

計畫編號：DOH93-DC-2022

行政院衛生署九十三年度

自行研究計畫

**結核菌抗藥性監測第一期計畫**

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

研究人員： 張素英、陳盟勳、郭廷雍

執行期間： 九十三年三月一日至九十三年十二月三十一日

\* \* 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 \* \*

# 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、中英文摘要	( 3 )
貳、本文	
一、前言	( 7 )
二、材料與方法	( 11 )
三、結果	( 18 )
四、結論與建議	( 24 )
五、參考文獻	( 25 )
六、圖、表	( 28 )

## 壹、摘要

**研究目的**利用對單一藥物具抗藥性背景之各類結核菌參考菌株，評估本實驗室配製之抗藥性試驗培養基之一致性，培養基之真正能力評估，可配合今年度收集之部份臨床菌株進行進一步抗藥性試驗，同時評估不同試驗方法在抗藥性試驗的表現，另外參加各國間菌株能力試驗，可由試驗結果之一致性與再現性，作為實驗室能力的評估及實驗室之間之相互評比。

**研究方法**建立以 Lowenstein-Jensen (L-J)法進行結核菌抗藥性分析與監測，待方法學上可有效做為判定之依據後，再將收集之臨床菌株進行抗藥性測試，利用該測試之結果，作為瞭解臺灣地區結核菌之抗藥性發生率及多重抗藥性菌株佔有之比例。另外，Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 法為新近開發具自動化、快速且準確的商業化結核菌抗藥性鑑定方法，為評估該法之有效性，本實驗室將該法與 L-J 法進行平行比對，以評估兩法之一致性，做為菌株抗藥性試驗的參考，以達結核病防治之終極目標。

**主要發現**利用各種具不同單一抗藥背景之參考菌株進行重複性 L-J 培養基法試驗評估，其抗藥性結果呈現一致滿意度 100%。臨床菌株於 L-J 法與 MGIT 960 法的試驗結果，整體滿意度分別為 100%及 93%。MGIT 960 法滿意度下降，主要在藥物 RMP 及 EMB 中與預期之結果產生不一致，滿意度分別為 95%及 98%。在國外參考菌株（比利時）能力試驗部分，MGIT 960 法與 L-J 法平行比對後，主要在藥物 rifampin (RMP)、ethambutol (EMB) 及 streptomycin (SM)與 L-J 法產生不一致，其滿意度分別為 90%、90%及 90%。顯然參考菌株在評估兩種方法學上並無差異，但進入臨床菌株的測試

時，因菌株之特異性，或對不同培養系統或藥物使用濃度產生敏感程度之差別，MGIT 960 法對 RMP、EMB 及 SM 三種藥物則未能顯現一致之結果。此外，針對 isoniazid (INH)藥物在高低濃度的抗藥性結果，發現在高濃度部分，L-J 法與 MGIT 960 法彼此間會有不一致之結果。就兩種方法之結果報告所需判讀時間，MGIT 960 法平均需 9 天，L-J 法需 28 天。

**結論及建議事項**國際上推薦廣為使用之主要結核菌抗藥性檢測方法比例法(proportion method and its variants)，利用 L-J 培養基法可正確提供菌株抗藥性結果，以加入國際間進行之能力試驗評比。至於商品化之 MGIT 960 系統之準確性與一致性雖未能較傳統 L-J 培養基法佳，然而在時效上，卻比 L-J 培養基法優異許多。今後臨床菌株的收集與取樣，後續應可與亞洲鄰近之結核菌參考實驗室進行雙向菌株測試，將可提昇本實驗室之能力與實驗結果一致性。

**關鍵詞：** 結核菌，抗藥性試驗，L-J 培養基法，MGIT 960

## **Abstract**

### **Purpose**

In order to monitor the trend of anti-tuberculosis drug resistance in Taiwan by using standardized methods, both Lowenstein-Jensen (L-J), Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 and agar 7H10 methods were compared in parallel. The overall goal of this project is to improve the performance of the national tuberculosis control program.

### **Materials and Methods**

In this study, reference stains obtained from ATCC, 21 tested strains from supernational reference laboratory and 44 *Mycobacterium tuberculosis* strains from local clinical laboratories have been tested using standardized L-J and MGIT 960 drug susceptibility tests.

### **Results and Discussion**

The overall performance of both methods in ATCC reference strains were 100% satisfaction, while, L-J method was more stable and accurate than MGIT method when evaluating clinical and tested strains. The discrepancy results obtained from MGIT method were mainly due to operational issues, including drug concentration, inoculums concentration, suspension homogeneity, contamination, etc. The MGIT method provides drug-resistant final results faster than L-J method.

