

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫期末成果報告

抗藥性結核病快速檢驗及與分子流行病學調查

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：周如文

研究人員：莊珮君、林宛璇、詹馨嬋、蔡興元、翁瑞芸、黃偉倫、蔡莉翎、
江亭誼、吳玫華

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 11 月 15 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

封面

目錄

壹、中英文摘要 (5)

貳、本文

一、前言 (8)

二、材料與方法 (12)

三、結果 (18)

四、討論 (35)

五、結論與建議 (38)

六、計畫重要研究成果及具體建議 (40)

七、參考文獻 (41)

八、圖、表

表一 165 例傳統及分子檢測結果不一致之多重抗藥性個案特性分析

表二 165 株檢測結果不一致多重抗藥菌株之抗藥型態

表三 165 株檢測結果不一致多重抗藥結核菌株之 RIF 抗藥 *rpoB* 基因
分析

表四 165 株檢測結果不一致多重抗藥菌株之 INH 抗藥基因 *katG*, *inhA*

promoter, inhA, oxyR-ahpC 分析

表五 146 株傳統藥敏表現型為 RIF-R 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果分析

表六 146 株傳統藥敏為 INH-R 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果分析

表七 與 RIF 抗藥有關之非熱區及熱區外之分子抗藥突變

表八 已被證實與 INH 產生抗藥有關之突變或機制

表九 由 *embB* 基因突變分析 INH 抗藥性

表十 MDR 結核菌聚集大小分布

表十一 Univariate and multivariable logistic regression analysis of risk factors associated with the clustering of MDR-TB cases, excluding foreign-born population, 2012-2015

圖一 146 株傳統藥敏表現型為 RIF-R 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果

圖二 傳統藥敏為 INH-R 的 146 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果

圖三 2012-2017 年聚集與非聚集菌株之比例

圖四 2017 年 19 株與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同者之基因型分布

圖五 2012-2017 年聚集與非聚集菌株個案年齡層分布

摘要

