

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-113122

衛生福利部疾病管制署 105 年署內科技研究計畫期末成果報告

結核病之抗藥性試驗監測及流行病學研究

年 度 研 究 報 告

執行單位：衛生福利部疾病管制署慢性傳染病組

計畫主持人：周如文

計畫共同主持人：吳玫華

研究人員：林宛璇、林庚酉、范芯芫

執行期間：105年1月1日至105年10月30日

目錄

頁碼

目次

壹、中英文摘要	(iii)
貳、本文	
一、前言	(1)
二、材料與方法	(4)
三、結果	(9)
四、討論	(13)
五、結論與建議	(17)
六、計畫重要研究成果及具體建議	(18)
七、參考文獻	(19)
八、圖、表	

圖次

圖一 以比例法瓊脂藥物敏感試驗測試 173 株 MDR 結核菌株抗藥性分析	(24)
圖二 (a) capreomycin 、kanamycin 及 amikacin 最低抑菌濃度分布範圍	(25)
圖三 (a) capreomycin 、kanamycin 及 amikacin 最低抑菌濃度累積百分比	(29)
圖四 標準菌株(H37Rv, ATCC® 27294™)標準生長曲線	(32)
圖五 (a)H37Rv 及 Simple MDR 、XDR 生長曲線	(33)

表次

表一 Sensititre™ MYCOTB for <i>M. tuberculosis</i> 藥盤示意圖	(35)
--	------

表二 Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ for <i>M. tuberculosis</i> 藥盤示意圖	(36)
表三 Checkerboard 測試藥盤示意圖	(37)
表四 使用最低抑菌濃度藥物敏感性試驗定量測試結果分類	(38)
表五 敏感株最低抑菌濃度藥物敏感性試驗定量測試之 MIC ₅₀ 及 MIC ₉₀	(41)
表六 Kappa 值分析	(44)
表七 進行結核菌生長適應性試驗菌株之藥物感受性型態	(45)
表八 以 MGIT960™ 方法測定生長遲滯期及生長速率之結果	(46)
表九 Bedaquiline 及 Clozazimine 藥物與藥物交互作用 FICI 值	(47)

壹、中英文摘要

研究目的 探討現行結核菌藥物敏感性試驗方法學結果之可靠性；評估定量法提高藥敏結果的正確性；評估新藥的藥物間交互作用結果，並建立結核菌生長適應性標準實驗流程。

研究方法分析 63 株超級抗藥性 (extensively drug-resistance, XDR)，及 173 株多重抗藥性 (multidrug-resistance, MDR) 結核菌菌株。進行定量藥物敏感性試驗及棋盤格藥物與藥物交互作用試驗，及使用商用液態培養系統及 Resazurin microtiter assay 測試結核菌株生長適應性試驗。以 Kappa 值分析，進行方法學比對。

主要結果 成功的藉由定量最低抑菌濃度藥物敏感性試驗建立 ECOFF 流行病學資料庫。MDR 結核菌株定性抗藥性結果可細分成：isoniazid 及 rifampin 其抗藥程度分別集中在中程度抗藥 (Intermediate-level resistance) 及高程度抗藥 (High-level resistance)。Ethionamide、rifabutin 及 capreomycin 為中、低程度抗藥。而 kanamycin 及 amikacin 為中、高程度抗藥。Levofloxacin 及 moxifloxacin 抗藥程度在低、中及高程度抗藥皆有出現。此外，clofazimine 及 bedaquiline 藥物與藥物交互作用實驗，顯示此二種藥物之藥物效力互相不干擾。本研究亦發現生長適應性試驗結果顯示，遲滯期 (lag phase) 與二線藥抗藥型態有關。

結論及建議事項 現行藥物敏感性試驗方法仍存有限制性，定量藥敏檢測結果，能將抗藥性依程度分類。因此，藥物感受性試驗方法學建議增加中間值 (Intermediate) 之判讀，以提高由藥敏結果預測處方用藥治療結果的準確性。此外，由藥物與藥物交互作用棋盤格試驗，證實 bedaquiline 與 clofazimine 合併用藥治療 MDR 及 XDR-TB 的可行性。

關鍵詞：結核病、抗藥性、生長適應性、藥物與藥物交互作用

Abstract

Tuberculosis (TB) is the second important global infection disease besides HIV. There are 9 million new cases and 1.5 millions of death annually. Drug resistance problems are very challenging for TB control. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR) defined as *Mycobacterium tuberculosis* resistant to at least rifampin and isoniazid and extensively drug resistant (XDR) defined as MDR strains resistant to any fluoroquinolone and at least one injectable drug (kanamycin, amikacin and capreomycin). Accurate drug susceptibility testing is required to develop of effective regimens for treating drug-resistant cases.

Purpose: To determine or redefine optimal drug concentrations for anti-TB drugs (e.g., fluoroquinolone, injectable drugs and others), to understand the synergistic effects of anti-TB drugs, and to establish a standardized growth assay.

Materials and Methods: In this study, we tested 63 XDR and 173 MDR *M. tuberculosis* strains. The conventional agar proportion method (APM) was used to determine drug susceptibility. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of single or combined CFZ and BDQ were determined using an established resazurin microtiter assay (RMA). The fractional inhibitory concentration index (FICI) is used to Interpret combination results as follows: FICI ≤ 0.5 , synergy; $0.5 < \text{FICI} \leq 2$, indifference; and $\text{FICI} > 2$, antagonism.

Results and Discussion: We found that the susceptibility of *M. tuberculosis* strains to one identical drug using the qualitative APM could differ in levels of resistance using the quantitative liquid-based RMA assay. Based on kappa value, APM and RMA shown good correlation except ethionamide. When FICIs were calculated, we only found indifferent effects rather than synergistic or antagonist effects in all the isolates. The decreases of MICs of ETH might give rise to the susceptibility to CFZ of MDR-TB isolates. There was no synergistic or antagonistic but indifferent effect on the MDR-TB or XDR-TB isolates whether CFZ combined with BDQ.

Conclusion and Suggestions: We suggested using quantitative liquid-based assays to determine drug susceptibility for preserving effective anti-TB drugs. Besides, our result suggests CFZ is a suitable drug to combine with BDQ for MDR-/XDR-TB treatment.

Key words: Tuberculosis, drug resistance, susceptibility, fractional inhibitory concentration index

貳、本文

一、 前言

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【34】：其方法學主要為瓊脂比例法 (agar proportion method, APM) 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 APM 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 APM 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【34】。

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 WHO 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 MIC 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 MDR-TB 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 APM 法藥敏試驗，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, 18】，因此亟待再確立，以嘉惠病患。

本研究以最低抑菌濃度 MIC 法，進行定量藥物敏感性試驗，嘗試藉由流行病學上該藥物可抑制野生株生長的最高濃度(Epidemiological breakpoints or Epidemiological cutoff, ECOFF)、文獻查找【14-20】及 APM 藥敏試驗臨界濃度【34】，將 MDR 菌株的藥敏結果，細分各藥物抗藥程度，以提供 MDR-TB 病患，在低程度的抗藥結果時，仍然能藉由藥物劑量的調整，繼續使用該藥物或降低劑量，減少副作用，使 MDR-TB 病患，獲得更多有效藥物的選擇，提高治癒率。並降低在藥物治療過程中，抗藥菌株被藥物再度的選殖，產生抗更多藥物的抗藥菌株型別。

影響抗藥性結核病的傳播，廣泛討論的研究方向之一為結核菌因為具有抗藥性，以致於降低其毒性及傳播能力【21-27】。因此，研究結核菌生長適應性，有助於探討為何一些特定 MDR 及 XDR 菌株會造成社區主要傳播源頭【28】。在研究生長適應性的實驗方法上，結核菌因生長緩慢及在培養基內成團生長的特性，

致使結核菌生長適應性實驗比一般細菌更難實行【29】。使用固態培養基，進行標準菌落計數方法，需時約 3-4 週，同時，往往因菌落生長融合致菌落計數困難、失準。使用濁度法測吸光值，因結核菌成團生長的特性，不同於一般細菌均勻混濁生長，致濁度法測量難以由吸光值檢測其線性變化，無法準確推估培養液內實際的菌量。

本研究使用商用液態培養 (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【21】。

另外，考量商品化試劑及儀器設備成本因素，嘗試使用實驗室自行配製 7H9 液態培養基，應用 Resazurin microtiter assay (REMA) 方法，resazurin 為氧化還原指示劑，當結核菌生長時，因代謝生長活動，將 resazurin 還原為 resorufin，由肉眼判定則為由藍色的 resazurin 變為紅色的 resorufin。染劑還原量與結核菌生長量有關【30】。在 REMA 的方法學應用上，已可使用在抗結核藥物敏感性測試，試驗結果可使用肉眼判讀，亦可使用分光光度法精準測量呈色劑的還原百分比 (% reduction) 【31】。

本研究預期成果為瞭解藥物敏感性試驗方法學之可靠性，可能具有效治療 MDR 及 XDR 的新藥物，評估臨床適用性，提供處方設計參考；完成 MDR、XDR 及 TDR 結核病抗藥性監測；建立結核菌生長適應性標準實驗流程，成為可用以做為探討抗藥菌株抗藥性及傳播研究的實驗室工具，提供未知傳染源抗藥性新案調查及發展快速分子檢測工具的參考。

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：2008 至 2015 年共 63 株 XDR 結核菌，及 2014 至 2016 年 10 月期間之 MDR 菌株。
2. 品管菌株：H37Rv (ATCC® 27294™) 標準菌株。
3. 藥敏試驗盤：
 - (1) MYCOTB1 plate (Sensititre®) 如 0。
 - (2) Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ for *M. tuberculosis* 如表二。
 - (3) 瓊脂比例法藥物感受性試驗(agar proportion method, APM)培養基 (Sancordon Inc.)。
 - (4) 藥物協同作用縱橫交錯試驗(checkerbroad assay)，96 孔盤配製藥物之排列如表三。用以評估 clofazimine 及 bedaquiline 藥物協同作用依 fractional inhibitory concentration index (FICI) 進行計算【32-33】:
$$\text{FICI} = \frac{\text{MIC drug A combination}}{\text{MIC drug A alone}} + \frac{\text{MIC drug B combination}}{\text{MIC drug B alone}}$$
$$\text{FICI} \leq 0.5 \text{ 為藥物間有協同作用； } 0.5 < \text{FICI} \leq 2 \text{ 為無顯著效益； } \text{FICI} > 2 \text{ 為拮抗作用。}$$
4. 測試藥物品項: isoniazid, rifampin, ethambutol, streptomycin, moxifloxacin, levofloxacin, para-aminosalicylic acid, ethionamide, rifabutin, amikacin, kanamycin, capreomycin, cycloserine, bedaquiline, clofazimine 及 linezolid。

(二) 實驗方法

1. 藥物敏感性試驗

- (1) 最低抑菌濃度(MIC)藥物敏感性試驗
 - (a) 使用 MYCOTB1 plate (Sensititre®) 操作步驟：
 - (i) 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 $100 \mu\text{L}$ 菌液入 MYCOTB1 plate，同時接種至 Sheep blood agar(BD®) 做無菌測試。

- (ii) 接種完畢之 MYCOTB1 plate 用塑膠袋封好，置入 35-37°C 溫箱培養。
- (iii) 培養 7-21 天後，觀察不含藥控制組生長至少 2 倍，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徹判定為敏感，最低的藥物敏感濃度即為最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)。
- (iv) 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。

(b) 使用 Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ for *M. tuberculosis* 操作步驟：

- (i) 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 1 菌液，製備 5×10^7 CFU/mL 菌液；取 $255 \mu\text{L}$ 菌液加入 12.5mL 無菌蒸餾水，稀釋後的菌液取 $100 \mu\text{L}$ 接種 Jenssen plate，相當於將 MacFarland 1 菌液稀釋 50 倍，製備 1×10^6 CFU/mL 濃度的菌液。同時接種至 Sheep blood agar (BD®)做無菌測試。接種菌液再繼續連續稀釋至 10^{-5} 菌液，接種至 Middlebrook 7H11 瓊脂平板培養基做接種菌液之菌落計數(colony count)，接種量需固定，以免影響測試結果。
- (ii) 接種完畢之 Jenssen plate 用塑膠袋封好，置入 35-37°C 溫箱培養。
- (iii) 培養 7-14 天後，觀察不含藥控制組生長至少 2 倍，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徹判定為敏感，最低的藥物敏感濃度即為最低抑菌濃度(MIC)。
- (iv) 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。菌落計數之 Middlebrook 7H11 瓊脂平板培養基置入 35-37°C 溫箱中培養約 14 天，待單一菌落生長至肉眼可觀察及單一菌落間生長未融合前，以解剖顯微鏡輔助觀察菌落型態及菌落計數。

(c) 使用藥物與藥物交互作用棋盤格(Checkerboard) 操作步驟：

XDR 菌株次培養於 7H9 培養液，待菌液濁度大於 McFarland 1.0 後，

以玻璃珠強力震盪 1 分鐘，靜置 30 分鐘待較大菌塊沉澱，上清以液以生理食鹽水調整菌液濁度為 McFarland 1.0，濁度計量測。取 McFarland 1.0 菌液，以 7H9 培養液稀釋 10 倍，稀釋菌液接種至 96 孔盤，每一小孔接種 $100 \mu\text{L}$ 。96 孔盤置 $35\text{-}37^\circ\text{C}$ 溫箱培養 7-10 天，以解剖顯微鏡觀察，待不含藥生長控制組生長至 2 儘，每一小孔加入 $30 \mu\text{L}$ 0.02% resazurin，再放回溫箱培養，待 48 小時後，取出 96 孔盤，以肉眼觀察顏色變化，藍色為未生長，紅色為生長。

(2) 瓊脂比例法藥物感受性試驗(Agar proportion method, APM)

(a) 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。

(b) 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。

(c) 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_2 可通透的塑膠袋中，於 $35\text{-}37^\circ\text{C}$ 之 5-10% CO_2 恒溫培養箱中靜置培養 21 天。

(d) 結果判讀為每四分格生長的量記錄如下： >500 菌落 4+、 $200\text{-}500$ 菌落 3+、 $100\text{-}200$ 菌落 2+、 $50\text{-}100$ 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】。

