

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-133128

衛生福利部疾病管制署 107 年委託科技研究計畫

計畫名稱：結核病之抗藥性試驗、監測及流行病學研究

年度/全程研究報告

執行機構：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：吳玫華

協同主持人：周如文

研究人員：林宛璇、詹馨燁、詹硯婷

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 133.1 萬元整

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目次

目次.....	i
圖表目次.....	ii
摘要.....	iii
本文.....	1
壹、前言.....	1
貳、材料與方法.....	10
參、結果.....	14
肆、討論.....	35
伍、結論與建議.....	40
陸、重要研究成果及具體建議.....	41
柒、參考文獻.....	44
附錄.....	51

圖表目次

圖次

圖 1 全國多重抗藥性結核病本國籍累計數與本計畫執行數比較.....	15
圖 2 多重抗藥(Multidrug-resistant TB, MDR)結核菌株，抗藥比例(%)在不同年份的分布曲線.....	18
圖 3 比較MDR及RR菌株在各藥物的抗藥比例.....	24
圖 4 二線藥針劑類固態瓊脂法(APM)與液態法(MGIT 960)藥敏及基因分析結果.....	27
圖 5 Fluoroquinolone固態瓊脂法(APM)與液態法(MGIT 960)藥敏及基因分析結果.....	33

表次

表 1 2013-2018年MDR結核菌株之藥物抗藥比例(%).....	17
表 2 重開MDR案 及新MDR案對各藥物的抗藥比例比較.....	19
表 3 針劑類(Second-line injectable agents)藥物交叉抗藥分析.....	20
表 4 Fluoroquinolone類抗生素交叉抗藥分析.....	21
表 5 比較MDR及RR菌株在各藥物的抗藥比例.....	24
表 6 MGIT快速液態藥物敏感性試驗與標準瓊脂比例法藥敏試驗比較.....	34

摘要

研究目的：蒐集本國籍 MDR 及 RR 菌株，分析抗結核二線針劑類、Fluoroquinolones 類，藥物抗藥比例分布變化趨勢；比較傳統固態及液態藥敏試驗檢驗性能，以評估定性、定量藥敏方法及抗藥監測的結果。

研究方法：2013 年至 2018 年之 MDR 626 株及 RR 333 株，藥敏試驗使用 MYCOTBI plate (Sensititre®) 最低抑菌濃度法、瓊脂比例法固態培養基及 MGIT 960 液態二線藥試劑組，MGIT 自動判讀儀器配置 EpiCenter TB eXiST 軟體。

主要發現：MDR 菌株在抗藥比例分布變化趨勢，從 2013 年至 2017 年的分布高低未達顯著差異($p > 0.05$)；抗藥比例在重開案對新案的比值(Odds ratio)，未達顯著差異($p > 0.05$)。在二線藥針劑類、Fluoroquinolone 類、Ethionamide 及一線藥 PZA、EMB 的抗藥比例，MDR 個案顯著比 RR 高($p < 0.05$)。MDR 菌株在針劑類(Second-line injectable agents)的交叉抗藥顯示，Kanamycin 抗藥中，有 19.44% 對 Amikacin 敏感；Amikacin 抗藥中，有 34.48% 對 Capreomycin 敏感，Capreomycin 抗藥中，有 17.39% 對 Amikacin 及 Kanamycin 敏感。MDR 菌株在 Fluoroquinolone 類的交叉抗藥顯示，低濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Moxifloxacin 抗藥中，有 19.05% Levofloxacin 敏感；高濃度 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Moxifloxacin 抗藥中，有 8.33% Levofloxacin 敏感；Moxifloxacin 低濃度抗藥中，有 33.33% 高濃度敏感。基因定序結果比較，在針劑類時，基因方法與固態瓊脂藥敏較為一致。在 Fluoroquinolones 類，比較 2018 年 WHO 調降後的臨界濃度時，基因方法與液態 MGIT 法藥敏結果較為一致。

結論及建議事項：MDR 菌株自 2013 年至 2017 年之抗藥比例無顯著變化。

同類藥物交叉抗藥比例顯示，治療時可考慮同類藥物中的其它有效藥。藥敏試驗方法學的評估，收集抗藥菌株與敏感株數量相當時，對於陽性(抗藥)預測值較能提供準確的評估結果。

關鍵詞：藥物敏感性試驗、MGIT 960 抗結核二線藥敏試驗、抗藥趨勢監測

Abstract

Aim: Collect MDR and RR strains of this nationality, analyze the anti-tuberculosis second-line injections, Fluoroquinolones, and the trend of drug resistance ratio distribution; compare the performance of traditional solid-state and liquid drug susceptibility test to evaluate qualitative and quantitative drug sensitivity methods.

Materials and Methods: In this study, 626 MDR and 333 RR MTBC strains were tested using the agar proportion method, a liquid-based MYCOTBI plate (Sensititre®) minimum inhibitory concentration (MIC) testing and/or the MGIT drug susceptibility testing. The SAS 9.4 software was used for statistic analysis.

Results and Discussion: The distribution of MDR strains in the proportion of drug resistance distribution did not reach a significant difference from 2013 to 2017 ($p > 0.05$); the ratio of drug resistance in the old case to the new case (Odds ratio) did not reach significant difference ($p > 0.05$). The MDR cases were significantly higher than RR in the second-line drug injections, Fluoroquinolone, Ethionamide, and first-line drugs PZA, EMB ($p < 0.05$). Cross-resistance of MDR strains in Second-line injectable agents showed that 19.44% of Kanamycin drugs were sensitive to Amikacin; among Amikacin drugs, 34.48% were sensitive to Capreomycin, and Capreomycin was 17.39%. Sensitive to Amikacin and Kanamycin. Cross-resistance of MDR strains in Fluoroquinolone showed that 19.05% of Levofloxacin was sensitive to low concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Moxifloxacin; 8.33% of Levofloxacin was sensitive to high concentration of 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Moxifloxacin; Moxifloxacin was low resistant Among them, 33.33% are sensitive to high concentrations. Compared with the results of gene sequencing, the genetic method is more consistent with the solid agar drug sensitivity in the injection. In the Fluoroquinolones class, the genetic method was more consistent with the liquid MGIT method when

comparing the critical concentrations after the WHO reduction in 2018.

Conclusion and Suggestions: There was no significant change in the proportion of MDR strains from 2013 to 2017. The proportion of cross-drug resistance of similar drugs shows that other effective drugs in the same class of drugs can be considered during treatment. The evaluation of the susceptibility test method provides an accurate evaluation result for the positive (drug resistant) predictive value when the number of resistant strains is comparable to that of the sensitive strain.

Key Words: drug susceptibility testing, MGIT 960 drug susceptibility testing, Drug resistance surveillance

本文

壹、前言

背景、現況、研究目的

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，超級抗藥性結核病 (extensively drug-resistant TB, XDR-TB)是指 MDR TB 病人對於 Fluoroquinolones 類的藥物抗藥，並同時對任一注射藥 Amikacin、Kanamycin 及 Capreomycin 具有抗藥性之結核菌株。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，2013 年粗估全球約出現 48 萬 MDR TB 個案，共占總結核病案例的 5% ，其中約有 20.5%是先前治療過結核病的個案；而有 9%的 MDR TB 個案為 XDR TB。值得注意的是，約有 56%的 TB 新案集中在東南亞及西太平洋地區。因 MDR TB 的治療困難度高與藥物效果不佳，於 2013 年已造成 21 萬病患死亡，2011 年統計顯示 MDR TB 治癒率僅 48%，XDR TB 治癒率僅 22%【1】。

藥物使用不當及作用濃度不足容易導致結核菌產生抗藥性，而抗藥性的出現無異使結核病防治更加困難。因為許多曾被使用來治療 MDR TB 的二線藥物，其療程長達 2 年，而藥效有限、副作用大且常供應短缺，而限制了使用範圍。此外，抗藥性結核病治療所需巨額的成本，限制了 MDR TB 照護與管理策略的推展，所以世界上絕大多數的 MDR TB 沒有受到充分且適當的治療。研發可縮短療程、有效及副作用低的藥物，對抗藥性 TB 及敏感性 TB 的治療與管理，均是非常迫切【2】。

許多商業上已上市藥物已被證實具有抑（殺）結核菌的效果，但由於實驗室及臨床證據不足，因此未被納入常規治療使用。在 2013-2014 年已有 2 種新藥證實對 MDR TB 有療效，通常一個藥物要被使用在 MDR TB 臨床治療上，須具有完整抑（殺）菌能力試驗、嚴謹且廣泛的體外試驗及動物安全性試驗等以證實其可行性【2】。

長期以來，結核菌藥敏試驗主要用定性法以臨界濃度區分測試藥物為抗藥或敏感株，抗藥表示治療無效，敏感表示有療效【3】。本研究以定量最低抑菌濃度法(minimum inhibitory concentration, MIC)測試抗結核一及二線藥及再定義藥物，使用包括根據世界衛生組織所建議之一線及二線抗結核藥物以及第 5 類抗結核藥物，莫西沙星(Moxifloxacin)藥物之安全性和低毒性已被證實，亦被美國食品藥物管理局(Food And Drug Administration, FDA)核可上市，並廣泛使用於非結核病的其他臨床適應症治療，且價格便宜。應用定量法藥敏試驗的優點為可測試菌株的抗藥程度，在抗藥性菌株或病人治療過程復發導致用藥劑量可能需要調整時，定量結果與傳統法定義的臨界濃度比較，MIC 測試結果如果低於或高於臨界濃度一個 2 倍稀釋濃度時定義為 intermediate【4】，因此，MIC 值在臨床應用上，可提供治療 MDR TB 的藥物組合及劑量調整建議。然而，臨界濃度需整合藥物動力學的資料及嚴謹的臨床療效評估決定，現階段對於新藥及再定義藥物則定義流行病學上的臨界值(ECOFF)，同時整合分子檢測突變位點結果，證實這些藥物對於 MDR 結核菌的殺（抑）菌效果【5】。MIC 值在臨床應用上，可被考慮做為提供臨床治療 MDR TB 的藥物組合及劑量調整建議。

異菸鹼醯(Isoniazid, INH)

INH 已知會干擾結核菌脂質及核酸的合成，具有 pyridine ring 及

hydrazide group 結構，對抗結核活性是必須的，口服後吸收很快而且完全，對快速增殖的結核菌特別有效，能殺死細胞內外生長繁殖的結核菌，對血腦屏障的穿透力良好，具有安全、便宜、易於投藥等優點，是目前使用最廣泛的抗結核藥物。另有研究指出缺乏雙功能過氧化氫酶(此指具 catalase/peroxidase activity)的 *M. bovis* 及 *M. tuberculosis* 對 INH 的耐受濃度會降低【6, 7】，INH 的活性與 katG, ahpC, inhA, kasA 及 ndh 皆有關【8】，藉由干擾 inhA 的表現可抑制 NADH-dependent enoyl-ACP reductase，影響 mycolic acids 生成【9】。

立汎黴素(Rifampicin, RMP)

RMP 屬於 ansamycin，具有高效能的抗菌作用，可抑制結核菌 RNA-polymerase 的活性【10】，具殺菌性，研究指出 RMP 可有效對抗快速生長或是處於緩慢代謝狀態(未增值)的細菌【11】，與其它 rifamycins 類藥物會產生交互抗藥(cross-resistance)作用【12】。此外，對吞噬細胞具有良好的穿透力，可殺死細胞內的結核菌。RMP 能穿透許多組織且達到相當高濃度，腦膜炎時腦脊髓液中濃度會增加至血中濃度的 12-25%。目前已知具 RMP 抗藥的 *M. tuberculosis* 對其它藥物也常具有抗性，尤其是 INH【13】。

吡嗪酰胺(Pyrazinamide, PZA)

PZA 為 nicotinamide 類似物，可被結核菌生成的 pyrazinamidase/nicotinamidase 轉化為活性態 pyrazinoic acid【14,15】，進而干擾膜電位且抑制細胞膜上的運輸功能【16】。過去也指出 pyrazinoic acid 及其 n-propyl ester 結構會抑制細菌複製過程表現的 fatty acid synthase type I【16】。研究指出當 pncA 突變時，便無法產生 pyrazinamidase 轉化 PZA 形成 POA【17】。PZA 對巨噬細胞內酸性(pH5.5)環境中生長緩慢的結核菌最

具殺菌力，組織穿透力佳，具滅菌功能 (sterilizing activity)，故能減少結核病的復發率，為現行短程化療方案中的主要藥物之一，但對 *M. bovis* 及部份非結核分枝桿菌則沒有作用。

乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)

EMB 可抑制結核菌蛋白質的合成和破壞細菌的代謝，及干擾細胞壁的合成【18】，因而阻斷細菌的增殖。EMB 主要經腎臟排泄並且對中樞神經系統之穿透力差。EMB 具有可避免結核菌產生抗藥性之特性，為目前抗結核藥物中最常用的抑菌劑。已知 EMB 的抑制作用與結核菌的 *embCAB* 有關【19】，相對應之抗藥基因主要有 *embB*；另有研究指出當這個 cluster 突變後，*M. tuberculosis* 仍具有高濃度的抗性(MIC \geq 40 mg/L)【20】。

鏈黴素(Streptomycin, SM)

SM 是一種氨基糖苷類藥(aminocyclitol glycoside antibiotic)，作用於細菌體內的核糖體，抑制細菌蛋白質合成【21】，並破壞細菌細胞膜的完整性。SM 對細胞外的鹼性病灶中之 *M. tuberculosis* 具殺菌性，適用於間歇性治療。主要經腎臟排泄，不易通過血腦屏障，對結核性腦膜炎較差，但對浸潤型肺結核、粟粒性結核等活動性肺結核療效較好。