### **Conclusion and Suggestions**

The laboratory proficiency, particularly the sensitivity and specificity of drug susceptibility testing, may affect the prevalence result of drug resistance. For drug resistance surveillance, the L-J method might be the better choice; while, in clinical laboratory MGIT method might be able to provide results for

early patient treatment.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug susceptibility test, Mycobacteria  
Growth Indicator Tube method

## 貳、本文

### 一、 前言：

結核病(Tuberculosis, TB)是由分枝桿菌所引發的一種傳染性疾病，通常的感染是表現在肺部，但是它的確會侵害人體所有組織，病原體是 *Mycobacterium tuberculosis*，可經由咳嗽飛沫傳播 (Small, 1994)。此疾病可以藥物治療，早期之診斷治療可降低發病率及死亡率，只是療程常需達 6-12 個月，病人之合作度是關鍵。人類通常以由減毒之牛型結核桿菌製成之卡介苗(BCG)疫苗來預防肺結核。在西方已開發國家中，一般認為 AIDS 流行的結果是造成 TB 再爆發流行主因 (Sepkowitz, 1995)。結核病的臨床症狀為持續性咳嗽，痰中帶有血絲，胸部疼痛，疲勞，食慾不振，體重減輕，虛弱等。結核病檢驗的方式有很多種，胸部 X 光比較不具特異性，但是對肺結核還算敏感 (50-60%)。結核病主要分為肺結核和非肺部的結核，前者又可分為可培養出桿菌之開放性與無培養出桿菌之封閉性肺結核。封閉性肺結核的病人大約是開放性肺結核病人的 2-3 倍。

現今全世界有二仟萬個患者，每年增加八百萬個新病例，並造成每年兩百萬人死亡(WHO, 1999)。尤其在最近五年內，在已開發國家中發生的病例急劇上昇，使得 TB 不再侷限於未開發及開發中國家的專利，更演變成為全球的問題。結核病在我國仍是一項急待解決的公共衛生問題。一般皆認為病人服藥的順從性不理想與具抗藥性的結核病人日益增多是造成治療失敗的兩大因素。其中，導致結核病 primary 或 acquired 抗藥性是人為因素居多，主要為處方錯誤、藥物供應不規律、藥物品質不良及病例管理不佳等。

基於結核病抗藥性問題日趨嚴重，世界衛生組織(World Health Organization, WHO)及 International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, IUATLD 已於 1994 年推出治療結核病藥物抗藥性監測全球計畫 (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。藉由結論，續推出'DOTS-PLUS'，以進一步研究使用第二線抗生素治療藥物之可行性。於第二期計畫 1996-1999 年期間，100 多家實驗室含括全世界 58 個地區加入此抗藥性監測計畫。由所收集之數據結果發現，抗藥性監測計畫為國家 TB 方案(National TB Program)成效評估必要工具，抗藥性監測計畫宜擴大至更多國家並做長期監控；而且除非結核病根除抗藥性問題將一直存在。概括而言，此全球抗藥性監測計畫總目標在藉由政策建議與藥物管理以改進國家 TB 方案。

依據慢性病防治局於 1997-1998 年調查台灣地區治療結核病藥物抗藥性之結果顯示，近十年來原發性所佔比例有增多趨勢，佔 12.3% 高於全球平均值；續發性抗藥性為 67%，亦高於全球平均值甚多。目前，台灣目前並無統籌之治療結核病藥物抗藥性監測系統，僅有少部分 (5.2%) 臨床檢驗室進行抗藥性檢驗，實驗品管亦堪慮；因所使用之測試方法互異，數據無法相互比對與整合，以致長期以來缺乏全國性代表數據，也無從真正透視結核病治療成效與抗藥性趨勢。疾病管制局結核分枝桿菌實驗室擬循序漸進的建立所需相關技術及機制，藉由 WHO 現有之跨國參考實驗室之運作模式，加入此全球性之抗藥性監測計畫，促進技術及衛生資訊交流。