2. 結核菌生長適應性試驗

(1) 自行配製之 96 孔呈色法(Resazurin microtiter assay)藥敏試驗盤

應用 Resazurin 呈色法進行生長適應性分析，使用分光光度法

(spectrophotometry)判讀【35】(型號 ELx808, BioTek Instruments, Inc.)，取代以肉眼觀察估計藥敏盤的顏色深淺關係之比色法。結核菌株接種至 7H11 瓊脂平版培養基，培養 21 天後，括取菌落至 7H9 培養液，以玻璃珠震盪 1 分鐘，靜置 30 分鐘待較大菌塊沉澱，上清液以生理食鹽水稀釋，使用濁度計調整菌液至 McFarland 0.5，以 7H9 培養液 10 倍稀釋菌液為 10^{-1} ，取 4 mL 10^{-1} 菌液至含 4mL 7H9 培養液的離心管進行培養，實驗進行 3 次重覆。培養 48 小時後，添加 0.02% Resazurin 1.2 mL 至培養離心管。每隔 24 小時，離心管以 20°C 溫控離心 3000g、15 分鐘，取 50 μ L 上清液至 96 孔盤，以分光光度計讀取吸光值，分別使用 OD 570 nm 及 OD 600 nm，OD 值輸出至儀器配置之 Gen5 Microplate Reader and Imager Software，以 Excel 檔案型式儲存，還原百分比以 Excel 軟體套入公式計算【38】。

(2) MGIT tube 培養法【35】：

與 Resazurin 呈色法相同的 McFarland 0.5 菌液，以 7H9 培養液 10 倍稀釋菌液為 10^{-1} ，取 100 μ L 的 10^{-1} 菌液接種至 MGITTM 培養管，實驗進行 3 次重覆，BD EpiCenterTM 軟體紀錄每小時生長單位(Growth units, GU)。生長遲滯期(lag phase)定義為開始培養至 > 0 GU 的時間長度，生長速率定義為由 5,000 GU 生長至 10,000 GU 的時間長度。時間長度以小時為記錄單位。量測吸光值與培養天數的線性關係變化，建立標準菌株 H37Rv 生長曲線。藉由 lag phase 的長短及生長速率，估計結核菌生長適應性【35】。

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) 數據及統計分析

分析流行病學上該藥物可抑制野生株生長的最高濃度(Epidemiological breakpoints or Epidemiological cutoff, ECOFF)值。比較血液濃度中的最高值血峰濃度(Maximum Concentration, C_{max})值，若此濃度太高的話發生藥物副作用的機率也會增高。此外，利用 excel 進行計算及圖表分析製作。藉由 Kappa 值計算最適一致性【36】，以訂定最低抑菌濃度臨界值。

三、結果

(一) 測試菌株之抗藥性

已完成 173 株 MDR 結核菌株分析，其中含 2014 年 8 株(全年 120 株)，2015 年 92 株(全年 120 株)及 2016 年 73 株(全年截至 10/30 日，99 株)。此 173 株依比例法藥物敏感試驗，各藥物抗藥比率如圖一。一線藥敏結果由臨床認可實驗室測試，二線藥敏結果則由本實驗室常規測試。由圖一得知，MDR *Mycobacterium tuberculosis* 菌株對藥物之抗藥性比率高：rifabutin (88.0%)、ethambutol (48.0%)、streptomycin (42.3%) 及 pyrazinamide (32%)。Rrifampin 與 rifabutin 的交互抗藥性為 88%。

(二) 最低抑菌濃度(MIC)藥物敏感性試驗方法進行定量藥物之抗藥程度

本研究執行之定量藥敏測試，係同時使用 MYCOTBI plate 商用及 Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ 客製化藥敏盤，藥物定量結果依 Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ 結果進行研究分析；而 Janssen 藥敏盤未包含的測試藥物 ethionamide、rifabutin、para-aminosalicylic acid 及 cycloserine，則以 MYCOTBI plate 結果列入分析。

依定量結果，將菌株抗藥程度分類(表四)。藥物測試濃度梯度係以微量滴定法 2 倍階梯稀釋，共測試一及二線藥物計 15 品項，各測試 7-10 個濃度梯度。由 173 株 MDR 菌株之抗藥程度分類統計表中得知，僅有 2 株對 cycloserine 具抗藥性；依 linezolid 臨界濃度判定，則無抗藥菌株【17】；而 bedaquiline 及 clofazimine 為新藥，抑菌濃度低，亦皆無抗藥菌株，所以未進行抗藥程度分類。其他各藥物分別有不同程度的抗藥分布，如：isoniazid 及 rifampin 其抗藥程度各分別集中在中程度抗藥(Intermediate-level resistance)及高程度抗藥(High-level resistance)。ethionamide、rifabutin 及 capreomycin 則僅有中、低程度抗藥。kanamycin 為低、中、高程度抗藥及 amikacin 為中、高程度抗藥。levofloxacin 及 moxifloxacin 抗藥程度分別在低、中及高程度抗藥。

由完成的 7 種藥物最低抑菌濃度 MIC 分布範圍測定及標準瓊脂比例法 APM 之定性藥敏結果，比較 2 種方法學一致性，藉由最佳 Kappa 值計算結果而訂定最

低抑菌濃度 MIC 的臨界值(Cut-off) (表六)。圖二顯示抑菌濃度分布範圍，並標示 cutoff 值、intermediate 區域、 C_{max} 值或 ECOFF 值。

Linezolid 及 clofazimine 結果顯示該藥物在臨床一般處方劑量下，可達到的最高血清濃度(C_{max})。圖二(a)二線藥針劑類 capreomycin、kanamycin 及 amikacin 其臨界值均遠低於最高血清濃度 C_{max} ；capreomycin 及 kanamycin 經排除中間值(intermediate)菌株後，如表六 kappa 值計算結果，顯示與定性法的標準瓊脂比例法結果比較，藥敏結果一致率分別可達到 100% 及 94%。Amikacin 的最低抑菌濃度分布範圍中，與定性瓊脂比例法 APM 結果比較，可明確區分抗藥及敏感 2 類，kappa 值為 100%，在臨界 cut-off 值 $4 \mu\text{g/mL}$ 與高程度抗藥 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 間，173 株 MDR 測試菌株均未落在此中間值 $8 \mu\text{g/mL}$ 濃度。圖二(b)fluoroquinolone 類 moxifloxacin 及 levofloxacin 中，moxifloxacin 在定性瓊脂比例法 APM 判為抗藥株的最低抑菌濃度可達到 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ，高於最高血清濃度 $3.1 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ 。若依 WHO 建議之藥敏測試臨界濃度【17】，moxifloxacin 測試濃為度 0.5 及 $2 \mu\text{g/mL}$ ，經 kappa 值計算，介於 $0.5-2 \mu\text{g/mL}$ 為中間值。而 levofloxacin 測試 6 個階梯稀釋濃度，均低於最高血清濃度。圖二(c)ethionamide 及 ethambutol 最低抑菌濃度 MIC 分布範圍，在定性瓊脂法 APM 分類的抗藥及敏感菌株中，ethionamide 抗藥株的最低抑菌濃度 MIC 從定量法最低測試濃度 $\leq 0.3 \mu\text{g/mL}$ 至最高測試濃度 $\geq 40 \mu\text{g/mL}$ 均有分布，敏感株抑菌濃度分布範圍則從 $\leq 0.3 \mu\text{g/mL}$ 至 $20 \mu\text{g/mL}$ ；依 kappa 值計算結果，臨界值 $2.5 \mu\text{g/mL}$ ，低於最高血清濃度 $2.16 \mu\text{g/mL}$ 。而 ethambutol 中間值依 kappa 值計算結果為 $2-4 \mu\text{g/mL}$ ，中間值 $4 \mu\text{g/mL}$ 與最高血清濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ 非常接近。圖二(d) linezolid、clofazimine 及 bedaquiline 均為敏感株，圖中標示 ECOFF 最低抑菌濃度值，在 linezolid 的 ECOFF 值 $2 \mu\text{g/mL}$ 低於最高血清濃度，但是 clofazimine 的 ECOFF 值 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 高於最高血清濃度 $0.145 \mu\text{g/mL}$ 。而由於新藥 bedaquiline 尚無最高血清濃度(C_{max})研究數據供參；本研究使用固態 24 孔盤培養基及液態 96 孔盤培養基測定，發現其抑菌濃度分布範圍，在液態培養基抑菌濃度分布範圍中， $0.03 \mu\text{g/mL}$ (39.9%) 及 $0.06 \mu\text{g/mL}$ (30.6%) 佔最多百分比；固態培養基抑菌濃度分布範圍中， $0.06 \mu\text{g/mL}$ (39.4%) 及 $0.12 \mu\text{g/mL}$ (36.8%) 佔最多百分比；液態及固態培養基抑菌分布相差僅 1 個階梯的藥物稀釋濃度，可供制定相關指標及標準化參考。

圖三圖三係依標準定性 APM 培養法，將定性藥敏結果分為抗藥及敏感 2 類。顯示在標準 APM 定性藥敏結果的分類基準下，定量藥敏結果微量滴定法其抑菌濃度隨著 2 倍階梯稀釋的遞減。各抑菌濃度分別對敏感株及抗藥株的菌株數目累積之百分比，佐以依 Kapp 值訂定的臨界值結果，以藍色雙箭頭標示及註記各藥物在臨界值時，能正確區分敏感株及抗藥株的百分比。圖三圖三(a) 二線藥針劑類 capreomycin、kanamycin 及 amikacin，由累積百分比結果顯示，藉由定量臨界值，區分抗藥或敏感株與定性 APM 藥敏試驗的一致率均大於 90%：在 capreomycin 為 90.9%、kanamycin 為 90.3% 及 amikacin 為 100%；圖三(b) moxifloxacin 及 levofloxacin，定量法臨界值區分抗藥或敏感株與定性 APM 藥敏試驗的一致率：在 moxifloxacin 為 86.3% 及 levofloxacin 為 89.1%；圖三(c) ethionamide 及 ethambutol 藉由定量臨界值，區分抗藥或敏感株與定性 APM 藥敏試驗的一致率：在 ethionamide 僅可區分 60.4% 的菌株，ethambutol 可區分 74.2% 的菌株。

表五 列出原以標準定性 APM 藥敏試驗檢測各藥物判為敏感的菌株，使用微量滴定法藥敏試驗之藥物效力分析，統計 MIC₉₀ 及 MIC₅₀ 值。isoniazid 及 rifampin 均為抗藥株，未進行 MIC₉₀ 及 MIC₅₀ 判定。rifabutin、levofloxacin、kanamycin、amikacin、capreomycin 及 linezolid 的 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 值相同；para-aminosalicylic acid、kanamycin、moxifloxacin 及 clofazimine 的 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 值相差 1 個階梯的藥物稀釋濃度，而 ethionamide 及 bedaquiline 相差 2 個階梯的藥物稀釋濃度，cycloserine 的 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 值則相差 3 個階梯的藥物稀釋濃度。使用 Janssen Custom Panel 的藥物 kanamycin、amikacin、capreomycin、levofloxacin、moxifloxacin、linezolid、bedaquiline 及 clofazimine 抑菌濃度分布範圍在 3-5 個階梯稀釋；使用 MYCOTB₁ plate 則 ethionamide、rifabutin、para-aminosalicylic acid 及 cycloserine 抑菌濃度分布範圍在 1-7 個階梯稀釋。細部的 MIC 分析，可供設計個人化治療藥方調劑參考。

(三) 分析第 5 類藥物 Clofazamine 及 bedaquiline 合併測試之藥物與藥物交互作用 (Drug-Drug Interactions, DDIs)

結果如表九，測試 2008 至 2015 年共 63 株 XDR 結核菌，發現在 clofazamine

及 bedaquiline 藥物與藥物交互作用，藥物效力顯示此二種藥物兩者互相不干擾。在藥物合併作用下，各自藥物對結核菌的藥物效力比單獨使用時的最低抑菌濃度(MICs)值雖有 1-128 倍的下降，仍尚未達到協同作用(Synergy, FICI ≤0.5)，但也不會造成拮抗作用(Antagonism, FICI >2)結果。

(四) 結核菌生長適應性試驗

先以 Resazurin microtiter assay 呈色法測定標準菌株(H37Rv, ATCC® 27294™)標準生長曲線如圖四。後續選取臨床 1 株 Simple MDR 菌株、1 株 pre-XDR-FLQ、1 株 pre-XDR-SLID 及 1 株 XDR 菌株及標準菌株 H37Rv，臨床菌株各藥物感受性型態如表七，以呈色法連續培養 23 天之吸光值結果如圖五藍色曲線，MGIT GU 值如圖五橘色曲線。呈色法在培養 23 天後，雖然由吸光值計算還原百分比數值隨培養天數持續攀升，但肉眼判定呈色仍為藍色，顯示培養液內的結核菌可能未生長或生長量少，少量代謝活動無法使培養液明顯由藍色變為紅色，因此未進行呈色法 lag phase 及生長速率的計算。僅以 5 株菌株 MGIT GU 值計算生長遲滯期時間及生長速率如表八。在 MGIT 培養管生長結果顯示，標準菌株 H37Rv 及 simple MDR 菌株的遲滯期(Lag phase)最短為 75 小時，XDR (1503-54)最長 196 小時。但是在生長速率上，標準菌株 27 小時，simple MDR 及 1 株 XDR 菌株最短 20 小時，lag phase 最長的 XDR (1503-54)的生長速率為 31 小時，與 XDR 編號 1503-93 的 30 小時及 H37Rv 的 27 小時相比，並未如同遲滯期有顯著時間長度的差異。此結果佐證二線藥物抗藥性對菌株生長之影響，可供後續探討以瞭解抗藥性菌株可能之傳播力之分子機制。

四、討論

探討現行傳統標準結核菌藥物敏感性 APM 試驗方法學結果之可靠性；評估定量法提高藥敏結果的正確性及改善判讀方式；評估藥物的藥物間交互作用結果，並建立結核菌生長適應性標準實驗流程，以提供後續菌株傳播力等分子層面之研究。