Fluoroquinolone 類藥物

Fluoroquinolone 可抑制 *M. tuberculosis* 的 type II topoisomerase (DNA gyrase)【22】，此類藥物包含 Ofloxacin、Ciprofloxacin、Moxifloxacin、Gatifloxacin、Levofloxacin 等。Ciprofloxacin 及 Ofloxacin 為 nalidixic acid 的衍生物，最早於 1965 年發現，是純化抗瘧疾之 chloroquine 類藥物時的副產物【23】。研究指出 *gyrB* 上的 Asn-533-Thr 突變會使菌株對 Moxifloxacin

及 Gatifloxacin 產生抗性，但對 Ofloxacin 產生敏感性【24】。左氧氟沙星 (Levofloxacin) 屬於新 fluoroquinolone 類，能在巨噬細胞內濃縮，抑制結核菌的 DNA gyrase，與 RMP 及 INH 有協同作用，具殺菌性。與其他抗結核的主要藥物無交叉抗藥性，治療多重抗藥性結核病時，和 aminoglycoside 為首選的藥物。必須搭配多種其他抗結核藥才能奏效，若單獨使用於治療結核病，很快就會引發抗藥性。實驗篩選及臨床分離的 *gyrA* 突變株以 Ofloxacin 測試，則被發現會得到不同的 MIC【25】。結核菌的 MfpA(屬 pentapeptide repeat family) 已知可結合在 DNA gyrase，因此被認為可能是造成 Ciprofloxacin 及 Sparfloxacin 抗藥性的原因【26】。Moxifloxacin 在 1962 年首次發現，用於治療革蘭氏陰性導致的尿道感染【42】。fluorine moiety 顯著增強藥物活性，並藉由各種側鏈(side chains)的設計，合成出許多不同的 fluoroquinolones 類藥物。Moxifloxacin 對廣泛的細菌具有活性，並越來越多的證據證明其安全性和適用範圍。雖被運用於治療抗藥性結核病【43】，很少實驗室的研究其 MICs。

Kanamycin/ Amikacin/ Capreomycin

Kanamycin 及 Amikacin 屬 aminoglycoside 類藥物，Capreomycin 屬 cyclic peptide 類，皆作為抗結核的二線藥使用。研究指出 Kanamycin 與 Amikacin 或是 Capreomycin 具有交互抗藥【27,28】，而隨 Kanamycin 與 Amikacin 的濃度提高 *rrs* 上的 A1401G 突變頻率也會增加【29】。Capreomycin 與 Viomycin 因結構相似也具交互抗藥【30】，*tlyA* 可轉譯出 rRNA methyltransferase，此基因的突變會影響細菌對 Capreomycin 的抗性【31】。

乙硫異煙胺(Ethionamide)

Ethionamide 可經由 *ethA*-encoded mono-oxygenase 活化成具有 NAD 結

構的抑制物，可對 NADH-dependent enoyl-ACP reductase InhA 進行抑制。MshA 也被認為是可能的作用標的，這個基因可轉譯出 glycosyltransferase 參與 mycothiol biosynthesis 【32】。

淨核(Rifabutin)

Rifabutin 是 rifamycin 的一種衍生物，但 RBT 在不影響核糖核酸(RNA)或蛋白質合成的情形下能抑制胸腺嘧啶攝入至細菌的去氧核糖核酸(DNA)內，其作用機轉與 RMP 不完全相同。在體外及實驗動物中，對 *M. tuberculosis*、*M. kansasii*、*M. marinum*、*M. xenopi*、*M. haemophilum* 及 *M. avium* complex 比 RMP 更有活性，也能作用於一些抗 RMP 的菌株。口服 RBT 在胃腸道吸收良好，服藥後 6 小時，肺中的濃度比血漿中的濃度高 5~10 倍。雖然它在肝臟內發生代謝作用，但對肝功能異常的病人仍能服用，不會加重 INH 對肝臟的毒性。Rifabutin 主要的 2 種代謝產物，31-OH RBT 與 25-deacetyl Rifabutin，皆對 *M. tuberculosis* 具有活性。半衰期約 12 至 18 小時，適合間歇式給藥。

對氨基水楊酸鈉(Para-aminosalicylate, PAS)

與 INH 及 SM 結合使用，具有抑制結核菌作用。研究指出 PAS 會與 para-amino benzoic acid 競爭 dihydropteroate synthase 影響葉酸(folate)合成【33】。口服吸收快而完全，腦膜炎患者可在腦脊液中達到治療濃度。PAS 的特點是 *M. tuberculosis* 抗藥性發生率較低，但單獨使用療效差，必須與其他抗結核藥物併用，以加強療效並延緩抗藥性的發生。

環絲胺酸(Cycloserine)

已知可抑制 *M. tuberculosis* 生長。與其他抗結核藥物沒有交互抗藥作

用，用於治療抗藥性 *M. tuberculosis*，或暫時與其他非肝毒性藥物合用，治療併發急性肝炎之結核病人。

氯法齊明(Clofazimine)

Clofazimine（原名稱為 B663）係 riminophenazines 類藥物，是於 1954 年合成的抗結核藥物【34】，但是因為在動物試驗無藥效而被擱置【35, 36】，直到被證實對漢生病有療效才再受重視。Riminophenazines 的特性包括：可在單核吞噬細胞的細胞內積累、抗藥性發生率較低、新陳代謝消除緩慢和具抗消炎活性【36】。然而 riminophenazine 抗結核活性的真正機轉，尚未明確證明【35, 36】。可能的作用機轉包括：生成細胞內的過氧化氫；或是與 DNA 的鳥嘌呤鹼基結合，抑制細菌複製【36-39】。重要的是 clofazimine 似乎很少會產生抗藥性【36】，也不會與 riminophenazines 類或其他抗結核藥物產生交互抗藥(cross-resistance)【40】；此外，已證明 clofazimine 可抑制 INH 產生的抗藥性及 in vitro 實驗證明與 INH 有協同作用活性(synergistic activity)【41】。有趣的是 clofazimine 和其他 riminophenazines 類藥物具有在巨噬細胞內運輸藥物獨特的能力【36】。初步瞭解 clofazimine 可用於治療 MDR【34】。

Bedaquiline (TMC-207)

商品名 Sirturo，研發藥廠為 Janssen Pharmaceutica，美國 FDA 在 2012 年 12 月核准上市，屬 diarylquinolines 類，為殺菌型藥物，作用機制是合成抑制劑，抑制結核分枝桿菌的三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate; ATP)，主要用於治療 MDR-TB，臨床試驗 Phase IIb 結果顯示安全性和有效性，Phase III 臨床試驗進行中【44】。

克拉霉素(Clarithromycin)

Clarithromycin 作用是能夠抑制細菌蛋白質的產生，使細菌不能正常生長與繁殖，因而造成細菌的死亡。臨床上大多用於治療幽門螺旋桿菌造成之胃潰瘍【45-46】，有研究指出 Clarithromycin 對非結核分枝桿菌亦有作用因此臨床上常用於治療如 *M. kansasii* 及 *M. avium complex*、*M. fortuitum*、*M. chelonae* 等造成之感染【47-50】，但目前尚無文獻指出 Clarithromycin 對 *M. tuberculosis* 有作用。

Delamanid (Deltyba™)

是由 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd 開發的抗結核藥物，在 2006 年證實對細胞內寄生的結核菌具有殺菌力，於 2014 經「EMA, the Korean Ministry of Health and Welfare」及「the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare」認可，此藥物可加速培養陰轉率及降低死亡率，以改善 MDR-TB 病患的治療成果。Delamanid 是由 nitro-dihydro-imidazooxazole 類的化合物衍生合成，其可破壞甲氧基(methoxy-)及酮基(keto-)黴菌酸(mycolic acids)的生物合成，黴菌酸為 *M. tuberculosis* 細胞壁的成分，無論是對休眠期或複製期的結核菌均具藥物效力。【51】

由於結核病是以複方治療，產生抗藥性之機制相對複雜。目前，仍然持續發現抗藥之表現型與基因型不一致狀況，可能是有混合(mixed)的抗藥與敏感菌株、傳統抗藥性試驗之方法學的不準度等因素。例如：雖然發現某些非 conventional 抗藥性基因突變位點，因為對應之抗藥性不明確，造成病患臨床治療結果不佳【52】。

以上所列藥物皆對 *M. tuberculosis* 具有活性的理論基礎，但實驗及臨床

證據尚有限，建議在現行使用的二線藥物外，進一步探討這些藥物對 MDR 及 XDR *M. tuberculosis* 的抗菌效果。本計畫為了測試藥物的療效，將收集送至疾病管制署分枝桿菌參考實驗室進行確認的 MDR 及 XDR *M. tuberculosis* 菌株。進行一系列的二線藥物及再定義藥物測試，並建置菌株庫。本研究是 population-based 的研究，所以會收集相關的人口學及基本統計資料，進行分析。此外，亦藉此研究進行二線藥物抗藥性監測，瞭解藥物抗藥性趨勢及是否有 TDR 結核病人的產生。

問題狀況及發展需求

由於 MDR 及 XDR 結核病的案例逐年增加及 TDR 結核病案例的報導，已威脅到全球結核病的控制。MDR-TB 的治療困難度高與效果不佳，依據 WHO 指出，於 2013 年已造成 21 萬病患死亡，且治癒率僅達 48%【1】。XDR 結核病可選擇的治療藥物更受到嚴重的限制，所以更難以獲得適當的治療。目前，許多曾被使用在治療 MDR-TB 的二線藥物，多有藥效有限、副作用較大、高昂價格且常供應短缺的限制。因此，世界上絕大多數的抗藥性結核病人仍未受到充分且適當的治療。由於新藥物從研究、實證到上市過程緩慢，但是對於新藥的需求卻是必要與迫切的。因此，確認可有效治療抗藥性結核病的藥物，並使用於臨床治療與管理 MDR-TB 是當務之急。本計畫將以臺灣地區之抗藥性結核病為族群，(1) 檢視現行抗結核藥物對於抗藥性個案之有效濃度，以了解抗藥性菌株之 MIC 是否有上升的趨勢，導致殺菌不完全進而產生抗藥性；(2) 瞭解表現型(phenotypic)抗藥性與相關基因突變的關聯，設計快速及簡易檢測法；(3) 可以提供重新定義藥物之藥物敏感試驗結果，供 MDR 照護團隊參考，評估最適用藥組合以提高 MDR 及 XDR-TB 治癒率嘉惠病人；(4) 可以加強臺灣的 TB 的抗藥性監測，確認是否有 TDR-TB，以評估 DOT-Plus 治療 MDR 等病人的策略成效。

防疫工作之相關性

確認現有試驗使用之藥物最小抑菌濃度之可靠性；分析可能具有效治療 MDR 及 XDR 的新藥物，以利評估臨床適用性，增加治療效果。並利用整合性監測資料。完成 MDR、XDR 及 TDR 結核病抗藥性監測。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。

第一年至第三年研究設計：一、進行 Resazurin Microtiter Assay (REMA)、Sensititre® MYCOTB MIC Plate、BACTEC™MGIT™960 及比例法瓊脂平板藥敏測試方法。二、監測 MDR、XDR 及 TDR 性結核病抗藥性及分布，分年進行個案菌株即時測試。三、建立臺灣用於治療各類病人之抗藥性檢測方法及抗藥性結核個案之藥物 MIC 資料庫。

貳、材料與方法

一、材料：

(一) 收集從 2013/1/1 至 2018/9/15 送驗日期區間，送驗本署多重抗藥 MDR 及 RMP 單一抗藥結核菌株：

本計畫選取本國籍個案，採檢年為 2013 年至 2018 年之檢驗結果，篩選方法為當年度的身分證號碼不重複，如有重複，則選當年的最早採檢日的菌株；如相同個案，但是當年同時有 MDR 及 RR 的菌株，則只選 MDR 菌株。MDR 及 RR 的判定，依據本實驗室分子檢測方法 GenoType MTBDR*plus*，如經分子檢測為 INH 或 RMP 敏感，則依本實驗室操作之傳統瓊脂比例法藥敏試驗結果為最終判定基準。

依據結核病中央傳染病追蹤管理系統及實驗室資料庫取得對應資料，菌株收集包括 MDR、RR 診斷日之菌株(新案)，及 MDR、RR 重開案(舊案)之菌株。

(二) 品管菌株：H37Rv (ATCC® 27294™)標準菌株。

二、方法：

收集臨床分離確認之陽性菌株，次培養於 Löwenstein-Jensen、Middlebrook 7H11 / 7H11 Selective Agar 及 BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube 培養基進行增菌，再次培養於 *p*-nitrobenzoic acid in 7H10 agar 及 BBL™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood，使用解剖顯微鏡檢確認結核菌單一菌種。

(一) 菌種鑑定

在生物安全第三等級(Biosafety level 3, BSL-3)實驗室的生物安全櫃中，以 0.5 µl 之接種環挑出 1 環的菌，放入裝有 500 µL Tris-EDTA 緩衝液的微量離心管中，於乾熱器以 95°C 不活化處理 20 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。

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。

GenoType MTBDRplus 檢測：(1)PCR 反應：配製核酸聚合酶液試劑後，

加入 5 μ L 經 GenoLyse 處理後檢體，進行 PCR 反應。(2)雜交反應：a.將 20 μ L 之 DEN(Denaturation Solution)加入反應盤中之專用溝槽，再加入 20 μ L 之 PCR 核酸產物混和均勻，反應 5 分鐘。加入 1 mL 之 HYB (Hybridization Buffer)。b.放入核酸線性探針反向雜交紙片後，於雜交反應槽反應 45 $^{\circ}$ C，30 分鐘，吸出反應槽內溶液。c.加入 1mL STR (Stringent WMTBCh Solution) 45 $^{\circ}$ C，15 分鐘，吸出 STR。d.加入 1mL RIN (Rinse Solution)，清洗 1 分鐘，吸出 RIN。e.加入 1 mL CON (Conjugate Buffer)，室溫反應 30 分鐘，吸出 CON。f.以 RIN 擺動清洗 1 分鐘 2 次，加入無菌水清洗 1 分鐘。g.加入 SUB(substrate Buffer)，避光靜置至雜交紙片呈色完成。(3)依雜交紙片之顯色位點對照比對表，得到檢體之抗藥性結果。