已經被國際上推薦廣為使用之主要結核菌抗藥性檢測方法含：(1) 比例法(proportion method and its variants)，能精確定量待測菌種內抗藥性變異菌株所佔比例；(2)抗藥性比法(resistance ratio method)，比較待測菌種與實驗室標準菌種之抗藥性；(3)絕對濃度法(absolute concentration method)，是以定量之菌液接種於對照及含不同濃度第一線治療藥物培養基上，結果以能抑制大部份或全部菌種生長之濃度表示；(4)Bectec 460<sup>®</sup> radiometric method。依據 WHO 2001 年修訂之規範，在進行抗藥性監測計畫前，建議實驗室需通過能力試驗及由跨國參考實驗室人員實地訪查，確認實驗之一致性(uniformity)與再現性(reproducibility)。抗藥性監測所需實驗技術，經與比利時熱帶醫學研究所結核菌國家參考實驗室及全球 TB 抗藥性監測計畫實驗室品管負責人 Professor Portaels 討論後，擬以全球多數實驗室採用之 proportion 方法為主，以利相互間評比；並搭配 MGIT 液態培養系統，監測第一線抗生素(isoniazid, INH; rifampicin, RIF; streptomycin, SM 及 ethambutol, EMB)使用抗藥情形，至於另一種第一線抗生素 pyrazinamide (PZA)需於酸性培養基內培養，因於低 pH 下極為不穩定，菌株有時無法培養出，測試上不易標準化，暫時摒除於監測計畫外。多重抗藥性之定義為，菌株至少對 INH 及 RIF，與/或對其他抗生素產生抗藥性。至於機制上，擬先以 clustering sampling 策略進行 TB 確定菌株採樣，樣本集中於本局結核菌分枝桿菌實驗室測試及分析報告。日後，再架構及推廣至其他有意願參與之通過品保測試 P3 實驗室。

病人檢體採樣設計上，擬依 WHO 建議方式進行 Cluster Sampling。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

且確認之菌株，以電腦建檔菌株之流病資料。菌株收集對象將以本局代檢網實驗室所分離之結核桿菌株為優先；為避免數據之偏頗，需避免僅使用爆發流行(outbreak)或抗藥性菌株。數據管理分析，運用 WHO 軟體 Surveillance of Drug Resistance in Tuberculosis (SDRTB)第三版，單一或多重藥物抗藥皆容易藉此軟體進行分析。數據之輸入，宜由不同人員輸入兩次，提升可靠與正確性。新與復發病例抗藥性之程度數據，將是國家 TB 方案成效之指標。

## 二、材料與方法

### (一) 病人選擇(patient intake)策略與菌株檢體之收集與運送：

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病例所分離出結核桿菌株為主；為避免數據之偏頗，需避免僅使用爆發流行(outbreak)或抗藥性菌株。

### (二) 菌株流行病學資料電腦檔之建立：

將由以電腦軟體 Access 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。

### (三) 標準化抗藥性監測方法：

1. 培養基配製 - 原則上，以 Lowenstein-Jensen (L-J)培養基為主，需注意選擇使用無特殊病原(SPF)或不含抗生素之雞蛋，抗生素需新鮮配製不宜貯存，以確保實驗穩定與準確性。

#### (1) 抗生素藥物配製 -

若以無菌操作技術配製，抗生素藥物則無需再滅菌處理。

Isoniazid stock solution 1mg/ml, working solution

20µg/ml; rifampicin stock solution 10mg/ml, working solution 2mg/ml; streptomycin stock solution 2mg/ml, working solution 400µg/ml ; ethambutol stock solution 1mg/ml, working solution 200µg/ml 及 para-aminosalicylic acid stock solution 1mg/ml, working solution 100µg/ml。

(2) 含抗生素藥物 L-J 培養基配製 -

37.2g L-J 培養基 base, 12ml glycerin 及 600ml 無菌蒸餾水, 加熱攪拌, 溶解配製成 2L 培養基後, 於 121 滅菌 15 分鐘。冷卻至室溫後, 加入 1000ml 無菌全蛋液。混合均勻後, 取 200ml 加入五個 500ml 血清瓶中, 各瓶中已預先分裝適量第一線抗生素。混合均勻後, 各瓶溶液分注 5ml 於滅菌玻璃管中, 再置於 85 恆溫乾燥箱中 40 分鐘。爾後, L-J 培養基貯於 4 冰箱備用, 使用期限最好不要超過 2 個月。

2. 菌液調製 - 原則上, 以 L-J 培養基培養出之新鮮初代 (fresh culture) 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。

