共有 8.8% (14/160)是 XDR-TB 個案。

四、痰檢體快速 TB 及 INH/RMP 抗藥性檢驗

醫療院所共送驗 91 件痰檢體，其中含再治療個案 48 件及新案 44 件。再治療個案中，以復發者 relapse 佔多數 66.7% (32/48)；新案個案中，以有接觸史者佔多數 25% (11/44)。GenoType 分析結果顯示(表四)，16 (16.7%)個案為 MDR-TB、50 (55%)個案為 TB 但是非為 MDR-TB；若以痰抹片結果來判讀，痰抹片陰性檢體有 23 件，其中有 14 (60.9%)件無法判讀；痰抹片陽性檢體有 68 件，其中有 11 (16.2%)件無法判讀。價數愈高，檢出率較高(即 sensitivity 高)。若平行比對快檢與 6 件後續取得的菌株 DST 結果，一致性高達 100%。

五、PETTS 計畫執行摘要

近年來，國際間對於多重抗藥結核病患的治療與管理相當關切，針對相關成效正在進行持續性評估。目前，疾管局已整合國內 MDR-TB 病患醫療專業照護團隊：台北萬芳醫院、署立桃園醫院、署立台中醫院、署立胸腔病院及中華民國防癆協會，共計 5 團隊，參與

保持有效的結核病治療研究計畫(Preserving Effective Tuberculosis Treatment Study, 簡稱 PETTS)。該計畫是由世界衛生組織(WHO)及美國疾病控制及預防中心(CDC)主導,是一個國際合作的 MDR-TB 治療成效性評估計畫。加入該項 PETTS 計畫目前已有包括台灣在內的 9 個國家:愛沙尼亞(Estonia)、拉脫維亞(Latvia)、秘魯(Peru)、菲國(Philippines)、蘇聯(Russia)、南非(South Africa)、南韓(South Korea)、臺灣(Taiwan)、泰國(Thailand)。

截至 2009 年 10 月 31 日止,已收案 66 名。各 MDR 照護團隊收案數目為:萬芳 21 例、署桃 9 例、署彰 7 例、胸腔 13 例、署中 8 例及慈濟 8 例。女性 11 例及男性 55 例。新治療 MDR 個案佔 35 名(50%)及再治療個案佔 31 名(50%)。臨床資料與對應之基礎(baseline)及每月檢體追蹤(follow-up)培養陽性菌株持續收集中。本 PETTS 計畫原則上將配合台灣 MDR 治療指引,於兩年內完治 MDR 個案。期間則由團隊個管師逐月提醒個案收集檢體送驗及隨時增修個案資料。目前已有 6 個案完治、2 個案死亡,其餘仍在繼續追蹤。

四、討論

「The Global MDR-TB & XDR-TB Response Plan 2007-2008」的目標 3 為「Strengthen laboratory services for adequate and timely diagnosis of MDR-TB and XDR-TB」，指出 4 項重點：擬定實驗室加強服務策略及經費，含快速檢驗之推展；疑似 MDR-TB & XDR-TB 個案的快速 RIF 測試；擴展一及二線藥物 DST 服務及其品管；及擴大 WHO 跨國參考實驗室運作。因此，本計畫依循以上精神落實於國內 DOTS-plus 政策中，TB 相關檢驗精進部分。

(一) 建立抗藥性實驗室監測流程，含臨床資料之收集與分析

MDR-TB & XDR-TB 比一般的 TB 更困難管理，需要實驗室協助快速確診及提供 DST 結果以利治療。本計畫建立之快速複驗流程，於 2008 及 2009 年，各排除非 MDR-TB 及 NTM 感染個案 14.2% 及 7.4%，減少不必要醫療資源及公衛管理。流程中所使用的之分子檢驗方法，大幅改善 DST 報告時效性限制，可建議於臨床實驗室運用於再治療或高度懷疑為抗藥性 TB 個案之快速判定。然而，WHO 今年中推薦之分子試驗方法在台灣 2008 及 2009 年評估結果並不如預期，依菌株僅 74%、78.1% 及依個案 74.6%、79.9% 可被確認，仍需待傳統藥敏再複驗，以提高確診率，如：依菌株 86.7%、88.1% 及依個案 85.8%、88.8% 可最終被確認。綜觀，一方面是全球各區域菌株抗藥性基因特異與多樣性，另一方面是結核菌複方治療方式使抗藥性產生機制複雜化，僅以數個基因位點分析誤差不小，尤其是針對 INH。

(二) 抗藥性試驗品管

WHO 「Guidelines for the programmatic management of drug resistance

tuberculosis (DR-TB)」(18)在第 2 章有效控制 DR-TB 的架構中，DR-TB 病人的照護須與 DOTS 架構的 5 要件契合，在政治承諾第一要件後即是正確及 timely 檢測 DR-TB 個案，策略上包含須有品質確認 (quality-assured) 之細菌培養及 DST。因此，台灣除專門醫療照護團隊外，仍需有良好的 TB 實驗室及架構以進行高品質 DST，及具有外部品質評估系統。診療醫師需依據 DST 才能審慎用藥確保病人得到最適照護。事實上，疾管局業於 2008 年 7 月 4 日公告「傳染病檢驗及檢驗機構管理辦法」後即日實施，然為配合國內 TB 個案追蹤管理及用藥治療現況，自實施日起，予檢驗單位至 2009 年底完成申辦完成認可實驗室程序。認可程序中檢驗能力證明為審核條件。目前，全台有 36 家實驗室執行 *M. tuberculosis* DST。本計畫為配合實驗室管理法規及 NTP 強化結核病檢驗量能的方案，持續推行 DST 的能力試驗。並針對抗藥性試驗品管不合格之實驗室，已個別電詢其操作人員資歷、訓練及自行檢討機制。並建議提供該單位「不符合事項登錄一覽表」及請依實驗室品質管理要求，進行「不符合性事物的鑑別與管制」，導入必要之改善措施及執行「矯正及預防措施程序」。

2008 年參加試驗的實驗室表現良好，成績皆高於設定合格標準，本來 2009 年實施的測驗合格標準考慮提高。2009 年的結果顯示：INH 及 RMP，正確率平均各為 99.7% 及 99.5%，INH 及 RMP 有 1 及 2 家未達 95% 合格標準；而 EMB 及 SM 正確率平均各達 97.2% 及 97.5%，EMB 及 SM 各有 2 家及 1 家未達 90% 合格標準。有 32 (86%) 家實驗室 4 種藥物皆合格。2009 年細部數據資料顯示：2 家 INH 未達 100% 中，2 家皆為醫學中心；2 家 RMP 未達 100% 中，有 1 家為醫學中心及 1 家為防治所；EMB 未達合格標準的 2 家為醫學中心，另有 10 家未達 100%，

SM 有 12 家未達 100%。2008 年所有實驗室 INH 及 RMP 全數測試合格，正確率平均各達 99.6%及 99.9%；且整體 EMB 及 SM 正確率平均各達 92.2%及 98.1%。2008 年細部數據資料顯示：3 家 INH 未達 100%中，有 2 家為醫學中心；2 家 RMP 未達 100%中，有 1 家為醫學中心其 INH 亦未達 100%。顯然，並非醫學中心就保證檢驗品質，系統性問題仍然需要改善。整體看來 2009 年測試結果成績佳。2008 年 EMB 及 SM 各有 5 家(14.3%)及 1 家未達 90%合格標準，但以比 2007 年進步顯著。2007 年，EMB 之 DST，在參與之 30 家中，22 家(73.3%)未合格；SM 之 DST，8 家(26.7%)未合格。持續教育訓練與現場輔導生效。此外，依據初步統計資料顯示，2005 年 15,378 新 TB 個案之治療成功率為 72.2%，而再治療 TB 個案之治療成功率為 53.7%，部分原因可歸於 DST 結果的有無及可參考性。此外，二線藥測試標準化與品質監測仍待建置機制。期望，藉由此計畫施行使臨床實驗室 DST 品質全面提昇與服務普及後，所有 TB 病患治療可以更有細菌學依據。

(三) MDR 菌株藥物試驗結果

由傳染病通報系統略知及由已完成 DST 資料得知，無論新或再治療 MDR-TB 病患抗藥性情況相當嚴重，加深治療挑戰性。數據顯示，MDR-TB 對一線藥物 EMB 抗藥達 50.8%及 PZA 達 29.1%，而對 SM 達 48.7%。依診治指引第四章結核病的治療中指出，僅對 INH 及 RMP 抗藥的 MDR-TB 病患其治療方式，加強期可用 TBN+FQN+PZA+EMB+SM 至少 6 個月，持續期則用 TBN+FQN+PZA+EMB 12-18 個月。但是，對 INH 及 RMP 抗藥及 EMB/PZA/SM 抗藥，則需使用多種二線藥物：加強期可用 TBN+PAS/CS+FQN+KM/AMK 及 PZA/EMB 可用者至少 6 個月，持續

期則用 TBN+PAS/CS+FQN 及 PZA/EMB 可用者 12-18 個月。除了二線藥物副作用大，造成管理上莫大困難度外，台灣約 40% MDR-TB 病人甚至可能無法使用此療法。EMB 為常使用之抑菌劑，可避免抗藥性之產生。PZA 具滅菌(sterilizing)能力，可減少復發率，如無法使用 PZA，治療率將受影響。PZA 的 DST 目前在國內受限於既昂貴又不準確液態培養的測試方法，因此尚為於臨床實驗室推行，造成 MDR-TB 開始治療時，用藥可能發生困難。正與照護醫師合作分析治療 outcome，以做為強化相關檢驗的實證依據。

國際治療指引建議使用 4 種有效二線藥物治療 MDR-TB，而台灣病患對二線藥物抗藥情形為：26.3%對 OFX、16.9%對 KM、50.6%對 EA、12.5%對 PAS。雖然，OFX 抗藥率與 2008 年 25.3%相當，但是比 2007 年之 44%低。2008 年 EA 抗藥性為 21.3%，遠低於今年的監測。至於 2009 年開始使用 CAP 治療 MDR-TB 病患，已產生 8.1% 抗藥現象。此外，實驗室監測結果仍持續發現 14 名 XDR-TB 個案。亦需要瞭解是因處方錯誤或未落實病人為中心(patient-centered)之治療等。藉由紮實的實驗室抗藥性監測，搭配專業 MDR 醫療照護，彰顯 DOTS-plus 效益，降低 MDR-TB & XDR-TB 發生。

(四)臨床檢體快速鑑定及抗藥性同步測試

依據現有評估結果，2009 年 10 月疾管局已公布新政策：病患符合下列 3 項條件，則其痰檢體之 GenoType 測試報告可視為 MDR 確診報告，做為收案依據：(1) 為痰抹片陽性且臨床診斷為結核病；(2) 至少 2 次採檢痰檢體 GenoType 結果一致；(3) 與多重抗藥性結核病確認病人有密切接觸史。

(五) PETTS 計畫

計畫進行的程序及內容為：每名符合計畫收案標準之結核病患者，需先簽署同意書。在二線藥物治療過程中，每月取病患的痰檢體進行結核菌培養檢驗，直到治療完成。所有參與計畫病患的培養陽性菌株，將會由台灣疾管局分送到美國疾病控制及預防中心進行分析實驗，以瞭解結核菌是否被治療藥物確實殺除。因為只是定期的配合療程取痰檢體進行檢驗，來確認治療是否有效，並不會影響醫師治療用藥過程，更不會對患者身心上導致任何副作用、不適或危險。治療過程須記錄臨床資料，如：用藥過程、檢驗結果等，所有可能影響治療過程中產生抗藥性的危險因子，都將會輸入分析軟體，進行統計分析。藉由 PETTS 計畫的參與，可以使臺灣 DOTS-plus 的實施方式納入國際性評估，分享多重抗藥結核病醫療照護體系，將來也有機會加入其他跨國合作。

五、結論與建議

1. MDR-TB & XDR-TB 實驗室檢驗與複判

抗藥性試驗之目的，主要為提供臨床菌株抗藥性結果，做為醫師對於病人用藥與治療的參考，如能於最短的時間內，提供準確及可信賴的抗藥性判讀結果，將可提高治癒率及降低因不當投藥轉為獲得性抗藥病人人數，尤其是 MDR-TB & XDR-TB 患者。建議由標準化之檢驗流程，早期判定病患 *M. tuberculosis* 抗藥性的情形，提供治療參考避免抗生素的誤用，並期能在結核病診治上有所助益。協助病人順利轉往專責醫療體系，避免因 NTM 感染而誤判及由非 MDR-TB 判定，使病人可以有效治療及公衛管理。

2. 加強實驗室快速診斷能力

初步證明分子技術可協助特殊 TB 個案判定，臨床檢體快速鑑定及抗藥性同步檢驗，3-7 天可發出結果報告。依據現有評估結果，2009 年 10 月疾管局已公布新政策大幅提昇 DR-TB & MDR-TB 診斷時效性。建議推廣至臨床實驗室運用於再治療或疑似 DR-TB & MDR-TB 個案以快速診斷及利早期治療。

3. 抗藥性試驗品管及抗藥性監測

抗藥性情形一直是國家結核病防治成敗之指標，必須建立整體性監測系統。需標準化二線藥測試方法，目前國際組織尚無適當的品管測試組，基於抗藥性菌株的危險性，施行上的生物安全性需慎重處理。建議持續架構高品質 TB 實驗室及以外部品管評估系統確保 DST 品質，診療醫師才得據以審慎用藥確保病人得到最適照護。

4. 參與國際合作計畫

積極藉由合作提昇 TB 團隊整體研究能量，並彰顯台灣在 TB 防治作為與成效。藉機培訓國際合作人才。

六、計畫重要研究成果及具體建議

(一) 成果

- (1) 截至 2009 年 10 月，224 名送複驗之疑似 MDR-TB 個案中經分子快速檢測及傳統藥敏確認後，MDR 佔 199 名(88.8%)、非 MDR 佔 13 名(5.8%)及 NTM 或其他病原佔 12 名(5.4%)；若以菌株數統計，總共 310 株菌株送達疾管局複驗：其中 MDR 佔 273 株(88.1%)、非 MDR 佔 14 株(4.5%)及 NTM 或其他病原佔 23 株(7.4%) (表一)。報告時效性上(未排除休假日)，MDR 菌株分子複驗平均可於 6 (範圍 1-21)天內(含假日)完成，非 MDR 則需經基因序列分析平均約為 10.7 天；若需以傳統藥敏方法再複驗則需時約 38 天。另外，NTM 因為需加上其它方法(PCR-RFLP 及基因序列分析)才得以判定至菌類(species)，因此所需要判定日數平均為 9.6 天。
- (2) 2009 年 DST 之品管評估共有 36 家實驗室參加，能力測驗結果顯示，isoniazid 正確率為 99.7%、rifampin 為 99.5%、ethambutol 為 97.2% 及 streptomycin 為 97.5%；並公告 32 家(88.9%)合格實驗室。
- (3) 截至 2009 年 10 月，完成 224 名疑似 MDR 個案的複驗，共有 88.8% (199/224)確認為 MDR。MDR 個案之一線藥物的聯合(含 primary 及 secondary)抗藥性結果為： 100% (199/199)對 INH、100% (199/199)對 RMP、50.8% (101/199)對 EMB、48.7%(97/199)對 SM 具有抗藥性。此外，有 151 名 MDR 個案的菌株完成 pyrazinamide 試驗，29.1% (44/151)具抗藥性。有 160 名 MDR 個案具有完整二線藥物抗藥性資料可供分析，26.3% (42/160)對 ofloxacin、16.9% (27/160)對 kanamycin、8.1% (13/160)對 capreomycin、50.6% (81/160)對

- (4) 快速抗藥性評估：以世界衛生組織推薦 GenoType®MTBDRplus 試劑組評估臨床檢體，評估試驗至 9 月 22 日止，共收 91 件痰檢體。發現仍以抹片陽性的檢測成效較佳，計 66 件(72.5%)可初判為 TB，其中 16 件(17.6%)可初判為 MDR；
- (5) 執行 PETTS 國際合作之計畫，協調整合國內 TB 研究架構，2008 年至 2009 年 10 月 20 日止共 66 名符合收案規格之 MDR-TB 病例。