(二) 藥物敏感性試驗

Middlebrook 7H11 及 Middlebrook 7H10 瓊脂平板比例法(Agar proportion method, APM)

(1) 藥物品項

依據世界衛生組織建議測試藥物品項如下：Isoniazid、Rifampin、Amikacin、Cycloserine、Ethionamide、Kanamycin、Moxifloxacin、PAS、Rifabutin、Capreomycin、Clofazimine 及 Levofloxacin，測試 MDR 結核菌株的藥物感受性結果。

(2) 菌液調製、接種及判讀：

a. 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 McFarland 1.0 測試菌液。接種量需固定，以免影響測試結果。配製 1:100 (10^{-2}) 及 1:10000 (10^{-4}) 稀釋菌液。接種三滴(約 0.1

mL) 之 10^{-2} 菌液至培養基；接種三滴 (約 0.1 mL) 之 10^{-4} 菌液至培養基。接種完成之培養基，置於室溫直到菌液完全被培養基吸附。將培養基個別封入 CO_2 可通透的塑膠袋中，培養於 37°C 、5% CO_2 恆溫培養箱中。

a. 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+； <50 菌落，記錄實際菌落數。

b. 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。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. 第 1 週 (7 天) 判讀是否有污染的細菌、黴菌或任何快速生長的分枝桿菌群。緩慢生長的分枝桿菌也可能在第 2 週的培養出現。感受性結果不能在此時報告，因為有些較具抗藥的菌株，相較於敏感菌株生長緩慢。除非抗藥的菌株在第 2 週已出現，則可報告抗藥性。最後判讀的時間在培養後第 3 週。如果對照組在第 3 週仍未生長，則再培養 3 週加長至 6 週培養時間。當對照組有長足夠量時，只能報告有效的藥。

Sensititre® MYCOTB MIC Plate：

測試藥物含 Amikacin、Cycloserine、Ethionamide、Ethambutol、Isoniazid、Kanamycin、Moxifloxacin、Ofloxacin、PAS、Rifampin、Rifabutin、Streptomycin。調製 McFarland 1.0 菌液，接種 100 μL 菌液至 96 孔微量滴定藥敏測試盤，於 37°C 恆溫培養箱中靜置培養 10 天，判讀濁度以決定最低抑菌濃度。

BACTEC™MGIT™960：

(1) 藥物品項

依據世界衛生組織建議測試藥物品項如下：Amikacin、Cycloserine、Ethionamide、Kanamycin、Moxifloxacin、PAS、Rifabutin、Capreomycin、Clofazimine、Levofloxacin、PZA、Prothionamide、Linezolid 及 Delamanid，測試 MDR 及 RMP 單一抗藥結核菌株的藥物感受性結果。【55】

(3) 菌液調製、接種

取 2 管 PZA 培養管各加 0.8 mL BACTEC™MGIT™960 PZA Supplement，將試管標示藥物名稱，加入 PZA 藥物溶液使種菌後藥物濃度為 100µg/mL，但生長控制組試管不加任何藥物。取 2 管 MGIT 培養管各加 0.8 mL BACTEC™MGIT™960 OADC Supplement，將試管標示藥物名稱，加入各藥物溶液使種菌後藥物濃度依世界衛生組織規範，但生長控制組試管不加任何藥物。

(4) MGIT 960 儀器配置 EpiCenter TB eXiST 軟體進行結果判讀。

(三) 抗藥性監測及統計分析

疾病管制署自 2007 年起，啟動 MDR 病人加強照護計畫，本計畫將由結核病中央個案追蹤管理系統及實驗室資料庫取得對應資料，綜合分析歷年 MDR 及 RR 結核病人抗藥性趨勢，以 Excel 進行資料建檔及圖表製作，統計量計算使用 SAS 9.4 軟體。

參、結果

一、2013-2018 年 MDR 及 RR 抗結核二線藥物藥敏試驗分布型態：

(一) 本計畫在各年份 MDR 個案數，與本署監測系統之確定病例數比較(圖

1)：

共分析 626 個案數。MDR 查詢的日期範圍為 2012/12/30 至 2018/09/15，系統累計數係以發病年計算。RR 登記作業自 2017 年 1 月上路實施，2017 年 RR 有 77 例，其餘年份系統無個案數資訊，尚無法評估 RR 分析數與系統登記數的差異。

本計畫依檢體採檢年計算，2013 年至 2017 年分析之 MDR 個案數 567 筆，以卡方適合度檢定與本署系統登記數 572 筆比較，在各年分布比例一致性，顯示無差異($p = 0.8399, p > 0.05$)；如加入 2018 年分析之 MDR 個案數 59 筆，與本署系統登記數 94 筆一起比較，顯示 2018 年比例尚不一致($p = 0.0247, p < 0.05$)。本計畫分析之 MDR 個案抗結核二線藥敏試驗結果，在 2013 年至 2017 年應具有全國抗藥性結核病抗藥趨勢之代表性。惟 2018 年檢體尚在持續送驗中，根據以往本實驗室收件經驗，預計需在隔(2019)年 4 月，始可收齊前一年採檢之 MDR 菌株檢體收件。

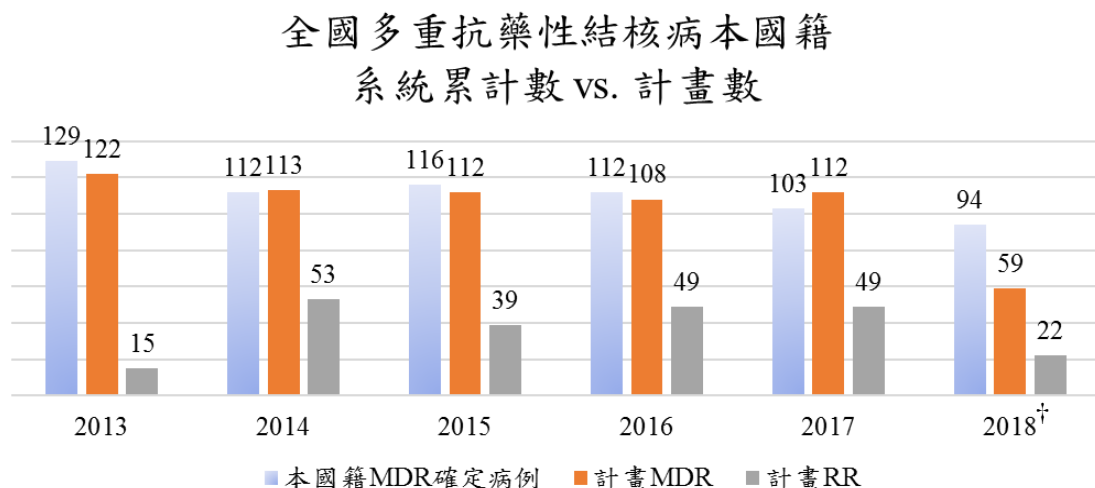


圖 1 全國多重抗藥性結核病本國籍累計數與本計畫執行數比較
MDR 查詢的日期範圍為 2012/12/30 至 2018/09/15，系統累計數係以發病年計算，本計畫數則依檢體採檢年計算。系統資料來源：

<https://nidss.cdc.gov.tw/ch/SingleDisease.aspx?dc=1&dt=2&disease=010m>。†2018 年計畫收件數與本署系統登記數有顯著差異($p < 0.05$)，2013 年至 2017 年計畫數與系統登記數則無顯著差異($p > 0.05$)。

(二) MDR 藥物敏感試驗結果分析：

瓊脂平板比例法測試 2013 年至 2018 年 MDR 結核菌株之藥物敏感性，各藥物抗藥比例(%)結果如

表 1，藥物在不同年份的抗藥比例分布高低，未達統計顯著性差異($p > 0.05$)。藥物抗藥比例(%)分布曲線如圖 2，圖中顯示 2013 年至 2017 年曲線高低亦無規律性，惟 Rifabutin 有雖然緩慢但持續下降的趨勢。

根據世界衛生組織於 2014 年 12 月更新文件之個案定義【56】，本計畫所計算的「重開案」，是指「Previously treated patients or Patients with unknown previous TB treatment history.」，「新案」則是指「New patients have never been treated for TB or have taken anti-TB drugs for less than 1 month.MDR」。結果顯示 MDR 菌株在重開案抗藥比例對新案抗藥比例的比值(Odds ratio)，未達顯著差異($p > 0.05$)。各藥物抗藥比例(%)如表 2。

針劑類(Second-line injectable agents)交叉抗藥如表 3，表 3 - a顯示當 MDR 菌株對 Amikacin 抗藥時，對 Kanamycin 也無一例外的同時有抗藥性；但是，如果是對 Kanamycin 抗藥的菌株，其中卻還有 19.44% (7/36)的菌株對 Amikacin 敏感。表 3 - b顯示 MDR 菌株對 Amikacin 抗藥時，有 34.48% (10/29)的菌株對 Capreomycin 敏感。表 3 - c顯示 MDR 菌株對 Capreomycin 抗藥時，同樣有 17.39% (4/23)的菌株對 Amikacin 及 Kanamycin 敏感。

Fluoroquinolone 類抗生素交叉抗藥如表 4。當 MDR 菌株對低濃度(0.5

µg/mL) Moxifloxacin 抗藥時，有 19.05% (12/63)的菌株對 Levofloxacin 敏感；對高濃度(2.0 µg/mL) Moxifloxacin 抗藥時，還有 8.33% (1/12)的菌株對 Levofloxacin 敏感。對 Moxifloxacin 低濃度抗藥的菌株，有 33.33% (6/18)的菌株對高濃度 Moxifloxacin 敏感。

表 1 2013-2018 年 MDR 結核菌株之藥物抗藥比例(%)

Year (N of MDR) Drug	2013 N = 122	2014 N = 113	2015 N = 112	2016 N = 108	2017 N = 112	2018 N = 59	<i>p</i> -value of χ^2
Amikacin	4.10	6.19	3.57	7.41	4.46	0.00	0.3320
Capreomycin	3.28	2.65	3.57	6.48	3.57	1.69	0.7211*
Kanamycin	4.10	7.96	3.57	11.11	4.46	1.69	0.0628
Levofloxacin	9.02	9.73	11.61	4.63	5.36	8.47	0.3856
Moxifloxacin 0.5	13.93	10.62	13.39	7.41	5.36	8.47	0.2078
PAS	8.20	3.54	7.14	4.63	8.04	6.78	0.6404
Ethionamide	27.87	27.43	28.57	31.48	25.89	23.73	0.9176
Rifabutin	89.34	85.84	89.29	87.04	79.46	77.97	0.1116
PZA	32.79	27.43	30.36	37.04	28.57	32.20	0.6969

*費雪精準檢定結果

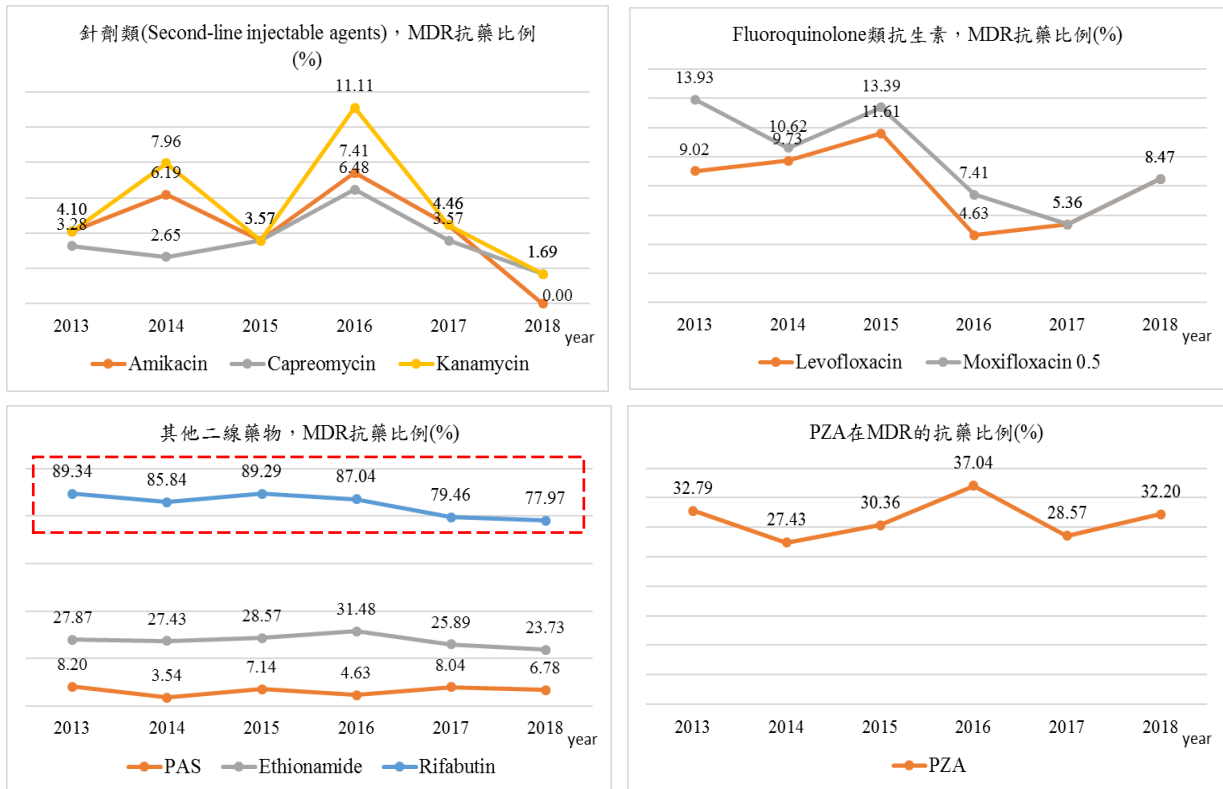


圖 2 多重抗藥(Multidrug-resistant TB, MDR)結核菌株，抗藥比例(%)在不同年份的分布曲線

抗藥比例(%)在不同年份的分布曲線，卡方檢定無顯著差異($p > 0.05$)，然而，Rifabutin(以紅色虛線方框標示)曲線呈現雖然緩慢但下降的趨勢。

表 2 重開 MDR 案 及新 MDR 案對各藥物的抗藥比例比較

Drug	% Resistant, 重開案 ^a	% Resistant, 新案 ^b	<i>p</i> -value of χ^2	Odds Ratio	95% CI		重開案 (n)	新案 (n)
Rifabutin	83.33	88.89	0.16	0.63	0.32	1.22	84	333
Ethionamide	30.95	28.83	0.70	1.11	0.66	1.86	84	333
PAS	4.76	7.21	0.42	0.64	0.22	1.91	84	333
Moxifloxacin 0.5	13.1	12.91	0.96	1.02	0.50	2.07	84	333
Levofloxacin	11.9	9.91	0.59	1.23	0.58	2.61	84	333
Kanamycin	7.14	7.81	0.84	0.91	0.36	2.28	84	333
Capreomycin^c	4.76	5.11	0.50	0.93	0.30	2.84	84	333
Amikacin	5.95	6.01	0.99	0.99	0.36	2.72	84	333
PZA	35.71	32.13	0.53	1.17	0.71	1.94	84	333
EMB10	14.49	17.48	0.55	0.80	0.38	1.67	69	286
EMB5	63.27	57.59	0.36	1.27	0.76	2.11	79	323

^a 重開案：Previously treated patients or Patients with unknown previous TB treatment history.