(1) 調製 1 mg/ml 菌液。

(2) 配製  $10^{-1}$  及  $10^{-3}$  稀釋菌液。

(3) 接種  $10^{-2}$  稀釋菌液(以 calibrated Pasteur pipette 取約兩滴菌液)加入 control L-J tube。

(4) 接種 0.1ml  $10^{-2}$  稀釋菌液於含不同待測試抗生素 L-J

tube 中。

(5) 接種  $10^{-3}$  稀釋菌液(以 calibrated Pasteur pipette 取約兩滴菌液)加入 control L-J tube。

(6) 確定 L-J tube 表面完全受菌液覆蓋，接種完成之 L-J tube，需於室溫下放置隔夜。

(7) 再將(6)之 L-J tube，置於 37 恆溫培養箱中靜置培養。

### 3. 結果判讀

28 天後做第一次判讀。若具抗藥性則終止實驗，若仍為敏感，則於第 42 天判讀實驗結果。病理檢體(Biopsy)來源之菌株，需至少觀察一年再終止實驗。

## B.MGIT 960 抗藥性試驗

### 1. 抗生素藥物配製

藥物最終濃度分別為 1.0 and 6.0 ug/ml for SM, 0.1 and 0.4 ug/ml for IHN, 1.0ug/ml for RMP, and 5.0 and 7.5 ug/ml for EMB

### 2. 高濃度培養液 (OADC) 的加入

測試培養管先行加入 0.8mL OADC 至每一培養管中。

3. 菌液調製 - 原則上，以 L-J 培養基培養出之新鮮初代(fresh culture)結核菌做為測試菌，於負壓實驗室中調製測試菌液。

(1) 調製 Macfarland 0.5 菌液。

(2) 配製 1:5 及 1:50 稀釋菌液。

### 4. 測試方式

- (1) 接種管擺放於測試架之位置次序依序為  
growth control, SM at 1.0 ug/ml, SM at 6.0 ug/ml,  
INH at 0.1 ug/ml, INH at 0.4 ug/ml, RMP at 1.0ug/ml,  
EMB at 5 ug/ml, and EMB at 7.5 ug/ml.
- (2) 接種 0.5ml 1:500 稀釋菌液加入 SIRE control  
MGIT 960 tube。
- (3) 接種 0.5ml 1:5 稀釋菌液於含不同待測試抗生素  
SIRE MGIT 960 tube 中。
- (4) 再將MGIT 960 tubes , 置於37 MGIT 960 主機中  
靜置培養。

#### 5.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。

#### C. Agar 7H10 培養基抗藥性試驗

##### 1.含抗生素藥物 agar 培養基配製

為購買自啟新與聖誠公司之新鮮培養基

##### 2.藥物濃度

啟新- SM2.0ug/ml,INH0.2 ug/ml,

RMP1.0 ug/ml,EMB7.5 ug/ml,PAS8.0 ug/ml,

EA10.0 ug/ml and K6.0 ug/ml

聖誠- SM2.0 ug/ml and 10.0 ug/ml,INH0.2 ug/ml

and 1.0 ug/ml,RMP 1.0 ug/ml,EMB5.0 ug/ml

and 7.5 ug/ml

3. 菌液調製 - 原則上，以 L-J 培養基培養出之新鮮初代(fresh culture)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。

(1) 調製 Macfarland 1.0 菌液。

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

4. 測試方式

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

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

(3) 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)。

(4) 將平板分別封入  $CO_2$  可通透的塑膠袋中，並於 37 恆溫培養箱中靜置培養。

5. 結果判讀

每四分格生長的量記錄如下：

>500 菌落 4+、 200-500 菌落 3+、 100-200 菌落 2+、 50-100 菌落 1+及<50 菌落則計錄實際菌落數。

(1) 兩組對照組中至少一組應可計數的菌落數

(至少50個)，否則結果無效。

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

(3) 有研究報告指出，大部份的菌株，用瓊脂比例法做 EMB 的感受性試驗會出現微小菌落

(microcolonies) , 因為微小菌落在不同的實驗室可能會改變 , 每個實驗室應決定如何來報告。

(4) 第一星期 ( 7 天 ) 判讀是否有污染的細菌或黴菌或任何快速生長的分枝桿菌。甚至緩慢生長的分枝桿菌也可能在2星期的培養出現。感受性結果不能在此時報告有效 , 因為有些較具抗藥的菌株 , 比有效的菌株長得慢。除非抗藥的菌株在2星期已出現 , 可報抗藥性。最後判讀的時間在培養後3星期。如果對照組在3星期仍未長 , 則再培養3星期 , 加長至6 星期培養時間。當對照組有長足夠量時 , 只能報有效的藥。