世界衛生組織(World Health Organization, WHO) "End TB Strategy" 冀望於 2030 年，降低 80%結核病發生率、90%死亡率及無家戶因結核病造成財務負擔而受難。WHO 提出 3 大策略：「以病人為中心的方式，整合照護及預防體系」、「高瞻的防治政策及支持體系」及「強化研究與研發」。其中，快速檢驗是重要策略之一，包含結核病、抗藥性檢測等，攸關個案發現、阻斷傳播鏈、優質化照護及提高治癒率。尤其是結核病一、二線藥物的傳統藥物敏感試驗(drug susceptibility testing, DST)耗時 1-2 月，使得對病人治療用藥相當困難。根據 WHO 的報告，2014 年估計全球約有 19 萬人死於多重抗藥結核病，該年的多重抗藥結核病的新增個案為 48 萬件，3.3%為新確診以及 20%再治療個案；其中超級抗藥結核病個案數，則佔多重抗藥結核病個案的 9.7%。2016 年，WHO 亦將 rifampicin 抗藥個案納入重點照護及防治項目。雖然分子檢驗已運用於臺灣的快速檢驗流程，然因現有已知之抗藥基因仍無法涵蓋抗藥性檢測，以及分子及傳統 DST 檢測結果不一致的問題，造成診治瓶頸。此外，抗藥性結核病的傳播效率似乎並不低於非抗藥性結核病，有鑑於此仍須持續加強傳播機制分析及引進新分析工具進行時間與空間之分子流行病學探討。因此，宜整合分析探討結核菌特性與結核病診斷、臨床及流行病學，以更強化管理照護機制及有效終止傳播問題。**計畫目的**：探討及釐清結核菌產生抗藥性的特定基因機制、研究並篩選出最少的結核病抗藥決定性基因因子，分析基因突變與抗藥性強弱的關聯性，藉以評估及發展快速檢驗技術。並利用基因分型等細菌學資料及地理資訊工具，整合分析抗藥性結核病個案，以瞭解傳播動態機制。**實驗方法**：包含個案檢體檢測、菌株核酸鑑定、抗藥基因分析、以基因體學分析抗藥機制；臨床檢體試驗、病人基本及細菌學資料收集等；菌株基因分型、查詢本局中央傳染病系統平台等資料，進行實驗室基因資料庫交叉比對。**研究結果**：(1)自 1,445 送複驗多重抗藥菌株中，發現有 165 (10.7%) 株抗藥性菌株之以 GenoTypeDRplus 試劑分子檢測之結果與傳統抗藥性再確認之檢驗結果不一致，包含 96 (58.2%)為新個案菌株，須再次執行抗藥性測試，以釐清治療與管理疑慮；分析 164 菌株，發現：56.4%為單純多重抗藥、9.7%對 4 種一線藥物皆有抗藥性；傳統抗藥性判為 RIF 及 INH 抗藥之菌株，分別有 6.1%及 73.9%無法以現有例行分子方法檢測。MIC 檢測結果顯示：分子抗藥性判為 RIF 及 INH 抗藥之菌株，與表現型檢測之一致率各為 90.4%及 8.9%。雖然，GenoType 是 WHO 建議的試劑，但是敏感度仍差強人意，抗藥基因序列分析可各提高 4.8% INH 及 13.9% RIF 抗藥性之檢測率。2016 至 2017 年非聚集 MDR 菌株比例增加。自 2012 年起最大的 MDR cluster 仍持續存在。首次使用空間資訊初探 MDR-TB 傳播因子，瞭解東區及非固定住址個案有較高產生集聚。**結論與建**