(一) 最低抑菌濃度(MIC)藥物敏感性試驗方法定量藥物抗藥性

將藥物感受性定量結果與標準 APM 藥敏試驗定性結果，經由 Kappa 值計算一致性以訂定出臨界值(cut-off)。藉由臨界值，也可得到該菌株對該藥物為抗藥或敏感的定性結果。定性結果可作為各藥物抗藥病患數量的監測，但定量結果可將抗藥程度細分類，可提供臨床用藥處方調整。後續將進一步分析或歸納各種藥物抗藥程度菌株的對應基因突變位點，以研究結核菌產生抗藥的機制。

本研究以最低抑菌濃度(MIC)法，進行定量藥物敏感性試驗，並藉由 ECOFF 值、文獻資料【14-20】及傳統 APM 藥敏試驗臨界濃度【34】分析，將 MDR 菌株的抗藥程度分成 3 類，低、中及高程度：高程度抗藥 MDR-TB 不適用於繼續使用該藥物治療，低及中程度抗藥則可藉由劑量調整，使 MDR-TB 病患有更多種類的藥物選擇，以提高治療效果及照護品質【39-40】。當各藥物的定性 APM 檢測結果為抗藥時，由其相對定量之抑菌濃度分布範圍結果得知：圖二(c) ethionamide，抑菌濃度分布從最低 ≤ 0.3 至最高 $\geq 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；但在定性 APM 結果為敏感時，其定量抑菌濃度分布範圍，則從最低 ≤ 0.3 至最高 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；圖二(c) ethambutol 在定性 APM 藥敏試驗結果分類為抗藥的菌株，其最低抑菌濃度範圍含有 5 個連續 2 倍稀釋濃度。此結果說明，現行使用定性試驗方法以臨界濃度將藥敏結果一分為二，區分抗藥或敏感方法學的限制性。也因此緣故使 ethionamide 及 ethambutol 藥敏結果之再現性並不穩定。在二線藥針劑及 fluoroquinolone 類藥物，除了 amikacin 可藉由臨界濃度將抗藥及敏感明確區分外，其餘藥物在定性 APM 藥敏試驗結果分類為抗藥的菌株中，其最低抑菌濃度範圍 1-3 個階梯稀釋範圍，同樣會造成以臨界濃度區分抗藥或敏感結果的再現性不佳。由圖二及圖三圖三可知不同病患結核菌株雖依定性 APM 藥敏試驗結果歸為抗藥性，但不同病患菌株之藥物最低抑菌濃度為連續性分布，而不是落在一個固定的抑菌濃度內。因此，在定性 APM 藥敏結果區分下，不同病患的菌株雖判為抗藥株及敏感株，但實際

上的抑菌濃度值各不相同。在現今全球抗藥情形盛行及有限可用於治療的藥物種類等現實情況下，定性結果未能提供該藥物對該菌株的實際抑菌濃度，亦即抗藥程度。因此，臨床醫師若可藉由藥物動力學的數據，合併參考該藥物的實際抑菌濃度及程度，將用藥劑量進行微調，可使病患有機會得以繼續使用該藥物，將獲得個人化的更好的治療效果。

此外，證實菌株於同類藥物不一定有相同的抗藥程度，定量最低抑菌濃度 MIC 結果顯示，kanamycin 高程度抗藥(8-16 μ g/mL)，但 amikacin 及 capreomycin 為低程度抗藥。Isoniazid 及 rifampin 皆抗藥的 173 株 MDR 菌株中，有 143 (82.7%) 株在 ethionamide 為低程度抗藥，而有 148 (85.5%) 株在 rifabutin 為低程度抗藥。定量結果可提供臨床醫師選擇同類藥物的其他藥物選項，同類藥物卻不同抗藥程度時，可供進一步探討其基因突變位點的異同。

再者，同類藥物間的藥物效力比較發現：kanamycin 的 MIC50 及 MIC90 抑菌濃度值比 amikacin 的 MIC50 及 MIC90 分別高 1 階梯及 4 階梯稀釋倍數，以 MIC50 及 MIC90 呈現的藥物效力顯示，amikacin 藥物效力比 kanamycin 好。Levofloxacin 的 MIC50 及 MIC90 抑菌濃度值比 moxifloxacin 的 MIC50 及 MIC90 分別高 3 階梯及 1 階梯稀釋倍數，以 MIC50 及 MIC90 呈現的藥物效力顯示，moxifloxacin 藥物效力比 levofloxacin 好。MIC90 是指能抑制 90% 菌株生長的最低抑菌濃度，與 WHO 訂定的 MGIT 液態藥敏臨界濃度比較【17】，由表五 amikacin 的 MIC90 與液態藥敏臨界濃度相同為 1 μ g/mL，para-aminosalicylic acid 的 MIC90 與液態藥敏臨界濃度相差 4 個階梯稀釋，其他藥物的 MIC90，與液態藥敏臨界濃度非常接近或相差僅 1 個階梯稀釋，而 2 倍階梯稀釋最低抑菌濃度方法學上，高或低 1 個階梯稀釋一般認定為無差異，與液態藥敏臨界濃度非常接近或相差僅 1 個階梯稀釋。因此，是造成二線藥敏結果再現性差的原因之一【20】；及二線藥物的定性標準藥敏試驗，僅以單一臨界濃度作為判定抗藥或敏感之基準【18, 34】，是方法學上的限制性。

雖然，目前全球公認的標準方法仍為定性藥敏試驗。本研究進一步由 Kappa 值的應用分析，比較定性及定量藥敏試驗方法判讀結果的一致性。由表六 及圖二抑菌濃度分布範圍的結果顯示，實際存在有抗藥株及敏感株共存的濃度範圍分布，但是缺乏可以將抗藥及敏感一分為二的明確抑菌濃度界線。而定量藥敏結果的抑菌濃度，由高及低程度的落點，更準確預測該菌株對該藥物為抗藥或敏感。

但是抑菌濃度落在中間值的菌株，若僅使用定性藥敏試驗可能無法準確預測該藥物使用於該病患的治療結果。

(二)由藥物與藥物交互作用(Drug-Drug Interactions, DDIs) 分析發現，clofazimine 及 bedaquiline 合併測試，顯示 CFZ 可適用於與 BDQ 組合，使用於 XDR 或有特殊治療需求結核病人處方設計。由於結核病採用複方，體外單一藥物之測試可能無法真實呈現體內藥物間之作用及真正有效濃度。因此，若先排除已知同類或不同類藥物間交互抗藥性，可思考建立棋盤式檢測法，甚至雖然已知對一線有效藥物具抗藥性，能有逆轉為敏感或明顯降低 MIC，則可提供更多可能參考用藥組合。

(三) 抗藥菌株生長繁殖適應性(fitness)的實驗數據。應用精準測量分光光度法(spectrophotometry)，提升方法學的準確性、可信度及實驗再現性。本研究結果顯示，在培養第二天即加入呈色劑 Resazurin，是否因呈色劑對結核菌生長有抑制作用，導致培養 23 天仍未變色，根據文獻顯示，resazurin 對引起兔熱病的土倫病法蘭西斯氏菌 (*Francisella tularensis*) 具有殺菌力【37】。雖然文獻 Von Groll A 等【35】，使用之方法可得到結核菌生長適應性結果，本研究因考量使用分光光度計測量呈色吸光值變化，為避免因結核菌生長使待測液混濁且不均勻，影響吸光值的準確讀值，因此改用 15mL 離心管。取代如文獻使用的 96 孔盤，以便在使用分光光度計測試前，先將培養液離心後，取上清液進行 OD 讀值，在實驗器材的選用上，不同於文獻建議。此法相對為生物危害高風險且不易標準化。但 MGIT 法較易標準化且檢測敏感度優於呈色法。本研究亦證實生長適應性試驗結果顯示，遲滯期(lag phase)與二線藥抗藥型態有關。由表七 菌株藥物感受性型態比較，在全敏感的標準菌株及對二線藥全敏感的 simple MDR 菌株，其遲滯期最短，同為 75 小時。然而，編號 1503-93 XDR 菌株也是 75 小時，由其抗藥型態顯示，fluoroquinolone 藥物全抗藥，但是 3 種二線藥針劑中，僅 capreomycin 抗藥，另二種針劑 kanamycin 及 amikacin 全敏感。編號 1202-152 XDR 菌株遲滯期則稍長，為 85 小時，由其抗藥型態顯示，藥物的 moxifloxacin 抗藥，但是 levofloxacin 敏感，而 3 種二線藥針劑中，僅 kanamycin 抗藥，另二種針劑 capreomycin 及 amikacin 全敏感。最長遲滯期 196 小時 XDR (1503-54) 菌株，此菌株抗藥型態則為 fluoroquinolone 類及 3 種二線藥針劑全抗藥。

由生長適應性結果顯示，遲滯期與二線藥抗藥型態有關。進一步的研究需搜尋證實為聚集感染的結核菌株，進行生長適應性及特定藥物突變位點測試，從而全面了解抗藥菌株傳播能力。本研究第一年結果初步建立以商用 MGIT™ 培養管進行生長適應性測試標準方法，是否在結核菌一旦進入遲滯期，其抗藥型態對生長速率則相對較少有關係，需進一步選取較多的不同抗藥型態及不同突變位點的菌株，由其生長適應性結果做更進一步的探討。

五、 結論與建議

1. 藥物感受性試驗方法學建議增加中間值(Intermediate)，以提高 MICs 法與瓊脂法的一致率。根據文獻資料顯示，導致定性藥物敏感性試驗不同方法間不一致結果原因，主要來自與其菌株 MICs 值落在敏感及抗藥之區間的 MICs 值。因此，將進一步分析及探討藥敏結果為中間值的菌株，其與分子檢驗突變位點的關聯性。
2. 成功的藉由最低抑菌濃度藥物敏感性試驗建立 ECOFF 流行病學資料庫，探討藥敏試驗方法臨界濃度、臨界比例及方法學的限制性。
3. 由藥物與藥物交互作用分析發現，clofazimine 及 bedaquiline 合併測試，顯示 CFZ 可適用於與 BDQ 組合，使用於 XDR 或有特殊治療需求結核病人處方設計。藥物與藥物交互作用棋盤格，探討藥物組合的最低抑菌濃度分布及合併用藥的可行性。
4. 由生長適應性結果顯示，遲滯期與二線藥抗藥型態有關。結核菌生長適應性試驗探討抗藥性菌株的生長速率差異，方法學建立以提供結核菌傳播機制的研究工具。期望藉由實驗室研究，建立及改善適用於臨床醫療的實驗室診斷方法，落實於臨床醫學研究，提供診斷指標準確度及方法學之可靠性。

六、計畫重要研究成果及具體建議

(一) 重要研究成果：

1. 建立本土MDR菌株epidemiological cut-off (ECOFF)流行病學資料庫。含抗結核藥物之最低抑菌濃度分布及藥物效力。
2. 合併使用bedaquiline與clofazimine，藥物效力互相不干擾。並建立藥物合併使用之標準操作流程。結果已發表於國際研討會。
3. 建立定量藥敏方法學及臨界濃度，並以實驗結果說明現有標準定性藥敏方法學的限制性。結果納入本署例行MDR菌株檢測服務。
4. 建立結核菌生長適應性試驗標準流程，作為研究結核菌傳播機制的實驗室工具。結果所確定之菌株將進行全基因體序列分析。

(二) 具體建議

1. 藥物感受性試驗方法學建議增加中間值(Intermediate)，以更加準確預測病患使用該藥物的藥物效力。
2. 應用藥敏試驗定量結果，提供臨床醫師設計抗藥病患的個人化處方。
3. 應用ECOFF流行病學資料庫，長期監測現有藥物效力對抗藥菌株的效力變化。
4. 應用結核菌生長適應性試驗，建立本土抗藥菌株傳播機制。
5. 應用藥物合併使用之標準操作流程，進一步研究第4及第5類藥物的效力及適用性。

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. World Health Organization 2008. World Health Organization Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO/HTM/TB/2008.392. World Health Organization, Geneva, Switzerland:
http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTM_TB_2008.392_eng.pdf Accessed 25 February 2012
10. Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M (2002) Quality assurance

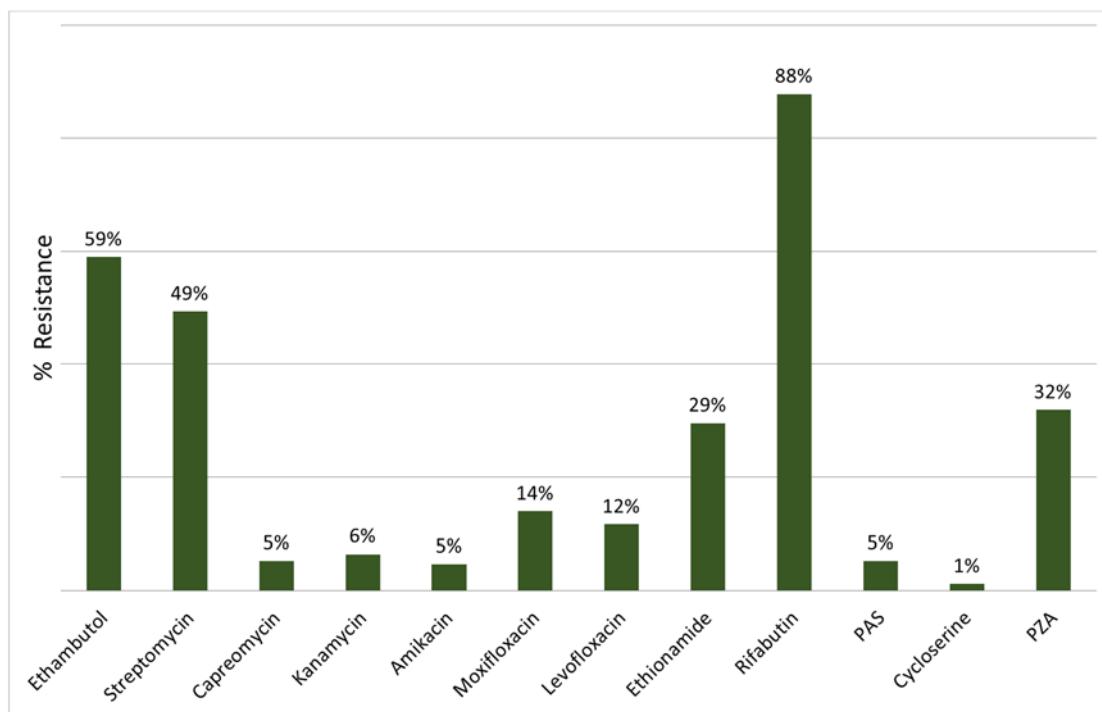
- programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994–1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 748–756.
11. Kim S-J. Drug susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability 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. Schon T, Jureen P, Chryssanthou E, et al. Wild-type distributions of seven oral second-line drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:502-9.
 15. Angeby KA, Jureen P, Giske CG, et al. Wild-type MIC distributions of four fluoroquinolones active against *Mycobacterium tuberculosis* in relation to current critical concentrations and available pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:946-52.
 16. Bottger EC. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1128-34.
 17. WHO . Updated interim critical concentrations for first-line and second-line DST. World Health Organization; Geneva: 2012:
http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentration%20table_1st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf
 18. 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.
 19. 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.