^b 新案：New patients have never been treated for TB or have taken anti-TB drugs for less than 1 month.

^c 費雪精準檢定

表 3 針劑類(Second-line injectable agents)藥物交叉抗藥分析

表 3 - a Kanamycin vs. Amikacin

Kanamycin	Amikacin		Total
	Resistant (row %)	Susceptible (row %)	
Resistant	29 (80.56)	7 (19.44)	36
Susceptible	0	590 (100)	590
Total	29	597	626

Amikacin	Capreomycin		Total
	Resistant (row %, column %)	Susceptible (row %, column %)	
Resistant	19 (65.52, 82.61)	10 (34.48, 1.66)	29
Susceptible	4 (0.67, 17.39)	593 (99.33, 98.34)	597
Total	23	603	626

表 3 - b Amikaacin vs. Capreomycin

表 3 - c Capreomycin vs. Amikacin & Kanamycin

Capreomycin	Amikacin		Kanamycin	
	Resistant (Row %)	Susceptible (Row %)	Resistant (Row %)	Susceptible (Row %)
Resistant	19 (82.61)	4 (17.39)	19 (82.61)	4 (17.39)
Susceptible	10 (1.66)	593 (98.34)	17 (2.82)	586 (97.18)
Total	29	597	36	590

*費雪精準檢定， $p < 0.0001$

表 4 Fluoroquinolone 類抗生素交叉抗藥分析

Moxifloxacin 0.5	Levofloxacin		Total
	Resistant (row %)	Susceptible (row %)	
Resistant	51 (80.95)	12 (19.05)	63
Susceptible	0	563 (100)	563
Total	51	575	626
Moxifloxacin 2.0	Levofloxacin		Total
	Resistant (row %)	Susceptible (row %)	
Resistant	11 (91.67)	1 (8.33)	12
Susceptible	5 (1.96)	250 (98.04)	255
Total	16	251	267
Moxifloxacin 0.5	Moxifloxacin 2.0		Total
	Resistant (row %)	Susceptible (row %)	
Resistant	12 (66.67)	6 (33.33)	18
Susceptible	0	249 (100)	249
Total	12	255	267

*費雪精準檢定， $p < 0.0001$

(三) RR 藥物敏感試驗結果分析：

共分析 227 個案數。以標準瓊脂平板法(Agar proportion method, APM)藥物敏感性試驗，測試 2013 年至 2018 年，Rifampin 單一抗藥結核菌株之藥物敏感性，各藥物抗藥比例(%)分布，比較 MDR 及 RR 菌株在各藥物的抗藥比例之異同，結果顯示如表 5 及圖 3。

其中，EMB 藥物敏感性結果來自臨床實驗室，有部份未提供藥敏結果，因此，EMB 低濃度(5 $\mu\text{g/mL}$)分析 204 個案，EMB 高濃度(10 $\mu\text{g/mL}$)分析

188 個案。

由 Odds Ratio 的計算結果，顯示 MDR 個案在二線藥針劑類與 Fluoroquinolone 類抗生素抗藥是 RR 個案的 0.96 至 17.58 倍，95%信賴區間下限接近 1 倍，抗藥比例最低可能無差異，最高達 17.58 倍。整體數字顯示，在二線藥針劑類、Fluoroquinolone 類抗生素、Ethionamide 及一線藥 PZA、EMB 的抗藥比例，MDR 個案均比 RR 高，卡方檢定達統計顯著差異， $p < 0.05$ 。

依據世界衛生組織在 2018 年發表，使用於治療抗藥性結核病個案的藥敏試驗技術指引文件【55】，PZA 及 EMB 使用於 D 類「Add-on agents」，本研究結果顯示 PZA、低濃度 EMB 及高濃度 EMB 藥物在 MDR 個案的抗藥個案數是 RR 個案的抗藥個案數的 9.90、34.53 及 33.50 倍，95%信賴區間下限均在 4 倍以上，而高濃度 EMB 相較於低濃度 EMB 有較低的抗藥比例，顯示如果增加 EMB 的藥物濃度，仍然有 84.81%的 MDR 菌株對 EMB 有藥物敏感性。

在 MDR 及 RR 同為 Rifampin 抗藥下，顯示 Rifamycin 類藥物交叉抗藥的影響下，僅有 < 20%的 Rifabutin 藥敏試驗結果為敏感。

MDR 的個案在 *inhA* 或 promoter region 發生突變時，可能導致 Ethionamide 與 INH 的交叉抗藥，本研究以標準瓊脂平板法(Agar proportion method, APM)藥物敏感性試驗測試交叉抗藥比例為 27.80%。

RR 結核菌株在新案及重開案之抗藥比例依表 2 之藥物品項比較，只有 Rifabutin 達顯著差異($p = 0.0017$, $p < 0.05$)，在新案的抗藥比例為 93.07%，而重開案的比例為 64.71%，新案對 Rifabutin 的抗藥比例顯著高於重開案。

其餘藥物在新案及重開案之抗藥比例，卡方檢定未達顯著差異($p > 0.05$)。

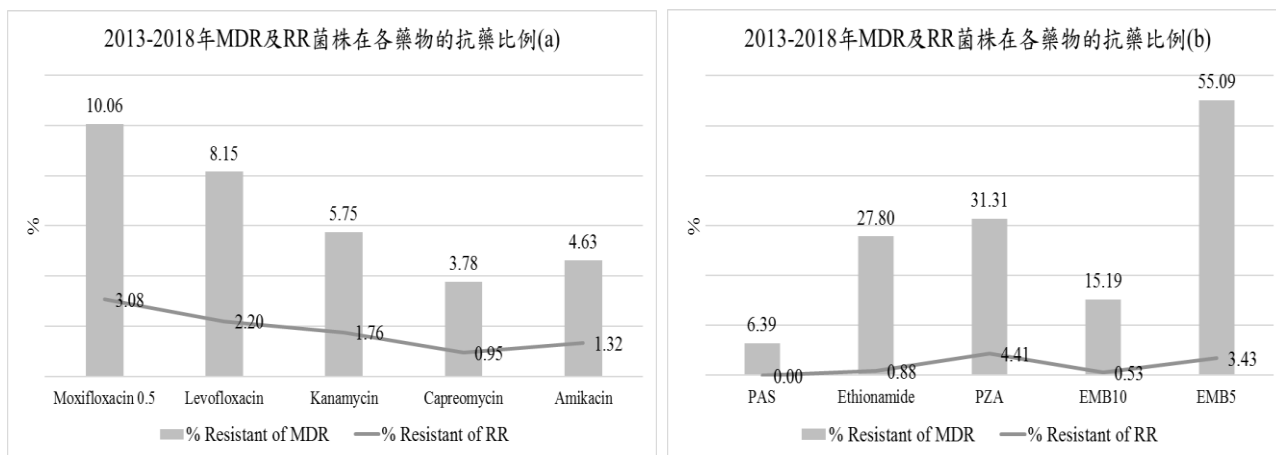


圖 3 比較 MDR 及 RR 菌株在各藥物的抗藥比例

Drug	% Resistant of MDR	% Resistant of RR	p-value of χ^2	Odds Ratio	95% CI	Number of MDR	Number of RR
Rifabutin	85.46	86.34	0.7425	0.93	0.60 1.44	626	227
Ethionamide	27.80	0.88	<.0001	43.31	10.65 176.15	626	227
PAS	6.39	0.00	<.0001	-	-	626	227
Moxifloxacin 0.5	10.06	3.08	<.0001	3.52	1.59 7.80	626	227
Levofloxacin	8.15	2.20	<.0001	3.94	1.55 10.00	626	227
Kanamycin	5.75	1.76	0.0018	3.40	1.20 9.67	626	227
Capreomycin	3.78	0.95	0.0392	4.11	0.96 17.58	626	227
Amikacin	4.63	1.32	0.0034	3.63	1.09 12.02	626	227
PZA	31.31	4.41	<.0001	9.90	5.13 19.06	626	227
EMB 10	15.19	0.53	<.0001	33.50	4.63 242.56	520	188
EMB 5	55.09	3.43	<.0001	34.53	15.96 74.68	579	204

表 5 比較 MDR 及 RR 菌株在各藥物的抗藥比例

二、液態藥敏試驗方法學評估：

(一) BACTECTTMMGITTM960 快速液態藥物敏感性試驗：

收集之 626 株 MDR 及 227 株 RR 個案菌株，其中有進行

BACTEC™MGIT™960 快速液態藥物敏感性試驗之筆數，最多 Amikacin 206 筆，最少 Levofloxacin 67 筆。以標準瓊脂平板法藥敏結果為黃金標準，評估液態藥敏的敏感性(sensitivity)、特異性(specificity)、陽性預測值(positive predictive value)、陰性預測值(negative predictive value)及正確率(accuracy)，測試檢體數及結果如表 6，測試臨界濃度(單位：μg/mL)符合世界衛生組織於 2018 年更新之技術指引【55】規範。

表 6 結果顯示，抗藥株及敏感株在二線藥針劑類與 Fluoroquinolone 類抗生素正確率分別為最低 95.83%，最高 99.03%，在 Ethionamid 正確率只有 48.81%。prothionamide 與 ethionamide 為同類藥物，比較 prothionamide 與 ethionamide 的一致性，只有 52.04%，prothionamide 尚未有瓊脂平板培養基標準臨界濃度建議，可供測試結果準確性的客觀評估工具，以 ethionamide 瓊脂平板培養結果僅供參考。

然而，表 6 之陽性預測值(positive predictive value, PPV)最高只有 Capreomycin 的 83.33%，最低為 Ethionamide 的 30.65%，陰性預測值較好，最低 97.18%，最高為 100%。

(二) 二線藥針劑類不一致的結果如下(圖 4)：

Capreomycin 共測試 186 株，液態藥敏結果有 6 株抗藥、180 株敏感。以固態瓊脂法為標準，抗藥(陽性)預測值 83.33%，敏感(陰性)預測值 99.44%。不一致的結果，MGIT 有 1 株偽陽性菌株，基因定序結果 wild type；1 株偽陰性菌株，基因定序突變位點為 *rrs* A1401G。在液態及固態藥敏試驗同為敏感的 179 株中，分子檢驗結果有 1 株在 *MTBDRsl* 有突變位點，其餘 178 株均為 wild type。液態及固態藥敏試驗同為抗藥的 5 株中，基因定序有 4 株抗藥，分別在基因定序 *rrs* A1401G 3 株、C1402T 1 株及 GenoType

MTBDRsl 1 株(圖 4 a)。

Kanamycin 共測試 205 株，液態藥敏結果有 12 株抗藥、193 株敏感。以固態瓊脂法為標準，抗藥(陽性)預測值 58.33%，敏感(陰性)預測值 100%。不一致的結果，MGIT 有 5 株偽陽性菌株，其中 4 株在基因定序突變位點為 *rrs* C1402T 1 株，*eis* g-10c 2 株、c-12t 1 株及 g-10a 1 株，其中 4 株 *eis* 突變位點報告為低程度抗藥，1 株 g-10c 突變位點的 MIC 為 1.2 µg/mL，其餘 MIC 未測試。在液態及固態藥敏試驗同為敏感的 193 株中，分子檢驗結果有 2 株基因定序低程度抗藥，分別在 *eis* c-12t 及 g-10c，其餘 191 株均為 wild type。液態及固態藥敏試驗同為抗藥的 7 株中，分子檢驗結果有 2 株低程度抗藥，分別在基因定序 *eis* g-10a 1 株及 MTBDRsl 1 株，其餘 4 株 *rrs* A1401G 及 MTBDRsl 1 株(圖 4 b)。

Amikacin 共測試 206 株，液態藥敏結果有 7 株抗藥、199 株敏感。不一致的結果，MGIT 有 2 株偽陽性菌株，基因定序結果為 wild type。以固態瓊脂法為標準，抗藥(陽性)預測值 71.43%，敏感(陰性)預測值 100%。在液態及固態藥敏試驗同為敏感的 199 株中，分子檢驗結果均為 wild type。在液態及固態藥敏試驗同為抗藥的 5 株中，分子檢驗結果在 MTBDRsl 1 株抗藥、4 株 *rrs* A1401G 突變位點(圖 4 c)。