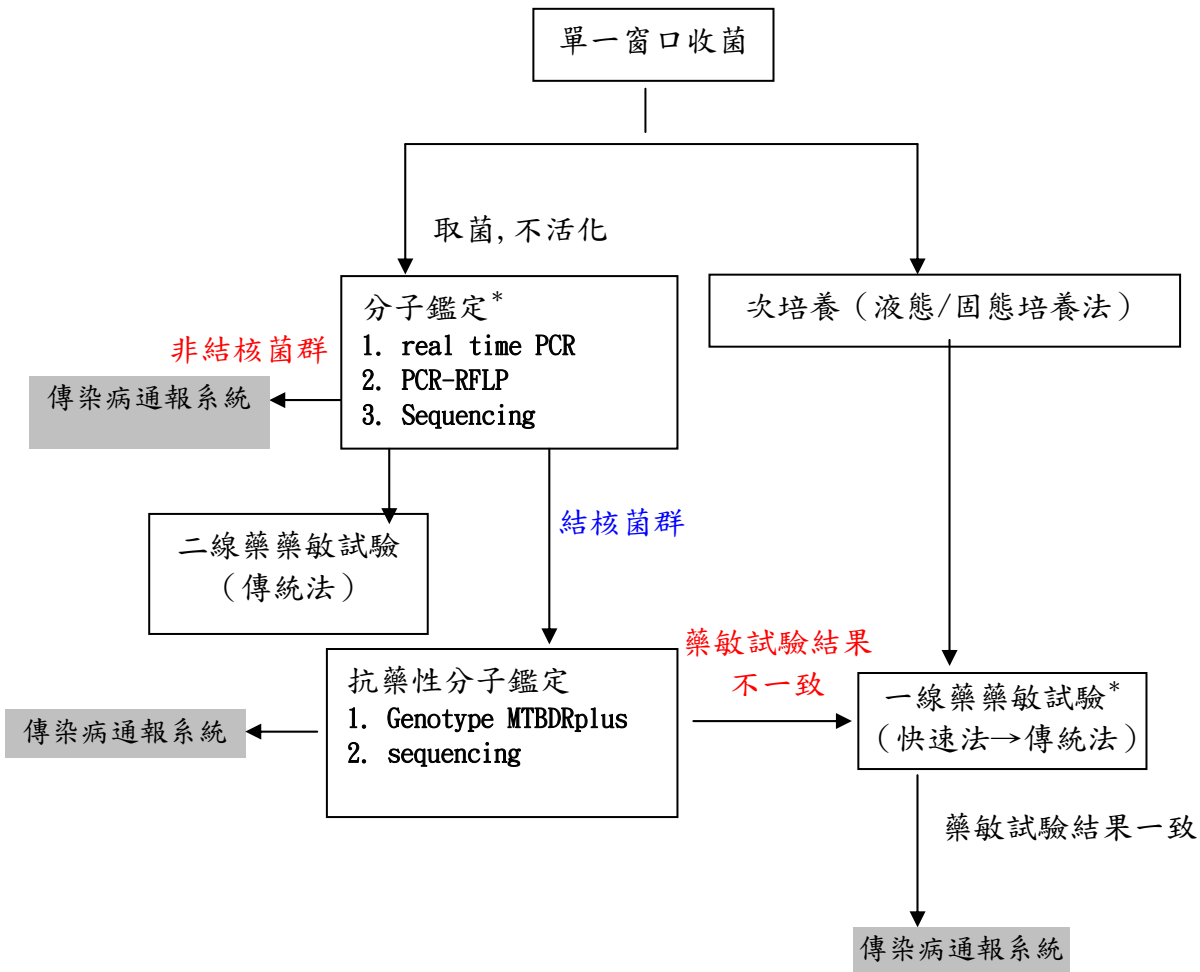
(二) 具體建議

1. 參考 WHO 建議配合品管措施及給付方式，推廣適當之分子檢驗試劑與方法至臨床實驗室，以運用於再治療或疑似 DR-TB & MDR-TB 個案以快速診斷及利早期治療。
2. DST 外部品管方面，除須規範臨床實驗室使用疾管局之方法與基準，及輔導漸納入期各醫療院所常規例行品管計畫中，並加強生物安全的訓練與管理。
3. 持續抗藥性監測並須有更即時機制，如：用藥查核、病患用藥監督及傳播(transmission)與感染控制等，以防止嚴重性一及二線藥物抗藥之產生。
4. 鼓勵國際合作、培訓人才、建立跨領域團隊，設立專屬資源供計畫執行與出國參與跨國會議、訓練與研習。

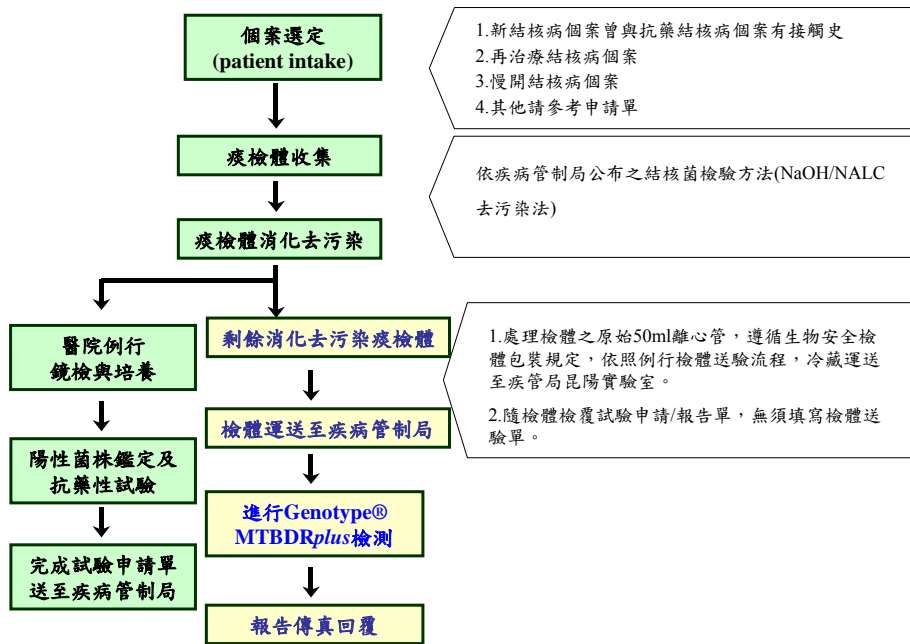
七、參考文獻

1. The World health Report 2007-A Safer Future- Global Public Health Security in the 21st Century Available from:
http://www.who.int/whr/2007/whr07_en.pdf
2. Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A et al. 1998. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med.* **338**:1641-9.
3. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L et al. 2001. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med.* **344**:1294-303.
4. Anti-tuberculosis drug resistance in the world report no.3. Available from:
http://www.who.int/tb/publications/who_htm_tb_2004_343/en/index.html
5. Chen, Z. C. 2002. Tuberculosis annual report 2002, Annual Rep., Cent. Disease Control. Dept. Health, R. O. C..
6. Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, Martin-Casabona N, Drobniewski F, Gilpin C, Havelkova M, Lepe R, Lumb R, Metchock B, Portaels F, Rodrigues MF, Rusch-Gerdes S, Van Deun A, Vincent V, Laserson K, Wells C, Cegielski JP. 2007. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis.* 13(3):380-7.
7. Policy guidance on TB drug susceptibility testing (DST) of second-line drugs (SLD).
http://www.who.int/tb/features_archive/xdr_mdr_policy_guidance/
8. Su WJ, Lee PY, Yu KW, Perng RP. Drug resistance of *Mycobacterium*

- tuberculosis* isolated from patients at a medical center in Taiwan. Chin Med J 1997; **60**: 21-7.
9. Yu MC, Suo J, Chiang CY, Bai KJ, Lin TP, Luh KT. Initial drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J Formos Med Assoc 1997; **96**: 890-894.
 10. Tsao TCY, Chiou W, Lin H, et al. Change in demographic picture and increase of drug resistance in pulmonary tuberculosis in a 10-year interval in Taiwan. Infection 2002; **30**: 75-80.
 11. Wang PD, Lin RS. Drug-resistant tuberculosis in Taipei, 1996-1999. Am J Infect Control 2001; **29**: 41-7.
 12. Liu CE, Chen CH, Hsiao JH, Young TG, Tsay RW, Fung CP. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2004; **37**: 295-300.
 13. Lee, JJ, Lee CN, Suo J, et al. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in eastern Taiwan. Tzu. Chi. Med. J. 2003;**15**:229-234.
 14. Chiang CY, Hsu CJ, Huang RM, Lin TP, Luh KT. Antituberculosis drug resistance among retreatment tuberculosis patients in a referral center in Taipei. J Formos Med Assoc 2004; **103**: 411-5.
 15. Hwang HY, Chang CY, Chang LL, Chang SF, Chang YH, Chen YJ. Characterization of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J Med Microbiol 2003; **52**: 239-45.
 16. Guidelines for Treatment of Tuberculosis, Cent. Disease Control. Dept. Health, R. O. C..
 17. Jou R, Chen HY, Chiang CY, Yu MC, Su IJ. Genetic diversity of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates and identification of 11 novel *ropB* alleles in Taiwan. J Clin Microbiol 2005; **43**: 1390-4.
 18. Guidelines for the programmatic management of drug resistance tuberculosis, WHO/HTM/TB/2008.402.



圖二 MDR-TB 臨床檢體快速鑑定與抗藥性試驗流程



表一 2009 年 MDR *Mycobacterium tuberculosis* 菌株複驗結果分析

| | 分子檢驗 (數; %) | 分子檢驗及傳統藥敏 試驗 (數; %) |
|----------|-------------|------------------------|
| 菌株數(310) | | |
| MDR-TB | 242 (78.1) | 273 (88.1) |
| 非 MDR-TB | 45 (14.5) | 14 (4.5) |
| NTM* | 19 (6.1) | 19 (7.4) |
| 其他病原 | 4(1.3) | 4(1.3) |
| 個案數(224) | | |
| MDR-TB | 179 (79.9) | 199 (88.8) |
| 非 MDR-TB | 33(14.7) | 13 (5.8) |
| NTM | 11 (4.9) | 11 (4.9) |
| 其他病原 | 1(0.4) | 1(0.4) |

* nontuberculous mycobacteria

表二 2009 年結核菌藥物感受性試驗能力測試結果

(a) ISONIAZID

| | No. of labs with results in the range of | | | | | Average score |
|------------------------------|--|--------|--------|--------|------|---------------|
| | 100% | 95-99% | 90-94% | 80-89% | <80% | |
| SENSITIVITY | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100% |
| SPECIFICITY | 34 | 0 | 1 | 1 | 0 | 99.3% |
| RESISTANT PREDICTIVE VALUE | 34 | 0 | 2 | 0 | 0 | 99.5% |
| SUSCEPTIBLE PREDICTIVE VALUE | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100% |
| REPRODUCIBILITY | 35 | 0 | 1 | 0 | 0 | 99.7% |
| ACCURACY | 34 | 1 | 1 | 0 | 0 | 99.7% |

(b) RIFAMPICIN

| | No. of labs with results in the range of | | | | | Average score |
|------------------------------|--|--------|--------|--------|------|---------------|
| | 100% | 95-99% | 90-94% | 80-89% | <80% | |
| SENSITIVITY | 35 | 0 | 0 | 1 | 0 | 99.7% |
| SPECIFICITY | 34 | 0 | 1 | 1 | 0 | 99.2% |
| RESISTANT PREDICTIVE VALUE | 34 | 1 | 1 | 0 | 0 | 99.6% |
| SUSCEPTIBLE PREDICTIVE VALUE | 35 | 0 | 0 | 1 | 0 | 99.5% |
| REPRODUCIBILITY | 34 | 0 | 2 | 0 | 0 | 99.4% |
| ACCURACY | 33 | 1 | 2 | 0 | 0 | 99.5% |

(c) ETHAMBUTOL

| | No. of labs with results in the range of | | | | | Average score |
|------------------------------|--|--------|--------|--------|------|---------------|
| | 100% | 95-99% | 90-94% | 80-89% | <80% | |
| SENSITIVITY | 27 | 0 | 3 | 4 | 2 | 94.6% |
| SPECIFICITY | 34 | 0 | 1 | 1 | 0 | 99.5% |
| RESISTANT PREDICTIVE VALUE | 34 | 0 | 1 | 1 | 0 | 99.4% |
| SUSCEPTIBLE PREDICTIVE VALUE | 27 | 0 | 3 | 5 | 1 | 95.5% |
| REPRODUCIBILITY | 29 | 0 | 5 | 2 | 0 | 97.5% |
| ACCURACY | 26 | 2 | 6 | 1 | 1 | 97.2% |

(d) STREPTOMYCIN

| | No. of labs with results in the range of | | | | | Average score |
|------------------------------|--|--------|--------|--------|------|---------------|
| | 100% | 95-99% | 90-94% | 80-89% | <80% | |
| SENSITIVITY | 27 | 0 | 4 | 4 | 1 | 97.4% |
| SPECIFICITY | 29 | 0 | 4 | 3 | 0 | 97.7% |
| RESISTANT PREDICTIVE VALUE | 29 | 0 | 7 | 0 | 0 | 98.4% |
| SUSCEPTIBLE PREDICTIVE VALUE | 27 | 0 | 4 | 4 | 1 | 96.1% |
| REPRODUCIBILITY | 29 | 0 | 6 | 1 | 0 | 97.8% |
| ACCURACY | 22 | 5 | 8 | 1 | 0 | 97.5% |

表三 痰臨床檢體快速檢驗結果分析

| AFB Smear | MDR | Non-MDR | Indeterminate | Total |
|-----------|------------|----------|---------------|-------|
| Positive | 0 | 4 | 3 | 7 |
| Negative | 4 | 5 | 14 (60.9%) | 23 |
| Scanty | 2 | 1 | 2 | 5 |
| 1+ | 2 | 7 | 4 | 13 |
| 2+ | 4 | 11 | 1 | 16 |
| 3+ | 1 | 9 | 1 | 11 |
| 4+ | 3 | 13 | 0 | 16 |
| Total | 16 (17.6%) | 50 (55%) | 25 (27.5%) | 91 |

計畫編號：DOH98-DC-2025

行政院衛生署疾病管制局九十八年度科技研究發展計畫

多重與超級抗藥性結核病實驗室檢驗與監測整合型計畫

子計畫二：

建立與評估多重抗藥性結核菌群快速分子檢測系統

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：黃偉倫

協同主持人：周如文

研究人員：郭裕民

執行期間：98年1月1日至98年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

| | 頁 碼 |
|-----------------|------|
| 目次 | |
| 壹、中英文摘要 | (3) |
| 貳、本文 | |
| 一、前言 | (5) |
| 二、材料與方法 | (8) |
| 三、結果 | (14) |
| 四、討論 | (17) |
| 五、結論與建議 | (21) |
| 六、計畫重要研究成果及具體建議 | (22) |
| 七、參考文獻 | (23) |
| 八、圖、表 | (27) |

壹、摘要

研究目的

評估多重及超級抗藥結核菌快速偵測試劑組之適用性並分析其抗藥基因資訊及建置基因庫。

研究方法

分析 2008 年 1 月至 2009 年 4 月送驗疾病管制局進行複判之疑似多重抗藥結核菌為樣本母數，並限制分析數為單一個案一人一株，該母數須具完整可供分析之藥敏試驗結果，進一步分析此批樣本抗結核菌第二線用藥之抗藥基因，並隨機篩選共 68 株確認為多重抗藥之結核菌株 (MDR-TB)，進一步利用本年 10 月份新上市之抗結核菌二線藥商品化快速檢測組 Genotype[®]MTBDRsl，並以抗藥基因定序輔以分析其適用性。

主要發現

1. 對 fluoroquinolone 藥敏結果為抗藥且於 *gyrA* 定序結果為突變，有近 93% 在 codon 90-94 區域間發生突變。
2. 19 株至少一種針劑藥物試驗結果抗藥判為 Aminoglycosides 抗藥且定序結果為突變，有 18 株為 *rrs* 1401 位點發生 A/G 突變。
3. Genotype[®]MTBDRsl 評估二線藥物抗藥基因顯示 Fluoroquinolone 藥物偵測敏感度為 61.8%，Aminoglycosides 藥物偵測敏感度為 54.2%，對第一線藥物 Ethambutol 偵測敏感度為 44.9%。

結論及建議事項

初步結果得知，利用分子檢驗二線藥物抗藥基因，敏感度不如多重抗藥結核菌之快速分子檢驗，仍有一定比例菌株須待藥敏試驗確認。

關鍵詞：second-line drug、GenoType[®]MTBDRsl、sequence、tuberculosis

Abstract

Multiple-drug resistance (MDR) was defined as *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to at least isoniazid and rifampin. Global surveillance of drug resistance tuberculosis (TB) revealed that there was an emerging concern of MDR TB patients infected with *M. tuberculosis* strains. Furthermore, MDR *M. tuberculosis* causes patients with high rates of treatment failure and death, the severity of the disease poses a public health concern. The new GenoType *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance second line (MTBDR_{sl}) assay (Hain Lifescience, Nehren, Germany) was tested on 68 clinical isolates to detect resistance to fluoroquinolones, injectable drugs (kanamycin, capreomycin or amikacin), and ethambutol in Multiple-drug resistance (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* strains. Those strains harboring fluoroquinolone, amikacin/capreomycin, or ethambutol resistance and partly fully susceptible strains were comparatively analyzed with the new MTBDR_{sl} assay, by DNA sequencing, and by conventional drug susceptibility testing in solid media. Fluoroquinolone resistance was detected in 42 (61.8%) of 60 resistance strains, Aminoglycosides resistance was detected in 13 (54.2%) of 24 resistance strains, and ethambutol resistance was detected in 22(44.9%) of 49 resistant strains. In combination with a molecular test for detection of rifampin and isoniazid resistance, the potential for the detection of extensively resistant tuberculosis within 1 to 2 days can be postulated.