20. Tuberculosis Volume 88, Issue 2, Pages 1-169 (March 2008) Handbook of Anti-Tuberculosis Agents
21. 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
22. S. Borrell, S. Gagneux Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* *Int J Tuberc Lung Dis*, 13 (2009), pp. 1456–1466
23. E.C. Bottger, M. Pletschette, D. Andersson Drug resistance and fitness in *Mycobacterium tuberculosis* infection *J Infect Dis*, 191 (2005), pp. 823–824
24. T.N. Buu, D. van Soolingen, M.N. Huyen, N.T. Lan, H.T. Quy, E.W. Tiemersma, K. Kremer, M.W. Borgdorff, F.G. Cobelens Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin: a population-based study *PLoS One*, 7 (2012), p. e42323
25. P. Bhatter, A. Chatterjee, D. D'Souza, M. Tolani, N. Mistry Estimating fitness by competition assays between drug susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* of predominant lineages in Mumbai, India *PLoS One*, 7 (2012), p. e33507
26. J.H. Lee, N.C. Ammerman, S. Nolan, D.E. Geiman, S. Lun, H. Guo, W.R. Bishai Isoniazid resistance without a loss of fitness in *Mycobacterium tuberculosis* *Nat Commun*, 3 (2012), p. 753
27. E. Rey-Jurado, G. Tudo, S. Borrell, F. Alcaide, P. Coll, M. Espanol, N. Martin-Casabona, V. Mick, M. Montemayor, R. Moure, M. Salvado, E. Vicente, J. Gonzalez-Martin Impaired fitness of *Mycobacterium tuberculosis* resistant isolates in a cell culture model of murine macrophages *J Antimicrob Chemother*, 66 (2011), pp. 2277–2280
28. N.R. Gandhi, P. Nunn, K. Dheda, H.S. Schaaf, M. Zignol, D. van Soolingen, P. Jensen, J. Bayona Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis *Lancet*, 375 (2010), pp. 1830–1843
29. Lambrecht R.S., Carriere J.F., Collins M.T. A model for analysing growth kinetics

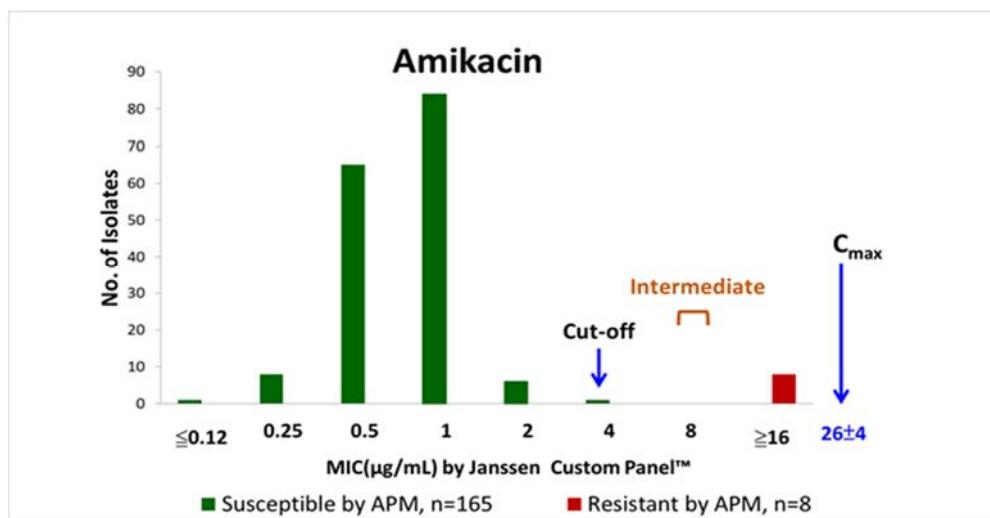
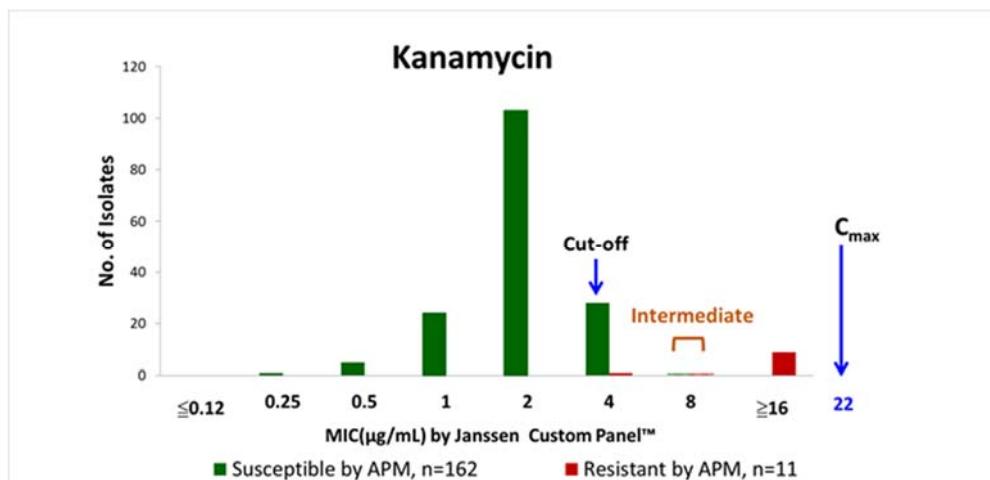
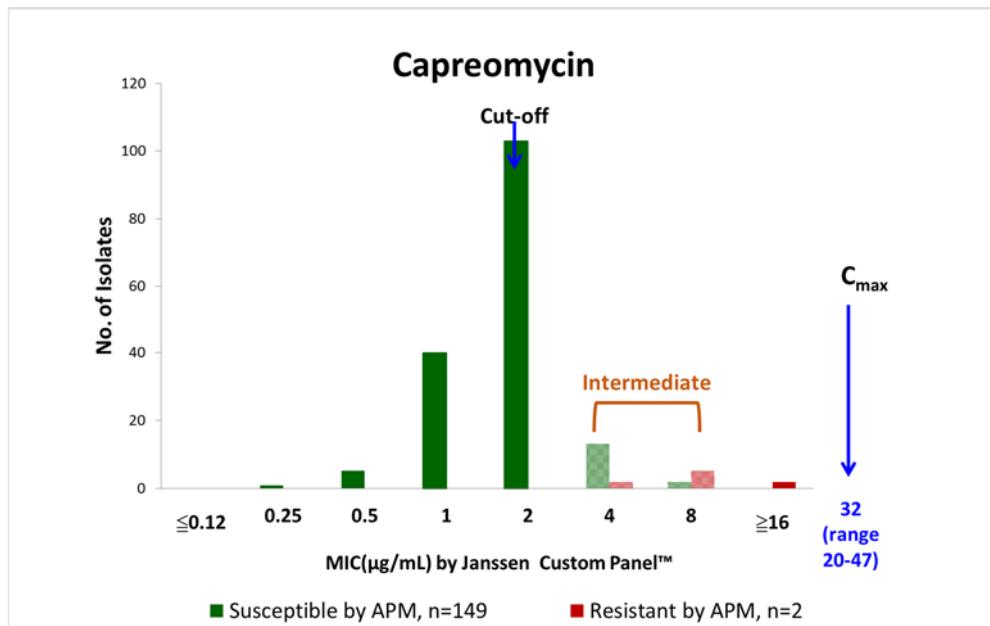
- of a Slowly growing mycobacterium sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988;54:910–916.
30. O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2000;267:5421–5426.
 31. Zrimsek P., Kunc J., Kosec M., Mrkun J. Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. *Int. J. Androl.* 2004;27:57–62.
 32. Zhang, Z., et al., In vitro synergistic activity of clofazimine and other antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 2015. 45(1): p. 71-5.
 33. Grosset, J.H., T.G. Singer, and W.R. Bishai, New drugs for the treatment of tuberculosis: hope and reality. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2012. 16(8): p. 1005-14.
 34. 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.
 35. Von Groll A, Martin A, Portaels F, Silva PEA, Palomino JC (2010) Growth kinetics of *Mycobacterium tuberculosis* measured by quantitative resazurin reduction assay: a tool for fitness studies. *Braz J Microbiol* 41:300-303.
 36. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*. 2012;22(3):276-282.
 37. Schmitt DM, O'Dee DM, Cowan BN, et al. The use of resazurin as a novel antimicrobial agent against *Francisella tularensis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013;3:93.
 38. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. 2007. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* 22:1304–1309.
 39. Katiyar SK, Bihari S, Prakash S, et al. A randomised controlled trial of high-dose isoniazid adjuvant therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:139-45.
 40. van Ingen J, Aarnoutse R, de Vries G, et al. Low-level rifampicin-resistant

Mycobacterium tuberculosis strains raise a new therapeutic challenge. Int J Tuberc Lung Dis 2011;15:990-2.

八、圖、表

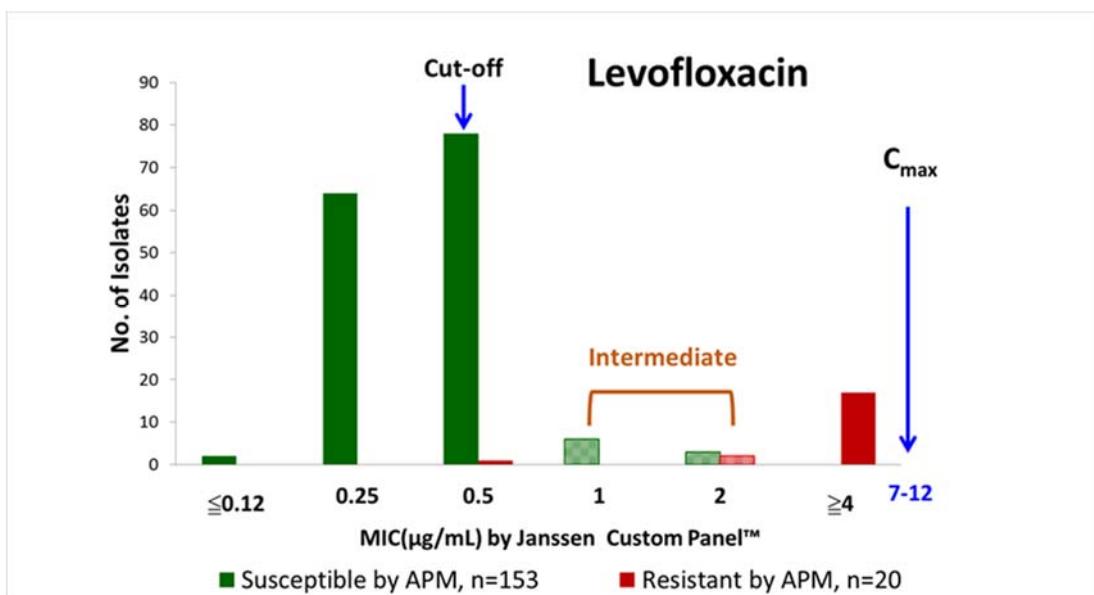
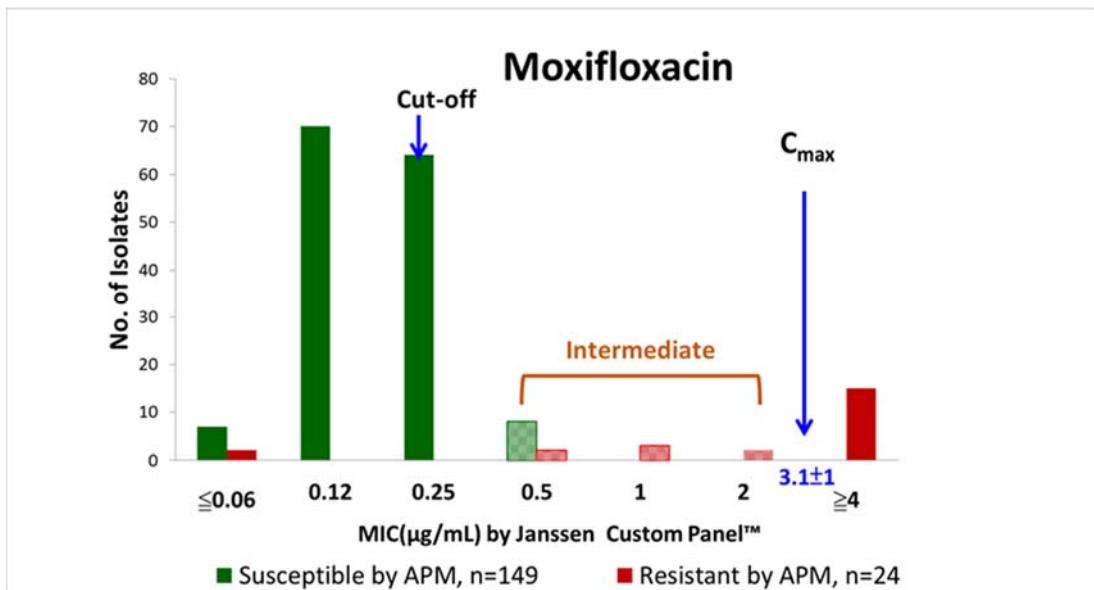