議：雖然，GenoType 是 WHO 建議的試劑，但是敏感度仍差強人意，抗藥基因序列分析可各提高 4.8% INH 及 13.9% RIF 抗藥性之檢測率。探討抗藥結核菌株抗藥性相關基因資料，仍持續有新增之證據，已收集 INH 及 RIF 新抗藥基因資訊，可優化快速檢測判定之敏感度。2016 至 2017 年非聚集 MDR 菌株比例增加；自 2012 年起最大的 MDR cluster 仍持續存在；首次使用空間資訊初探 MDR-TB 傳播因子，瞭解東區及非固定住址個案有較高產生集聚。建議使用基因序列分析方法檢測抗藥性，及探討 DST 檢測結果不一致個案之臨床診治分析。增加抗藥性監測及分析，以 whole genome sequencing 數據了解抗藥關之機轉。建議仍應加強相關監測及整合性分析，以釐清現有觀察結果。細菌學之資料，可能當做預後及聚集性之預測因子，可加強 MDR-TB 照護及傳播鏈調查參考。

關鍵字：結核病、結核菌、抗藥性、分子流行病學

Abstract

Tuberculosis (TB) is a worldwide infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). According to the 2015 WHO global TB report, in 2014, 1.5 million people were killed by TB; 9.6 million people are estimated to have fallen sick with this disease. In Taiwan, there are 11,375 new TB cases, with the incidence of 45.6 per 100 thousands people in 2015. To cure TB, long-term therapy is required. Resistance to the antimicrobial drug of MTBC can be developed due to inappropriate or incorrect use of antimicrobial drugs, and treatment interruption. WHO reported in 2015, of the 480,000 new MDR-TB cases, 3.3% were new TB cases and 20% were previously treated cases. An estimated 9.7% of people with MDR-TB have XDR-TB. In 2016, WHO further includes rifampicin-resistant cases into the focus of care. Due to the slow growth rate of MTBC, it takes weeks to culture, identify and test drug susceptibility. Therefore, the early diagnosis and treatment are not easy in TB cases. In order to solve these problems, rapid molecular tests for drug resistance in TB have been developed over the years. However, as the drug resistant related gene mutations are complicated and not fully understood, the molecular tests can only be restricted in the particular drugs, and the particular genes. High ratio of discordant results was obtained between conventional and molecular drug susceptibility testing (DST). In order to establish a more reliable rapid genetic diagnostic system, we will study the genome of the MTBC with discordant testing results. In addition, the efficiency of spreading drug-resistant TB does not seem lower than non-drug-resistant TB; it is needed to continue the introduction of new analytical tools for molecular epidemiology investigations. The goals of this project are to explore and clarify the mechanism of specific genes and decisive genes conferring TB resistance, and to analyze gene mutation and resistance strength of association. This approach will help to develop new TB diagnostics for rapid uptake of particular drug-resistant TB cases for early commencement of proper treatment and for better case management. Besides, we aim to integrate genotyping and other bacteriological data and geographic information for better understanding of the dynamics of the transmission. Methods: We carried out specimen testing, DST (including MIC determination), resistant gene analysis, molecular testing, patient data collection and other basic and bacteriological strain genotyping or other survey data for cross-comparison analysis. Results: Of the 1,445 MDR isolates, we found 165 (10.7%) isolates with discordant

phenotypic and genotypic INH- and RIF-resistant results. Of the 165 isolates, 6.1% RIF-R isolates and 73.9% INH-R cannot be detected using the GenoType assay and drug-resistant gene sequencing. Gene sequencing can detect extra 4.8% RIF-R and 13.9% INH-R isolates. Based on the genotyping results, we found that case numbers in 2 major clusters are increasing in 2017. Besides, old age was associated with a decreased odd of TB cluster. Conclusions and suggestions: Drug-resistant gene sequencing assay has better performance than the GenoType assay for detecting resistance to RIF and INH. Continuous surveillance of MDR-TB is crucial for TB control program.

Keywords : Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, drug-resistance, molecular epidemiology

貳、本文

一、前言

結核病(tuberculosis, TB)是一種古老的傳染性疾病，估計全球有將近三分之一的人口受到結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)的潛伏感染。TB 雖然已有許多有效的治療藥物，然而隨著抗藥性的產生、全球化人口流動的快速、愛滋病的流行，以及並非所有國家的防治計畫皆實施完善，自 1980 年代起，全球結核病疫情呈現逐漸回升的趨勢。有鑑於此，1993 年世界衛生組織(World Health Organization, WHO)呼籲各國重視 TB 的防治，避免惡化與反撲。依據 WHO 的 2015 年 TB 年報:在 2014 年全球有 151 萬人死於 TB，已超越愛滋病成為傳染性疾病的頭號死因；同時估計該年約有 960 萬人患有 TB，其中僅有約 600 萬新 TB 個案被通報，未被確診通報與獲得妥善治療的患者造成 TB 持續傳播的隱憂，而新確診的個案大多分布在東南亞與西太平洋國家，佔總數的 58%。TB 為台灣法定傳染病之一，自 2006 年啟動「結核病十年減半全民動員計畫【1】」，並配合 Stop TB Partnership 國際組織推動的「The Global Plan To Stop TB 2006-2015」全球 TB 防治計畫【2】，TB 的每年新增個案數自 2005 年的 16,472 人，發生率每十萬人 72 例，下降到 2015 年的 11,377 人，發生率每十萬人 45.6 例【3】。