貳、本文

一、前言

多重抗藥性結核病的逐年增長已成為全世界結核病防治工作之重要課題，由於 INH 及 RIF 是重要的第一線藥物，因此對兩者皆產生抗藥之結核病患將對治療而言是一大難題。抗藥性結核病是結核病治療失敗的重要因素之一，發生抗藥性的原因很多，除了少部分病患是因為直接被具有抗藥性的結核菌株感染致病以外，大部分是人為因素所造成，主要為病患的服藥順從性、處方錯誤、藥物供應不規律、藥物品質不良及個案管理不佳等。發生因素尤其是和病患的服藥順從性與規律性關聯性最大。美國 CDC 於 2007 發表 2005 年全美之結核病患有 7.8% 對 INH 抗藥，對 INH 及 RIF 皆有抗藥之比例為 1.2%【1】；此比例與 Moore 等人於 1997 年針對 1993-1996 年全美結核病患中有 1.6% 對 INH 及 RIF 皆有抗藥並無明顯下降【2】。

由於液態培養系統之問世，使結核菌之培養大幅縮短時程，因此利用該系統進行藥敏試驗成為抗藥性結核菌株篩選確認一項工具【3】，但由於自陽性培養菌株導入此系統仍需 7-10 天才能獲得抗藥試驗結果，因此直接由檢體進行快速分子試驗室目前努力的方向【4,5】，這些實驗方法是基於目前對 RIF 與 INH 抗藥機制之了解，如針對 Rifampicin 抗藥基因 *rpoB* 之 81-bp "Core-region" 定序結果，有超過 95% 對 RIF 產生抗藥之菌株於此區域皆發生基因突變【6】；但對於 INH 之抗藥基因及抗藥位點卻是多元化，*katG* 315 codon 發生突變產生對 INH 抗藥之比例介於 50-95%【6,7,8】；*inhAr* 發生突變產生對 INH 抗藥之比例介於 20-35%【6,8,9】；此外，*oxyR-ahpC* 發生突變產生對 INH 抗藥之比例介於 10-15%【6,9,10】，但此基因之突變通常亦伴隨 *katG* 315 codon 之突變【11】。根據統計數據顯示，INH 抗藥與上述 *katG*、*inhAr*、*inhA*、*oxyR-ahpC* 有顯著相關【12】。

目前以分子技術為基礎，利用陽性結核菌株及痰陽性檢體，針對 *rpoB* 基因發展商品化試劑組 (INNO-LiPA Rif; Innogenetics N.V., Ghent, Belgium)、及對 *rpoB* 與 *katG* 基因之商品化試劑組 (Genotype MTBDR; Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) 正在評估階段【4,13,14,15,16】。新一代之試劑組 (Genotype®MTBDRplus) 也針對除 *katG* 基因

以外之基因 (*inhAr*) 進行設計，試圖更廣泛偵測對 INH 抗藥基因位點【17】。針對去年研究計畫我們利用多重抗藥性結核菌株 (MDR-TB) 246 株，分析其基因突變機率及多型性，並搭配 Genotype®MTBDRplus 試劑組及定序結果進行抗藥性菌株抗藥位點偵測評估。發現 Genotype®MTBDRplus 偵測 MDR-TB 之準確率可達 76.8%，同時利用 3 基因 5 段 PCR 產物 (*rpoB516*、*rpoB526*、*rpoB531*、*katG315*、*inhAr-15*) 所建立之 in-house multiplex PCR 之準確率達 70.3%，若針對 *rpoB*、*katG*、*inhAr*、*inhA*、*oxyR-ahpC* 抗藥基因進行分析，其突變之基因位點判定為 MDR-TB 之準確率最高，達 91.1%。抗藥基因突變比例最高分別為 *rpoB531/katG315* 佔 24%，其次則為 *rpoB531/inhAr-15* 佔 14%。根據定序結果分析，有特定比例之抗藥性結核菌株有其他突變基因位點之熱點 (hot-spot)，分別位於 *rpoB*、*oxyR-ahpC* 抗藥基因上，於去年計畫後期，已針對上述基因設計聚合酶連鎖反應試驗，並合併原建立之 in-house multiplex PCR，預期將使偵測 MDR-TB 之準確率達 80-85%，同時使偵測 MDR-TB 之成本大幅下降。

本年度計畫中，除持續運用多重抗藥結核菌第一線用藥抗藥基因及商品化試劑外，為與子計畫一研究區隔，將特別針對二線藥抗藥 (導致 XDR-TB) 之基因序列進行分析，期中報告後並調整研究方向，針對審查委員建議，捨棄自行發展之 in-house multiplex PCR 研究，將研究重點調整為二，其一分析二線用藥抗藥基因序列，其二為評估目前全世界最新上市 (2009 年 10 月) 唯一偵測結核菌二線藥抗藥之分生檢測試劑組之敏感性。

就超級抗藥性結核菌 (XDR-TB) 定義而言，除為多重抗藥結核菌 (MDR-TB) 外，另須對 fluoroquinolone 藥物及任一針劑 (capreomycin、kanamycin、amikacin) 均為抗藥始為 XDR-TB。fluoroquinolone 主要機制為與 gyrase 結合進而抑制核酸超螺旋形成 (supercoiling)。CIP (Ciprofloxacin) 及 OFX (Ofloxacin) 為 fluoroquinolone 兩主要類型用藥，Hooper DC【18】等人指出在 *gyrA* 內之 40 氨基酸短片段與 fluoroquinolone 抗藥高度相關，分析 MIC $\geq 4\mu\text{g/mL}$ 對 CIP (Ciprofloxacin) 抗藥菌株時，在 codons 90、91、94 產生 missense 突變，然而在敏感菌株卻無此突變。同樣在 codon 89 產生 missense 突變也發生在 *M. smegmatis* 抗 ofloxacin 菌株，但在 *M. tuberculosis* 尚無相關研究。簡言之

gyrA 發生突變產生對 fluoroquinolone 抗藥之比例介於 42-85%。對於二線藥針劑部分，Taniguchi 等人【19】研究 *M. smegmatis* 指出發生在 16SrRNA 基因 (*rrs*) 第 1389 位點發生 A→G 突變，與 kanamycin 抗藥有關；而第 1473 位點發生 G→A 或 G→T 突變與 Viomycin 抗藥相關，換算成 *M. tuberculosis* 序列其位點在於 16SrRNA 基因 (*rrs*) 第 1400 位點。Suzuki 等人【20】亦分析 *rrs* 基因內 300 bp 序列，指出於 43 株對 kanamycin 抗藥菌株有 29 株 (67%) 在第 1400、1401、1483 發生突變，其中更有 26 株 (90%) 在 *rrs* 基因第 1400 位點發生 A→G 突變，然而分析 77 株對 kanamycin 敏感菌株於此位點上均無突變發生。在 *rrs* 基因第 1483 位點發生 G→T 突變，除與 kanamycin 抗藥有關外，亦與 Capreomycin 和 Viomycin 抗藥相關。美國疾病控制及預防中心 Maus C.E 等人【21】亦針對 *tlyA* (Rv1694) 分析發現在第 644 位點插入一段 transposon 會對 Capreomycin 產生抗藥。因此本計畫將針對上述文獻所提，將以 *gyrA*、*rrs* 及 *tlyA* 基因進行二線抗藥基因分析並與傳統藥敏結果比對；另將以最新上市之商品化試劑組 Genotype®MTBDRsl【22】分析其敏感性。

二、材料與方法

實施方法：

98 年度－

1. 持續執行 97 年之工作項目。

超級抗藥性菌株第二線抗藥基因分析。了解各基因突變位點與菌株抗藥之關聯性。

步驟：

一、研究設計：以 2008-2009 年共 430 株 *M. tuberculosis* 為分析樣本。進一步分析二線藥 fluoroquinolone 及任一 Aminoglycoside 針劑 (capreomycin、kanamycin、amikacin) 之抗藥基因。

二、菌株與資料收集：以 MDR 照護體系個案送昆陽實驗室複驗菌株為主體，抗藥資料為送驗實驗室提供並與昆陽實驗室分子及藥敏試驗結果串聯分析。

三、分析方法：

(1) 結核桿菌群之確認：

首先須確認送驗菌株屬於結核桿菌群，再進行後續抗藥性基因分析之複驗工作及藥敏試驗。

(1-1)、16S rRNA、IS6110 即時聚合酶連鎖反應

原理係利用 *M. tuberculosis* 之 16S rRNA、IS6110 上特定序列設計一組引子對，利用 PCR 方式擴增，此目標核酸區域具有 *M. tuberculosis* complex 專一性序列區。另外設計一段螢光標的核酸探針 (probe) 具 *M. tuberculosis* complex 專一性序列與上述擴增核酸區段產物進行雜交，此為即時聚合酶連鎖反應。

執行 PCR 程式：

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|----------------------|-------|------|
| 1. Enzyme Activation | 50 °C | 2分鐘 |
| 2. Denature | 95 °C | 10分鐘 |
| 3. Denature | 95 °C | 15秒 |
| 4. Extension | 60 °C | 1分鐘 |
| 步驟3.至步驟4.循環重複50次 | | |

菌株檢測結果為陽性時屬於結核桿菌群，則進行後續抗藥基因位點定序等實驗；若檢測結果為陰性，該菌株則進行聚合酶連鎖反應酵素切割片段多型性分析（PCR-RFLP）及 16S rRNA 定序實驗確認菌株種類。

(1-2)、聚合酶連鎖反應酵素切割片段多型性分析（PCR-RFLP）

原理為利用分枝桿菌屬通有的 65 kD heat shock protein (*hsp65*)，以聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）方式增幅檢體中 *hsp65* 核酸片段 (439 bp)，再將此核酸片段以限制酶切割，不同菌種可切割成不同核酸片段，於電泳分析上判定特殊長度核酸片段以比對並鑑定出特定分枝桿菌菌種。

實驗方法為以接種環(0.5 L)挑出 1 環的菌，放入裝有 400 L 1X TE 的 2 mL 微量離心管中，於乾熱器以 95°C 不活化處理 5 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。

配製 PCR 液，單一檢體之 PCR 液含以下配方：

| 試劑 | 體積 (μL) |
|--------------------------------|---------|
| 無菌水 | 4.7 |
| Tb11 引子 (1.6 pmole/μL) | 5.0 |
| Tb12 引子 (1.6 pmole/μL) | 5.0 |
| 25 mM dNTP | 0.2 |
| 25 mM MgCl ₂ | 2.5 |
| 不含 MgCl ₂ 之 10X 緩衝液 | 2.5 |
| DNA 聚合酶 | 0.1 |
| 檢體 | 5.0 |
| 總體積為 25 μL | |

此時陽性對照組為 *M. tuberculosis* H37Rv strain DNA，濃度 100

ng/μL，取 1 μL 加 4 μL 無菌水；陰性對照組取 5 μL 無菌水。

執行 PCR 程式

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|----------------------|-------|------|
| 1. Enzyme Activation | 96 °C | 10分鐘 |
| 2. Denature | 96 °C | 1分鐘 |
| 3. Annealing | 58 °C | 1分鐘 |
| 4. Extension | 72 °C | 2分鐘 |
| 步驟2.至步驟4.循環重複30次 | | |
| 5. Final extension | 72 °C | 6分鐘 |
| 6. Store for o/n | 16 °C | ∞ |

反應完成後，進行電泳分析，以確定 PCR 反應結果成功及片段 (439 bp) 正確。之後取 PCR 產物進行 *Bst*EII、*Hae*III 2 種限制酶切割。配製限制酶反應液，單一檢體之限制酶反應液含以下配方：

| 試劑 | 體積 (μL) |
|---|---------|
| 無菌水 | 5 |
| 10X 限制酶緩衝液 | 3 |
| 限制酶 <i>Bst</i> EII (10 U/μL) 或 <i>Hae</i> III (10 U/μL) | 2 |
| PCR 產物 | 20 |
| 總體積為 30 μL | |

含 *Bst*EII 之反應管置於 60 °C 1.5 小時；含 *Hae*III 之反應管置於 37 °C 1.5 小時。限制酶切割完畢後於 4% 核酸電泳洋菜膠進行分析。其結果之判定可於 <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> 進行菌種檢索。

(1-3) 16S rRNA 定序

原理係利用 *M. tuberculosis* 之 16S rRNA 上特定序列設計一組引子對 (16S-27F, 5'AGAGTTTGATCCTGGCTC 與 16S-907R,

5'CCGTCAATTCCTTTGAGT)，利用 PCR 方式擴增約 880 bp 片段大小產物。

PCR 程式

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|----------------------|-------|-------|
| 1. Enzyme Activation | 96 °C | 10分鐘 |
| 2. Denature | 96 °C | 45秒 |
| 3. Annealing | 53 °C | 1分鐘 |
| 4. Extension | 72 °C | 1.5分鐘 |
| 步驟2.至步驟4.循環重複30次 | | |
| 5. Final extension | 72 °C | 6分鐘 |
| 6. Store for o/n | 16 °C | ∞ |

反應完成後，進行電泳分析，以確定 PCR 反應結果成功及片段大小正確。再以 16S-27F 及 16S-519R, 5'GTATTACCGCGGCTGC 進行定序試驗，

確認菌株種類。

(2) 超級抗藥結核菌株抗藥基因分析

確認為結核桿菌群之菌株檢體核酸，將對第二線抗藥 fluoroquinolone 類藥物之抗藥基因 *gyrA* 進行分析，同時亦針對針劑 (capreomycin、kanamycin、amikacin) 抗藥基因 *rrs* 及 *tlyA* 基因進行分析。引子序列如下：*gyrA*F GAT GAC AGA CAC GAC GTT GC，*gyrA*R AGC ATC TCC ATC GCC AAC G；*rrs*F TTA AAA GCC GGT CTC AGT TC，*rrs*R TAC GCC CCA CCA GTT GGG GC；*tlyA*1F GTA GGA ACG CAA TGA CCA TCG，*tlyA*2R GCC AAC GAG ATG AAC GAC AG；*tlyA*3F CCG TGG TGA CCG ACA GTG，*tlyA*4R TGT GGA CGA CCA GCA GAA C。

(3) Genotype®MTBDR *sl* 檢測

原理係利用第二線抗藥 (如 fluoroquinolone 及針劑用藥

Aminoglycoside/cyclic peptides) 之 *gyrA*、*rrs* 等抗藥基因突變位點最常發生者，設計引子對並進一步將突變基因位點合成相對應之核酸序列，鑲結於已知位置之長型纖維紙片上，利用聚合酶連鎖反應後之核酸產物，與長型纖維紙片上之核酸序列進行雜交，若有相對應之抗藥位點即可在此紙片上呈色，本試驗將以經確認後之 68 株多重抗藥結核菌 (MDR-TB) 之菌株核酸為實驗樣本，相關 PCR 配置及反應條件如下：
配製 PCR 液，單一檢體之 PCR 液含以下配方：

| 試劑 | 體積 (μL) |
|--------------------------------|---------|
| 無菌水 | 4.7 |
| PNM 引子 | 35.0 |
| 25 mM dNTP | 0.2 |
| 25 mM MgCl ₂ | 2.5 |
| 不含 MgCl ₂ 之 10X 緩衝液 | 2.5 |
| DNA 聚合酶 | 0.1 |
| 檢體 | 5.0 |
| 總體積為 50 μL | |