圖一 以比例法瓊脂藥物敏感試驗測試 173 株 MDR 結核菌株抗藥性分析



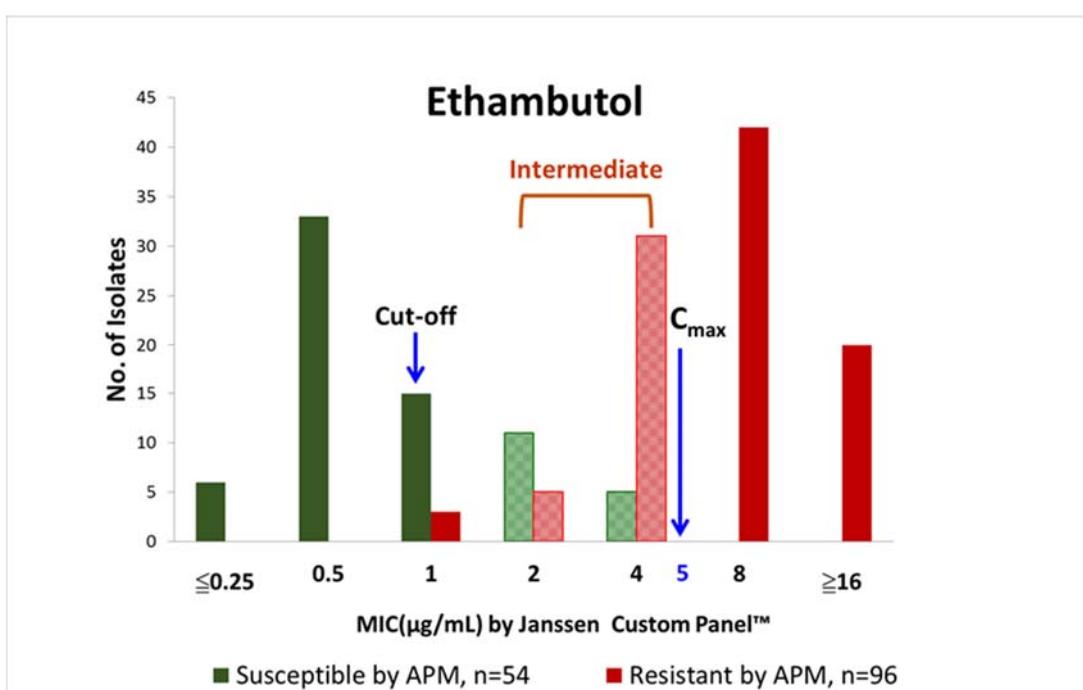
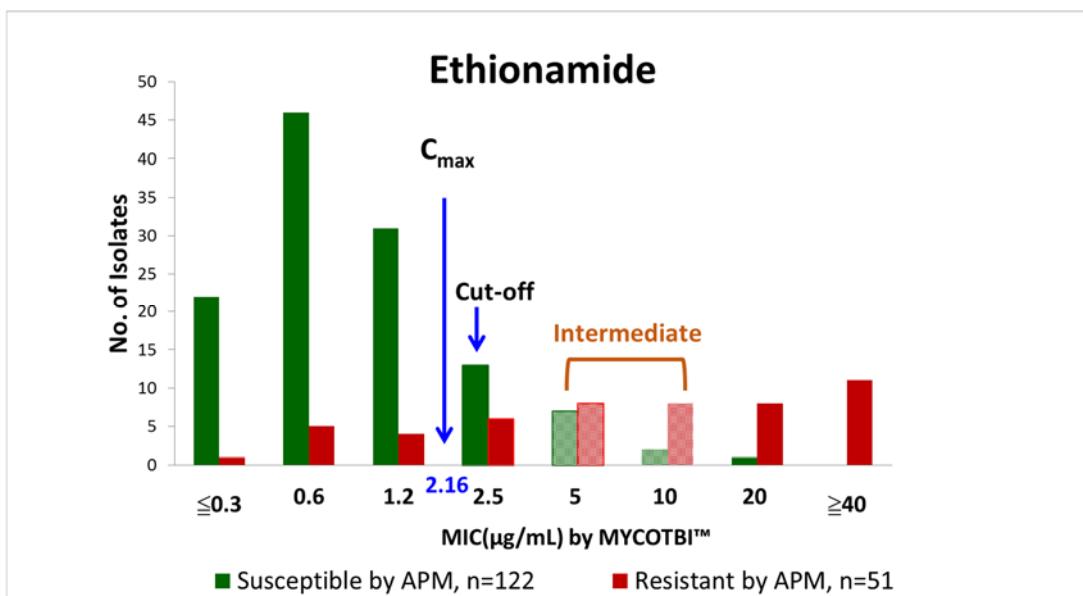
APM: agar proportion method

圖二 (a) capreomycin 、kanamycin 及 amikacin 最低抑菌濃度分布範圍



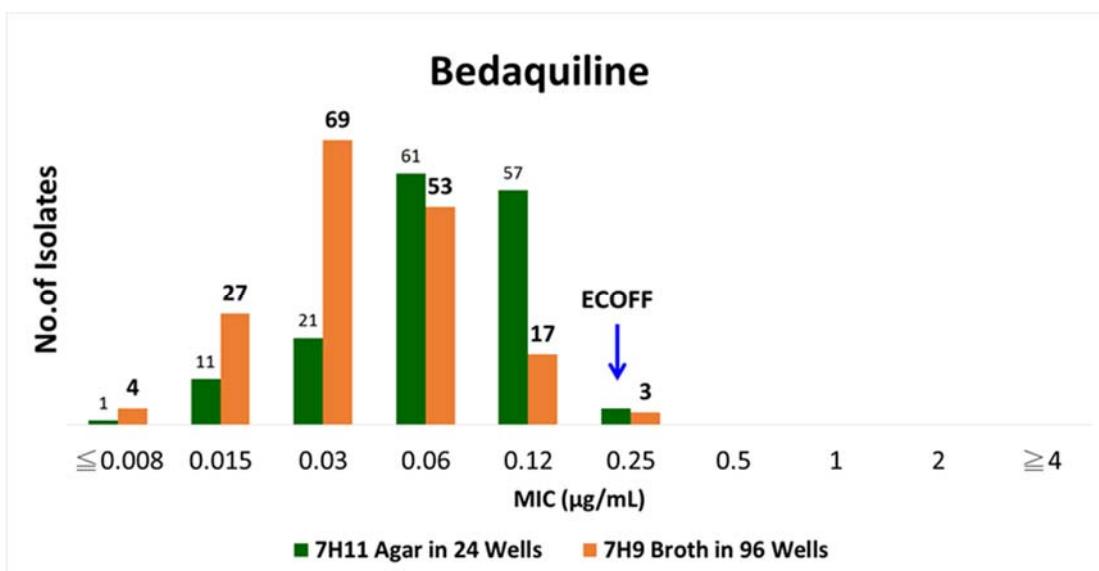
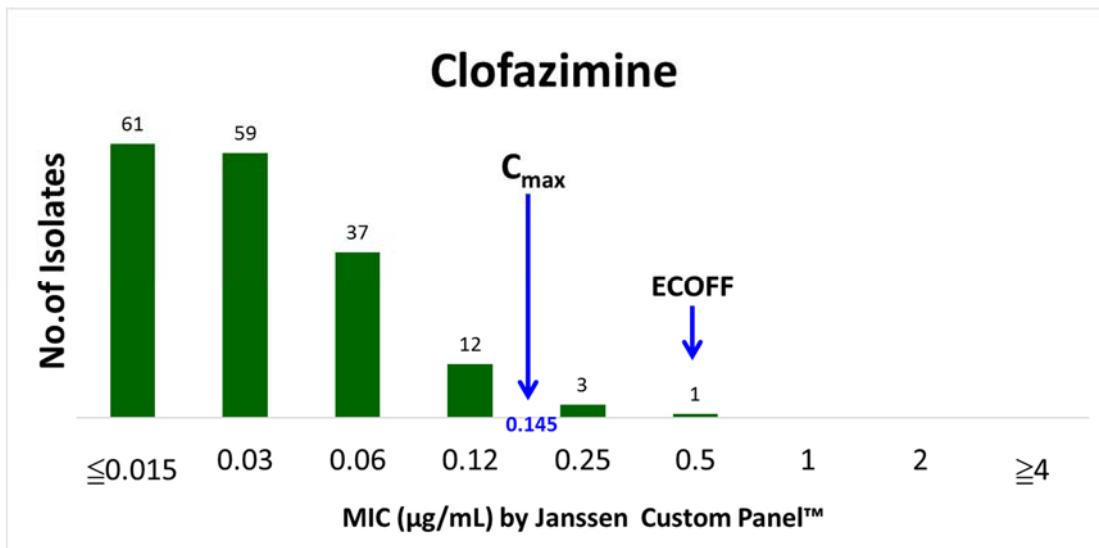
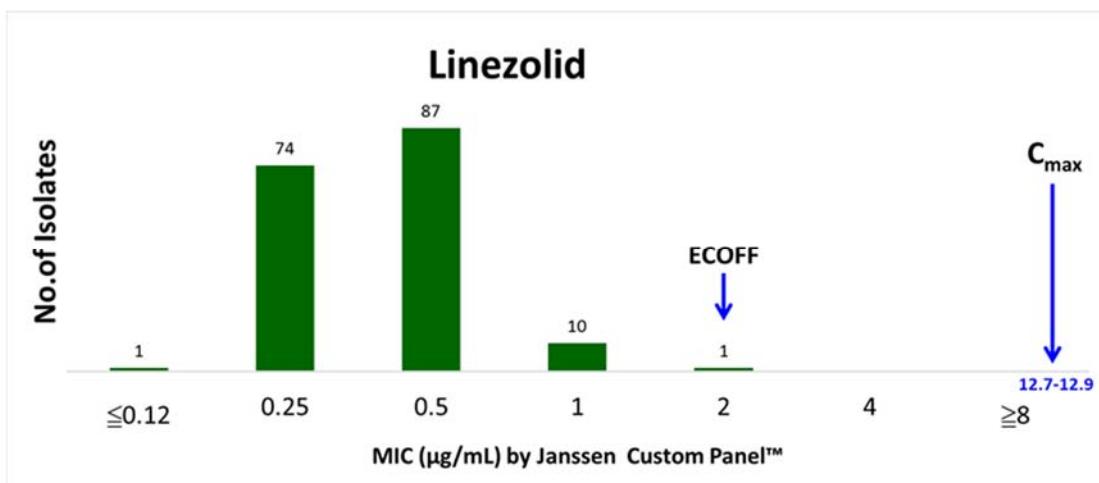
APM: agar proportion method

圖二 (b) moxifloxacin 及 levofloxacin 最低抑菌濃度分布範圍

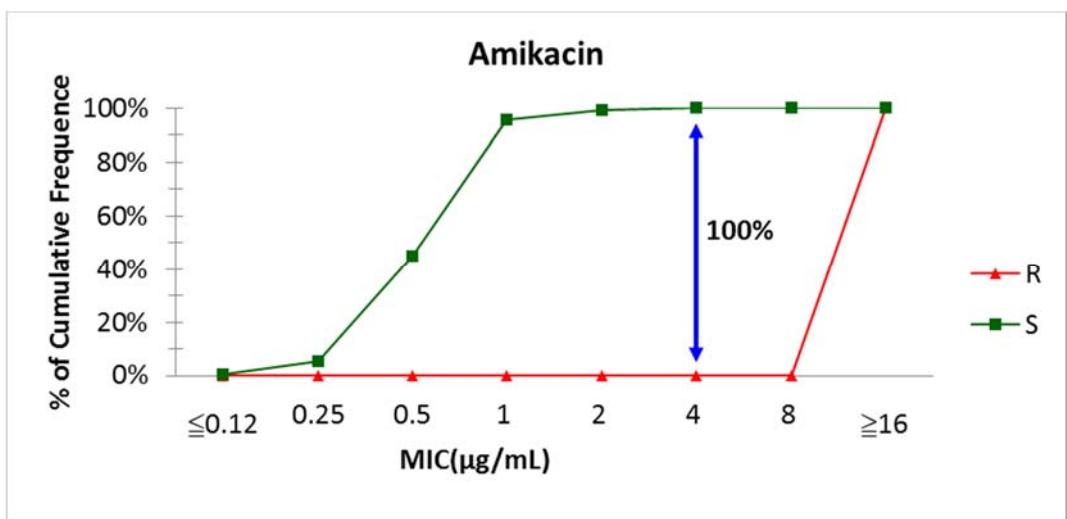
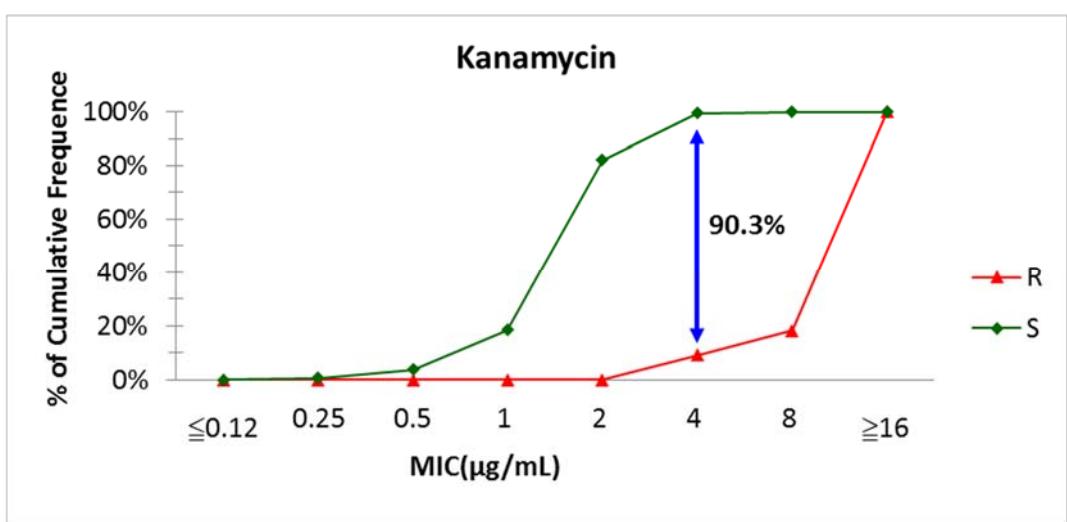
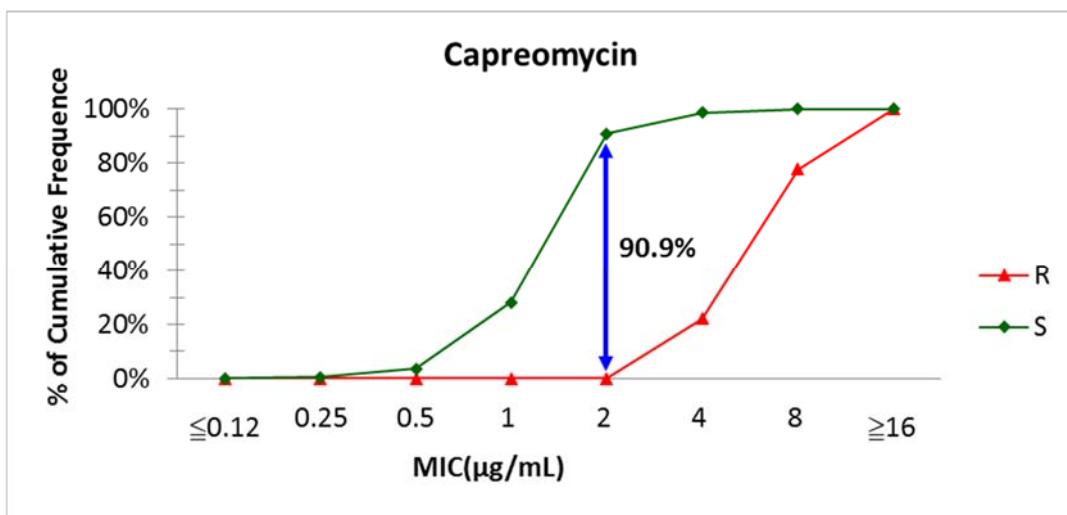