而抗藥性 TB 的產生使得在防治上更加艱困。多重抗藥性結核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)是指個案的結核菌株至少對一線結核病用藥中的 rifampin (RIF)及 isoniazid (INH)具抗藥性，廣泛抗藥性結核病(extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)則是 MDR-TB 個案的結核菌株對 fluoroquinolone 類藥物，及任一針劑藥物(capreomycin, CM; kanamycin, KM; amikacin, AM)產生抗藥性。WHO 在 2015 年的報告中指出，儘管預估 2014 年全球 MDR-TB 的發生個案約為 48 萬人，但僅有 12.3 萬件個案被通報，預估個案與實際監測個案數落差最大的地區位在西太平洋國家，僅有 19%的 MDR-TB 的偵測率，而中國的 MDR-TB 偵測率則是 11%。若是能檢驗所有已通報 TB 個案，預估應有 30 萬的 MDR-TB 個案；其中超過半數(54%)分布在印度、中國與俄羅斯。在 2014 年全球總計 11.1 萬人接受了 MDR-TB 的治療，比 2013 年總數上升 14%。目前全球的 MDR-TB 治癒率為 50%，但依據 2012 年的 127 個國家的統計數據，有 43 個國家的 MDR-TB 治癒率達到 2015 年大於 75%的目標，包含了三個 MDR-TB 的高負擔國家：愛沙尼亞、衣索比亞與緬甸【2】。台灣抗藥性監測結果顯示：(1)新 TB 個案中，有 9%對 isoniazid (INH)抗藥，2%對 rifampicin (RIF)抗藥，2%對 ethambutol (EMB)抗藥，8%對 streptomycin (SM)，14%對任一線藥物抗

藥，1%則為 MDR；(2) 再治療 TB 個案中，有 18%對 isoniazid (INH)抗藥，10%對 rifampicin (RIF)抗藥，7%對 ethambutol (EMB)抗藥，12%對 streptomycin (SM)，23%對任一線藥物抗藥，6%則為 MDR；約 10%的 MDR-TB 個案為 XDR-TB 個案【4】。由台灣疾管署 Infectious Disease Data Warehouse 的資料顯示，1%的新 TB 個案與 6%的再治療個案為 MDR-TB。台灣因設置 MDR-TB 治療團隊，治癒率亦達到 WHO 於 2015 年設定目標。

抗藥性結核病之主要治療藥物包含：(1) Fluoroquinolone 類藥物：Fluoroquinolone 可抑制 *M. tuberculosis* 的 type II topoisomerase (DNA gyrase)【5】，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【6】。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【7】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【8】。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【9】。Moxifloxacin 在 1962 年首次發現，用於治療革蘭氏陰性導致的尿道感染【10】。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【11】，很少實驗室的研究其 MICs。(2) Injectable drugs: 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【12, 13】，而隨 Kanamycin 與 Amikacin 的濃度提高 *rrs* 上的 A1401G 突變頻率也會增加【14】。Capreomycin 與 Viomycin 因結構相似也具交互抗藥【15】，*tlyA* 可轉譯出 rRNA methyltransferase，此基因的突變會影響細菌對 Capreomycin 的抗性【16】。

莫西沙星(Moxifloxacin)

問題狀況或發展需求

WHO "End TB Strategy" 冀望 2030 年時，降低 80%發生率、90%死亡率及無家戶因 TB 造成財務負擔而受難。WHO 提出 3 大策略：「以病人為中心的方式，整合照護及預防體系」、「高瞻的防治政策及支持體系」及「強化研究與研發」。其中，快速檢驗是重要策略之一，包含 TB、抗藥性等。攸關個案發現、阻斷傳播鏈優質化照護、及提高治癒率。尤其是 TB 一、二線藥物的傳統藥物敏感試驗(drug susceptibility testing, DST)耗時 1-2 月，使得對病人治療用藥相當困難。