PCR 程式

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|------------------|-------|-----|
| 1. | 95 °C | 5分鐘 |
| 2. | 95 °C | 30秒 |
| 3. | 58 °C | 2分鐘 |
| 步驟2.至步驟3.循環重複10次 | | |
| 4 | 95 °C | 25秒 |
| 5. | 53 °C | 40秒 |
| 6. | 70 °C | 40秒 |
| 步驟4.至步驟6.循環重複20次 | | |

| | | |
|------------------|-------|-----|
| 7. | 70 °C | 8分鐘 |
| 8. Store for o/n | 16 °C | ∞ |

(4) Genotype®MTBDR *sl* 敏感性之評估

執行 Genotype®MTBDR *sl* 檢測後，並配合基因定序數據，於比對藥敏試驗最終結果後，分析此商品化試劑對於檢測超級抗藥結核菌株（XDR-TB）之敏感度。

三、結果

(一) 第二線抗藥基因核酸定序分析

表一為 396 株結核菌株進行 Fluoroquinolone 類藥物之抗藥基因 *gyrA* 分析，以傳統藥物試驗抗藥結果分類，共有 96 株藥物試驗最終結果為抗藥，分析顯示 54 株(56.2%)於 *gyrA* 定序上發現突變位點。其中以最常出現的突變位點為 codon 94 GAC/GGC，佔 20 株(20.8%)，其次為 codon 94 GAC/AAC，佔 8 株(8.3%)；此外 codon 94 GAC/TAC 及 codon 90 GCG/GTG 亦有各 7 株(7.3%)發生變異。在 54 株藥敏結果為抗藥且於 *gyrA* 定序結果為突變中，有近 50 株(93%)發生在 codon 90-94 區域間。但亦有近 42 株(43.8%)抗藥菌株無法以 *gyrA* 定序進行判讀。另一結果顯示在 300 株抗藥結果顯示為敏感之菌株，279 株(93%)定序結果與藥物試驗結果一致，然有 21 株(7%)顯示定序結果與藥敏結果不一致，尤其有 8 株於 *gyrA* codon 94 GAC/GGC 產生突變，但藥敏結果卻顯示為敏感。

另以 317 株結核菌株進行針劑 (Capreomycin、Kanamycin、Amikacin) 抗藥基因分析如表二，共分析兩組基因 *rrs* 與 *tlyA*，以傳統藥物試驗抗藥結果分類，因有三種藥物致不同藥物抗藥模式，至少一種藥物試驗結果抗藥判為 Aminoglycosides 抗藥有 54 株，其中 19 株(35.2%)於 *rrs* 與 *tlyA* 定序結果發現突變位點，其中更有 18 株為 *rrs* 1401 位點發生 A/G 突變，僅一株為 *tlyA* codon 80 GCG/GTG 突變；但有 35 株(64.8%)未偵測到基因序列改變。同樣結果相似於 *gyrA* 定序試驗，263 株最終藥敏試驗為敏感菌株，其中 251 株(72.2%)定序結果與藥物試驗一致，但仍有 12 株發現定序有發生突變位點，其中有 5 株發生在 *rrs* 1401 位點 A/G 突變，另 7 株發生於 *tlyA* 序列變異。

(二) Genotype®MTBDR *sl* 敏感性之評估

68 株隨機篩選並經分子檢測及第一線藥物試驗確認為多重抗藥結核菌 (MDR-TB)，藥物抗藥結果分析如表三，4 株為對 Fluoroquinolone 類藥物及針劑 (Capreomycin、Kanamycin、Amikacin) 藥物全敏感菌株，就額外抗藥而言，有 60 株(88.2%)額外對 Fluoroquinolone 類藥物抗藥，24 株(35.2%)額外對 Kanamycin 抗藥，12 株(17.6%)額外對 Capreomycin 抗藥，16 株(23.5%)額外對

Amikacin 抗藥，49 株(72.1%)額外對 Ethambutol 抗藥。藥敏資料顯示測試 68 株菌株中顯示有 20 株為 XDR-TB。所有 68 株菌株以 Genotype®MTBDR *sl* 進行試驗 (圖一)，結果與定序搭配判讀，並比較最終藥物抗藥結果。

Genotype®MTBDR *sl* 試驗皆可判讀，同時試劑上之對照組 MTBC-specific 及 Amplification-specific 均正確呈色。

利用 Genotype®MTBDR *sl* 與 *gyrA* 基因定序檢測 Fluoroquinolone 藥物結果如表四，68 株測試菌株中，8 株經藥物試驗判為敏感菌株，3 株顯示不一致結果，其中 2 株於 Genotype®MTBDR *sl* 及 *gyrA* 定序結果均判為抗藥，且 Genotype®MTBDR *sl* 抗藥型別與定序吻合，另一株 Genotype®MTBDR *sl* 顯示 mix pattern (wild type 與 mutation 同時存在)，Genotype®MTBDR *sl* 判定為抗藥。然定序初步顯示卻為 wild type。於 60 株抗藥菌株中，42 株(61.8%)經 Genotype®MTBDR *sl* 判定為抗藥，18 株(38.2%)經 Genotype®MTBDR *sl* 判定為敏感，因此針對此次分析顯示對 Fluoroquinolone 藥物，Genotype®MTBDR *sl* 偵測敏感度為 61.8%。於 42 株經 Genotype®MTBDR *sl* 判為抗藥中，1 株型別為 *gyrA* Δ WT3,MUT3A+MUT3B，定序結果應出現 D94A，D94N 或 D94Y 2 種序列，但分析定序結果僅出現 D94N 序列，D94A 序列則未出現。分析 Genotype®MTBDR *sl* 抗藥結果，最常出現抗藥型別為 *gyrA* Δ WT3,MUT3C (15/42, 35.7%)，但 15 株序列結果並不完全相同，其中 2 株為 wild type，11 株為 codon 94 GAC/GGC，另 2 株分別為 GAC/TAC 及 GAC/GCC；其次常出現之抗藥型別則為 *gyrA* Δ WT3 (5/42, 11.9%) 及 *gyrA* Δ WT3,MUT3B (4/42, 9.5%)。此 Genotype®MTBDR *sl* 試劑所設計之一組突變核酸探針(MUT3D)於此次檢測中並未發現；另根據設計說明，MUT3B 核酸探針應可辨識 D94N 及 D94Y 兩種序列，測試顯示 5 株定序為 D94N 菌株可清楚雜交反應於 MUT3B 位點上，但另有 5 株菌株序列結果為 D94Y，卻無法正確與 MUT3B 進行反應，僅出現 *gyrA* Δ WT3 結果，雖與藥物試驗之最終判定結果一致，但定序結果卻與 Genotype®MTBDR *sl* 產生不一致的現象。5 株經 Genotype®MTBDR *sl* 判定為抗藥顯示為 mix pattern，即同時存在抗藥及敏感菌株，其中 1 株為敏感菌株夾雜 MUT3C 抗藥，1 株為敏感菌株夾雜 MUT1 抗藥，2 株為敏感菌株夾雜 MUT1 與 MUT3C 抗藥，另 1 株則為敏感菌株夾雜 MUT3A 與 MUT3C 抗藥。

表五為利用 Genotype®MTBDR *sl* 與 *rrs* 基因定序檢測 Aminoglycosides 藥物結果，68 株測試菌株中，44 株經針劑 (Capreomycin、Kanamycin、Amikacin) 藥物試驗三者均為敏感菌株，其中 39 株顯示與 Genotype®MTBDR *sl* 及定序結果一致均為 wild type，但有 5 株藥物試驗結果與基因型不一致，其中 4 株 Genotype®MTBDR *sl* 結果為 *rrs* Δ WT, MUT1 與定序結果(1401 A/G)相同，另 1 株 Genotype®MTBDR *sl* 結果為 *rrs* Δ WT 與定序結果 1402 C/T 亦一致。24 株藥敏試驗為抗藥菌株中，三種藥物抗藥結果顯示，均對 Kanamycin 抗藥，其中 12 株另與 Capreomycin 產生抗藥，16 株另與 Amikacin 產生抗藥，3 種藥物皆抗藥有 11 株，2 種藥物抗藥有 6 株，僅 1 種藥物抗藥有 7 株。Amikacin 抗藥均會伴隨 Kanamycin 抗藥。於 24 株抗藥菌株中，13 株 Genotype®MTBDR *sl* 判定為抗藥，11 株未發生任何位點突變，偵測敏感度為 54.2%。所有菌株皆具 MUT1 突變，但有 1 株出現 mix pattern (即敏感與抗藥菌株共存)，抗藥型別中未出現任何 MUT2，即未出現 *rrs* 1484 G/T 突變。3 株為 *rrs* Δ WT, MUT1 定序結果為 wild type。

於 49 株 EMB 藥敏結果抗藥且與 Genotype®MTBDR *sl* 判定相同為 22 株，偵測敏感度為 44.9% (表六)。最常出現抗藥型別為 *embB* Δ WT1, MUT1B 共 14 株(14/22, 63.6%)，其中 13 株與定序結果一致為 codon 306 ATG/GTG，另 1 株定序結果則為 wild type。其次抗藥型別為有 6 株為 *embB* Δ WT1(6/22, 27.3%)，定序結果分為 3 類，3 株為 codon 306 ATG/CTG，2 株為 codon 306 ATG/ATC，1 株為 codon 306 ATG/ATT，此 6 株抗藥菌株核酸變異並未設計專一性辨識探針，因此僅能偵測 *embB* Δ WT1。就 Genotype®MTBDR *sl* 所設計突變核酸探針分析，僅 2 株為 *embB* Δ WT1, MUT1A (2/22, 9.1%)。27 株經 Genotype®MTBDR *sl* 判為 wild type 之抗藥菌株中，1 株經定序結果為 codon 319 TAT/GAT，其餘 26 株抗藥菌株 Genotype®MTBDR *sl* 與定序均為 wild type。19 株藥敏結果為敏感菌株中，5 株 Genotype®MTBDR *sl* 判定為抗藥，但其中 3 株為 *embB* Δ WT1, MUT1B 且定序結果為 codon 306 ATG/GTG，其餘 2 株為 *embB* Δ WT1，定序 1 株為 codon 306 ATG/ATC，另 1 株為 codon 306 ATG/CTG。另有 1 株藥敏為敏感菌株，定序結果為 codon 319 TAT/GAT，因此位點同時出現於不同抗藥結果菌株，初步推測此位點應與抗藥無關。

四、討論

世界衛生組織於 2008 年下半年正式宣告將以 line probe 檢測技術推廣 MDR-TB 之快速檢測。就目前檢測多重抗藥結核菌之商品化試劑組而言，HAIN 所發展之 Genotype[®]MTBDRplus 雖然僅上市兩年，但因改進了第一代 Genotype[®]MTBDR 針對 INH 抗藥僅偵測 *katG* 單一基因位點之限制，增加了 *inhAr* 位點增加其敏感性，雖然 Hillemann D 【17】等人指出第二代試劑組（即 Genotype[®]MTBDRplus）對 MDR 菌株偵測 INH 抗藥部分，僅較第一代增加約 3% 敏感度，但根據我們研究結果顯示 【23】，於台灣地區使用經驗就 INH 單一抗藥而言，*inhAr* 位點至少可增加 65 株（32.8%）偵測比例，大幅改善僅使用 *katG* 位點時之 107 株（54.1%），可見全球不同地區多重抗藥菌株之抗藥基因序列之多樣性。

利用 line probe 檢測技術運用於 MDR-TB 上，多國經驗已證實可於短時間內快速鑑定結核桿菌群並確認抗藥型別，運用上述技術用以偵測超級抗藥菌株基因之分生試劑組 (Genotype[®]MTBDR *sl*) 已於今年 10 月正式於全世界上市，第一份評估報告(2009 年 6 月) 顯示，對檢測第二線用藥基因結果，Fluoroquinolone 藥物偵測敏感度為 90.6%，Aminoglycosides 藥物偵測敏感度為 84.8%，對第一線藥物 Ethambutol 偵測敏感度為 69.2%。

我們利用 68 株多重抗藥結核菌株(MDR-TB)進行評估，結果與 Hillemann D.等人 【22】 相較，偵測敏感度卻較低，Fluoroquinolone 藥物偵測敏感度為 61.8%，Aminoglycosides 藥物偵測敏感度為 54.2%，對第一線藥物 Ethambutol 偵測敏感度為 44.9%。

文獻指出對 Fluoroquinolone 藥物抗藥而言，有 70%至 90% 菌株於 *gyrA* 區域定序結果發生突變 【24,25】，因此檢測第二線抗藥基因之分生試劑組(Genotype[®]MTBDR *sl*)將偵測 Fluoroquinolone 藥物基因位點設計於 *gyrA* 區域 codon 85 至 codon 96。Hillemann D. 等人發現 D94G (codon 94 GAC/GGC) 為 *gyrA* 區域為最常出現之突變(41.5%)，本計畫分析基因序列也發現 codon 94 GAC/GGC 是最常出現的變異，於 33 株 *gyrA* 定序發生突變

中 codon 94 GAC/GGC 佔 11 株(33.3%)。另一有趣發現為 5 株(5/68,7.4%)多重抗藥菌株具 2 個以上的抗藥位點，此結果與其他文獻報導相似【25】，甚至有 6 株為敏感與抗藥基因型同時存在，是否因特殊治療處方、病患適應敏感及抗藥菌株同時存在值得進一步研究。一般認為敏感及抗藥菌株同時存在是最終演變為完全抗藥菌株之前期，因此此現象可能也反映某些治療過程中的菌株變化。就原理而言，與定序和藥物試驗結果相較，Genotype®MTBDR *sl* 可同時偵測敏感及抗藥菌株菌株序列，但此項結果還是需在病人治療過程中，持續監控菌株抗藥變化。另外，2009 年 Feuerriegel S et al.【26】對於 *gyrA* 基因與二線藥針劑關聯性進行分析，該研究採用 CLSI 建議之 MGIT-960 二線藥抗藥試驗濃度 (2µg/ml)，所有藥敏試驗為敏感之菌株在 *gyrA* 基因上均未發現突變。本計畫亦使用 CLSI 所建議之 7H11 試驗濃度，卻發現在 279 株對二線藥 flouroquinolone 敏感菌株中，有 19 株 (19/279, 6.8%) 在 codon 90-94 hot-spot 位點產生突變【表一】。此結果是否與使用不同培養基之藥物濃度所致，需要進一步分析。且 Feuerriegel S et al.另分析了 *gyrB* 基因與 Flouroquinolon 抗藥之關係，發現有少數的 Flouroquinolon 抗藥菌株 *gyrB* 基因發生突變(2/26, 7.6%)。因表一分析 *gyrA* 在 codon 90-94 hot-spot 位點發生突變共有 50 株，僅佔 52.1%(50/96)，另有 41 株抗藥菌株之 *gyrA* 基因並未發生突變，需進一步分析上述菌株是否具有 *gyrB* 或其他基因位點發生突變。

相對於 Aminoglycosides 藥物結果，Fluoroquinolone 藥物偵測敏感度屬可接受，畢竟影響 Fluoroquinolone 藥物抗藥的核酸序列已有多數文獻報導，但對 Aminoglycosides 藥物僅少數文獻進行核酸序列研究【19,20,21】，就本計畫 68 株以 Genotype®MTBDR *sl* 測試菌株，若對單一抗藥分析，Genotype®MTBDR *sl* 對 Kanamycin、Capreomycin、Amikacin 的偵測敏感度分別為 54.2%、58.3%及 75%，與 Hillemann D.等人研究 Capreomycin、Amikacin 的偵測敏感度 88.6%及 87%相較仍低。Maus【21】等人研究認為 *rrs* 1402 C/T 對 Capreomycin 抗藥但對 Amikacin 敏感，但 Hillemann D.等人卻發現 1 株 *rrs* 1402 C/T 對 Capreomycin 及 Amikacin 均為抗藥，認為該菌株對 Amikacin 抗藥可能係由於尚未發現的基因突變導致。本計畫卻與上述有不同發現，發現 1 株 *rrs* 1402 C/T