APM: agar proportion method

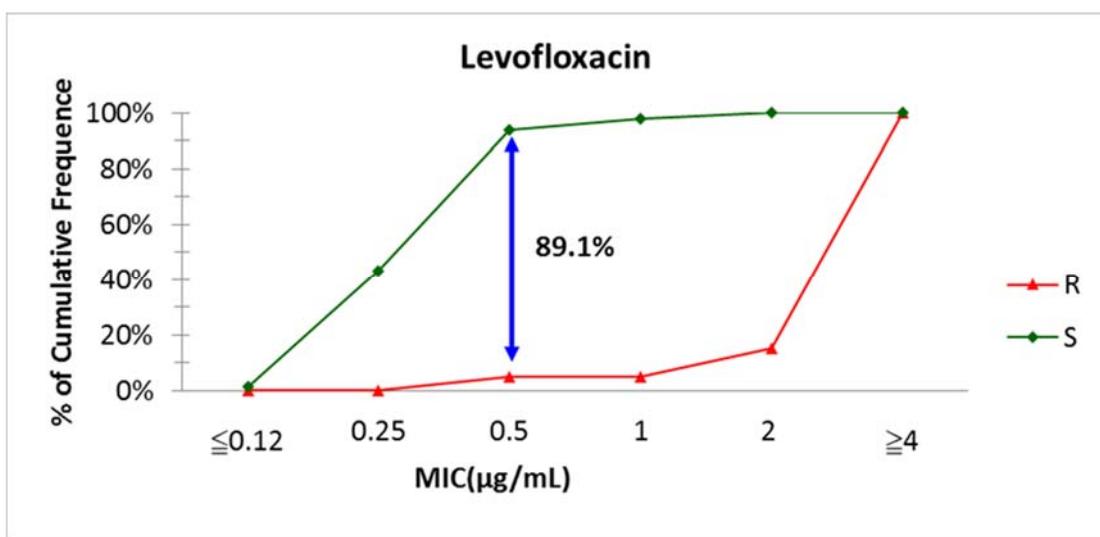
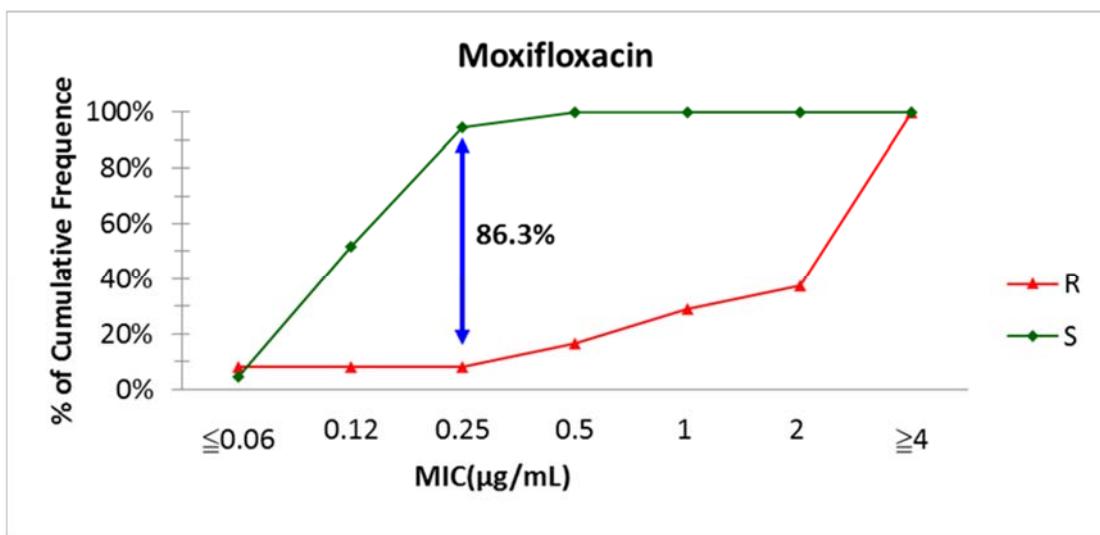
圖二 (c) ethionamide 及 ethambutol 最低抑菌濃度分布範圍



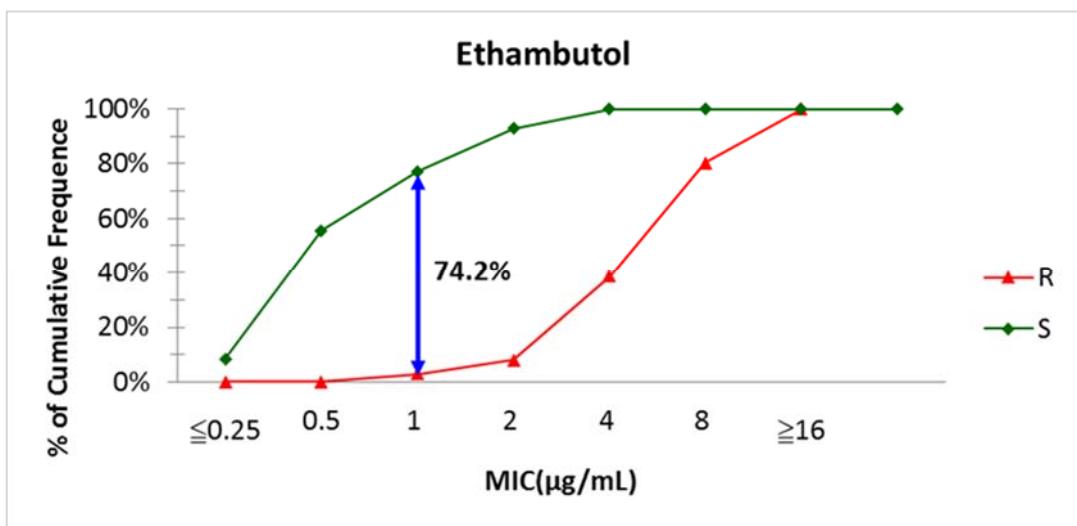
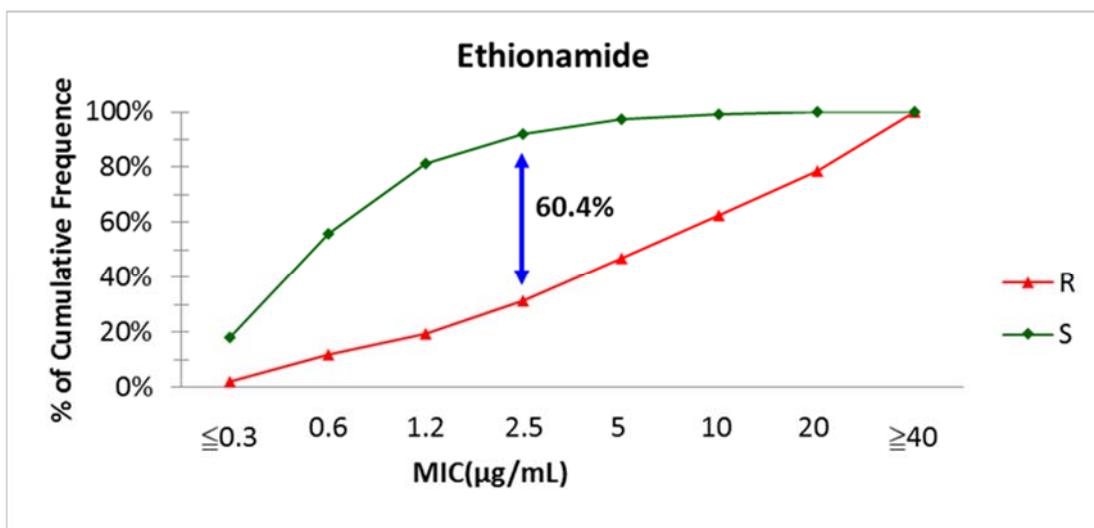
圖二 (d)Linezolid 、clofazimin 及 bedquiline 最低抑菌濃度分布範圍



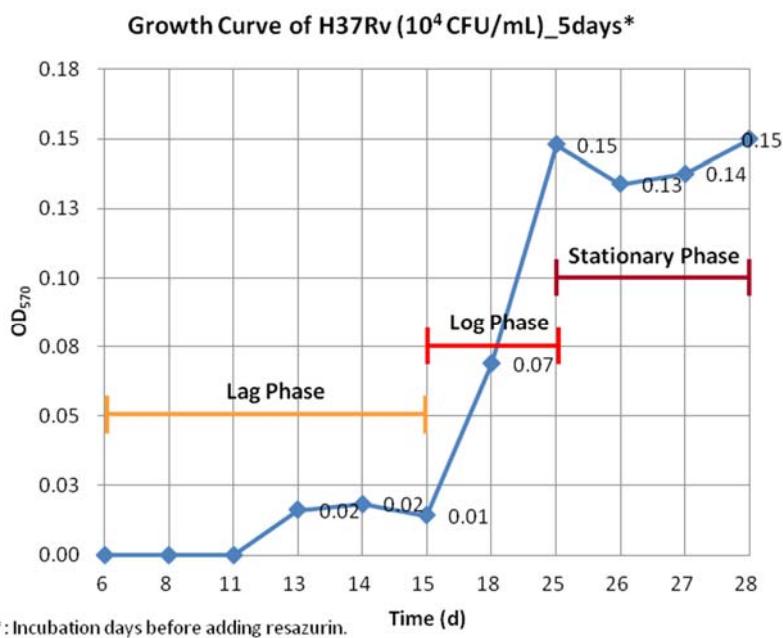
圖三 (a) capreomycin 、 kanamycin 及 amikacin 最低抑菌濃度累積百分比



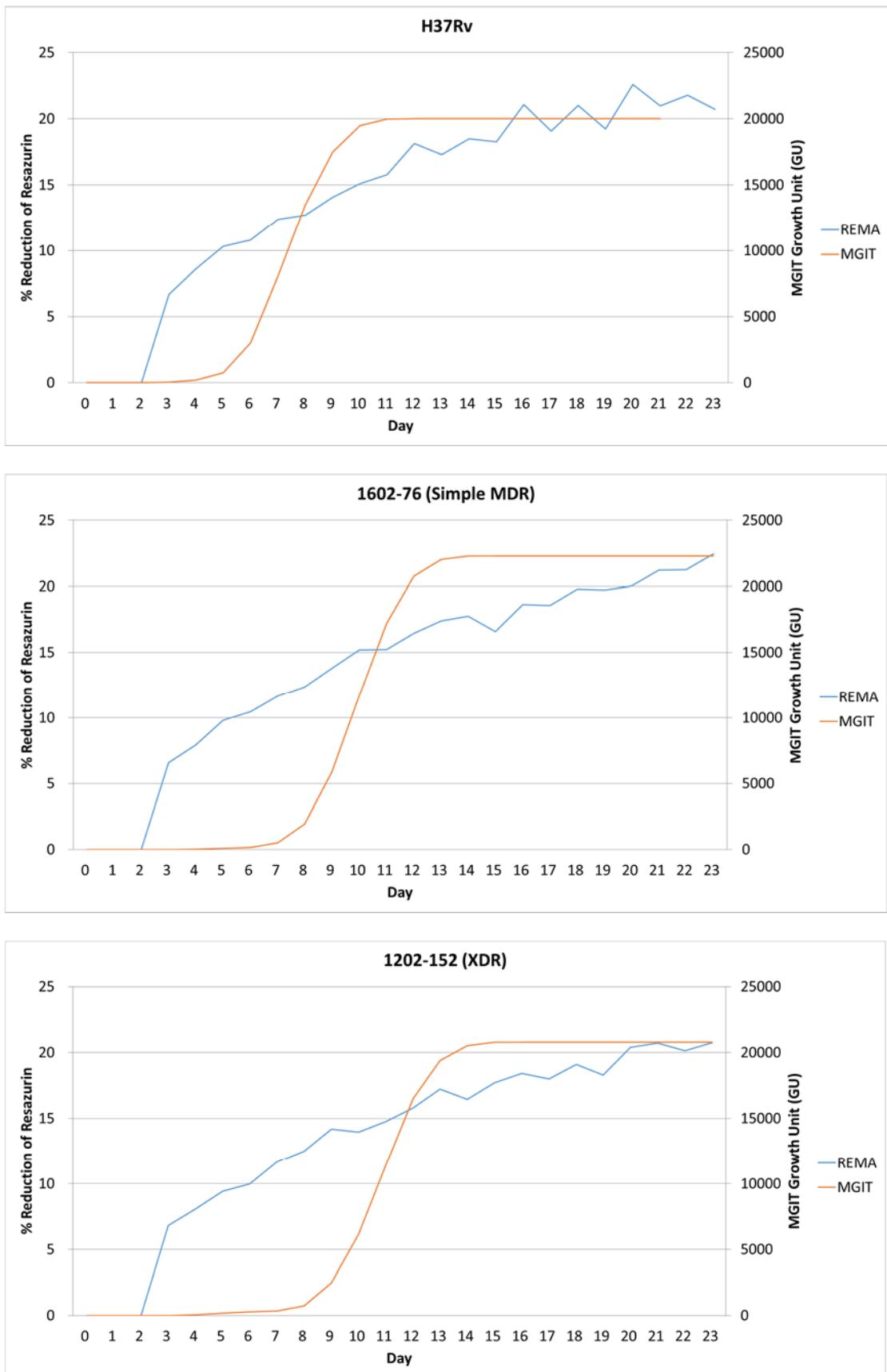
圖三 (b) Moxifloxacin 及 levofloxacin 最低抑菌濃度累積百分比