#### (四) 通過能力測試 :

實驗室品管是數據可信度重要依據 , 參與抗藥性監測全球計畫實驗室 , 目前皆參加品保方案 (quality assurance programme) , 定期接受 supranational 參考實驗室 (supranational reference laboratory, SRL) 提供之菌株以比例法進行能力測試 , 或/及將本局測試菌株送交比利時 ITM SRL 重複測試。以確認本局抗藥性測試方法與系統之一致性及再現性。

#### (五) 管理與分析數據 :

##### 1. 數據及資料收集

建議包含 : 病人登記、臨床資料收集之品質、檢體運送及操作污染問題等。數據收集品質、實驗操作流程、



品管結果及初步流行分析結果等。

## 2. 數據分析

為計算抗藥性發生率，分母為具藥物敏感實驗結果之病例。當然仍需報告未能取得結果之病例，如：污染、培養陰性、菌數不足供敏感性測試等。下列變數皆應列入考量：analysis of patient intake 及抗藥性 pattern 分析。

## 3. 結果釋義

新與復發病例抗藥性之程度數據，將是國家 TB 方案成效之指標。

### (六) 建立抗藥性結核菌株庫：

菌株先存放於檢驗實驗室，以含 10% OADC 0.2 % glycerol 之 7H9 培養基保存於-70 中，待分析後選擇值得保存之特定菌株，轉交疾病管制局生物材料中心進行永久保存。

### 三、結果

九十三年為結核菌抗藥性監測第一期計畫（第二年）的延續，本期計劃主要執行項目為臨床分離菌株抗藥性試驗與接受國外盲樣菌株能力測試。

#### (一)建立 L-J 培養基法

試驗初期先行利用實驗室購自美國 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas USA) 菌株庫參考菌株，分別為 ATCC27294 H37Rv fully susceptible、ATCC 35822 INH resistant、ATCC 35838 RMP resistant、ATCC 35837 EMB resistant、ATCC 35820 SM resistant 及 ATCC 35828 PZA resistant，進行培養基重複性試驗(Reproducibility Test)。一般而言，重複性試驗為抗藥性培養基的品質與臨床分離菌株抗藥性試驗前的先行重要測試項目之一。本法主要為利用已知抗藥性背景之參考菌株，進行不同時間多次接種後統計出每一次之抗藥性試驗結果，再經轉換成每一類藥物呈現之滿意度 (Agreement, %) 報告，藉由滿意度的高低可為評比培養基優劣、試驗流程污染、藥物濃度適當與否及國際間所使用之不同抗藥性試驗方法間的評比。首先在 L-J 培養基法進行參考菌株之重複性試驗結果 (表一) 均呈現一致的滿意度 100 %。證明在抗藥性試驗的培養基配製、藥物濃度及試驗方法，可正確的判別受試菌株的抗藥性，後續同樣利用重複性試驗方法。

#### (二) L-J 培養基法與 MGIT 960 培養法之評比

以參考菌株進行 L-J 固態培養基法與 MGIT 960 液態培養法結果的評比，兩者測試結果之滿意度 (表二) 並未顯現不同。此結果同時說明目前的結核菌抗藥性試驗採用方法可能依實驗室具備的條件而不同，但

以大多數實驗室所採用之 L-J 培養基法與 MGIT960 培養法上，只要能正確的操作，皆可做為實驗室進行臨床菌株抗藥性鑑定之方法。另外，結果判定依據：L-J 培養基法可依據菌落生長的數量進行判定，圖一、圖二及圖三分別為 ATCC 27294 H37Rv、ATCC35822 INH 及 ATCC35838RMP 部份抗藥性試驗之結果；而 MGIT 960 法則以超過 200GU( susceptibility breakpoint ) 螢光偵測值來進行判定，圖四、圖五及圖六分別為 ATCC 27294 H37Rv、ATCC 35822 INH 及 ATCC 35838RMP 部份抗藥性試驗之結果。