對 Capreomycin 及 Amikacin 藥敏結果均為敏感。此結果是否因本計畫執行不同培養基進行二線藥物試驗或該位點並不直接影響抗藥結果，值得進一步研究。

對 EMB 抗藥偵測敏感度與 Hillemann D.等人發現一樣，是此分析試劑偵測敏感度最低的藥物(44.9%)，甚至偵測不到一半 EMB 抗藥的菌株。但有研究指出 *embB* codon 306 發生突變的機率統計為 30 至 68%，因此我們所獲得 44.9%偵測敏感度尚在可接受的範圍。部分研究也發現 *embB* codon 306 突變與其他藥物抗藥有關，甚至會影響菌株導致多重抗藥與否。

本計畫初步以 68 株多重抗藥菌株進行 Genotype®MTBDR *sl* 評估其敏感度，因至今針對多重抗藥結核菌進行二線用藥抗藥基因分析運用該項試劑評估僅出現一篇文獻，因此本項評估計畫成果將有助於研究二線抗藥基因之後續發展。

另針對期末報告委員審查意見討論如下：

(1) 請增加說明菌株及檢體的來源，與提出檢驗報告後的影響。

子計畫二目前所分析的樣本屬於年度複驗的疑似 MDR-TB 菌株，因目前政策針對 MDR-TB 之判定歸屬本局研檢中心，因此進行研究之菌株含括全國各地，均為各醫療院所培養陽性並經藥物感受性試驗結果至少為 RIF 及 INH 為抗藥的樣本。所有經複驗確認為 MDR-TB 的個案，於本局複驗確認後，隨即進入 MDR 照護體系進行個案照護。

(2) 可嘗試與 Hillemann D 等人的研究，進行試劑的敏感度的比較，可增加研究內容的豐富性與結果。

本計畫顯示利用商品化之快速檢測試劑組 Genotype®MTBDR*sl*，於 68 株 MDR 結核菌株分析二線藥抗藥基因，Fluoroquinolone 藥物偵測敏感度為 61.8%，Aminoglycosides 藥物偵測敏感度為 54.2%，對第一線藥物 Ethambutol 偵測敏感度為 44.9%。與 Hillemann D.等人發表全世界第一篇評估報告相較，Fluoroquinolone 藥物偵測敏感度為 90.6%，Aminoglycosides 藥物偵測敏感度為 84.8%，對第一線藥物 Ethambutol 偵測敏感度為 69.2%，三種藥物偵測敏感度均較低，與相關文獻相較，

對 Fluoroquinolone 藥物抗藥而言，我們的研究僅 61.8% 抗藥基因突變發生在 *gyrA* codon 85-96，是否台灣地區抗 Fluoroquinolone 藥物尚有其他抗藥基因影響（如 *gyrB* 或 *gyrC*），值得進一步分析。Aminoglycosides 藥物偵測而言，對於 68 株評估測試菌株，僅 1 株具 *rrs* 1402 發生突變，其餘突變均發生於 *rrs* 1401 位點，文獻所提的 *rrs* 1484 突變，定序結果顯示均未發生；另外針對 *rrs* 1402 發生突變所導致抗藥之結果，亦有不同文獻有不同看法，我們的結果與不同文獻相異，但因僅 1 株菌株發生該位點突變，樣本數不足，須待進一步的研究以釐清抗藥與否。

- (3) 在資源有限的情況下，GenoType MTBDR plus 已可以直接自痰檢體中檢出 80%。請於研究結果中增加分析及說明以 sequencing 方法增加 10% 的 MDRTB 快速檢出的成本效益。

目前子計畫二僅針對臨床複驗 MDR 菌株進行抗藥基因分析，於 2008 年計畫研究中，我們已發現 GenoType MTBDRplus 於基因序列上，和定序結果相吻合，因此 2009 年策略已修正為若 GenoType MTBDRplus 檢測結果可判定為 MDR-TB 時，於第一時間並不直接進行基因定序，以節省人力之負擔。若 RIF 或 INH 有任一結果為敏感時（即 GenoType MTBDRplus 針對其中之一 RIF 或 INH 判為 susceptible），會對被判為 susceptible 之基因進行定序試驗，針對 2009 年 10 月完成分析共 273 株菌株而言（表七），僅需針對約 25% 菌株進行（*rpoB*、*katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC*）基因定序，即可將 31 株（11.4%）判定為 MDR-TB，雖然定序成本每株需進行 12 條序列分析，成本約需 1740 元（合約價）。但卻可節省至少 1 個月的菌株培養及藥敏試驗時間，對整體防治結核病及病人照護時效而言，成本效益不言可喻。

五、結論與建議

本計畫顯示利用商品化之快速檢測試劑組 Genotype[®]MTBDRsl 於 MDR 結核菌株分析二線藥抗藥基因，Fluoroquinolone 藥物偵測敏感度為 61.8%，Aminoglycosides 藥物偵測敏感度為 54.2%，對第一線藥物 Ethambutol 偵測敏感度為 44.9%。雖初步結果顯示尚待繼續研究其他新適合位點，但與藥物試驗相較，傳統藥敏試驗需花費 4 周時間才能獲得結果，此項試劑組僅需約 6 小時即可完成判讀，就時效性而言仍有其優勢。對病人治療而言，仍有近半數 MDR-TB 菌株可在短時間內確定是否為 XDR-TB，可縮短臨床醫師之準確用藥時程。

六、計畫重要研究成果及具體建議

現有結果顯示商品化之快速檢測試劑組 Genotype[®]MTBDR *sl* 於MDR 結核菌株進行分析二線藥物抗藥基因時，其敏感度僅達 54-62%。但在時效上，商品化之快速檢測試劑組仍較傳統藥物試驗縮短至少一星期以上時間，建議此項快速試劑組可針對疑似高度接觸者、治療失敗、失落個案、重開個案提供另一項快速檢測之分子工具。但就二線抗藥基因而言，目前研究仍無法完全檢測所有之抗藥菌株，因此傳統的藥物試驗仍舊是必須依循的標準檢驗方法。

七、参考文献

1. Centers for Disease Control and Prevention: Reported Tuberculosis in the U.S., 2005
2. **Moore M, Onorato I M, McCray E, Castro K G.** Trends in drug-resistant tuberculosis in the United States, 1993–1996. *JAMA* 1997; 278: 833–837.
3. **Piersimoni, C., A. Olivieri, L. Benacchio, and C. Scarparo.** 2006. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. *J. Clin. Microbiol.* **44**:20–28.
4. **Hillemann, D., M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter, and S. Niemann.** 2005. Use of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3699–3703.
5. **Somoskovi, A., J. Dormandy, D. Mitsani, J. Rivenburg, and M. Salfinger.** 2006. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based GenoType MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4459–4463.
6. **Telenti, A., N. Honore´, C. Bernasconi, J. March, A. Ortega, H. E. Takiff, and S. T. Cole.** 1997. Genotyping assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J. Clin. Microbiol.* **35**:719–723.
7. **Mokrousov, I., O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko, L. Steklova, and B. Vyshnevkiy.** 2002. High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1417–1424.
8. **Musser, J. M., V. Kapur, D. L. Williams, B. N. Kreiswirth, D. van Soolingen, and J. D. van Embden.** 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by

9. **Piatek, A. S., A. Telenti, M. R. Murray, H. El-Hajj, W. R. Jacobs, Jr., F. R. Kramer, and D. Alland.** 2000. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:103–110.
10. **Kelley, C. L., D. A. Rouse, and S. L. Morris.** 1997. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2057–2058.
11. **Sreevatsan, S., X. Pan, Y. Zhang, V. Deretic, and J. M. Musser.** 1997. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:600–606.
12. **Hazbon, M. H., M. Brimacombe, M. Bobadilla del Valle, M. Cavatore, M. I. Guerrero, M. Varma-Basil, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, C. I. Leon, M. Bose, F. Chaves, M. Murray, K. D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, M. D. Cave, A. Ponce de Leon, and D. Alland.** 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2640–2649.
13. **Bang, D., A. B. Andersen, and V. O. Thomsen.** 2006. Rapid genotypic detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2605–2608.
14. **Maikinen, J., H. J. Marttila, M. Marjamaki, M. K. Viljanen, and H. Soini.** 2006. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:350–352.

15. **Miotto, P., F. Piana, V. Penati, F. Canducci, G. B. Migliori, and D. M. Cirillo.** 2006. Use of GenoType MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2485–2491.
16. **Traore, H., A. van Deun, I. C. Shamputa, L. Rigouts, and F. Portaels.** 2006. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4384–4388.
17. **Hillemann, D., Sabine R-G, and E. Richter.** 2007. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2635–2640.
18. **Hooper D.C., Wolfson J.S.,** 1993. *Quinolone Antimicrobial Agents.* Washington DC: American Society for Microbiology Press.
19. **Taniguchi H, Chang B, Abe C, Nikaido Y, Mizuguchi Y, Yoshida SI.** 1997. Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J. Bacteriol.* **179**:4795–4801.
20. **Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, Taniguchi H.** 1998. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1220–1225.
21. **Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM.** 2005. Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:571–577.
22. **Hillemann, D., Sabine R-G, and E. Richter.** 2009. Feasibility of the GenoType MTBDR_{sl} Assay for Fluoroquinolone, Amikacin-Capreomycin, and Ethambutol Resistance Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Specimens *J. Clin. Microbiol.* **47**:1767–1772.

23. **Huang WL, Chen HY, Kuo YM, and Ruwen J.** Performance Assessment of the GenoType MTBDRplus Test and DNA Sequencing in Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2520–2524.
24. **Antonova, O. V., D. A. Gryadunov, S. A. Lapa, A. V. Kuz'min, E. E. Larionova, T. G. Smirnova, E. Y. Nosova, O. I. Skotnikova, L. N. Chernousova, A. M. Moroz, A. S. Zasedatelev, and V. M. Mikhailovich.** 2008. Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips. *Bull. Exp. Biol.Med.* **145**:108–113.
25. **Mokrousov, I., T. Otten, O. Manicheva, Y. Potapova, B. Vishnevsky, O. Narvskaya, and N. Rastogi.** 2008. Molecular characterization of ofloxacinresistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2937–2939.
26. **Feuerriegel, S., H.S. Cox, N. Zarkua, H. A. Karimovich, K. Braker, S. Rusch-Gerdes and S. Niemann.** 2009. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3353–3356.

八、圖表

FIGURE 1. Representative patterns obtained by GenoType MTBDR_{s/l} test for isolates.

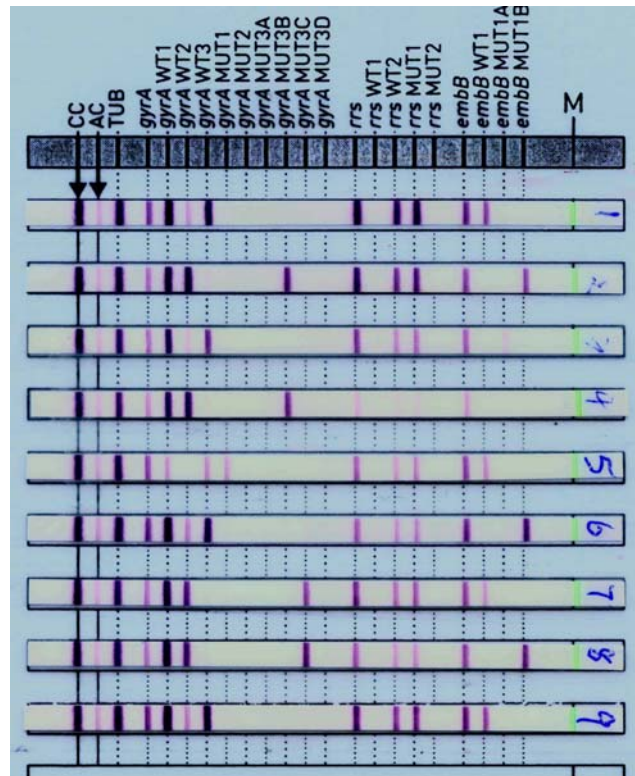


TABLE 1. Analysis *gyrA* sequencing result in 396 *M. tuberculosis* strains

| <i>gyrA</i> mutation | OFX DST Resistant | OFX DST Susceptible |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------|
| | Number (%) | Number (%) |
| codon86 CCG/CCA | 0(0) | 1(0.3) |
| codon88 GGC/TGC | 3(3.1) | 1(0.3) |
| codon89 GAC/AAC | 1(1.0) | 0(0) |
| codon90 GCG/GTG | 7(7.3) | 4(1.3) |
| codon90 GCG/GTG , codon94 GAC/GCC | 1(1.0) | 0(0) |
| codon90 GCG/GTG , codon94 GAC/GGC | 0(0) | 1(0.3) |
| codon91 TCG/CCG | 1(1.0) | 1(0.3) |
| codon94 GAC/TAC | 7(7.3) | 1(0.3) |
| codon94 GAC/AAC | 8(8.3) | 2(0.7) |
| codon94 GAC/GCC | 6(6.3) | 2(0.7) |
| codon94 GAC/GCC | 20(20.8) | 8(2.7) |
| WT | 42(43.8) | 279(93) |

TABLE 2. Analysis *rrs* and *tlyA* sequencing result in 317 *M. tuberculosis* isolates.

| Sequencing result | DST result | No (%) of strains |
|---------------------------------------|--|-------------------|
| <i>rrs</i> 1401 A/G | KM ^r CAP ^r AM ^r | 7(2.2) |
| WT | KM ^r CAP ^r AM ^r | 7(2.2) |
| <i>rrs</i> 1401 A/G | KM ^r CAP ^s AM ^s | 7(2.2) |
| WT | KM ^r CAP ^s AM ^s | 19(6.0) |
| WT | KM ^r CAP ^r AM ^s | 7(2.2) |
| <i>rrs</i> 1401 A/G | KM ^r CAP ^s AM ^r | 4(1.3) |
| <i>tlyA</i> codon 80 GCG/GTG | KM ^r CAP ^s AM ^r | 1(0.3) |
| WT | KM ^r CAP ^s AM ^r | 4(1.3) |
| WT | KM ^s CAP ^r AM ^s | 6(1.9) |
| WT | KM ^s CAP ^r AM ^r | 2(0.6) |
| <i>rrs</i> 1401 A/G | KM ^s CAP ^s AM ^s | 5(1.6) |
| <i>tlyA</i> codon 166 GCG/GTG | KM ^s CAP ^s AM ^s | 4(1.3) |
| <i>tlyA</i> codon 98 GAA/GTA | KM ^s CAP ^s AM ^s | 1(0.3) |
| <i>tlyA</i> codon 80 GCG/GTG | KM ^s CAP ^s AM ^s | 1(0.3) |
| <i>tlyA</i> codon 78~79 insert TTCGCG | KM ^s CAP ^s AM ^s | 1(0.3) |
| WT | KM ^s CAP ^s AM ^s | 251(79.2) |

TABLE 3. Resistance patterns of 68 MDR-TB strains tested with the GenoType MTBDRsl^a

| No. of strains | OFL | KM | CAP | AM | EMB |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 6 | R | R | R | R | R |
| 3 | R | R | R | R | S |
| 1 | R | R | R | S | R |
| 5 | R | R | S | S | R |
| 3 | R | R | S | R | R |
| 1 | R | R | S | R | S |
| 1 | R | R | S | S | S |
| 30 | R | S | S | S | R |
| 10 | R | S | S | S | S |
| 2 | S | R | R | R | R |
| 1 | S | R | S | R | R |
| 1 | S | R | S | S | S |
| 1 | S | S | S | S | R |
| 3 | S | S | S | S | S |

^a R, resistant; S, susceptible; The strains with bold marked are classified as XDR.