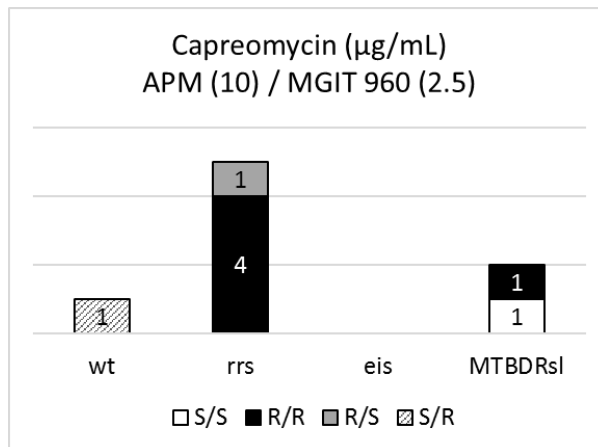


圖 4 a Capreomycin

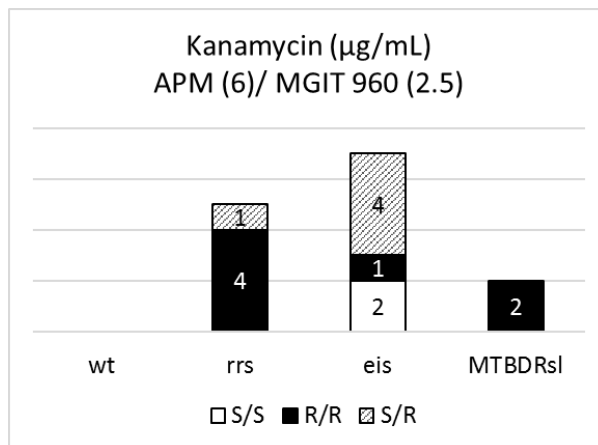


圖 4 b Kanamycin

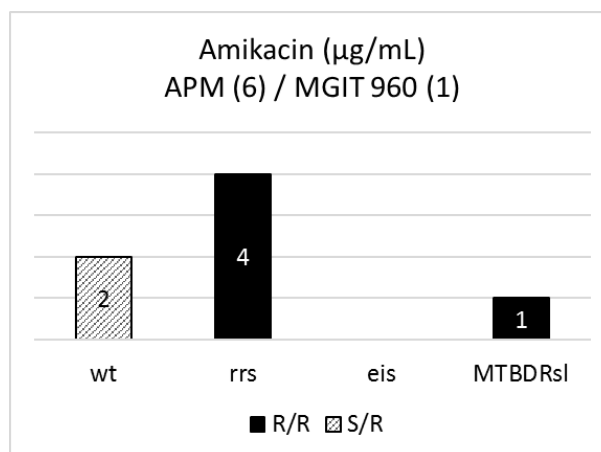


圖 4 c Amikacin

圖 4 二線藥針劑類固態瓊脂法(APM)與液態法(MGIT 960)藥敏及基因分析結果

(三) Fluoroquinolone 類不一致的結果如下：

Levofloxacin 於 2018 年依世界衛生組織指引【55】，將 MGIT 法的臨界濃度由改版前的 2012 年草案版 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 【57】，改為 2018 年確定版的 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 【55】。

Levofloxacin 新版濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共測試 67 株，液態藥敏結果有 5 株抗藥、62 株敏感。以固態瓊脂法為標準，抗藥(陽性)預測值 80.0%，敏感(陰性)預測值 100%。不一致的結果，MGIT 有 1 株偽陽性菌株，二線藥定序結果 *gyrA* 基因 GAC/GGC D94A 突變位點，*gyrB* 基因為 wild type，報告為抗藥，定序與液態法相同為抗藥，固態瓊脂法為敏感。Sensititer®商用試劑，最低抑菌濃度(MIC)未測試此項藥物。在固態法與液態法結果同為敏感的 62 株中，有 1 株定序結果抗藥，為 *gyrA* 基因 D94A 突變位點。1 株定序 *gyrA* 基因 TCG/CCG S76P，結果無法判定。在液態及固態藥敏試驗同為抗藥的 4 株中，分子檢驗結果 4 株 *gyrA* D94G 突變位點(圖 5 a)。

Levofloxacin 液態舊版濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共測試 173 株，液態藥敏結果有 9 株抗藥、164 株敏感，與固態瓊脂法結果 100%一致，9 株抗藥之定序結果，9 株均為 *gyrA* 基因 GAC/GGC D94G 突變位點，*gyrB* 基因為 wild type，報告為抗藥。液態及固態藥敏試驗同為敏感的 164 株中，分子檢驗有 3 株定序結果抗藥，分別為 1 株 *gyrB* 基因 GGG/AGG G551R 突變位點，MIC = 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (其他商用 MIC 試劑)；2 株 *gyrA* 基因 D94A 突變位點，未測試 MIC。1 株定序 *gyrA* 基因 TCG/CCG S76P，結果無法判定(圖 5 b)。

Levofloxacin 新版液態濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與舊版液態濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比較 66 株，以舊版液態 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 為標準，測試新版液態 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有 5 株抗藥、61 株敏感。不一致的結果 1 株偽陽性，定序結果 *gyrA* 基因 D94A 突變位點，

gyrB 基因為 wild type，報告為抗藥，定序與新版濃度 1.0 µg/mL 相同為抗藥，舊版液態 1.5 µg/mL 為敏感。在液態新舊法結果同為敏感的 61 株中，有 1 株定序結果抗藥，為 *gyrA* 基因 D94A 突變位點。在液態及固態藥敏試驗同為抗藥的 4 株中，分子檢驗結果 4 株 *gyrA* D94G 突變位點(圖 5 c)。

Moxifloxacin 與 Levofloxacin 相同有新舊版本問題，於 2018 年依世界衛生組織指引【55】，將 MGIT 法的臨界濃度(Critical concentrations, CCs)由改版前的 2012 年草案版 0.5 µg/mL【57】，改為 2018 年確定版的 0.25 µg/mL【55】，另外，在高濃度(Clinical breakpoint, CBs)則由舊版的 2.0 µg/mL 改為新版的 1.0 µg/mL。

Moxifloxacin 新版低濃度 0.25 µg/mL 共測試 73 株，液態藥敏結果有 6 株抗藥、67 株敏感。不一致的結果有 2 株偽陽性菌株，二線藥定序結果均為 *gyrA* 基因 GAC/GCC D94A 突變位點，*gyrB* 基因為 wild type，報告為抗藥，定序與液態法相同為抗藥，固態瓊脂法為敏感。其中 1 株為與前述 Levofloxacin 1.0 濃度之不一致結果為相同菌株。Sensititer®商用試劑，最低抑菌濃度(MIC)未測試。以固態瓊脂法為標準，液態濃度 0.25 µg/mL 之抗藥(陽性)預測值 66.67%，敏感(陰性)預測值 100%。在液態及固態藥敏試驗同為敏感的 67 株中，分子檢驗結果除了 1 株無法判定，其餘均為 wild type。在液態及固態藥敏試驗同為抗藥的 4 株中，分子檢驗結果 4 株 *gyrA* D94G 突變位點(圖 5 d)。

Moxifloxacin 液態舊版低濃度 0.5 µg/mL 共測試 204 株，液態藥敏結果有 9 株抗藥、195 株敏感，與固態瓊脂法比較，MGIT 不一致的結果有 1 株偽陰性菌株，二線藥定序結果為 wild type，報告為敏感，定序與液態法相同為敏感，固態瓊脂法為抗藥。在液態及固態藥敏試驗同為敏感的 194 株

中，分子檢驗有 3 株定序結果抗藥，分別為 1 株 *gyrB* 基因 GGG/AGG G551R 突變位點，MIC = 0.12 µg/mL；2 株 *gyrA* 基因 D94A 突變位點，未測試 MIC。1 株定序 *gyrA* 基因 TCG/CCG S76P，結果無法判定。在液態及固態藥敏試驗同為抗藥的 9 株中，分子檢驗結果均為 *gyrA* D94G 突變位點(圖 5 e)。

Moxifloxacin 新版高濃度 1.0 µg/mL 共測試 72 株，液態藥敏結果有 1 株抗藥、71 株敏感。與固態瓊脂法比較，不一致的結果有 1 株偽陽性菌株，二線藥定序結果 *gyrA* 基因 GAC/GGC D94G 突變位點，*gyrB* 基因為 wild type，報告為抗藥，定序與液態法相同為抗藥，固態瓊脂法為敏感。Sensititer® 商用試劑 MIC = 8 µg/mL。2 株偽陰性菌株，二線藥定序結果均為 *gyrA* 基因 GAC/GGC D94A 突變位點，*gyrB* 基因為 wild type，報告為抗藥，定序與固態瓊脂法相同為抗藥。以固態瓊脂法為標準，液態濃度 1.0 µg/mL 之敏感(陰性)預測值 97.18%。在液態及固態藥敏試驗同為敏感的 69 株中，分子檢驗有 3 株 *gyrA* 定序結果抗藥，分別為 D94A 突變位點 2 株、D94G 突變位點 1 株，D94G 的 MIC = 8 µg/mL，D94A 未測試 MIC。1 株定序 *gyrA* 基因 TCG/CCG S76P，結果無法判定(圖 5 f)。

Moxifloxacin 液態舊版高濃度 2.0 µg/mL 測試 205 株，結果均為敏感。5 株偽陰性，定序結果均為 *gyrA* 基因 D94G 突變位點，*gyrB* 基因為 wild type，報告為抗藥，定序與固態瓊脂法相同為抗藥。Sensititer® 商用試劑有測試其中 3 株，分別為 2 株 MIC ≤ 0.06 µg/mL，1 株 MIC = 8 µg/mL。在固態法與液態法結果同為敏感的 200 株中，有 7 株定序結果抗藥，分別為 1 株 *gyrB* 基因 GGG/AGG G551R 突變位點，MIC = 0.12 µg/mL；6 株 *gyrA* 基因中，4 株 D94G、2 株 D94A 突變位點，MIC 分別為 2 株 MIC = 4 µg/mL、2 株 MIC = 8 µg/mL。1 株定序 *gyrA* 基因 TCG/CCG S76P，結果無法判定(圖 5 g)。

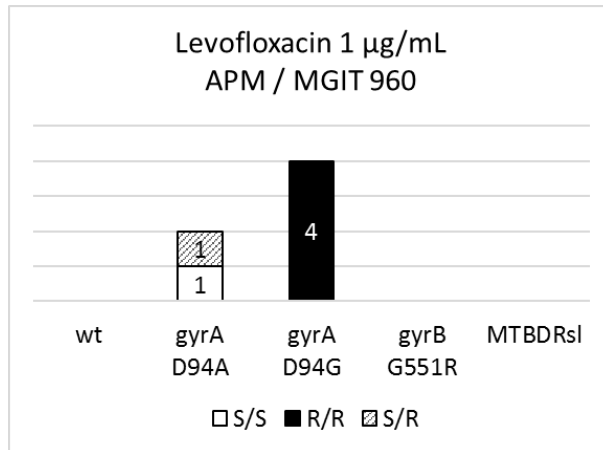


圖 5 a Levofloxacin (APM/MGIT, 1/1 µg/mL)

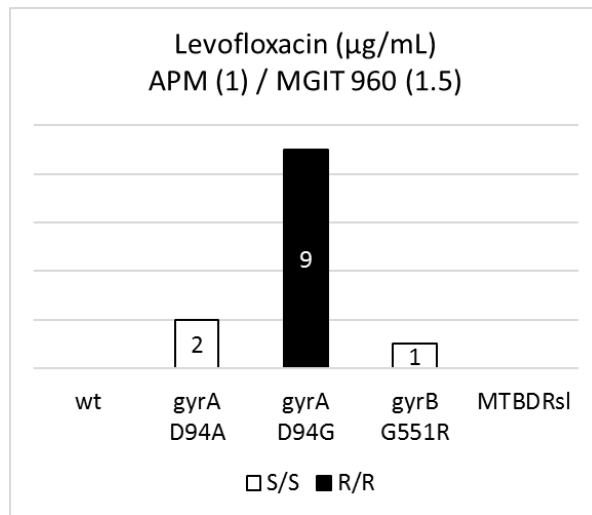


圖 5 b Levofloxacin (APM/MGIT, 1/1.5 µg/mL)

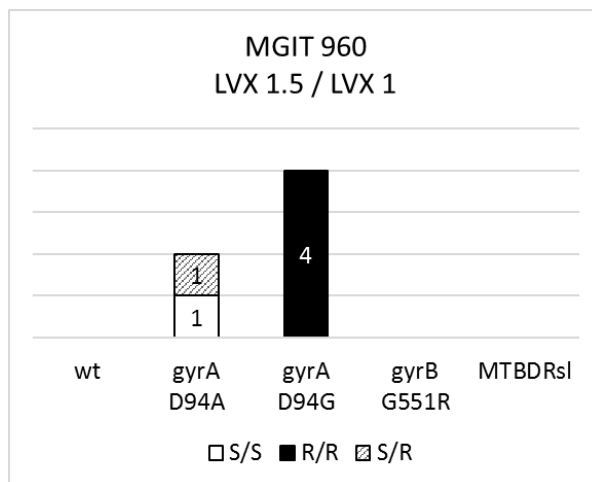


圖 5 c Levofloxacin (MGIT 1.5/MGIT 1 µg/mL)