分子快速檢測已被廣泛運用在檢驗對 RIF 與 INH 產生抗藥的 MDR-TB 個案，而對於 XDR-TB 抗藥個案的分子檢測工具則仍持續在發展當中。由於，抗藥性結核菌的抗藥圖譜具有相當的歧異度，除了 MDR 及超級抗藥(extensively drug-resistant, XDR)外，還有抗藥(poly-resistant)、前期 XDR (pre-XDR)等眾多分類。而且在大多不同地理分布的不同型菌株，都能偵測到前述各抗藥類型。然而，即使僅分析一種藥物的感受性(susceptibility)，結核菌能有不同程度的抗藥性。表型(phenotypic)抗藥性，可經由分析相關基因的突變以進行預測，但已知與 7 個主要抗結核病藥物的預測敏感度(sensitivity) 平均只有 78%。例如：雖然 *rpoB* 的 consensus 突變，預測 rifampin 抗性的敏感度與精確度 (specificity) 分別為 92%及 99%【17, 18】；但是以基因突變預測 pyrazinamide 抗藥性的靈敏度，則只有 28%【19】。由於抗藥的程度不佳，傳統 DST 所檢測出的抗藥性結果，與基因檢測所預期有很高比例的不一致，意味著有一半的弱抗藥性結核菌株可能被判定為對藥物敏感，很可能造成臨床治療上高度抗藥性菌株在病人體內的快速產生【20, 21】。

特定的基因突變與抗藥程度是否能釐清明確關聯性也有一定的困難，不同研究報告所得出的結果也有所出入。很顯然對於藥物抗性的產生可能來自於一群基因，並被其他未知的調控機制所影響，例如藥物的輸出幫浦機制，分枝桿菌的細胞壁構造等。流行病學與分子演化學的研究顯示，MDR 與 XDR 的抗藥性與北京株(Beijing)、拉丁美洲株(LAM)的基因簇有某些程度的關聯性，然而此結果並無法提高偵測單一檢體抗藥程度的可信度【22】。以 kanamycin (KM)的抗藥性為例，三個 *rrs* 基因上的突變，以及七個 *eis* 啟動子上的突變已被偵測，在不同的突變區域已被發現與抗藥性間有顯著的不一致。在二線針劑間的交叉抗藥性具有更高的複雜性，而 *eis* 與 *tlyA* 基因的突變也與抗藥性有不一致的結果。很顯然許多不在 *rrs*、*eis*、*tlyA* 基因位點的未知上位基因影響著抗藥的表現型。再例如：分子檢測工具，檢測結果之 *rpoB* 基因型與 RIF 抗藥的表現型不同，可能在於不同 DST 相對濃度的差異抑或是核酸突變並不影響轉譯的氨基酸。

近代的定序技術將結核病的基因研究提升到一個不同的水準。已有研究利用次

世代定序的技術交叉分析臨床分離菌株整個基因組上所有的單核苷酸多型性 (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs)，並列出所有與抗藥性相關的候選位點【19, 23, 24, 25, 26, 27】。所找出的候選基因根據所使用的傳統微生物學藥敏試驗方法、定序方法與生物資訊分析方法而有所不同。此計畫將利用在抗藥表現型與基因型結果有所差異的臨床菌株，搭配 MICs 結果進行基因序列上的分析，以鑑別出可信的與具抗藥表現型高度相關的 SNPs。此相關分析可幫助我們發現特定的抗藥機制，以建立快速基因診斷的系統，提供與抗藥相關的詳細資訊並預測可能的藥物抗性發展。

此外，由於 TB 發病緩慢，再加上地理特性人口流動率高，個案關聯性不易判定。本計畫亦將持續探討台灣抗藥性結核菌與 TB 傳播的分析。結合個案地理資訊(GIS)與結核菌株基因分型結果，逐步建構抗藥性結核菌株分子流行病學資料庫，整合入建置中之自動化流行趨勢監測系統，以供傳播鏈之推測，落實熱點防疫避免發生群聚(特別是抗藥性 TB)。依據 2009 至 2014 年 MDR 菌株基因型分析，顯示 MDR 傳播的基因型似乎有別於一般的結核病群聚事件。此外，也發現在 MDR 與非 MDR cluster 中，年齡層、地理區域、基因型分布也有差異處。藉由持續執行基因型監測，有效搭配流病資料，即時介入阻斷結核病傳播。