TABLE 4. GenoType MTBDRsl test results for the detection of FLQ

| MTBDRsl pattern | MTBDRsl result | Sequencing result | DST result | No (%) of strains |
|---|------------------|----------------------------------|------------------|-------------------|
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3A | FLQ ^r | codon94 GAC/GCC | OFL ^r | 3(4.4) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3A+MUT3B | FLQ ^r | codon94 GAC/AAC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3B | FLQ ^r | codon94 GAC/AAC | OFL ^r | 4(5.9) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3C | FLQ ^r | WT | OFL ^r | 2(2.9) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3C | FLQ ^r | codon94 GAC/GGC | OFL ^r | 11(16.2) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3C | FLQ ^r | codon94 GAC/TAC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3C | FLQ ^r | codon94 GAC/GCC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3 | FLQ ^r | codon94 GAC/TAC | OFL ^r | 5(7.4) |
| <i>gyrA</i> Δ WT2 Δ WT3, MUT1+MUT3A | FLQ ^r | codon90 GCG/GTG, codon94 GAC/GCC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> Δ WT1 Δ WT2 | FLQ ^r | codon89 GAC/AAC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> Δ WT2, MUT1 | FLQ ^r | codon90 GCG/GTG | OFL ^r | 2(2.9) |
| <i>gyrA</i> Δ WT2, MUT1 | FLQ ^r | WT | OFL ^r | 2(2.9) |
| <i>gyrA</i> Δ WT1 | FLQ ^r | codon88 GGC/TGC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> Δ WT1 | FLQ ^r | WT | OFL ^r | 2(2.9) |

| | | | | |
|---------------------------------|------------------|-----------------|------------------|----------|
| <i>gyrA</i> WT, MUT3C | FLQ ^r | WT | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> WT, MUT1 | FLQ ^r | codon94 GAC/TAC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> WT, MUT1+MUT3C | FLQ ^r | codon90 GCG/GTG | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> WT, MUT1+MUT3C | FLQ ^r | WT | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> WT, MUT3A+MUT3C | FLQ ^r | WT | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> WT | FLQ ^s | WT | OFL ^r | 17(25.0) |
| <i>gyrA</i> WT | FLQ ^s | codon94 GAC/GGC | OFL ^r | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> Δ WT3, MUT3C | FLQ ^r | codon94 GAC/GGC | OFL ^s | 2(2.9) |
| <i>gyrA</i> WT, MUT3C | FLQ ^r | WT | OFL ^s | 1(1.5) |
| <i>gyrA</i> WT | FLQ ^s | WT | OFL ^s | 5(7.4) |

TABLE 5. GenoType MTBDRsl test results for the detection of Aminoglycosides

| MTBDRsl pattern | MTBDRsl result | Sequencing result | DST result | No (%) of strains |
|----------------------|--------------------|-------------------|--|-------------------|
| <i>rrs</i> ΔWT, MUT1 | AG/CP ^r | 1401 A/G | KM ^r CAP ^r AM ^r | 6(8.8) |
| <i>rrs</i> WT | AG/CP ^s | WT | KM ^r CAP ^r AM ^r | 3(4.4) |
| <i>rrs</i> ΔWT, MUT1 | AG/CP ^r | WT | KM ^r CAP ^r AM ^r | 2(2.9) |
| <i>rrs</i> WT | AG/CP ^s | WT | KM ^r CAP ^s AM ^s | 6(8.8) |
| <i>rrs</i> WT , MUT1 | AG/CP ^r | 1401 A/G | KM ^r CAP ^s AM ^s | 1(1.5) |
| <i>rrs</i> ΔWT, MUT1 | AG/CP ^r | 1401 A/G | KM ^r CAP ^s AM ^r | 3(4.4) |
| <i>rrs</i> WT | AG/CP ^s | WT | KM ^r CAP ^s AM ^r | 1(1.5) |
| <i>rrs</i> ΔWT, MUT1 | AG/CP ^r | WT | KM ^r CAP ^s AM ^r | 1(1.5) |
| <i>rrs</i> WT | AG/CP ^s | WT | KM ^r CAP ^r AM ^s | 1(1.5) |
| <i>rrs</i> ΔWT, MUT1 | AG/CP ^r | 1401 A/G | KM ^s CAP ^s AM ^s | 4(5.9) |
| <i>rrs</i> ΔWT | AG/CP ^r | 1402 C/T | KM ^s CAP ^s AM ^s | 1(1.5) |
| <i>rrs</i> WT | AG/CP ^s | WT | KM ^s CAP ^s AM ^s | 39(57.4) |

TABLE 6. GenoType MTBDR_{sl} test results for the detection of Ethambutol.

| MTBDR _{sl} pattern | MTBDR _{sl} result | Sequencing result | DST result | No (%) of strains |
|-----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <i>embB</i> ΔWT1, MUT1B | EMB ^r | codon 306 ATG/GTG | EMB ^r | 13(19.1) |
| <i>embB</i> ΔWT1, MUT1A | EMB ^r | codon 306 ATG/ATA | EMB ^r | 2(2.9) |
| <i>embB</i> ΔWT1 | EMB ^r | codon 306 ATG/CTG | EMB ^r | 3(4.4) |
| <i>embB</i> ΔWT1 | EMB ^r | codon 306 ATG/ATC | EMB ^r | 2(2.9) |
| <i>embB</i> ΔWT1 | EMB ^r | codon 306 ATG/ATT | EMB ^r | 1(1.5) |
| <i>embB</i> WT1, MUT1B | EMB ^r | WT | EMB ^r | 1(1.5) |
| WT | EMB ^s | WT | EMB ^r | 26(38.2) |
| WT | EMB ^s | codon 319 TAT/GAT | EMB ^r | 1(1.5) |
| WT | EMB ^s | WT | EMB ^s | 13(19.1) |
| WT | EMB ^s | codon 319 TAT/GAT | EMB ^s | 1(1.5) |
| <i>embB</i> ΔWT1, MUT1B | EMB ^r | codon 306 ATG/GTG | EMB ^s | 3(4.4) |
| <i>embB</i> ΔWT1 | EMB ^r | codon 306 ATG/ATC | EMB ^s | 1(1.5) |
| <i>embB</i> ΔWT1 | EMB ^r | codon 306 ATG/CTG | EMB ^s | 1(1.5) |

計畫編號：DOH98-DC-2025

行政院衛生署疾病管制局九十八年度自行研究計畫

多重與超級抗藥性結核病實驗室檢驗與監測整合型計畫

子計畫三：結核菌抗藥性相關基因特性分析與應用發展

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：莊珮君

協同主持人：周如文

研究人員：簡瑞哲

執行期間：98年1月1日至98年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

| | 頁 碼 |
|--|------|
| 封面 | |
| 目錄 | |
| 壹、中英文摘要 | (4) |
| 貳、本文 | |
| 一、前言 | (8) |
| 二、材料與方法 | (11) |
| 三、結果 | (16) |
| 四、討論 | (18) |
| 五、結論與建議 | (21) |
| 六、計畫重要研究成果及具體建議 | (22) |
| 七、參考文獻 | (23) |
| 八、圖、表 | |
| 圖一、 <i>furA</i> codon 61 wild type (Gac) 及 mutation (Cac) 混合 序列 | (27) |
| 表一、INH 抗藥性相關新的抗藥性基因序列分析使用之 | |

| | |
|---|------|
| primers | (28) |
| 表二、 <i>rpoB</i> codon 176 位點突變分析 | (30) |
| 表三、INH 抗藥性相關 <i>furA</i> 、 <i>ndh</i> 、 <i>kasA</i> 基因序列分析 | (31) |
| 表四、INH 抗藥性相關 <i>mabA</i> 、 <i>efpA</i> 基因序列分析 | (32) |
| 表五、INH 抗藥性相關 <i>iniB</i> 、 <i>iniA</i> 、 <i>iniC</i> 基因序列分析 | (33) |
| 表六、Synonymous 突變 (核苷酸改變但胺基酸未改變) 或是 僅出現在 INH 敏感性菌株之突變位點 | (34) |

壹、摘要

研究目的 根據 96 年 5 月至今之MDR結核菌株複驗結果，針對*rpoB*、*katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC*抗藥基因定序結果準確率達 91.1% (子計畫二)，顯示仍有 8.9%之MDR菌株未能利用以上與抗藥相關的基因突變進行MDR快速檢驗，必須等待藥敏試驗結果才能確認。為此，擬於本計畫進行其他與RIF或INH抗藥相關基因之分析，期能找到與MDR相關之新的抗藥基因與突變位點，作為分子基因定序快速鑑定之標的基因，以提高MDR分子複驗之準確率，協助病人提早進入MDR照護團隊並接受適當治療。

研究方法 (1) 菌株為RIF藥敏試驗結果抗藥之菌株但*rpoB* core-region基因序列無突變者 10 株進行*rpoB* codon 176 位點突變分析，另選取 31 株為RIF敏感性菌株進行比對分析。(2) 菌株為INH藥敏試驗結果抗藥之菌株但*katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC*基因序列無突變之菌株 60 株，進行*furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniB*、*iniA*、*iniC*等與INH抗藥性相關之基因序列分析，另選取 19 株為INH敏感性菌株進行比對分析。

主要發現 (1) 在 10 株原*rpoB* core-region定序結果wild type，然RIF藥敏為抗藥的菌株中，有 7 株 (70.0%) 發生codon 176 Val→Phe突變；然 31 株RIF藥敏為敏感性菌株皆無突變。(2) 本研究共計偵測到 14 個與INH抗藥性有關的位點，其中除*iniB* codon 222 12-bp deletion、*mabA* start codon上游-15 base C→T及-17 base G→T已發表外，其餘 11 個突變皆為新的基因突變位點。(3) 本研究發現 3 個新的突變位點 (*iniA* codon 481、*kasA* codon 6、*efpA* codon 73) 與*kasA* codon 312 同屬EAI2_Manilla shared type 19 基因型之SNPs，而與INH抗藥性無關。

結論及建議事項 利用 *rpoB* codon 176 及 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 等 8 個基因的 14 個突變位點約可提高 MDR 分子快速鑑定 4.49% 敏感度。根據此研究成果，可進一步利用快速高效率 SNPs 偵測系統設計對應之 probes 以同時偵測多個突變位點，將可提高 MDR 分子複驗的效率。增加新的 RIF 或 INH 抗藥性相關基因突變位點偵測，確實可儘早確認多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 結核菌株，縮短因須依賴藥敏結果判定所需之冗長時間，協助病人提早進入 MDR 照護團隊並接受適當治療。本研究之成果並可做為快速診斷試劑研發之參考。

關鍵詞：多重抗藥性結核菌、*rpoB* codon 176、*furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*iniBAC*、EAI2_Manilla shared type 19 基因型

Abstract

Purpose

According to the confirmation results of MDR *M. tuberculosis* isolates collected from May, 2007, the accuracy in detection MDR was 91.1% base on DNA sequencing, including *rpoB* core-region, *katG*, *inhA*, *inhAr*, and *oxyR-ahpC* genes. It meant that 8.9% of MDR isolates had to be confirmed by drug susceptible test (DST). The objective of this study is to identify new mutation sites of other RIF and INH resistant-associated genes to elevate the accuracy of DNA sequencing. Therefore, the MDR patients can be transferred to caring systems and accept appropriate treatment as soon as possible.

Materials and Methods

1. Ten MDR *M. tuberculosis* isolates which were RIF resistant confirmed by DST but harboring no mutation on *rpoB* core-region were selected to be sequenced of *rpoB* codon 176. Thirty-one RIF susceptible isolates were analyzed concordantly.
2. Sixty MDR *M. tuberculosis* isolates which were INH resistant confirmed by DST but harboring no mutation on *katG*, *inhA*, *inhAr*, and *oxyR-ahpC* genes were selected to be sequenced of *furA*, *ndh*, *kasA*, *mabA*, *efpA*, *Rv0340*, *iniB*, *iniA*, and *iniC* genes. Nineteen INH susceptible isolates were analyzed concordantly.

Results

1. Of ten MDR *M. tuberculosis* isolates which were RIF resistant confirmed by DST but harboring no mutation on *rpoB* core-region, seven had mutation on *rpoB* codon 176 Val to Phe. This mutation were not identified

2. Fourteen mutation sites were identified among new sequenced INH resistant-associated genes in INH resistant isolates. Besides *iniB* codon 222 12-bp deletion, *mabA* -15 base upstream of the start codon C→T, and -17 base upstream of the start codon G→T, the rest twelve mutation sites were new identified in this study.
3. As *kasA* codon 312 were published as specific mutation in EAI2_Mallina shared type 19 genotype isolates, three new mutation sites, *iniA* codon 481, *kasA* codon 6, and *efpA* codon 73, were recognized as SNPs of EAI2_manilla shared type 19 genotype but not associated with INH resistance in this study.

Conclusions and Suggestions

Based on the sequence analyses of new RIF and INH resistant-associated genes, we found *rpoB* codon 176 and fourteen mutation sites in INH-associated genes can be identified in RIF and INH resistant isolates, respectively, and about 4.49% accuracy can be elevated in confirmation of MDR isolates by rapid molecular diagnosis. These results can be applied in high throughput system to detect these mutation sites simultaneously. The results in this study showed that using additional mutation sites associated with RIF and INH resistant-associated genes can identify MDR isolates without waiting for DST results. Therefore, the MDR patients can be transferred to caring systems and accept appropriate treatment as soon as possible. In addition, the results in this study can be as reference in development of rapid molecular diagnosis kit.

Key Words: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB* codon 176, *furA*, *ndh*, *kasA*, *mabA*, *efpA*, *iniBAC*, EAI2_Manilla shared type 19 genotype

貳、本文

一、前言

為儘早確認多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 結核菌株，利用與抗藥相關之基因 (*rpoB*、*katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC*) 直接定序方法，可以快速進行 MDR 之確認，縮短因藥敏檢驗所需之冗長時間。根據 96 年 5 月至今之 MDR 菌株複驗結果，針對 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 抗藥基因定序結果準確率達 91.1% (子計畫二)，顯示仍有 8.9% 之 MDR 菌株未能利用以上與抗藥相關的基因突變進行 MDR 快速檢驗，必須等待藥敏試驗結果才能確認。為此，擬於本計畫進行其他與 RIF 或 INH 抗藥相關基因之分析，期能找到與 MDR 相關之新的抗藥基因與突變位點，作為分子基因定序快速鑑定之標的基因，以提高 MDR 分子複驗之準確率，協助病人提早進入 MDR 照護團隊並接受適當治療。

MDR 之定義為至少同時對第一線藥物 rifampin (RIF) 及 isoniazid (INH) 產生抗藥性。已知 RIF 抗藥性主要與 *rpoB* 基因 81-bp "Core-region" 產生突變有關。根據去年子計畫二之結果，共收集 416 株多重抗藥結核菌株及 30 株敏感結核菌株進行分析，對 RIF 單一抗藥，可檢測出 405 株，達 97.4%。代表當分析 *rpoB* 基因位點 (codon 406-572) 序列，已包括此基因之 Core-region 區域 (codon 507-533) 時，仍有部分菌株未發現基因突變，但藥敏試驗結果確屬 RIF 抗藥。根據文獻針對 *rpoB* 基因 Core-region 區域以外進行研究，Bartfai Z 等人【1】發現 3 株 RIF 藥敏結果為抗藥的菌株於 codon 176 產生突變 (Val→Phe)；Heep M 等人【2】亦發現 1 株 RIF 藥敏結果為抗藥者於 codon 146 產生突變 (Val→Phe)，顯示增加 *rpoB* codon 176 位點突變的偵測應可再提高利用 *rpoB* 基因分析快速鑑定 RIF

抗藥性菌株之比例。

相對地，INH 藥物之作用機制較為複雜，與 INH 抗藥性相關之基因種類較多。研究亦顯示，INH 抗藥之藥敏試驗 MIC 濃度高或低可能與不同的抗藥性基因突變有關。INH 藥物為 prodrug，已知可經由結核菌之 KatG 蛋白質活化生成 oxygenated 及 organic 游離基 (radicals) 後，與結核菌細胞壁 mycolic acid、carbohydrates、lipids 或 DNA 代謝產物等 targets 形成複合物，進而阻斷結核菌之正常功能。其中已知 INH radicals 可經由與結核菌細胞壁合成 fatty acid synthase type II system (FAS II) 中所需之 NAD 形成 INH-NAD adduct，進而阻斷 mycolic acid 的合成【3】。*inhA* 基因產物 InhA (enoyl-ACP reductase) 亦參與 FAS II system，因此 *inhA* 基因之突變也會造成 InhA 正常功能喪失，導致菌株 INH 抗藥性的產生【4,5】。除此之外，其他研究也顯示 *oxyR-ahpC* intergenic region 的突變也與 INH 抗藥性有關【6,7,8】。因此在 INH 抗藥研究皆主要針對 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因突變進行分析。