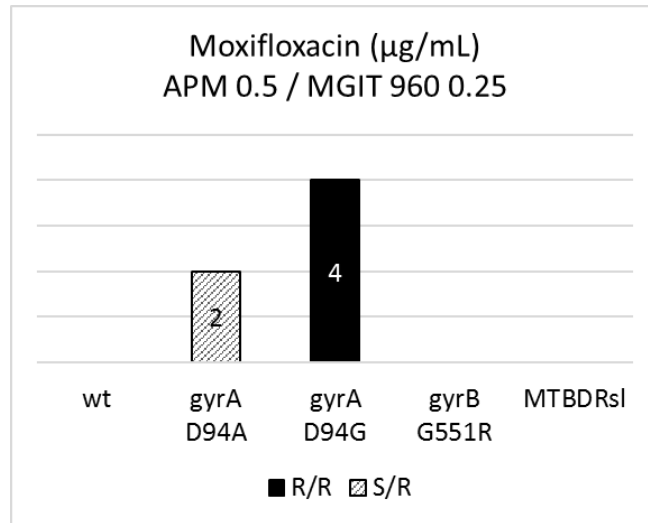


圖 5 d Moxifloxacin (APM/MGIT, 0.5/0.25 $\mu\text{g/mL}$)

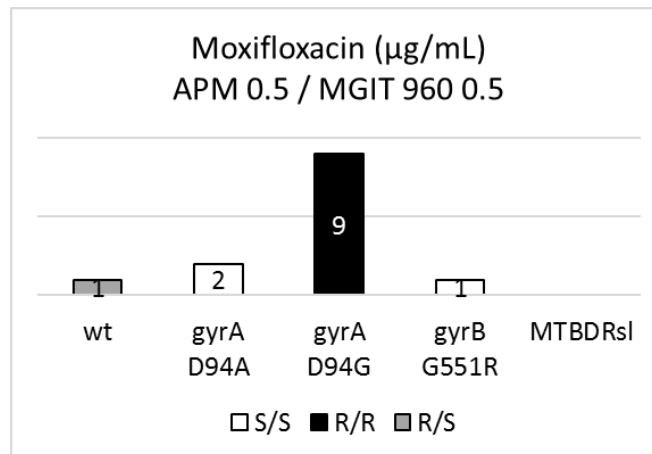


圖 5 e Moxifloxacin (MGIT 0.5/MGIT 0.5 $\mu\text{g/mL}$)

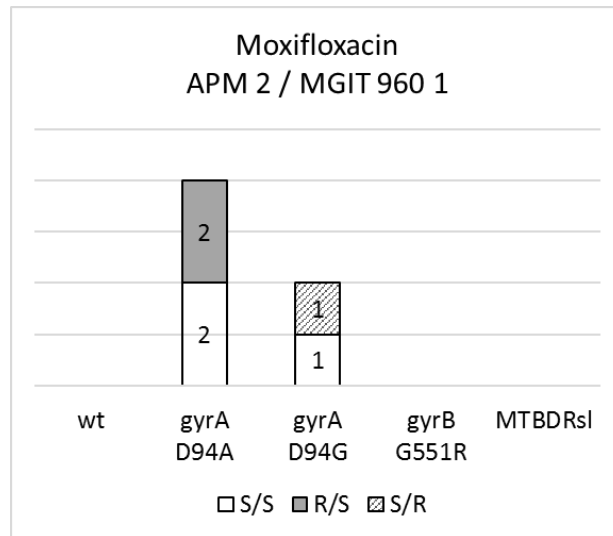


圖 5 f Moxifloxacin (APM/MGIT, 2/1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

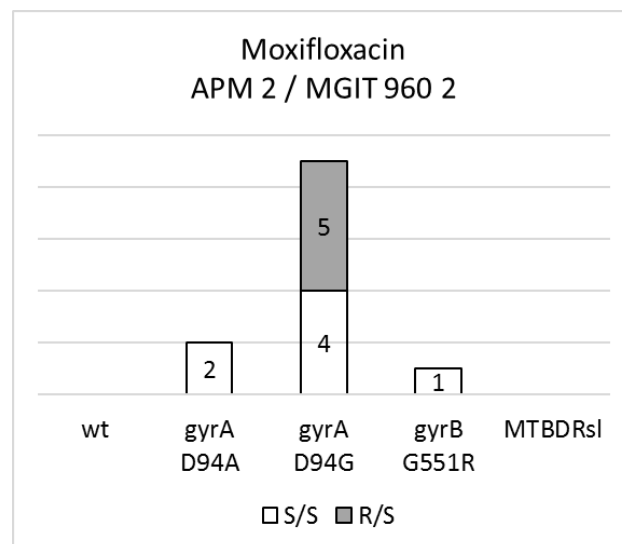


圖 5 g Moxifloxacin (APM/MGIT, 2/2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

圖 5 Fluoroquinolone 固態瓊脂法(APM)與液態法(MGIT 960)藥敏及基因分析結果

表 6 MGIT 快速液態藥物敏感性試驗與標準瓊脂比例法藥敏試驗比較

MGIT™ 960 system (µg/mL)		Agar proportion (µg/mL)		Total	Sensitivity ^d %	Specificity ^d %	PPV ^d %	NPV ^d %	Accuracy ^d %	p-value
		Resistant	Susceptible							
		Levofloxacin 1								
Levofloxacin 1	Resistant	4	1	67	100.00%	98.41%	80.00%	100.00%	98.51%	<.001
	Susceptible	0	62							
		Moxifloxacin 0.5								
Moxifloxacin 0.25	Resistant	4	2	73	100.00%	97.10%	66.67%	100.00%	97.26%	<.001
	Susceptible	0	67							
		Moxifloxacin 2								
Moxifloxacin 1	Resistant	0	1	72	0.00%	98.57%	0.00%	97.18%	95.83%	0.865
	Susceptible	2	69							
		Capreomycin 10^a								
Capreomycin 2.5	Resistant	5	1	186	83.33%	99.44%	83.33%	99.44%	98.92%	<.001
	Susceptible	1	179							
		Kanamycin 6^a								
Kanamycin 2.5	Resistant	7	5	205	100.00%	97.47%	58.33%	100.00%	97.56%	<.001
	Susceptible	0	193							
		Amikacin 6^b								
Amikacin 1	Resistant	5	2	206	100.00%	99.00%	71.43%	100.00%	99.03%	<.001
	Susceptible	0	199							
		p -aminosalicylic acid 8^a								
p -aminosalicylic acid 4^c	Resistant	7	5	171	77.78%	96.91%	58.33%	98.74%	95.91%	<.001
	Susceptible	2	157							
		Ethionamide 10								
Ethionamide 5	Resistant	19	43	84	100.00%	33.85%	30.65%	100.00%	48.81%	0.003
	Susceptible	0	22							
		Ethionamide 10								
Prothionamide 2.5	Resistant	37	94	196	100.00%	40.88%	28.24%	100.00%	52.04%	<.001
	Susceptible	0	65							

^a Clinical and Laboratory Standards Institute, USA.

^b National Jewish Health, USA

^c WHO, interim critical concentrations (May 2012).

^d Sensitivity = true positive / (true positive + false negative). Specificity = true negative / (false positive + true negative). Positive predictive value (PPV) = true positive / (true positive + false positive). Negative predictive value (NPV) = true negative / (false negative + true negative). Accuracy = (true positive + true negative) / total samples.

肆、討論

MDR 結核菌株在二線針劑類、Fluoroquinolone 類抗生素、*p*-aminosalicylic acid、Rifabutin、Ethionamide、PZA、低濃度及高濃度 EMB 藥物的抗藥比例，不同年份的分布高低未達統計顯著差異。由各年份的曲線分布趨勢顯示，Rifabutin 仍有雖然緩慢，但持續下降的趨勢。藉由分析 2013 至 2018 年的抗藥比例趨勢，了解在 MDR 菌株並無顯著上升情形，在控制抗藥性結核病的努力下，正持續穩定中。

比較 MDR 及 RR 菌株在各藥物的抗藥比例之異同，同類藥物交叉抗藥在 Rifampin 抗藥時，仍有約 13% 的 MDR 及 RR 菌株對 Rifabutin 敏感。在 Moxifloxacin 抗藥時，仍有 21.67% 的 MDR 菌株對 Levofloxacin 敏感，PZA 及 EMB 使用於世界衛生組織建議之 D 類「Add-on agents」，有 68.75% 的 MDR 菌株對 PZA 敏感，EMB 的部份，僅有 43.91% 的 MDR 菌株對低濃度 EMB(5 µg/mL)敏感，如果提高到高劑量 EMB，則有 84.74% 的 MDR 菌株對高濃度 EMB(10 µg/mL)敏感。

大部份的二線針劑類藥物交叉抗藥發生在 *rrs* 基因的突變。文獻顯示【53】，同類藥物交叉抗藥的情形並非一定，但是，一般而言，對 Amikacin 抗藥的菌株，對 Kanamycin 也會抗藥，但是對 Capreomycin 則不一定也抗藥。反之，對 Kanamycin 抗藥的菌株，通常對 Amikacin 抗藥，但對於 Capreomycin 則僅為可能抗藥。對 Capreomycin 抗藥的菌株，不一定對 Kanamycin 或 Amikacin 抗藥。本計畫二線針劑類藥物交叉抗藥的情形，與文獻所敘述相符。另外，對 Streptomycin 抗藥的菌株，除非之前有用過前述二線針劑類藥物，則通常對這些藥物仍為敏感。Amikacin 易於取得，通常是針劑類藥物的第一選擇，對於 Capreomycin 則保留於對 Amikacin 抗藥、

及 XDR-TB、聽覺障礙及懷孕的 MDR 病人。【53】

Ethionamide (ETH)及 prothionamide (PTH)屬於 thioamides 類，已有證實顯示對臨床研究的有效性，並且是治療 MDR、成人及兒童結核性腦膜炎病人的重要組合藥物之一。在 inhA 或 promoter region 發生突變時，可能導致 Ethionamide 與 INH 的交叉抗藥【54】，本研究顯示交叉抗藥比例在 27.8%，仍有大部份的病人仍適用於此類藥物。

液態藥敏試驗可提供較快速的定量及定性表現型藥敏試驗結果，供臨床更快的決定選擇用藥，世界衛生組織(WHO)在 2018 年發表的藥敏試驗技術指引文件中【55】，液態的部份建議使用 MGIT 商品化培養基操作二線藥敏。MGIT 液態與現行標準固態瓊脂法一樣，依據菌株在單一藥物臨界濃度(critical concentrations, CCs)下的生長與否，決定為抗藥株或敏感株；除了臨界濃度(CCs)外，在 moxifloxacin 還有高濃度(clinical breakpoints, CBs)的建議，提供治療指引。

在 2018 年的指引文件【55】，將 levofloxacin 的臨界濃度(CCs)及 moxifloxacin 的臨界(CCs)、臨床濃度(CBs)都進行了調降，實驗室因此有必要與原依據 2012 年舊版的濃度進行藥敏結果的平行比對，尤其是 MGIT 因為這份文件，於 2018 年成為 WHO 唯一建議(proposed)使用於抗結核二線藥物試驗的標準法(reference method)。

MGIT 在與標準固態瓊脂法比較時，其不一致的部份，在抗結核二線針劑類結果，偽陽性有 Capreomycin 1 株、Kanamycin 5 株及 Amikacin 2 株，對照基因定序結果均判定為 wild type，基因定序結果在 Capreomycin 及 Amikacin 與固態瓊脂法所判定之敏感結果一致；偽陰性有 Capreomycin 1 株，同樣在基因定序結果與固態瓊脂法所判定之抗藥結果一致。2 種方法學

在一致判定為敏感的部份，與基因定序的結果均一致。MGIT 作為 WHO 所建議的二線藥試驗的參考方法，似乎需要再多些評估。在二線藥針劑類的藥敏測試上，基因分析的方法與標準固態瓊脂法較為一致。

MGIT 在與標準固態瓊脂法比較時，其不一致的部份，在 Fluoroquinolones 類，Levofloxacin 濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 判讀為抗藥共 5 株，與定序結果均為一致，其中 1 株在標準固態瓊脂法判為敏感。Levofloxacin 因為由原先 2012 年 WHO 草案建議之濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，於 2018 年調降至濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，造成易於判讀為抗藥，因為，此菌株同樣有平行比對 MGIT 濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其 MGIT 結果與標準固態瓊脂同為敏感。如果參考這個不一致菌株的基因定序 *gyrA* D94A 突變位點之抗藥判定，又 WHO 在 2018 年將 Levofloxacin 臨界濃度(CCs)調降，也因此使得菌株在表現型上與基因分析結果較為一致。

本研究顯示，在 Levofloxacin 濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MGIT 液態與瓊脂固態同為敏感的 62 株菌株，有 1 株在 *gyrA* 基因 D94A 突變位點，如果是 Levofloxacin 濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MGIT 液態與瓊脂固態同為敏感的 164 株菌株，有 3 株分別在 1 株 *gyrB* 基因 GGG/AGG G551R 突變位點，但是 MIC 為 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，比臨界濃度低；2 株 *gyrA* 基因 D94A 突變位點，則未測試 MIC。基因分析比液態 MGIT 表現型方法，更易於將菌株判讀為抗藥。

抗藥的結果使得臨床治療更改藥物或調整劑量，是否因此提高病人的治療成功率，可能只能由病人治療的長期追蹤來評估。在 Fluoroquinolones 類的藥敏測試上，基因分析的方法是否與 MGIT 液態法較為一致，因為本研究僅有 1 株，因此需要在後續的藥敏試驗，以搜集較多的抗藥株進行分析。

在 Moxifloxacin 有臨界濃度(CCs)及臨床濃度(CBs)，臨床濃度為高濃度的部份，當臨界濃度(CCs)測試結果為抗藥，臨床濃度(CBs)為敏感時，臨床上可能可以將藥物劑量提高，使病人可以繼續使用這項藥物。MGIT Moxifloxacin 與瓊脂固態法的比較及基因分析結果，與 Levofloxacin 有類似的情形，MGIT 法與基因分析結果較為一致，比固態瓊脂法易於將菌株判定為抗藥，而基因分析法，又比 MGIT 法，將較多的菌株判定為抗藥。同樣，在 2018 年 WHO 指引文件【55】，同時將 Moxifloxacin 的臨界濃度及臨床濃度調降，也因此較低的藥物濃度下，有較多的抗藥菌株。