### (三) 臨床菌株之抗藥性試驗

本年度臨床菌株抗藥性試驗主要以收集之部分菌株為鑑定的類別，合計有 44 株進行抗藥性試驗及不同試驗方法間平行評比。在 MGIT 960 的抗藥試驗中，發現 3 株臨床菌株在一線藥物 RMP 及 EMB 中呈現不一致(discrepancy)結果。不一致結果可分為兩大類：第一類為培養假陰性(false-susceptible results)，主要為鑑定結果是 susceptible 但實際上該菌株抗藥背景為 resistant，此種誤判為抗藥性鑑定上的非常重大錯誤(very major error, VME)；反之若培養結果為假陽性( false resistant results )，則視為鑑定上的重大錯誤( major error, ME )。在臨床菌株試驗結果，除 3 株菌株出現培養假陰性之非常重大錯誤：RMP 的 2 株及 EMB 的 1 株外(表三)，其他部分菌株皆顯現一致之結果。評估臨床菌株之在 L-J 培養基法及 MGIT 960 法的整體滿意度：L-J 培養基法為 100%；MGIT 960 法為 93%。

### (四) 抗藥性試驗之能力測試

抗藥性試驗能力試驗部分，本實驗室每年固定參加國際專業評估測

試，定期接受美國病理學家學會（College of American Pathologists, CAP）盲樣測試。上半年度已完成 CAP 編號 E01 結核菌株抗藥性鑑定報告，下半年度則於十二月初期將 CAP 編號 E09 之抗藥性鑑定報告送達該協會，在 CAP 的菌株抗藥性結果，L-J 培養基法及 MGIT 960 法與公佈之的結果一致（表四）。

另外，本實驗室亦針對比利時國家參考實驗室(National Reference Lab, NRL)所提供之 21 株盲樣測試菌株進行測試。每一菌株以三重複試驗進行 L-J 培養基法及 MGIT 960 法平行評比。目前，已就 L-J 培養基法及 MGIT 960 法所呈現之結果加以比較。若以 L-J 培養基法作為本次試驗的依據判定方法，再與 MGIT 960 法相互比對後，其中 MGIT 960 共 5 株菌分別於 SM、EMB 及 RMP 藥物呈現假陰性不一致（VME）的結果（表五）。SM 及 EMB 滿意度為 90% 及 90%。另外，有一株在 RMP 呈現假陽性不一致（ME）的結果，合併上述 RMP 假陰性結果其滿意度為 90%。情況較特別的是菌株號碼 0674 為唯一一株同時於 MGIT 960 SM 及 EMB 出現假陰性不一致（VME）的結果。

整體而言，INH 雖然在臨界藥物濃度（Critical concentration）皆呈現一致之結果，然而有 6 株菌株在高濃度（High concentration）部分則呈現不一致性。針對表五中 12 株對 EMB 藥物有抗藥性菌株的比對，發現該 12 株菌株也對 INH 產生抗藥性，另外相對於一線藥物 RMP 同時顯現抗藥性之比率則相對減低。

#### （五）Agar 比例法之初步試驗

目前初步利用商品化配製之 Agar7H10 抗藥性培養基進行試驗，分別進行參考菌株（圖七）、臨床菌株（圖八）及 CAP 能力試驗菌株（圖九）的抗藥性實驗，試驗結果與 L-J 法相同，該法將來亦可同時用於方

法學上平行測試。

由於抗藥性試驗之目的，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續發性抗藥（Acquired resistant）病人人數，因此針對 L-J 法及 MGIT 960 法在試驗開始至完成結果報告所需平均之時間的結果，MGIT 960 法及 L-J 法分別為 9 天及 28 天，顯然 MGIT 960 法在完成抗藥性報告時效上較 L-J 法為快速。

#### 四、討論

目前全球多數實驗室皆採用 proportion 方法進行結核菌抗藥性試驗，L-J 培養基法進而與 MGIT960 法平行比對的結果之一致性，兩者之滿意度皆高於 90% 的最低要求，臨床菌株的表現似乎以 L-J 培養基法較 MGIT 960 法佳。雖然，受限於實驗室於本年度三月十五日才開啟使用，截至目前為止的測試樣品數略微不足無法有效進行統計分析，但可經由陸續的菌株收集，加大樣本數目，做進一步的測試，若有需要可將 Agar proportion 法也一併加入初期之重複性試驗當中，三者平行比對。

表三與表五中，MGIT960 法之所以與 L-J 法在平行比對測試時，會發生 VME 及 ME 的問題，新近的文獻報告中亦曾被提及，VME 的發生，探究其原因可能是不同批次之藥物濃度對於相同菌株之抑制效果增強的關係、菌株過老、菌液靜置過久、菌液稀釋不當、加藥過程與接種劑量過少而發生，另外也可能是所放置培養管所在位置，其螢光變化未能被有效偵測，因為有些時候我們發現培養管內雖有菌的生長，但未能顯現出螢光值的變化，導致不一致假陰性 ( false-susceptible results ) 的結果，另外，對於發出假陽性( false resistant results ) 報告的重大錯誤( major error, ME )，探究其原因可能為菌研磨時間過短與靜置沉澱時間過短而造成大團塊菌塊的吸取、單一試驗安排的測試菌株數目過多、加藥過程、菌液稀釋不當、接種劑量過量等人為疏失及菌株受到污染而造成。