針對現階段結核病防治之問題評析中，因為無法提供適切的快速診斷工具，造成「臨床診治延遲」，提出科學性證據，縮短臨床診斷時差，加速高風險族群個案之發現，及早治療及降低社區傳播。此外，逐步擴大結核菌基因分子資料庫之對象及結合結核病個案居住地以資訊管理系統進行整合分析，提高可能之聚集事件之偵測效能及結核病傳播動態監測。透過本計畫若能積極有效整合細菌學與地理資訊，可提供公衛調查時更多佐證。

二、材料與方法

研究設計:

1. 蒐集送複驗之多重抗藥性結核菌株中，分子及傳統抗藥性檢測結果不一致菌株及資料。
2. 建立檢測結果不一致菌株之抗結核藥物最低抑制濃度(minimal inhibiting concentrations, MICs)詳細抗藥圖譜。
3. 蒐集抗藥結核菌株抗藥性基因體相關資料。
4. 抗藥性結核菌株基因型分析。

持續建立基因體資料庫。且將例年多重抗藥性結核菌基因型資料 (包括 spoligotype、MIRU、SNP 等) 以 Bionumerics 分析軟體進行基因型相似性分析，並比對國際間公認的基因型分群資料庫，包括 SITWEB database、TB Genome database 等，進行台灣多重抗藥性菌株基因特性分析。

5. 結核菌基因型資料地理資訊系統(GIS)分析

建立結核菌基因型資料地理資訊分析系統，作為推估多重抗藥性結核病傳播方式及速率之參考依據。

料收集及分析方法：

一、材料及資料

由醫療院所結核病實驗室分送至疾病管制署進行抗藥性結核菌株，進行藥物敏感性及/或抗藥基因測試。收集個案資料如：年齡、性別、居住及戶籍等地址、藥物抗性等資料將會輸入 Microsoft Access 所建構之資料庫供後續分析。

二、實驗方法：

- (一) 收集臨床分離確認之抗藥性結核菌陽性菌株，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，合併使用解剖顯微鏡檢確認結核菌單一菌種。
- (二) 菌種鑑定

將結核菌菌液，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。

實驗步驟敘述如下：

(1) 在生物安全第三等級 (biosafety level 3, BSL-3) 實驗室的生物安全櫃中，以大小為 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 $^{\circ}\text{C}$ 不活化處理 5 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。

(2) 配製 real-time PCR 反應液，單一管反應液總體積為 25 μL ，含以下配方：

試劑	體積 (μL)
無菌水	1.5
IS6 引子 (10 μM)	2.0
IS7 引子 (10 μM)	2.0
IS6110 probe 核酸探針 (1.25 μM)	2.0
2X real-time PCR 試劑	12.5
檢體上清液	5.0

(3) 取濃度為 100 μM IS6、IS7 引子各 1 μL ，加入 9 μL 無菌水中，即為實際實驗引子濃度(10 μM)。

(4) 置於冰寶上之 2 mL 微量離心管內依序加入無菌水、引子、核酸探針、2X 即時定量聚合酶連鎖反應試劑，振盪混合均勻後分別於 real-time PCR 管內加入 20 μL 試劑混合液。

(5) 各反應管最後加入 5 μL 檢體。

(6) 反應管置於微量離心機旋轉離心 (spin down)。

(7) 將反應管置於即時定量 PCR 機器反應座上，執行 real-time PCR 程式。

Stage	溫度	時間
Stage 1	50 $^{\circ}\text{C}$	2分鐘
Stage 2	95 $^{\circ}\text{C}$	10分鐘
Stage 3 (40 cycles)	95 $^{\circ}\text{C}$	15秒
	60 $^{\circ}\text{C}$	1分鐘

(8) 結果判讀：

反應 Ct 值	內在對照組反應	陽性對照組	陰性對照組	結果判讀
Ct<35	陽性	陽性	陰性	陽性
Undet. 或 Ct \geq 35	陽性	陽性	陰性	陰性
Undet.	陰性	陽性	陰性	有抑制物， 重新處理檢體，重複實驗