本研究顯示 MGIT 液態法在與標準固態瓊脂法比較時，正確率 (accuracy)除了 ethionamide 48.81%及 prothionamide 52.04%外，均在 95%以上。但是，在陽性(抗藥)及陰性(敏感)預測值則有差異，在陰性預測值有最低 97.18%、最高 100%的優良表現，即使是定性、定量藥敏結果不穩定的 PAS、Ethionamide 及 Prothionamide，也有 98.74% - 100%的陰性預測值。

然而，使用於 MDR 及 RR 病人的重要的藥物，Fluoroquinolones 類及針劑類藥物的陽性預測值在 MGIT 液態法，最高只有 Capreomycin 的 88.33%，Kanamycin 最低為 58.33%。預測值高低表示新方法學與原方法或標準法的一致率的高低，對於臨床治療的解讀是當實驗室報告為敏感時，菌株可能為抗藥的機率低，反之，當實驗室報告為抗藥時，菌株可能為敏感的機率高。對於實驗室而言，可以有信心的發出試驗敏感的報告，但是當試驗結果為抗藥時，則須謹慎評估可能是偽陽性。

就抗結核二線藥物試驗而言，表 6 整體數據顯示，MGIT 液態藥敏比標準固態瓊脂藥敏，MGIT 更易於系統性的把菌株判定為抗藥株。採用或更改不同的方法學，除了對於病人的治療，對於全國抗藥趨勢數據的浮動，其

影響尚待評估。

有鑑於實驗室方法學的重要性，WHO 每年一次由其參考實驗室製備能力試驗菌株提供全球有參加的國家，進行一及二線藥物表現型及基因型能力試驗，本實驗室歷年表現均是優良，操作技術的穩定性，對於病人治療及公衛監測，均有重要影響。

除了操作技術的穩定性因素外，試劑供應的易於取得、運輸及使用者的便利性是做為常規檢驗的必要因素，商用液態 MGIT 法試劑的穩定性比起自行配製藥物預期有更優良的品質，然而，WHO 指引文件中【55】，將 Moxifloxacin 濃度調整為 0.25 µg/mL 及 1.0 µg/mL，卻不同於已經上市的 BD BACTEC™ MGIT™ 960 二線藥試驗試劑套組 Moxifloxacin 濃度 0.5 µg/mL 及 2.0 µg/mL，套組另有 Ofloxacin 2.0 µg/mL、Kanamycin 2.5 µg/mL、Capreomycin 2.5 µg/mL 及 Amikacin 1.0µg/mL。MGIT 液態法做為 WHO 建議之二線藥物測試標準方法，在 WHO 建議的 A 類及 B 類藥物中，套組內尚缺乏 Levofloxacin，而 Moxifloxacin 的濃度也需修正。套組提供的 Ofloxacin 在指引文件已刪除，並建議實驗室轉換至目前有在治療指引所列的 Fluoroquinolones 類如 Levofloxacin、Moxifloxacin 及 Gatifloxacin。

在 MGIT 儀器設備的判讀上，二線藥物必需配置 BD EpiCenter™ TB eXiST 軟體，eXiST 全名為「Extended individual susceptibility testing」，其目的為因應使用者需求而設計的二線藥判讀軟體，可以操作任何待測之抗結核藥物，培養天數可依結核菌實際生長情況做延長，測試藥物品項及濃度可依需求進行撰寫建置，非常適合於研究型實驗室，在常規之醫療實驗室時，如果測試藥物要自行配製，在實務上可能較難達成。

伍、結論與建議

- 一、本研究分析 2013 年至 2017 年之 MDR 個案數與本署系統登記數的差異未達統計顯著性，藥物敏感性分析結果應具有代表性。
- 二、藉由分析 2013 至 2018 年的抗藥比例趨勢，了解在 MDR 菌株並無顯著上升情形，在控制抗藥性結核病的努力下，正持續穩定中。
- 三、二線針劑類藥物交叉抗藥的情形對 Amikacin 抗藥的菌株，對 Kanamycin 也會抗藥，但是對 Capreomycin 則不一定也抗藥。
- 四、Ethionamide 與 INH 的交叉抗藥比例在 27.8%，仍有大部份的病人仍適用於此類藥物。
- 五、在二線藥針劑類的藥敏測試上，基因分析的方法與標準固態瓊脂法較為一致。在 Fluoroquinolones 類，基因分析的方法與液態 MGIT 法於 2018 年調降後的臨界濃度測試結果較為一致。
- 六、就本研究的結果顯示，實驗室使用 MGIT 法測試抗結核二線藥物之針劑類藥物及 Fluoroquinolones 類藥物時，如果測試結果為敏感，可以較有信心的發出試驗敏感的報告，但是當試驗結果為抗藥時，則須謹慎評估可能是偽陽性。
- 七、對於藥敏試驗方法學的評估，當收集更多的抗藥菌株與敏感株數量相當時，對於試驗的陽性(抗藥)預測值，較能提供更準確的評估結果。
- 八、採用或更改不同的方法學，除了對於病人的治療有影響之外，對於全國抗藥趨勢數據的浮動，其影響也尚待評估。

陸、重要研究成果及具體建議

(一) 研究成果

1. 本研究分析 2013 年至 2017 年之 MDR 個案數與本署系統登記數的差異未達統計顯著性，藥物敏感性分析結果應具有代表性。
2. 藉由分析 2013 至 2018 年的抗藥比例趨勢，了解在 MDR 菌株並無顯著上升情形，在控制抗藥性結核病的努力下，正持續穩定中。
3. 顯示二線針劑類藥物交叉抗藥的情形對 Amikacin 抗藥的菌株，對 Kanamycin 也會抗藥，但是對 Capreomycin 則不一定也抗藥，本土抗藥菌株型態與文獻一致。
4. Amikacin 抗藥時，仍有部分 Capreomycin 敏感，其臨界濃度的適當，本研究蒐集 6 株抗藥株與基因定序結果比較，一致性 100%。
5. Ethionamide 與 INH 的交叉抗藥比例在 27.8%，仍有大部份的病人仍適用於此類藥物。
6. 在二線藥針劑類的藥敏測試上，基因分析的方法與標準固態瓊脂法較為一致。在 Fluoroquinolones 類，基因分析的方法與液態 MGIT 法於 2018 年 WHO 調降後的臨界濃度測試結果較為一致。

(二) 具體建議

1. 同類藥物交叉抗藥數據顯示當選擇用藥時，仍有同類有效藥物可使用。
2. 實驗室使用 MGIT 法測試抗結核二線藥物之針劑類藥物及 Fluoroquinolones 類藥物時，如果測試結果為敏感，可以較有信心的發

出試驗敏感的報告，但是當試驗結果為抗藥時，則須謹慎評估可能是偽陽性。對於藥敏試驗方法學的評估，當收集更多的抗藥菌株與敏感株數量相當時，對於試驗的陽性(抗藥)預測值，較能提供更準確的評估結果。

3. 已建立之本土 MDR 菌株 epidemiological cut-off (ECOFF) 流行病學資料庫，亦可做為對新藥敏方法學的輔助評估工具。

柒、參考文獻

1. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). World Health Organization; 2014 update.
http://www.who.int/tb/challenges/mdr/mdr_tb_factsheet.pdf?ua=1.
2. Introduction and rational use of new drugs and drug regimens for TB treatment,
http://www.who.int/tb/publications/newdrugs_factsheet.pdf?ua=1.
3. CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard—Second Edition. CLSI document M24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
4. Mpagama, S.G., et al., Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. *BMC Infect Dis*, 2013. 13: p. 432.
5. Angeby, K.A., 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(5): p. 946-52.
6. Middlebrook G, Cohn ML. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science* 1953; 118: 297–9.

7. Middlebrook G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli; a preliminary report. *Am Rev Tuberc* 1954; 69: 471–2.
8. Zhang Y, Heym B, Allen B et al. The catalase/oxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992; 358:591–3.
9. Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13881–6.
10. Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 215–39.
11. Mitchison DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 1979; 76 Suppl 6: 771–81.
12. Burman WJ, Jones BE. Treatment of HIV-related tuberculosis in the era of effective antiretroviral therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 7–12.
13. Traore H, Fissette K, Bastian I et al. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 481–4.
14. Konno K, Feldmann FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95: 461–9.
15. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 1996; 2: 662–7.
16. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 790–5.
17. Zhang, Y., W. Shi, W. Zhang, and D. Mitchison. 2013. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol. Spectr.* 2:1-12.

18. Takayama K, Armstrong EL, Kunugi KA et al. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 240–2.
19. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S et al. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* 1997; 3: 567–70.
20. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1677–81.
21. Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1987; 327: 389–94.
22. Aubry A, Pan XS, Fisher LM et al. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1281–8.
23. Goss WA, Deitz WH, Cook TM. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 1965; 89: 1068–74.
24. Von Groll A, Martin A, Jure´en P et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4498–500.
25. Sun Z, Zhang J, Zhang X et al. Comparison of *gyrA* gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 115–21.
26. Hegde SS, Vetting MW, Roderick S et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 2005; 308: 1480–3.

27. Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A et al. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1295-7.
28. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3192-7.
29. Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P et al. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5064-8.
30. McClatchy JK, Kanes W, Davidson PT et al. Cross-resistance in *M. tuberculosis* to kanamycin, capreomycin and viomycin. *Tubercle* 1977; 58: 29-34.
31. Johansen SK, Maus CE, Plikaytis BB et al. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell* 2006; 23: 173-82.
32. Vilche`ze C, Av-Gay Y, Attarian R et al. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2008; 69: 1316-29.
33. Lehmann J. para-Aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. *Lancet* 1946; i: 15-6.
34. Clofazimine. *Tuberculosis*. 2008; 88(2): 96-9.
35. Reddy VM, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Antimycobacterial activities of riminophenazines. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1999; 43(5): 615-23.
36. Wadee AA, Anderson R, Rabson AR. Clofazimine reverses the inhibitory effect of *Mycobacterium tuberculosis* derived factors on phagocyte

- intracellular killing mechanisms. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1988; 21(1): 65-74.
37. Morrison NE, Marley GM. The mode of action of clofazimine DNA binding studies. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*. 1976; 44(1-2): 133-4.
 38. Yano T, Kassovska-Bratinova S, Teh JS, Winkler J, Sullivan K, Isaacs A, et al. Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH:quinone oxidoreductase: a pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286(12): 10276-87.
 39. Van Rensburg CE, Joon GK, Sirgel FA, Matlola NM, O'Sullivan JF. In vitro investigation of the antimicrobial activities of novel tetramethylpiperidine-substituted phenazines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemotherapy*. 2000; 46(1): 43-8.
 40. Bulatovic V, Wengenack N, Uhl J, Hall L, Roberts G, Cockerill F, et al. Oxidative stress increases susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002; 46(9): 2765-71.
 41. Van Deun A, Maug AK, Salim MA, Das PK, Sarker MR, Daru P, et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010; 182(5): 684-92
 42. Fouad M, Gallagher JC. Moxifloxacin as an Alternative or Additive Therapy for Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Ann Pharmacother*. 2011; 45(11): 1439-44.18.
 43. Lenaerts A, Woolhiser L, Gruppo V, Orme I, Goldman R, Lambros C. Mefloquine, moxifloxacin and pyrazinamide is a triple-drug alternative to isoniazid- and rifampin-containing regimens for treatment of tuberculosis in

- mice, abstr. B-1873. 49th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. San Francisco, USA; 2009.
44. The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Interim policy guidance (WHO/HTM/TB/2013.6). Geneva, World Health Organization. 2013.
 45. Imoto T, Kodama M, Murakami K. The drugs for *H. pylori* eradication therapy. *Nihon Rinsho*. 2015 Jul;73(7):1169-74.
 46. Ermis F, Senocak Tasci E. Current *Helicobacter pylori* treatment in 2014. *World J Methodol*. 2015 Jun 26;5(2):101-7. doi: 10.5662/wjm.v5.i2.101. eCollection 2015.
 47. Brown BA, Wallace RJ Jr, Onyi GO. Activities of clarithromycin against eight slowly growing species of nontuberculous mycobacteria, determined by using a broth microdilution MIC system. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:1987-1990.
 48. Chaisson RE, Benson CA, Dube MP, et al. Clarithromycin therapy for bacteremic *Mycobacterium avium* complex disease. A randomized, double-blind, dose-ranging study in patients with AIDS. AIDS Clinical Trials Group Protocol 157 Study Team. *Ann Intern Med*. 1994;121:905-911
 49. Brown BA, Wallace RJ Jr, Onyi GO, DeRosas V, Wallace RJ III. Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium chelonae*-like organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:180-184.
 50. Wallace RJ Jr, Brown BA, Onyi GO. Skin, soft tissue, and bone infections due to *Mycobacterium chelonae*; importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. *J Infect Dis*. 1992;166:405-412.