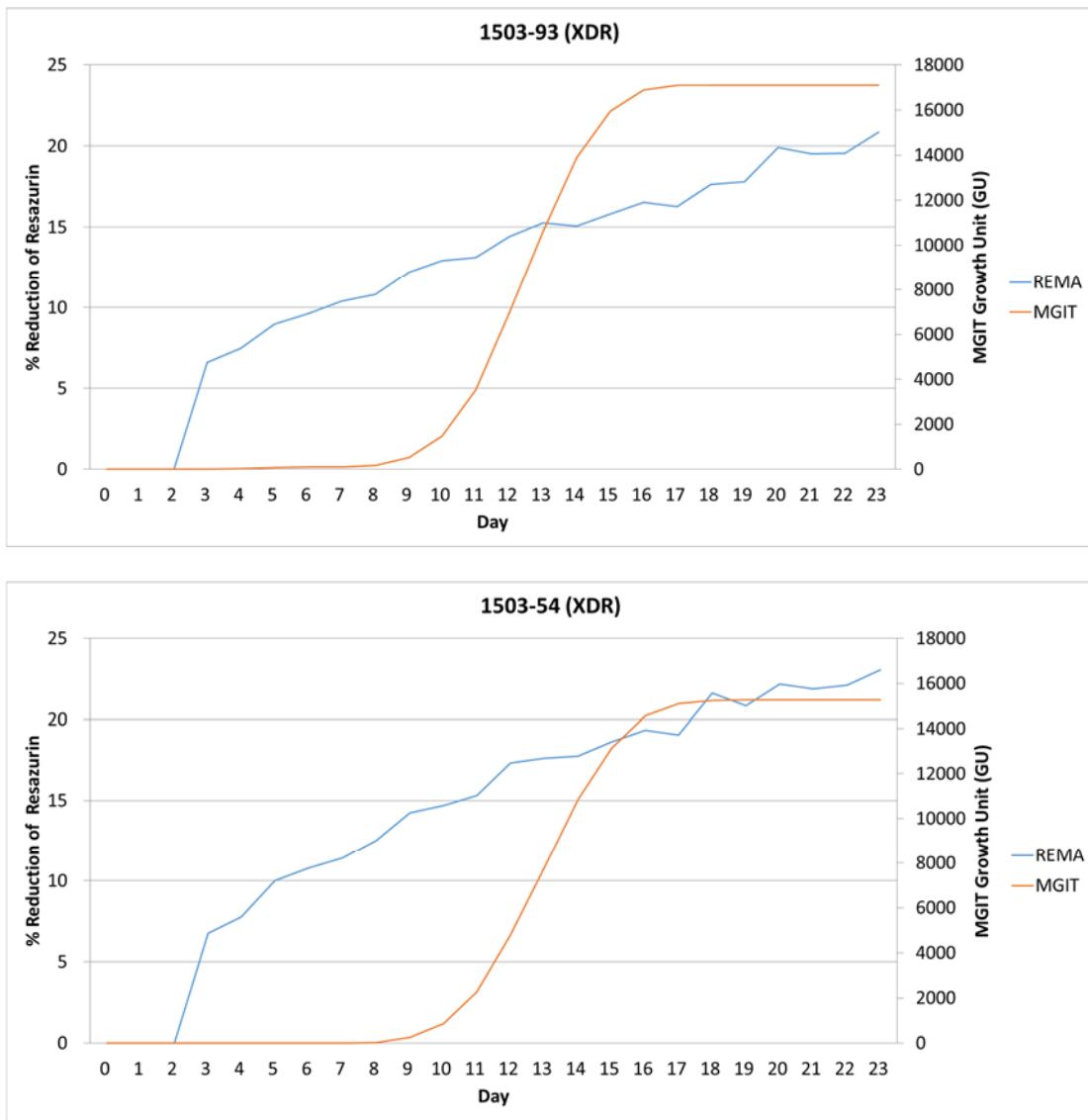
圖三 (c) Ethionamide 及 ethambutol 最低抑菌濃度累積百分比



圖四 標準菌株(H37Rv, ATCC® 27294™)標準生長曲線



圖五 (a)H37Rv 及 Simple MDR、XDR 生長曲線



圖五 (b)XDR 生長曲線

表一 SensititreTM MYCOTB for *M. tuberculosis* 藥盤示意圖

1a OFL 32	2a MXF 8	3a RIF 16	4a AMI 16	5a STR 32	6a RFB 16	7a PAS 64	8a ETH 40	9a CYC 256	10a INH 4	11a KAN 40	12a EMB 32
1b OFL 16	2b MXF 4	3b RIF 8	4b AMI 8	5b STR 16	6b RFB 8	7b PAS 32	8b ETH 20	9b CYC 128	10b INH 2	11b KAN 20	12b EMB 16
1c OFL 8	2c MXF 2	3c RIF 4	4c AMI 4	5c STR 8	6c RFB 4	7c PAS 16	8c ETH 10	9c CYC 64	10c INH 1	11c KAN 10	12c EMB 8
1d OFL 4	2d MXF 1	3d RIF 2	4d AMI 2	5d STR 4	6d RFB 2	7d PAS 8	8d ETH 5	9d CYC 32	10d INH 0.5	11d KAN 5	12d EMB 4
1e OFL 2	2e MXF 0.5	3e RIF 1	4e AMI 1	5e STR 2	6e RFB 1	7e PAS 4	8e ETH 2.5	9e CYC 16	10e INH 0.25	11e KAN 2.5	12e EMB 2
1f OFL 1	2f MXF 0.25	3f RIF 0.5	4f AMI 0.5	5f STR 1	6f RFB 0.5	7f PAS 2	8f ETH 1.2	9f CYC 8	10f INH 0.12	11f KAN 1.2	12f EMB 1
1g OFL 0.5	2g MXF 0.12	3g RIF 0.25	4g AMI 0.25	5g STR 0.5	6g RFB 0.25	7g PAS 1	8g ETH 0.6	9g CYC 4	10g INH 0.06	11g KAN 0.6	12g EMB 0.5
1h OFL 0.25	2h MXF 0.06	3h RIF 0.12	4h AMI 0.12	5h STR 0.25	6h RFB 0.12	7h PAS 0.5	8h ETH 0.3	9h CYC 2	10h INH 0.03	POS CON	POS CON

表二 Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ for *M. tuberculosis* 藥盤示意圖

1a BDQ 0.008	2a BDQ 0.015	3a BDQ 0.03	4a BDQ 0.06	5a BDQ 0.12	6a BDQ 0.25	7a BDQ 0.5	8a BDQ 1	9a BDQ 2	10a BDQ 4	11a RIF 0.06	12a RIF 0.12
1b RIF 0.25	2b RIF 0.5	3b RIF 1	4b RIF 2	5b RIF 4	6b INH 0.03	7b INH 0.06	8b INH 0.12	9b INH 0.25	10b INH 0.5	11b INH 1	12b INH 2
1c INH 4	2c INH 8	3c INH 16	4c OFL 0.12	5c OFL 0.25	6c OFL 0.5	7c OFL 1	8c OFL 2	9c OFL 4	10c OFL 8	11c LEVO 0.12	12c LEVO 0.25
1d LEVO 0.5	2d LEVO 1	3d LEVO 2	4d LEVO 4	5d MXF 0.06	6d MXF 0.12	7d MXF 0.25	8d MXF 0.5	9d MXF 1	10d MXF 2	11d MXF 4	12d KAN 0.12
1e KAN 0.25	2e KAN 0.5	3e KAN 1	4e KAN 2	5e KAN 4	6e KAN 8	7e KAN 16	8e AMI 0.12	9e AMI 0.25	10e AMI 0.5	11e AMI 1	12e AMI 2
1f AMI 4	2f AMI 8	3f AMI 16	4f CAP 0.12	5f CAP 0.25	6f CAP 0.5	7f CAP 1	8f CAP 2	9f CAP 4	10f CAP 8	11f CAP 16	12f LZD 0.12
1g LZD 0.25	2g LZD 0.5	3g LZD 1	4g LZD 2	5g LZD 4	6g LZD 8	7g CFZ 0.015	8g CFZ 0.03	9g CFZ 0.06	10g CFZ 0.12	11g CFZ 0.25	POS
1h CFZ 0.5	2h CFZ 1	3h CFZ 2	4h CFZ 4	5h EMB 0.25	6h EMB 0.5	7h EMB 1	8h EMB 2	9h EMB 4	10h EMB 8	11h EMB 16	NEG

表三 Checkerboard 測試藥盤示意圖

QC+100ul 7H9 CFM 1A		D/W 2A	D/W 3A	D/W 4A	D/W 5A	D/W 6A	D/W 7A	D/W 8A	D/W 9A	D/W 10A	D/W 11A	QC+100ul 7H9 BDQ 12A									
QC+100ul 7H9 CFM 1B	BDQ 0.5	BDQ 0.25	BDQ 0.125	BDQ 0.0625	BDQ 0.03125	BDQ 0.0156	BDQ 0.0078	BDQ 0.0039	CFM	QC+100ul 7H9 BDQ 12B		GC(+) 11B									
	CFM 0.5	2B	CFM 0.5	3B	CFM 0.5	4B	CFM 0.5	5B	CFM 0.5	6B	CFM 0.5	7B	CFM 0.5	8B	CFM 0.5	9B	0.5	10B	GC(+) 11B	BDQ 12B	
QC+100ul 7H9 CFM 1C	BDQ 0.5	BDQ 0.25	BDQ 0.125	BDQ 0.0625	BDQ 0.03125	BDQ 0.0156	BDQ 0.0078	BDQ 0.0039	CFM	QC+100ul 7H9 BDQ 12C		GC(+) 11C									
	CFM 0.25	2C	CFM 0.25	3C	CFM 0.25	4C	CFM 0.25	5C	CFM 0.25	6C	CFM 0.25	7C	CFM 0.25	8C	CFM 0.25	9C	0.25	10C	GC(+) 11C	BDQ 12C	
QC+100ul 7H9 CFM 1D	BDQ 0.5	BDQ 0.25	BDQ 0.125	BDQ 0.0625	BDQ 0.03125	BDQ 0.0156	BDQ 0.0078	BDQ 0.0039	CFM	QC+100ul 7H9 BDQ 12D		GC(+) 11D									
	CFM 0.125	2D	CFM 0.125	3D	CFM 0.125	4D	CFM 0.125	5D	CFM 0.125	6D	CFM 0.125	7D	CFM 0.125	8D	CFM 0.125	9D	0.125	10D	GC(+) 11D	BDQ 12D	
QC+100ul 7H9 CFM 1E	BDQ 0.5	BDQ 0.25	BDQ 0.125	BDQ 0.0625	BDQ 0.03125	BDQ 0.0156	BDQ 0.0078	BDQ 0.0039	CFM	QC+100ul 7H9 BDQ 12E		GC(+) 11E									
	CFM 0.0625	2E	CFM 0.0625	3E	CFM 0.0625	4E	CFM 0.0625	5E	CFM 0.0625	6E	CFM 0.0625	7E	CFM 0.0625	8E	CFM 0.0625	9E	0.0625	10E	GC(+) 11E	BDQ 12E	
QC+100ul 7H9 CFM 1F	BDQ 0.5	BDQ 0.25	BDQ 0.125	BDQ 0.0625	BDQ 0.03125	BDQ 0.0156	BDQ 0.0078	BDQ 0.0039	CFM	QC+100ul 7H9 BDQ 12F		GC(+) 11F									
	CFM 0.0313	2F	CFM 0.0313	3F	CFM 0.0313	4F	CFM 0.0313	5F	CFM 0.0313	6F	CFM 0.0313	7F	CFM 0.0313	8F	CFM 0.0313	9F	0.0313	10F	GC(+) 11F	BDQ 12F	
QC+100ul 7H9 CFM 1G	BDQ	BDQ	BDQ	BDQ	BDQ	BDQ	BDQ	BDQ	CFM	QC+100ul 7H9 BDQ 12G		GC(-) 11G									
	0.5	2G	0.25	3G	0.125	4G	0.0625	5G	0.03125	6G	0.0156	7G	0.0078	8G	0.0039	9G	1	10G	2	11G	BDQ 12G
QC+100ul 7H9 CFM 1H	GC(-)	2H	GC(-)	3H	GC(-)	4H	GC(-)	5H	GC(-)	6H	GC(-)	7H	GC(-)	8H	GC(-)	9H	GC(-)	10H	GC(-)	11H	BDQ 12H

表四 使用最低抑菌濃度藥物敏感性試驗定量測試結果分類

Drug (list of concentrations tested in $\mu\text{g/mL}$)	No. of resistant strains ^a	Low-level resistance ^c (%)	Intermediate-level resistance ^f (%)	High-level resistance ^g (%)	Susceptible ^h (%)	Exclude ⁱ
Isoniazid (0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	173	28 (16%)	127 (73%)	13 (8%)	5 (3%)	-
Rifampin (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	173	2 (1%)	16 (9%)	150 (87%)	5 (3%)	-
Ethambutol (0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	101	5 (5%)	73 (72%)	20 (20%)	3 (3%)	-
Ethionamide (0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10, 20, 40) ^d	51	8 (16%)	11 (22%)	0	32 (63%)	-
Rifabutin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^d	152	3 (2%)	22 (14%)	0	127 (84%)	-
Para-aminosalicylic acid (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64) ^d	9	1 (11%)	5 (56%)	2 (22%)	1 (11%)	-