由於 INH 藥物作用相關之基因較多，研究顯示除主要之 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因突變分析外，尚有較低比例為 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniBAC* (*iniB*, *iniA*, *iniC*) operon 等基因突變與 INH 抗藥性有關【9,10,11,12】。Zahrt TC 等人以 *Mycobacterium smegmatis* 進行研究發現，FurA 為 *katG* 基因之 negative regulator【13】。Pym AS 等人亦發現結核菌之 FurA 可調節 *katG* 基因的表現【14】。因此推論 *furA* 基因的突變可能會造成 KatG 的表現量減少，進而導致 INH 抗藥。在 *ndh* (NADH dehydrogenase) 基因抗藥性相關研究顯示，*ndh* 基因突變與牛型 BCG strain 之 INH 抗藥有關，主要是因為 *ndh* 基因突變會造成 Ndh II 活性降低，

造成 NADH 的堆積，進而成為 InhA 與 NAD 結合之競爭者，抑制了 INH-NAD adduct 形成，進而導致 INH 抗藥性的產生【15】。研究顯示 INH 抗藥結核菌株有 *ndh* 基因 R268H 突變【9】。*kasA* 基因所產生的 β -ketoacyl ACP synthase 蛋白質-KasA 乃參與細胞壁 mycolic acid 合成【16】。*mabA* 基因位於 *inhA* 之上游，與 *inhA* 相同其製造之蛋白質 MabA 為細胞壁 mycolic acid 合成所需之酵素【17】。*efpA* 基因已知製造一 efflux 蛋白質 EfpA，該基因之特定位點突變與 INH 抗藥性有關，但真正機制尚不清楚【18】。*Rv0340* 基因位於 *iniBAC* operon 上游，*iniBAC* operon 包含 *iniB*、*iniA*、*iniC* 三個基因，IniA 具有與 acyl carrier proteins (ACPs, 參與 FAS II system) 結合之 phosphopantetheine attachment site motif, IniC 則與 IniA 有 34%相似性【19,20】。研究顯示在 INH 抗藥菌株有 *mabA*、*kasA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 基因特定位點的突變，在 INH 敏感的菌株中則未見【10,12】。

因此本計畫擬自 96 年 5 月至今藥敏試驗複驗 MDR 菌株中篩選：(1) RIF 藥敏試驗結果為抗藥性，但 *rpoB* core-region 基因無突變者，進行 *rpoB* codon 176 位點突變分析。(2) INH 藥敏試驗結果為抗藥性者，但分子基因定序 (含 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC*) 未發現突變之菌株進行 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniBAC* (*iniB*, *iniA*, *iniC*) operon 基因序列分析。同時亦挑選 RIF 或 INH 敏感性菌株進行同步比對分析，以得知突變位點與 INH 抗藥性之相關性。

二、材料與方法

1. 菌株與資料收集

針對核心計畫自 96 年 5 月起送昆陽實驗室複驗所收集之 MDR 結核菌株中：(1) 菌株為 RIF 藥敏試驗結果抗藥之菌株但 *rpoB* core-region 基因序列無突變者 10 株進行 *rpoB* codon 176 位點突變分析，另選取 31 株為 RIF 敏感性菌株進行比對分析。(2) 菌株為 INH 藥敏試驗結果抗藥之菌株但 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因序列無突變之菌株 60 株，進行 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 基因序列分析，另選取 19 株為 INH 敏感性菌株進行比對分析。

2. 新的抗藥性基因序列分析

(1) 引子的設計

根據 Heep M 等人的文獻【2】合成引子 Tb176-f (5'-CTTCTCCGGGTCGATGTCGTTG-3') 及 Tb176-r (5'-CGCGCTTGTCGACGTCAAACCTC-3') 進行 *rpoB* codon 176 位點突變分析。

利用 FastPCR 軟體【21】，針對 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 基因設計引子做為聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 及定序使用 (表一)。

(2) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

配製 PCR 液，針對引子對 Tb176 之單一檢體之 PCR 液含以下配

方：

| 試劑 | 體積 (μL) |
|--------------------------------|---------|
| 無菌水 | 7.7 |
| F 端引子 (1.6 μM) | 5.0 |
| R 端引子 (1.6 μM) | 5.0 |
| 25 mM dNTP | 0.2 |
| 25 mM MgCl ₂ | 2.5 |
| 不含 MgCl ₂ 之 10X 緩衝液 | 2.5 |
| DNA 聚合酶 (5U/μL) | 0.1 |
| 檢體 | 2.0 |
| 總體積 | 25.0 |

配製 PCR 液，針對引子對 furA、ndh-1、ndh-2、Rv0340、kasA-1、mabA-1、mabA-2、efpA-1、efpA-2、iniA-2、iniC-1 之單一檢體之 PCR 液含以下配方：

| 試劑 | 體積 (μL) |
|--------------------------------|---------|
| 無菌水 | 15.7 |
| F 端引子 (10 μM) | 1.0 |
| R 端引子 (10 μM) | 1.0 |
| 25 mM dNTP | 0.2 |
| 25 mM MgCl ₂ | 2.5 |
| 不含 MgCl ₂ 之 10X 緩衝液 | 2.5 |

| | |
|-----------------------|------|
| DNA 聚合酶 (5U/ μ L) | 0.1 |
| 檢體 | 2.0 |
| 總體積 | 25.0 |

配製 PCR 液，針對引子對 kasA-2、iniB-1、iniB-2、iniA-1、iniC-2 之單一檢體之 PCR 液含以下配方：

| 試劑 | 體積 (μ L) |
|--------------------------------|---------------|
| 無菌水 | 14.45 |
| F 端引子 (10 μ M) | 1.0 |
| R 端引子 (10 μ M) | 1.0 |
| 25 mM dNTP | 0.2 |
| 25 mM MgCl ₂ | 2.5 |
| 不含 MgCl ₂ 之 10X 緩衝液 | 2.5 |
| DMSO | 1.25 |
| DNA 聚合酶 (5U/ μ L) | 0.1 |
| 檢體 | 2.0 |
| 總體積 | 25.0 |

PCR 程式 (引子對 Tb176)：

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|----|-------|------|
| 1 | 96 °C | 10分鐘 |

| | | |
|--------------|-------|-----|
| 2 | 96 °C | 1分鐘 |
| 3 | 60 °C | 1分鐘 |
| 4 | 72 °C | 2分鐘 |
| 步驟2至4循環重複32次 | | |
| 5 | 72 °C | 7分鐘 |
| 6 | 16 °C | ∞ |

PCR 程式(引子對 *furA*、*ndh-1*、*ndh-2*、*kasA-1*、*kasA-2*、*mabA-1*、*mabA-2*、*efpA-1*、*efpA-2*、*Rv0340*、*iniB-1*、*iniB-2*、*iniA-1*、*iniA-2*、*iniC-1*、*iniC-2*)：

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|--------------|-------|------|
| 1 | 95 °C | 10分鐘 |
| 2 | 95 °C | 30秒 |
| 3 | 62 °C | 30秒 |
| 4 | 72 °C | 1分鐘 |
| 步驟2至4循環重複30次 | | |
| 5 | 72 °C | 7分鐘 |
| 6 | 16 °C | ∞ |

(3) 基因序列突變位點比對

自 NCBI 資料庫下載 H37Rv 參考菌株 (NC_000962) 之 *rpoB*、*furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 等基因序列，並將菌株定序完成之序列利用 Sequencher (Gene Codes Corporation,

USA)、MEGA4 軟體【22】與 H37Rv 參考菌株進行比對以獲得各基因突變位點資訊。

三、結果

1. RIF 抗藥性相關 *rpoB* codon 176 位點突變分析

在 10 株原 *rpoB* core-region 定序結果 wild type，然 RIF 藥敏為抗藥的菌株中，有 7 株 (70.0%) 發生 codon 176 Val→Phe 突變；然 31 株 RIF 藥敏為敏感性菌株，其 *rpoB* core-region 定序為 wild type，於 *rpoB* codon 176 亦未發生突變。結果如表二所示。

2. INH 抗藥性相關 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*Rv0340*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 基因序列分析

60 株 INH 藥敏結果為抗藥，但 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因定序結果為 wild type 的菌株中發現：(1) 在 *furA* 序列分析中，1 株 codon 40 Thr→Pro、1 株 codon 61 Asp→His (與 wild type 混合存在)；(2) 在 *ndh* 序列分析中，4 株 codon 68 Ile→Thr；(3) 在 *kasA* 序列分析中，2 株 codon 253 His→Tyr；(4) 在 *masA* 序列分析中，2 株 start codon 上游-15 base C→T、1 株 start codon 上游-17 base G→T、1 株 codon 74 Ala→Thr、1 株 codon 196 Glu→Lys；(5) 在 *efpA* 序列分析中，1 株 codon 47 Pro→His；(6) 在 *iniB* 序列分析中，3 株 codon 222 有 12-bp deletion，且會伴隨 codon 216 gtT→gtC (Val→Val)；(7) 在 *iniA* 序列分析中，1 株 codon 19 Lys→Asn、1 株 codon 84 Ser→Arg、1 株 codon 634 Arg→Pro；然 19 株 INH 敏感性菌株進行分析以上基因位點皆未發生突變 (表三、表四、表五)。在 1 株含 *furA* codon 61 Asp→His 突變的菌株該基因分析中發現此位點為 mutation 與 wild type 混合型 (圖一)，進行重複序列分析皆得到同樣的結果，顯示該檢體可能同時含有兩種菌株。於 *Rv0340*

基因序列分析中，在 INH 抗藥性菌株未見突變。Synonymous 突變 (核苷酸改變但胺基酸未改變) 或是僅出現在 INH 敏感性菌株之突變位點列於表六。因此本結果顯示 60 株原 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 定序結果 wild type，然 INH 藥敏為抗藥的菌株中，有 18 株 (30.0%) 發現新的抗藥基因突變位點，且未見於 19 株的 INH 敏感性菌株。本研究共計偵測到 14 個與 INH 抗藥性有關的位點，其中除 *iniB* codon 222 12-bp deletion、*mabA* start codon 上游-15 base C→T 及-17 base G→T 已發表外，其餘 11 個突變皆為新的基因突變位點。

3. 與 spoligotype East-African-Indian (EAI) 基因型有關之突變位點

在 60 株 INH 藥敏結果為抗藥性及 19 株 INH 藥敏結果為敏感性的菌株進行 *iniA*、*kasA*、*efpA* 基因序列分析時發現，*iniA* codon 481 His→Gln、*kasA* codon 6 acC→acT (Thr→Thr)、*kasA* codon 312 Gly→Ser、*efpA* codon 73 Ile→Thr 皆出現在同樣的菌株：1 株 INH 藥敏結果為抗藥性及 2 株 INH 藥敏結果為敏感性菌株。經比對發現此 3 株 spoligotype 基因型皆為 EAI2_Manilla shared type 19 (ST 19)，但同屬 EAI family 的 EAI1_SOM 菌株則無以上 SNPs。根據文獻發現 *kasA* codon 312 Gly→Ser 為 EAI2_manilla ST 19 之單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 【23】。因此可推論本研究發現 3 個新的突變位點 (*iniA* codon 481、*kasA* codon 6、*efpA* codon 73) 與 *kasA* codon 312 同屬 EAI2_Manilla ST 19 基因型之 SNPs，而與 INH 抗藥性無關。

四、討論

本研究結果顯示，在 10 株原 *rpoB* core-region 定序結果 wild type，然 RIF 藥敏為抗藥的菌株中，有 7 株 (70.0%) 發生 codon 176 Val→Phe 突變。若以去年有 2.6% 之 MDR 菌株未能以 *rpoB* core-region 基因突變檢出 RIF 抗藥者計算，估計將有 1.82% 可利用 *rpoB* codon 176 快速複判為 MDR。在 60 株 INH 藥敏結果為抗藥，但 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因定序結果為 wild type 的菌株中則發現 14 個與 INH 抗藥性有關的位點出現在 18 株 (30.0%, 18/60) 菌株中，且這些位點未見於 INH 敏感性菌株中。若以去年有 8.9% 之 MDR 菌株未能以 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因突變檢出 INH 抗藥者計算，估計將有 2.67% 可利用 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 等 8 個基因的 14 個突變位點快速複判為 MDR。綜合以上結果利用本計畫偵測之新的突變位點約可提高 MDR 分子快速鑑定 4.49% 敏感度。

本研究進行分析的 60 株 INH 為抗藥但 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因為 wild type 菌株中，Beijing 佔 36 株、Haarlem 3 佔 6 株、T 佔 5 株、U 佔 2 株、EAI 佔 2 株 (1 株為 EAI2_Manilla shared type 19，1 株為 EAI1_SOM)、LAM 佔 2 株、CAS 佔 1 株、undesignated 佔 6 株。本研究發現 4 個屬於 EAI2_Manilla ST 19 基因型的 SNPs，且未見於 EAI1_SOM 菌株中。除 *kasA* codon 312 Gly→Ser 為已發表外，其餘為新發現之基因型特有的 SNPs。這也提醒在進行抗藥性基因突變位點分析時，需注意有些抗藥性基因位點突變是與抗藥性無關的，如 *katG* codon 463 及 *gyrA* codon 95【24】。

在 INH 抗藥性基因分析中顯示 18 株具有 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、

efpA、*iniB*、*iniA*、*iniC* 突變位點菌株中，Beijing 佔 10 株、Haarlem 3 佔 2 株、T 佔 2 株、U 佔 1 株、EAI 佔 1 株、undesignated 佔 2 株。其中 1 株 Beijing 型同時具有 *furA* codon 61 及 *mabA* codon 74 的突變；另外 2 株 Beijing 型則同時具有 *iniB* codon 222 12-bp deletion 及 *kasA* codon 253 的突變。

根據文獻已知 *iniB*、*iniA*、*iniC* 某些位點突變是與 EMB 抗藥有關。包括 *iniB* codon 47、*iniA* codon 308 及 codon 501、*iniC* codon 248 及 codon 351【25】。這些位點並未出現在本計畫進行研究的 60 株 INH 抗藥性菌株中。另同時檢視具有本研究偵測到 *iniB*、*iniA*、*iniC* 突變之菌株，除 3 株具 *iniB* codon 222 12-bp deletion 的菌株其 EMB 也抗藥外，有 1 株具有 *iniC* codon 457 突變的菌株 EMB 藥敏結果為抗藥，其餘皆為 EMB 敏感菌株。*iniB* codon 222 12-bp deletion 為已知與 INH 抗藥有關的突變，因此除 1 株具 *iniC* codon 457 突變與 INH 抗藥性的相關性需進一步確認，其餘在 *iniBAC* operon 發現的 4 個新突變位點應與 INH 抗藥性有關。未來可再增加 INH 敏感性菌株分析或利用單點基因突變實驗來確認與 INH 的相關性。

另針對期末報告委員審查意見討論如下：

- (1) 本研究係屬技術發展，如果在結核病防治政策上要引用，必須增加成本效益及時效的分析及考量。

根據本計畫之成果，利用新的 1 個 RIF 抗藥相關突變位點及 14 個 INH 抗藥相關突變位點可將 10%左右需要等待傳統藥敏試驗結果的 MDR 病人中之 4.49%快速複判為 MDR，即在 70 名需要等待傳統藥敏試驗結果的病人中有 25 名可利用分子快速鑑定為

MDR，藉此可提早進入 MDR 團隊接受完整的治療。以目前定序成本每株需進行 10 對(20 條)序列分析，成本約需 2900 元（合約價）。但卻可節省至少 1 個月的菌株培養及藥敏試驗時間，對整體防治結核病及病人照護時效而言，成本效益不言可喻。在下年度將利用快速高效率 SNPs 偵測系統設計對應之 probes 以同時偵測多個突變位點，更可提高 MDR 分子複驗的效率及降低成本。

- (2) 建議說明合約實驗室的結果可否使用？及實驗結果對結核病的防治與臨床治療的影響，俾利未來政策參酌。

根據本計畫之成果，若增加抗藥性相關標的基因的偵測將有助於提升 MDR 分子複驗的效率，且根據美國 CDC 專家 Dr. Tomas Shinnick 表示，基因突變位點的偵測對 MDR 之篩檢可信度相當高，因此分子快速檢驗必定對 MDR 病人的治療有相當的助益。