表五之 MGIT 960 與 L-J 法在 INH 高濃度的不一致現象，一但高濃度藥物培養基的配製發生問題時，恐造成高濃度結果的誤判，由於參考菌株對高濃度藥物皆有抗藥性，因此理想上應使用對臨界濃度具抗藥性但對高濃度敏感性菌株作為參考菌株較佳，這部份可將臨床菌株確認為臨界濃度具抗藥性但對高濃度敏感性者，併入品管試驗中，有效降低高

濃度結果誤判情形發生。

MGIT 960 法及 L-J 法分別為 9 天及 28 天，雖然快速取得抗藥性結果是 MGIT 960 法的優點，但滿意度較 L-J 法低，且 MGIT 960 法似乎也較容易產生污染，這種情況在過去實驗期間也的確發生過，通常短時間內培養管內細菌會大量生長，觀察菌液色澤呈現混濁而粉狀樣 (Turbidities)，抗藥結果顯現全數抗藥，因此在報告結束即將移除測試菌株時，對於一線藥全為抗藥性之菌株，應再檢視其菌液型態，作為汙染判定之指標。

由於抗藥性試驗之目的，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續發性抗藥 (Acquired resistant) 病人人數，因此針對 L-J 培養基法及 MGIT 960 法在試驗開始至完成結果報告所需平均之時間的結果，MGIT 960 法及 L-J 培養基法分別為 9 天及 28 天，顯然 MGIT 960 法在完成抗藥性報告時效上較為快速。

## 五、結論與建議

抗藥性情形一直是國家結核病成功與否之指標，必須建立台灣地區整體性監測系統。本年度以設置 BSL-3 之核心實驗室、建立標準化抗藥性試驗方法為目標。目前以 Agar 7H10 與 L-J 培養基法實驗結果較穩定；但是 MGIT 960 最為快速。將來需確認實驗之一致性與再現性，持續收集台灣地區之確定抗藥性菌株，建立菌株資料庫，由早期判定病患致病菌株抗藥性的發生，提供治療參考避免抗生素的誤用，並期能在結核病防治上有所助益。



## 六、參考文獻

WHO, The world health report 1999, Geneva: WHO 1999; 110.

Sepkowitz, K. A., J. Raffalli, L. Riley, T. E. Kiehn, D. Armstrong, 1995. Tuberculosis in the AIDS era. Clin. Micro. Rev., 8: 180-199.

Small PM, van Embden JDA. Molecular epidemiology of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: American Society for Microbiology; 1994, p. 569-82.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;97:9869-74.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31:406-9.

Sola C, Horgen L, Goh KS, Rastogi N. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes. J Clin Microbiol 1997;35:843-6.

Sola C, Horgen L, Maisetti J, Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Spoligotyping followed by double-repetitive element PCR as rapid alternative to IS6110-fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998;36:1122-4.

Sola C, Horgen L, Devallois A, Rastogi N. Combined numerical

analysis based on the molecular description of *Mycobacterium tuberculosis* by four-repetitive sequence-based DNA typing sequence. Res Microbiol 1998;149:349-60.

Kamerbeek J, Schouls L, van Agterveld M, van Soolingen D, Kolk A, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35:907-14.

Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy: the principles and practices of classification. San Francisco (CA): W.H. Freeman & Co.; 1973.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987;4:406-25.

Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997;35:647-51.

Goguet de la Salmonière Y, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden JDA, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997;35:2210-4.

Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JDA. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol Microbiol 1993;10:1057-65.

Meyer A. In: Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J, editors.

New uses for new phylogenies. London: Oxford University Press; 1996. p. 322-40.

Tuberculosis. The WHO/IUATLD Global project on antituberculosis drug resistance surveillance. *Weekly Epidemiological Records* 1996; 71:281-86.

Laszlo A, Rahaman M, Raviglione M, Buestreo F. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in WHO/IUATLD Supernational Laboratory Network: first round of proficiency testing. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 1997; 1:231-8.

Bastian I, Protails F. Resurgent and emerging infectious diseases. Multidrug-resistant tuberculosis. Kluwer Academic Publishers. 2000; 8:139-140.