Drug (list of concentrations tested in μ g/mL)	No. of resistant strains ^a	Low-level resistance ^c (%)	Intermediate-level resistance ^f (%)	High-level resistance ^g (%)	Susceptible ^h (%)	Exclude ⁱ
Kanamycin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	11	1 (9%)	2 (18%)	8 (73%)	0	-
Amikacin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	8	0	1 (13%)	7 (88%)	-	-
Capreomycin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	9	5 (56%)	2 (22%)	0	2 (22%)	-
Levofloxacin (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	20	2 (10%)	4 (20%)	13 (65%)	1 (5%)	-
Moxifloxacin (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	24	3 (13%)	14 (58%)	3 (13%)	0	4
Cycloserine (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256) ^d	2	NA	NA	NA	2 (100%)	-
Linezolid (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8) ^e	0 ^b	NA	NA	NA	-	-
TMC-207 (Bedaquiline) (0.008, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	NA	NA	NA	NA	-	-
Clofazimine (0.015 ,0.03, 0.06, 0.12, 0.25 , 0.5, 1, 2, 4) ^e	NA	NA	NA	NA	-	-

a Phenotypic resistance was determined by agar proportion method.

b Phenotypic resistance was determined by MGIT.

c Low-level resistance was defined as resistance at the H37Rv(ATCC® 27294™) quality control range and the critical concentration by agar proportion method (green label), but susceptibility at the intermediate drug concentration.

d Determined by Sensititre™ MYCOTBI for *M. tuberculosis*.

e Determined by Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ for *M. tuberculosis*.

f Intermediate-level resistance was defined as resistance at the screening concentration and the intermediate concentration, but susceptibility at the highest concentration.

g High-level resistance was defined as resistance at all concentrations tested

h The MIC \leq the QC range of H37Rv

i Determined by the poor agreement between MYCOTBI and Janssen

表五 敏感株最低抑菌濃度藥物敏感性試驗定量測試之 MIC50 及 MIC90 分析

Drug (list of concentrations tested in $\mu\text{g/mL}$)	No. of susceptible strains ^a	MIC 50 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC 90 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$) ^j	AUC (Area Under the Curve) ($\text{mg}\cdot\text{h/L}$) ^j	PK methodology ^j
Isoniazid (0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	0	NA	NA	0.12 - >16	FA: 5.4±20 SA: 7.1±1.9	FA: 19±6.1 SA: 48.2±1.5	Single oral dose of 6.2 mg/kg FA = fast acetylators SA = slow acetylators
Rifampin (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	0	NA	NA	0.06 - >4	14.91	117.93	Single oral dose of 10-15 mg/kg
Ethambutol (0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	70	1	4	0.5 - 8	5	24.9	Prospective study PK evaluated after 2 months daily treatment with 100+ patients, dose median value 24.5 mg/kg. FDA label on myambutol: Cmax 2.5 mg/ml (2-4 h after dosing), drug undetectable 24 hours after last dose except in cases of renal insufficiency.
Ethionamide (0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10, 20, 40) ^d	122	0.6 ^d	2.5 ^d	$\leq 0.3 - 20^d$	2.16	7.67	Mean PK for 250 mg oral dose using film-coated tablet in healthy adults
Rifabutin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^d	21	$\leq 0.12^d$	$\leq 0.12^d$	$\leq 0.12^d$	375±267 ng/L	-	300 mg single oral dose to healthy volunteers

Drug (list of concentrations tested in $\mu\text{g/mL}$)	No. of susceptible strains ^a	MIC 50 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC 90 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$) ^j	AUC (Area Under the Curve) ($\text{mg}\cdot\text{h}/\text{L}$) ^j	PK methodology ^j
Para-aminosalicylic acid (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64) ^d	164	$\leq 0.5^{\text{d}}$	1 ^d	$\leq 0.5 - >64^{\text{d}}$	9-35 (median 20)	-	Single 4 g dose in healthy adults. A level above 1 mg/ml was maintained for 8 hours 7.5 mg/kg dose given i.v.
Kanamycin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	162	2	4	0.25 - 8 ^e	22	-	Intravenous administration of KAN over a period of one hour resulted in serum concentrations similar to those obtained by intramuscular administration
Amikacin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	165	1	1	$\leq 0.12 - 4$	26±4	-	6.3±1.4 mg/kg dose given 3 times daily to steady state
Capreomycin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	164	2 ^d	2 ^d	0.25 - 8 ^d	32 (range 20-47)	-	Dose: 1 g CAP i.m.
Levofloxacin (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	153	0.5	0.5	$\leq 0.12 - 2$	7-12	71.4-110.0	Dose 750 mg oral
Moxifloxacin (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	149	0.12	0.25	$\leq 0.06 - 0.5$	3.1±1	36.1±9.1	Single 400 mg oral dose in healthy young adults
Cycloserine (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256) ^d	171	$\leq 2^{\text{d}}$	16 ^d	$\leq 2 - 64^{\text{d}}$	25-30	-	C_{\max} after a dose of 250 mg every 12 hours

Drug (list of concentrations tested in $\mu\text{g/mL}$)	No. of susceptible strains ^a	MIC 50 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC 90 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$) ^j	AUC (Area Under the Curve) ($\text{mg}\cdot\text{h/L}$) ^j	PK methodology ^j
Linezolid (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8) ^e	175	0.5	0.5	$\leq 0.12 - 2$	12.7*, 12.9**	91.4*, 80.2**	Single dose *600 mg i.v. **600 mg oral
TMC-207 (Bedaquiline) (0.008, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	NA	0.03	0.12	$\leq 0.008 - 0.25$	-	7.91, 24*, 52**	AUCs for a once-daily dose at 50 *150 and **400 mg/day for 14 days
Clofazimine (0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	NA	0.03	0.06	$\leq 0.015 - 0.5$	0.145	1.5	200 mg fasting oral dose (administered with PAS, cycloserine, ETH and pyridoxime), T_{\max} 6.23 h

a Phenotypic resistance was determined by agar proportion method.

b Phenotypic resistance was determined by MGIT.

d Determined by Sensititre™ MYCOTBI for *M. tuberculosis*.

e Determined by Janssen Sensititre Custom Panel CML4FBDQ for *M. tuberculosis*.

j According to reference 20.

表六 Kappa 值分析

7H11 Agar			Broth Microdilution Method ^a							Raw Agreement	Cohen's Kappa			
Critical Concentration	Result	No. of Strains	Determined MIC ($\mu\text{g/mL}$) and no. of Isolates ^b						No. Resistant	No. Susceptible				
Ethambutol			≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	≥ 16					
5 $\mu\text{g/mL}$	R	96	0	0	3	5	31	42	20	93	3	0.98	0.96	
	S	54	6	33	15	11	5	0	0	0	54			
Capreomycin			≤ 0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	≥ 16				
10 $\mu\text{g/mL}$	R	9	0	0	0	0	0	2	5	2	2	0	1.00	
	S	164	0	1	5	40	103	13	2	0	0	149		
Kanamycin			≤ 0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	≥ 16				
6 $\mu\text{g/mL}$	R	11	0	0	0	0	0	1	1	9	9	1	0.99	
	S	162	0	1	5	24	103	28	1	0	0	161		
Amikacin			≤ 0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	≥ 16				
6 $\mu\text{g/mL}$	R	8	0	0	0	0	0	0	0	8	8	0	1.00	
	S	165	1	8	65	84	6	1	0	0	0	165		
Ethionamide			≤ 0.3	0.6	1.2	2.5	5	10	20	≥ 40				
10 $\mu\text{g/mL}$	R	51	1	5	4	6	8	8	8	11	19	16	0.89	
	S	122	22	46	31	13	7	2	1	0	1	112		
Moxifloxacin			≤ 0.06	0.12	0.25	0.5	1	2		≥ 4				
0.5 $\mu\text{g/mL}$	R	24	2	0	0	2	3	2	15		15	2	0.99	
	S	149	7	70	64	8	0	0	0		0	141		
Levofloxacin	0	0	0	≤ 0.12	0.25	0.5	1	2	≥ 4		0	0		
1 $\mu\text{g/mL}$	R	20	0	0	0	1	0	2	17		17	1	0.99	
	S	153	0	2	64	78	6	3	0		0	144		

^a All of the MIC values determined by Janssen Custom Panel CML4FBDQ. Only ethionamide determined by MYCOTBI.

^b  : Susceptible;  : Intermediate;  : Resistant

表七 進行結核菌生長適應性試驗菌株之藥物感受性型態

		Isoniazid	Rifampicin	Ethambutol	Streptomycin	Pyrazinamide
Simple MDR	1602-76	R	R	S	S	S
	1202-152	R	R	R	R	S
XDR	1503-93	R	R	R	S	R
	1503-54	R	R	R	R	R

		Capreomycin	Kanamycin	Amikacin	Moxifloxacin	Levofloxacin
Simple MDR	1602-76	S	S	S	S	S
	1202-152	S	R	S	R	S
XDR	1503-93	R	S	S	R	R
	1503-54	R	R	R	R	R

		Ethionamide	Rifabutin	Prothionamide	Cycloserine	Linezolid
Simple MDR	1602-76	S	S	S	S	S
	1202-152	R	R	S	S	-
XDR	1503-93	S	R	R	S	S
	1503-54	R	R	S	S	S

表八 The length of lag phase and rate of growth obtained MGIT960™ methods

Strain	Length of lag phase (h)	Rate of growth (h)
H37Rv	75	27
1602-76 (Simple MDR)	75	20
1503-93 (XDR)	75	30
1202-152 (XDR)	85	20
1503-54 (XDR)	196	31

表九 Bedaquiline 及 Clozazimine 藥物與藥物交互作用 FICI 值

MDR Strain no.	FICI	BDQ alone	CFZ alone	BDQ/CFZ	CFZ/BDQ	BDQ MIC ratio of decrease in combined with CFZ	CFZ MIC ratio of decrease in combined with BDQ
1	0.56	0.02	0.50	0.01	0.03	2	16
2	0.56	0.13	0.50	0.06	0.03	2	16
3	0.56	0.13	0.50	0.06	0.03	2	16
4	0.56	0.03	0.50	0.02	0.03	2	16
5	0.56	0.03	0.50	0.02	0.03	2	16
6	0.56	0.13	0.50	0.06	0.03	2	16
7	0.56	0.25	0.50	0.13	0.03	2	16
8	0.62	0.02	0.25	0.01	0.03	2	8
9	0.62	0.06	0.50	0.01	0.25	8	2
10	0.62	0.06	1.00	0.01	0.50	8	2
11	0.63	0.06	0.50	0.03	0.06	2	8
12	0.63	0.13	0.50	0.06	0.06	2	8
13	0.63	0.13	0.50	0.02	0.25	8	2
14	0.63	0.13	0.25	0.06	0.03	2	8
15	0.63	0.25	0.50	0.13	0.06	2	8
16	0.63	0.13	1.00	0.06	0.13	2	8
17	0.63	0.06	0.25	0.03	0.03	2	8
18	0.75	0.02	0.25	0.01	0.06	2	4
19	0.75	0.02	0.13	0.01	0.03	2	4
20	0.75	0.02	0.13	0.01	0.03	2	4
21	0.75	0.02	0.25	0.01	0.06	2	4
22	0.75	0.03	1.00	0.01	0.50	4	2
23	0.75	0.13	0.50	0.03	0.25	4	2
24	0.75	0.06	0.06	0.02	0.03	4	2
25	0.75	0.03	0.25	0.02	0.06	2	4
26	0.75	0.03	0.50	0.02	0.13	2	4
27	0.75	0.06	0.13	0.03	0.03	2	4
28	0.75	0.03	0.25	0.02	0.06	2	4
29	0.75	0.06	0.13	0.03	0.03	2	4
30	0.75	0.13	0.50	0.06	0.13	2	4
31	0.75	0.13	1.00	0.06	0.25	2	4
32	0.75	0.13	0.50	0.06	0.13	2	4
33	0.75	0.03	0.25	0.02	0.06	2	4
34	0.75	0.03	0.50	0.02	0.13	2	4
35	0.75	0.06	0.50	0.03	0.13	2	4

MDR Strain no.	FICI	BDQ alone	CFZ alone	BDQ/CFZ CFZ/BDQ		BDQ MIC ratio of decrease in combined with CFZ	CFZ MIC ratio of decrease in combined with BDQ
36	0.75	0.06	1.00	0.03	0.25	2	4
37	0.75	0.06	0.50	0.03	0.13	2	4
38	0.75	0.03	0.50	0.02	0.13	2	4
39	1.00	0.02	0.13	0.01	0.06	2	2
40	1.00	0.02	0.25	0.01	0.13	2	2
41	1.00	0.02	0.50	0.01	0.25	2	2
42	1.00	0.06	0.25	0.03	0.13	2	2
43	1.00	0.03	0.25	0.02	0.13	2	2
44	1.00	0.03	0.25	0.02	0.13	2	2
45	1.00	0.03	0.13	0.02	0.06	2	2
46	1.00	0.13	0.13	0.06	0.06	2	2
47	1.00	0.25	0.50	0.13	0.25	2	2
48	1.00	0.06	0.25	0.03	0.13	2	2
49	1.00	0.06	0.06	0.03	0.03	2	2
50	1.00	0.06	0.13	0.03	0.06	2	2
51	1.00	0.03	0.25	0.02	0.13	2	2
52	1.00	0.06	0.25	0.03	0.13	2	2
53	1.00	0.06	0.25	0.03	0.13	2	2
54	1.00	0.06	0.25	0.03	0.13	2	2
55	1.00	0.50	1.00	0.25	0.50	2	2
56	1.00	0.13	0.50	0.06	0.25	2	2
57	1.01	0.50	0.50	0.00	0.50	128	1
58	1.03	0.13	0.25	0.00	0.25	32	1
59	1.06	0.50	0.50	0.03	0.50	16	1
60	1.12	0.03	0.13	0.00	0.13	8	1
61	1.13	0.13	0.25	0.02	0.25	8	1
62	1.25	0.01	0.13	0.01	0.03	1	4
63	1.25	0.03	0.13	0.03	0.03	1	4