五、結論與建議

根據本研究的結果，利用 *rpoB* codon 176 及 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 等 8 個基因的 14 個突變位點約可提高 MDR 分子快速鑑定 4.49% 敏感度。根據此研究成果，可進一步利用快速高效率 SNPs 偵測系統設計對應之 probes 以同時偵測多個突變位點，將可提高 MDR 分子複驗的效率。同時根據研究結果並發現特定菌株基因型之 SNPs 可排除與抗藥性無關的突變位點。由於與 INH 抗藥性相關的基因會同時與 EMB 抗藥性相關基因重複，因此在分析上仍須謹慎。根據核心計畫自 96 年 5 月起送昆陽實驗室複驗所收集之 MDR 結核菌株中，仍須等待傳統藥敏的結果複判為 MDR 之菌株仍以 Beijing 基因型居多【26】，在本研究中 INH 為抗藥但 *katG*、*inhA*、*inhAr*、*oxyR-ahpC* 基因皆為 wild type 的菌株中 Beijing 型佔 36 株，其中有 10 株 (27.8%, 10/36) 可在本研究中利用新的基因突變位點鑑別出來。本研究發現 INH 抗藥相關的 14 個突變位點中有僅 3 個已發表於文獻，顯示可能因不同國家進行分析的菌株基因型不同而有不同的 INH 抗藥相關性突變位點。

根據本研究之成果，增加新的 RIF 或 INH 抗藥性相關基因突變位點偵測，確實可儘早確認多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 結核菌株，縮短因須依賴藥敏結果判定所需之冗長時間，協助病人提早進入 MDR 照護團隊並接受適當治療。本研究之成果並可做為快速診斷試劑研發之參考。

六、計畫重要研究成果及具體建議

本研究主要成果為利用 RIF 抗藥相關 *rpoB* codon 176 位點及 INH 抗藥相關 *furA*、*ndh*、*kasA*、*mabA*、*efpA*、*iniB*、*iniA*、*iniC* 等 8 個基因的 14 個突變位點偵測，提高 MDR 分子快速鑑定 4.49% 敏感度。在未來進行 MDR 分子快速鑑定時可加入做為分析之標的基因，縮短因須依賴藥敏結果判定所需之冗長時間，協助病人提早進入 MDR 照護團隊並接受適當治療。同時將利用快速高效率 SNPs 偵測系統設計對應之 probes 以同時偵測多個突變位點，提高 MDR 分子複驗的效率。本研究成果並可做為快速診斷試劑研發之參考。

七、参考文献

1. Bártfai Z, Somoskövi A, Ködmön C, Szabó N, Puskás E, Kosztolányi L, Faragó E, Mester J, Parsons LM, Salfinger M. 2001. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol.* 39(10):3736-9.
2. Heep M, Brandstätter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. 2001. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 39(1):107-10.
3. Bardou F, Raynaud C, Ramos C, Lanéelle MA, Lanéelle G. 1998. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 144 (Pt 9):2539-44.
4. Marrakchi H, Lanéelle G, Quémard A. 2000. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* 146 (Pt 2):289-96.
5. Vilchèze C, Jacobs WR Jr. 2007. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol* 61:35-50.
6. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQ, Sato DN, Shikama Mde L, Mamizuka EM, Hirata RD, Hirata MH. 2004. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(9):3373-81.
7. Kelley CL, Rouse DA, Morris SL. 1997. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(9):2057-8.
8. Kim SY, Park YJ, Kim WI, Lee SH, Ludgerus Chang C, Kang SJ, Kang

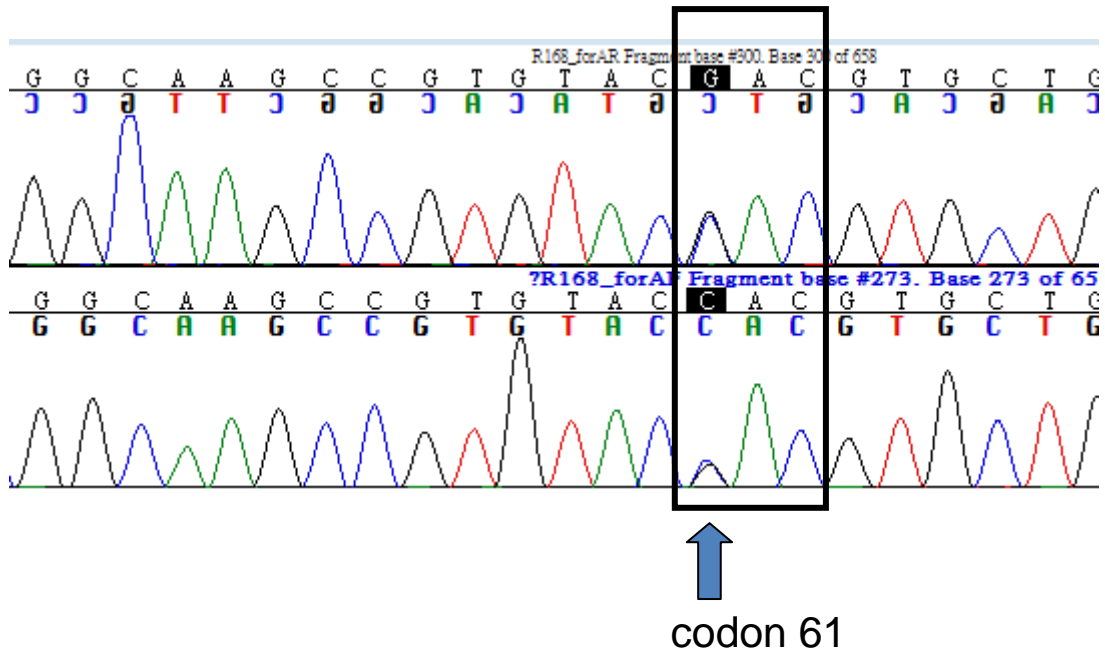
9. Lee AS, Teo AS, Wong SY. 2001. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(7):2157-9.
10. Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, García-García L, León CI, Bose M, Chaves F, Murray M, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J, Cave MD, Ponce de León A, Alland D. 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(8):2640-9.
11. Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, Zhang XL, Wang HH. 2005. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol.* 43(11):5477-82.
12. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA. 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(4):1241-50.
13. Zahrt TC, Song J, Siple J, Deretic V. 2001. Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene *katG*. *Mol Microbiol.* 39(5):1174-85.
14. Pym AS, Domenech P, Honoré N, Song J, Deretic V, Cole ST. 2001. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 40(4):879-89.

15. Vilchèze C, Weisbrod TR, Chen B, Kremer L, Hazbón MH, Wang F, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. 2005. Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(2):708-20.
16. Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, Crane DD, Musser JM, Barry CE 3rd. 1998. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science.* 1998. 280(5369):1607-10.
17. Banerjee A, Sugantino M, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. 1998. The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiology.* 144 (Pt 10):2697-704.
18. Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rane S, Brown PO, Schoolnik GK. 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22):12833-8.
19. Alland D, Kramnik I, Weisbrod TR, Otsubo L, Cerny R, Miller LP, Jacobs WR Jr, Bloom BR. 1998. Identification of differentially expressed mRNA in prokaryotic organisms by customized amplification libraries (DECAL): the effect of isoniazid on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(22):13227-32.
20. Alland D, Steyn AJ, Weisbrod T, Aldrich K, Jacobs WR Jr. 2000. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis iniBAC* promoter, a promoter that responds to cell wall biosynthesis inhibition. *J Bacteriol.* 182(7):1802-11.
21. Kalendar R. 2008. FastPCR: a PCR primer and probe design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein.

22. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8):1596-9.
23. Sun YJ, Lee AS, Wong SY, Paton NI. 2007. Analysis of the role of *Mycobacterium tuberculosis kasA* gene mutations in isoniazid resistance. *Clin Microbiol Infect.* 13(8):833-5.
24. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9869-74.
25. Ramaswamy SV, Amin AG, Göksel S, Stager CE, Dou SJ, El Sahly H, Moghazeh SL, Kreiswirth BN, Musser JM. 2000. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(2):326-36.
26. Huang WL, Chen HY, Kuo YM, Jou R. 2009. Performance assessment of the GenoType MTBDRplus test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 47(8):2520-4.

八、圖、表

圖一、*furA* codon 61 wild type (Gac) 及 mutation (Cac) 混合序列



表一、INH 抗藥性相關新的抗藥性基因序列分析使用之 primers

| Gene | Locus tag | Primer name | Primer sequence | Size (bp) | |
|---------------|-----------|-------------|---------------------------------|-----------|------|
| <i>furA</i> | Rv1909c | furA-F | 5'-CTCATCGGAACATACGAAGGCT-3' | 700 | |
| | | furA-R | 5'-ATTTCATATGACCCACGACGGGAC-3' | | |
| <i>ndh</i> | Rv1854c | ndh-1F | 5'-GCACGCTGTGGTGTGGCTGATGAC-3' | 906 | |
| | | ndh-1R | 5'-CGGAGTCCTTGACGGTGATGCCGT-3' | 888 | |
| | | ndh-2F | 5'-CCGGCACATCGACTCGACCAA-3' | | |
| | | ndh-2R | 5'-GCATTCACCGACGCCATCGACG-3' | | |
| <i>kasA</i> | Rv2245 | kasA-1F | 5'-GGTGACGTTGTCGCCTACATCC-3' | | 884 |
| | | kasA-1R | 5'-CGTCTCGATGAGCATCAGCGCA-3' | 854 | |
| | | kasA-2F | 5'-CGTCAGATCGTGATGGGCGAC-3' | | |
| | | kasA-2R | 5'-GCGATGCCGGTGACGACTACGTA-3' | | |
| <i>mabA</i> | Rv1483 | mabA-1F | 5'-GCAATTGCGCGGTCAGTTCCA-3' | | 674 |
| | | mabA-1R | 5'-CGACCGAATTTGTTGCGCTGC-3' | 685 | |
| | | mabA-2F | 5'-GCTGTTTGGCGTCGAATGTGAC-3' | | |
| | | mabA-2R | 5'-TACCCGTGCGATGTGAAACGCGAT-3' | | |
| <i>efpA</i> | Rv2846c | efpA-1F | 5'-AACAGACGTTGCGGGCCACCCT-3' | | 1019 |
| | | efpA-1R | 5'-CGCTCCACGATGACAAACGCGAC-3' | 952 | |
| | | efpA-2F | 5'-GCCTTCTCGATCGGTCCTGAA-3' | | |
| | | efpA-2R | 5'-GGTGCGCAAGAACAACCTCGGACAT-3' | | |
| <i>Rv0340</i> | Rv0340 | Rv0340-F | 5'-TAATGCGGCCATCCCCTAACG-3' | | 797 |
| | | Rv0340-R | 5'-ATCGACGCTATGGATTCCGCCT-3' | | |
| <i>iniB</i> | Rv0341 | iniB-1F | 5'-GCCGATCCCGATAGGTGTTTGG-3' | 981 | |
| | | iniB-1R | 5'-GCATAGCAGCGCCGTTCAAGG-3' | 837 | |
| | | iniB-2F | 5'-CGCTAGCCAGATCGGTGTCTC-3' | | |
| | | iniB-2R | 5'-GCTCGTTTACGCCTCAGATCACG-3' | | |
| <i>iniA</i> | Rv0342 | iniA-1F | 5'-TCGGTGTTTACGTCGGTCACGAG-3' | | 891 |
| | | iniA-1R | 5'-CAGATGTGCTGCATTGGCATTGAC-3' | 800 | |
| | | iniA-2F | 5'-CGATGCCGTCTTGGTGGTCAG-3' | | |
| | | iniA-2R | 5'-CGAAGTCGGTGCCCATGACGTG-3' | | |
| | | iniA-3F | 5'-TGTGACCCGACTGCGCATTGG-3' | | 835 |
| | | iniA-3R | 5'-CGGTCCAGCTGGCAAAAAACGTGCG-3' | | |
| <i>iniC</i> | Rv0343 | iniC-1F | 5'-CGGAAACCGAGCGGGACAATCG-3' | | 890 |
| | | iniC-1R1 | 5'-TCAGCGCAAGAAGTCCGGATACC-3' | | |

| Gene | Locus tag | Primer name | Primer sequence | Size (bp) |
|------|-----------|-------------|--------------------------------|-----------|
| | | iniC-2F | 5'-CTCAAACAGATCGGTGGGCTGGT-3' | 1009 |
| | | iniC-2R | 5'-GCTCGAAAACATGTTCCACCCGGT-3' | |

表二、*rpoB* codon 176 位點突變分析

| <i>rpoB</i> core | DST result | | <i>rpoB</i> codon 176 | |
|------------------|------------|----|-----------------------|----------|
| wild type | R | 10 | Val→Phe | 7 |
| | | | wild type | 3 |
| | S | 31 | Val→Phe | 0 |
| | | | wild type | 31 |

表三、INH 抗藥性相關 *furA*、*ndh*、*kasA* 基因序列分析

| <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>inhAr</i> , <i>oxyR-ahpC</i> | DST result | | | <i>furA</i> | | <i>ndh</i> | <i>kasA</i> |
|---|---------------|----|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | codon 40 | codon 61 | codon 68 | codon 253 |
| | | | | Acg→Ccg Thr→Pro | Gac→Cac Asp→His | aTc→aCc Ile→Thr | Cac→Tac His→Tyr |
| | | | mutation | 1 | 1* | 4 | 2 |
| | R | 60 | wild type | 59 | 57 | 55 | 56 |
| wild type | | | NA | 0 | 2 | 1 | 2 |
| | S | 19 | mutation | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | wild type | 19 | 19 | 19 | 19 |

*: mutation and wild type mixed pattern

NA: not available

表四、INH 抗藥性相關 *mabA*、*efpA* 基因序列分析

| <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>inhAr</i> , <i>oxyR-ahpC</i> | DST result | | <i>mabA</i> | | | | <i>efpA</i> |
|---|---------------|-----------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| | | | -15 UPS [#] | -17 UPS [#] | codon 74 | codon 196 | codon 47 |
| | | | C→T | G→T | Gcg→Acg Ala→Thr | Gag→Aag Glu→Lys | cCc→cAc Pro→TyHis |
| | | mutation | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | R 60 | wild type | 58 | 59 | 59 | 59 | 56 |
| | | NA | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| wild type | | mutation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | S 19 | wild type | 19 | 19 | 19 | 19 | 18 |
| | | NA | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

[#]: nucleotide position (base pairs) upstream of the start codon

NA: not available

表五、INH 抗藥性相關 *iniB*、*iniA*、*iniC* 基因序列分析

| <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>inhAr</i> , <i>oxyR-ahpC</i> | DST result | | <i>iniB</i> | | <i>iniA</i> | | <i>iniC</i> |
|---|---------------|-----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | | codon 222 12-bp deletion | codon 19 aaG→aaC Lys→Asn | codon 84 agT→agG Ser→Arg | codon 634 cGg→cCg Arg→Pro | codon 457 Cac→Tac His→Tyr |
| | | mutation | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | R 60 | wild type | 51 | 56 | 56 | 59 | 59 |
| wild type | | NA | 6 | 3 | 3 | 0 | 1 |
| | S 19 | mutation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | wild type | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |

NA: not available

表六、Synonymous 突變 (核苷酸改變但胺基酸未改變) 或是僅出現在 INH 敏感性菌株之突變位點

| Gene | Codon with synonymous substitutions (sSNPs) | Codon with non-synonymous substitutions (nsSNPs) | UPS [#] | No. of isolates | |
|---------------|---|--|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | | | | INH resistant | INH susceptible |
| <i>furA</i> | | 28 Gtc→Atc (Asp→Ile) | | 0 | 1 |
| <i>mabA</i> | 203 ctG→ctA (Leu) | | | 5 | 0 |
| | 211 gtC→gtT (Val) | | | 1 | 0 |
| | | | -170~-161 bp deletion | 0 | 1 |
| | 241 ggC→ggT (Gly) | | | 0 | 1 |
| <i>efpA</i> | 237 aaG→aaA (Lys) | | | 1 | 0 |
| | 347 atC→atT (Ile) | | | 1 | 0 |
| <i>Rv0340</i> | 97 caA→caG (Gln) | | | 0 | 2 |
| <i>iniB</i> | 367 gtC→gtT (Val) | | | 1 | 0 |
| <i>iniA</i> | 126 ccC→ccA (Pro) | | | 1 | 0 |
| | 178 ggT→ggC (Gly) | | | 2 | 0 |
| | 640 gcG→gcA (Ala) | | | 0 | 1 |
| <i>iniC</i> | 1 Gtg→Atg (Met) | | | 0 | 1 |
| | 22 ccG→ccA (Pro) | | | 1 | 1 |

[#]: nucleotide position (base pairs) upstream of the start codon