World Health Organization, Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis, 2002. WHO and IUATLD, Geneva, Switzerland.

表一 Reproducibility testing for standard proportion method by the L-J medium in ATCC Reference strains.

Drug (ug/mL)	Strains <sup>a</sup>	No. of tests performed <sup>b</sup>	No. of results agreeing with reference method <sup>c</sup>	Agreement (%)
INH(0.2)	S	5	5	100
	R	5	5	100
INH(1.0)	S	5	5	100
	R	5	5	100
RIF(40.0)	S	5	5	100
	R	5	5	100
EMB(2.0)	S	5	5	100
	R	5	5	100
STR(4.0)	S	5	5	100
	R	5	5	100
Total		50	50	100

<sup>a</sup> S,susceptible; R, resistant

<sup>b</sup> With three strains of M. tuberculosis in triplicate from three separate inocula

<sup>c</sup> L-J proportion method for SIRE

表二 Expected susceptibility results and those obtained using MGIT 960 and L-J proportion methods in ATCC Reference strains.

strain	Expected result <sup>a</sup>				Result <sup>b</sup> obtained by method									
					MGIT 960					L-J				
	INH	RMP	EMB	SM	INH low	INH high	RMP	EMB	SM	INH low	INH high	RMP	EMB	SM
ATCC27294	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC35822	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S
ATCC35838	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
ATCC35837	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
ATCC35820	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R

<sup>a</sup> Results expected according to the ATCC.

<sup>b</sup> Abbreviations: S, susceptible, R, resistant; B, borderline.

圖一、參考菌株 H37Rv-All Sensitivity

Test tube with or without drug from right to left C1,C2,C3,SM,INH(C),INH(H),RMP,EMB and PAS

圖二、參考菌株 35838-Rifampin Resistant

Test tube with or without drug from right to left C1,C2,C3,SM,INH(C),INH(H),RMP,EMB and PAS

圖三、參考菌株 35822-Isoniazid Resistant

Test tube with or without drug from right to left C1,C2,C3,SM,INH(C),INH(H),RMP,EMB and PAS

圖四、參考菌株 H37Rv-All Sensitivity

圖五、參考菌株 35822-Isoniazid Resistant

圖六、參考菌株 35838-Rifampin Resistant

表三 Expected susceptibility results and those obtained using MGIT 960 and L-J proportionation methods in clinical isolate strains.

Strains	Expected result <sup>a</sup>				Result <sup>b</sup> obtained by method									
					MGIT 960					L-J				
	INH	RMP	EMB	SM	INH low	INH high	RMP	EMB	SM	INH low	INH high	RMP	EMB	SM
04010018	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
04010019	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
04010021	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
04010022	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
04010284	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S
04010018	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
TC 514	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC1100	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
TC1246	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC1257	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 1562	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 5317	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TC14629	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 19920	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 20975	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 20978	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 21678	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 21786	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 21883	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 21887	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 21971	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 22137	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 22611	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TC 22612	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 22614	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 23655	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 23916	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TC 23930	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 44	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 45	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH043	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CH 042	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

<sup>a</sup> Results expected according to the other clinical lab.

<sup>b</sup> Abbreviations: S, susceptible, R, resistant.

表四 Expected susceptibility results and those obtained using MGIT 960 and L-J proportion methods in CAP test

strain	Expected result <sup>a</sup>				Result <sup>b</sup> obtained by method									
					MGIT 960					L-J				
	INH	RMP	EMB	SM	INH low	INH high	RMP	EMB	SM	INH low	INH high	RMP	EMB	SM
CAPE01	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
CAPE09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

<sup>a</sup> Results expected according to the WHO.

<sup>b</sup> Abbreviations: S, susceptible, R, resistant; B, borderline.

表五 Expected susceptibility results and those obtained using MGIT 960 and L-J proportion methods in proficiency testing from NRL.

strain	Result <sup>b</sup> obtained by method									
	MGIT 960					L-J				
	INH low	INH high	RMP	EMB	SM	INH low	INH high	RMP	EMB	SM
0674	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R
0696	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
0715	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
1933	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
1945	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R
3063	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
3980	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R
4118	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R
4460	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4913	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S
5397	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R
5839	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
6143	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6763	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
6868	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R
7615	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8222	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
8496	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
8564	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
9034	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R
9945	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R

<sup>a</sup> Results expected according to the NRL.

<sup>b</sup> Abbreviations: S, susceptible, R, resistant; B, borderline.