51. Harald Hoffmann, Emanuele Borroni, Elisa Schena, Lubov Nedialkova, Sabine Hofmann-Thiel, and Daniela Cirillo, Delamanid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis using the resazurin microtitre assay and the BACTEC™ MGIT™ 960 system, *J. Antimicrob. Chemother.* (2016)71(6): 1532-1539.
52. Van Deun A, Aung KJM, Bola V, Lebeke R, Hoss Aung KJ, Bola V, Lebeke R, Hossain MA, de Rijk WB, Rigouts L, Gumusboga A, Torrea G, de Jong BC; Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: Challenging the gold standard. *J. Clin Micro.* 2013;51(8):2633-40.
53. Curry International Tuberculosis Center and California Department of Public Health, 2016: Drug-Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians, Third Edition [inclusive page numbers].
54. S. Thee, A.J. Garcia-Prats, P.R. Donald, A.C. Hesselning, H.S. Schaaf, A review of the use of ethionamide and prothionamide in childhood tuberculosis, *Tuberculosis*, Volume 97, 2016, Pages 126-136, ISSN 1472-9792,. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.09.007>.
55. World Health Organization. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2018.
56. World Health Organization. Definitions and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision. Updated December 2014. Document WHO/HTM/TB/2013.2. Geneva, World Health Organization, 2013. <http://www.who.int/tb/publications/definitions/en/>
57. Updated interim critical concentrations for first-line and secondline DST. 2012. WHO Global TB Programme. www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentra

[tion%20table_1st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf](#). [accessed Nov 2018].

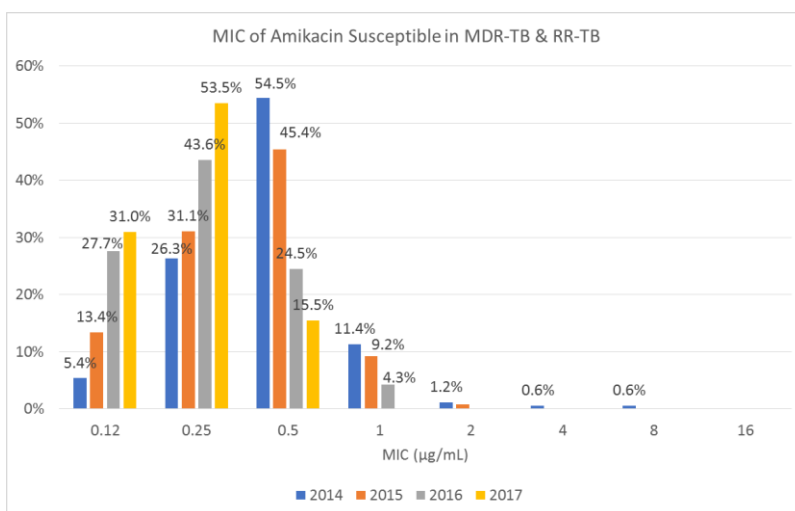
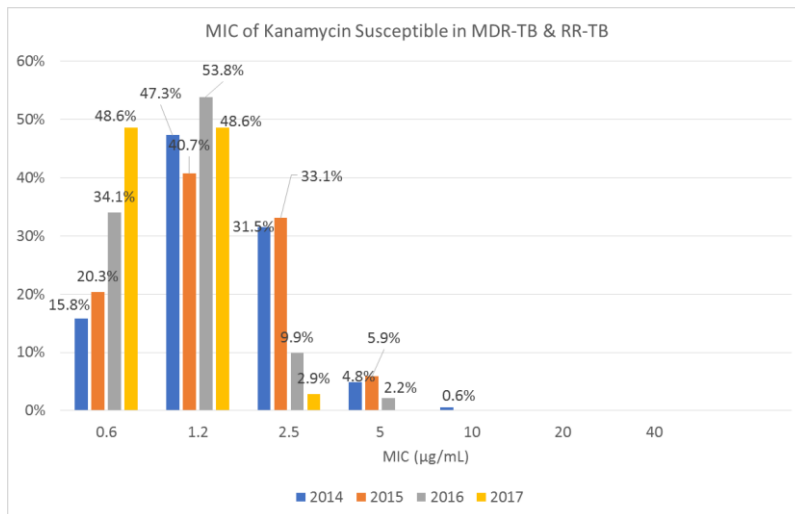
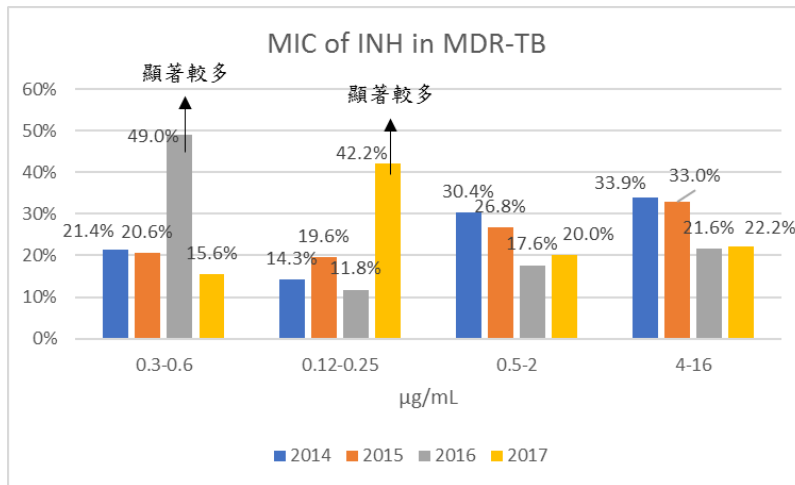
附錄

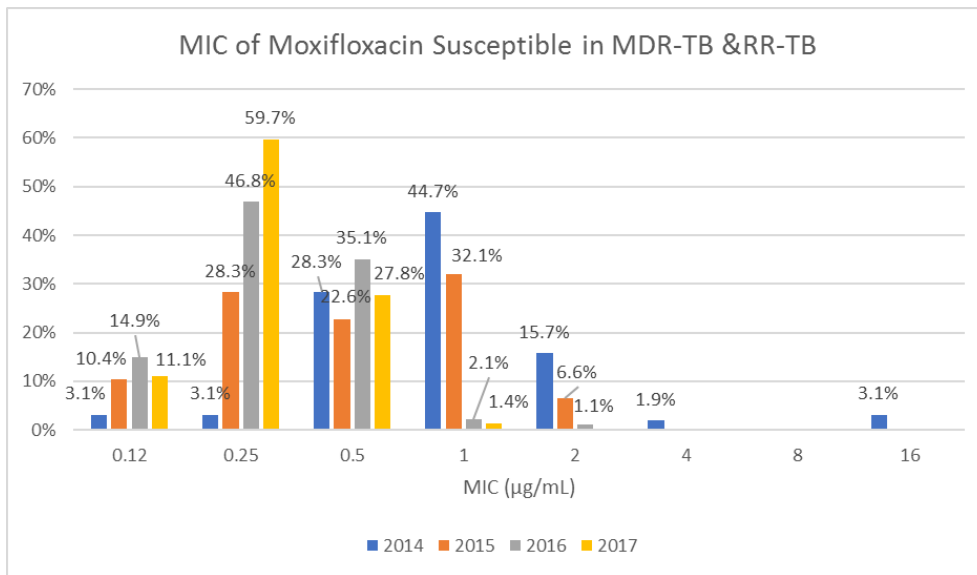
一、 第一年(2016年)方法學分析結果：使用最低抑菌濃度藥物敏感性試驗定量測試結果分類

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 $\mu\text{g/mL}$)	No. of resistant strains ^a	Low-level resistance ^c (%)	Intermediate-level resistance ^f (%)	High-level resistance ^g (%)	Susceptible ^h (%)	Exclude ⁱ

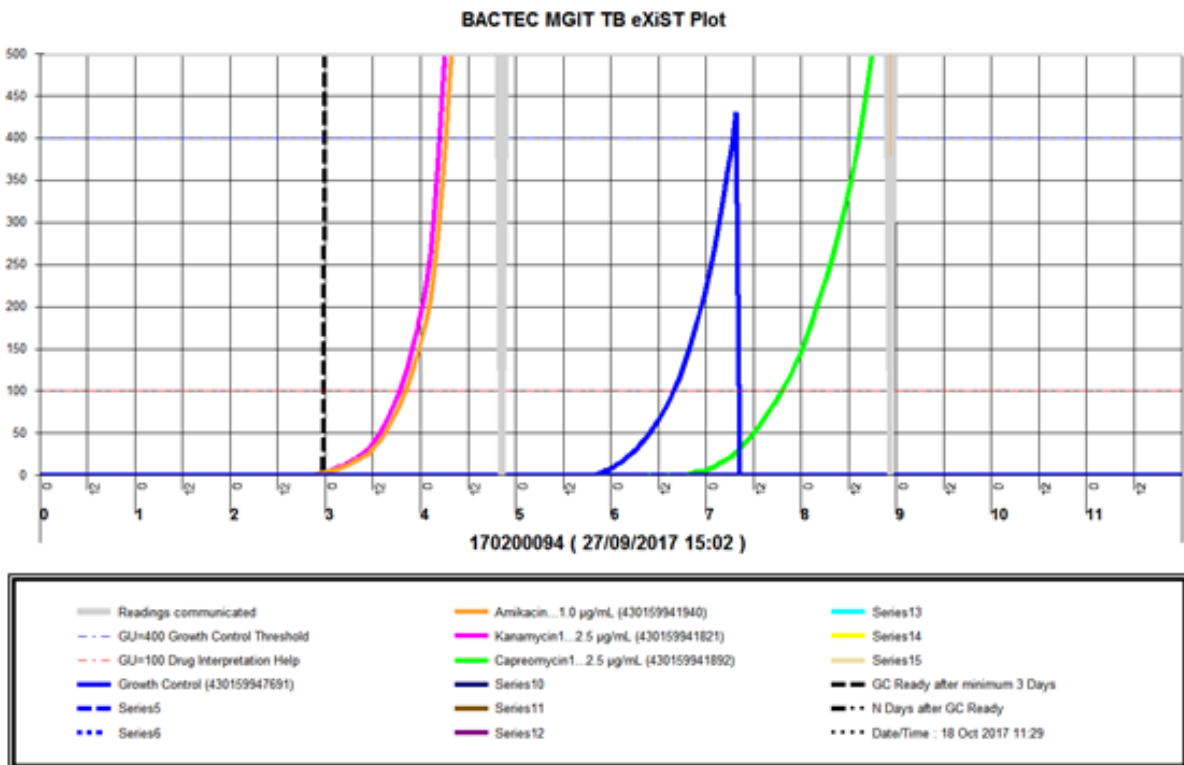
Kanamycin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	11	1 (9%)	2 (18%)	8 (73%)	0	-
Amikacin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	8	0	1 (13%)	7 (88%)	-	-
Capreomycin (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16) ^e	9	5 (56%)	2 (22%)	0	2 (22%)	-
Levofloxacin (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4) ^e	20	2 (10%)	4 (20%)	13 (65%)	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	-	-

二、 第二年(2017年)使用定量藥敏試驗藥物效力監測結果：



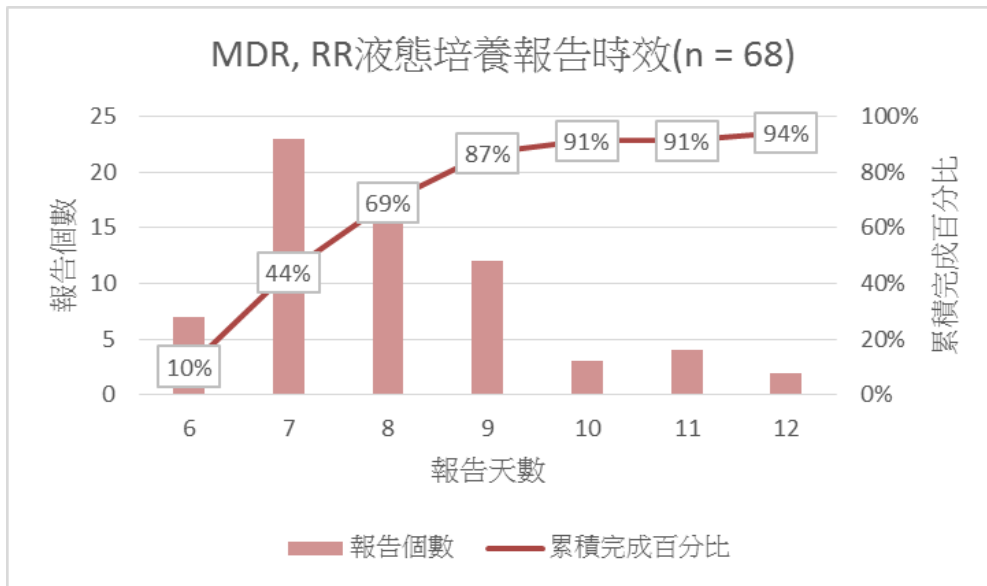


三、EpiCenter TB eXiST 藥敏試驗生長曲線



四、

五、 BACTEC™MGIT™960 液態培養藥敏試驗報告時效(2017 年分析結果)



107 年科技研究計畫期末報告審查意見回復表

計畫名稱：結核病之抗藥性試驗、監測及流行病學研究

計畫主持人：吳政華

填報日期：107/12/3

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
1	結核病抗藥性持續監測為重要任務，應持續進行。	謝謝委員意見，依建議持續監測。	無
2	Moxifloxacin 高低濃度之結果與臨床使用劑量之關聯性為何？	<p>新增說明於討論段落及新增 1 篇參考文獻：</p> <p>WHO 在 2018 年指引提到高濃度 (Clinical breakpoint, CBs) 測試，其定義為高於臨界濃度，高濃度與文獻上的臨床治療研究結果有關，包括 MIC 分布、基因位點及藥物動力/效力學的資料佐證，因藥物濃度的提高，可以克服在因低藥物濃度下的抗藥性，同時，治療劑量仍維持在病人可容忍之最大劑量範圍內。高劑量適用於個人化的治療，但是在抗藥監測數據上，仍以低濃度即臨界濃度為區分抗藥及敏感【55】。</p> <p>依文獻建議，當 moxifloxacin 的 MIC 在 1 或 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，建議將用藥劑量由 400 mg 提高到 600 mg 或 800 mg【53】。WHO 建議，800 mg 使用於 9 個月的治療【58】。</p>	第 76 頁及第 90 頁。