備註：Undet. 表示未檢測到

(三) 藥物敏感性試驗

(1) Resazurin Microtiter Assay (REMA)

1.1 藥物品項：在 96 孔盤含 Middlebrook 7H9 Broth 液態 35-37°C 溫箱培養 7 天，加入氧化還原指示劑 Resazurin，再經 24-48 小時 35-37°C 溫箱培養，觀察顏色的變化，來偵測抗結核菌的藥物感受性。

1.2 菌液調製：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 實驗室中調製測試菌液。接種量需固定，以免影響測試結果。

1.2.1 調製濁度 Macfarland 1.0 菌液。

1.2.2 配製 1:20 稀釋菌液。

1.3 接種方式：接種 100 μ L 之 1:20 稀釋菌液入 96 孔盤。

1.4 結果判讀

將接種完畢之 96 孔盤用塑膠袋封好，置入 35°C-37°C 溫箱培養，7 天後加入 0.02% 的 resazurin，24-48 小時後觀察顏色變化。若為藍色判定為敏感，若為粉紅色(需與對照組一樣粉紅)則判定為抗藥。

(2) Middlebrook 7H11 比例法瓊脂平板

2.1 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、para-Aminosalicylic acid、Rifampin、Rifabutin、Capreomycin、Clofazimine 及 Levofloxacin，測試 MDR 結核菌株的藥物感受性結果。

2.2 菌液調製：固態或液態培養基培養出之新鮮初代(fresh primary)結核菌做為測試菌，於 BSL-3 實驗室中調製測試菌液。接種量需固定，以免影響測試結果。

2.2.1 調製濁度 Macfarland 1.0 菌液。

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

2.3 接種方式

2.3.1 接種三滴 (約 0.1 ml) 之 10^{-2} 菌液至培養基。

2.3.2 接種三滴 (約 0.1 ml) 之 10^{-4} 菌液至培養基。

2.3.3 接種完成之培養基，置於室溫直到菌液完全被培養基吸附。

2.3.4 將培養基個別封入 CO₂ 可通透的塑膠袋中，培養於 37°C、5% CO₂ 恆溫培養箱中。

2.4 結果判讀

每四分格生長量記錄如下：>500 菌落 4+、200-500 菌落 3+、100-200 菌落 2+、50-100 菌落 1+ 及 <50 菌落則記錄實際菌落數。

2.4.1 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。

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

2.4.3 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。

(3) Sensititre® MYCOTB MIC Plate

測試藥物含 Amikacin、Cycloserine、Ethionamide、Ethambutol、Isoniazid、Kanamycin、Moxifloxacin、Ofloxacin、para-Aminosalicylic acid、Rifampin、Rifabutin、Streptomycin。調製 Macfarland 1.0 菌液，接種 100μL 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。

(4) BACTEC™ MGIT™ 960 PZA 及 Linezolid

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 Linezolid 藥物溶液使種菌後藥物濃度為 1μg/mL，但生長控制組試管不加任何藥物。

(四) 抗藥基因定序

抗藥相關基因的 DNA 序列定序被使用在解決抗藥性表現型與基因型產生差異的案例中。分析 *rpoB* hot spot 區域基因突變的 primer sets 為：*rpoB*-F (5'-TCG GCG AGC CCA TCACGT CG-3') and *rpoB*-R (5'-GCG TAC ACC GAC AGC GAG CC-3')。分析

rpoB codon 170 突變的 primer sets 為：TB-176-F (5'-CTT CTC CGG GTC GAT GTC GTT G-3') 及 TB-176-R (5'-CGC GCT TGT CGA CGT CAA ACT C-3')。分析 *katG* 基因突變的 primer sets 為：*katG*-F (5'-GTC ACA CTT TCG GTA AGA C-3') and *katG*-R (5'-TTG TCG CTA CCACGG AAC G-3')。分析 *inhA* promoter region 基因突變的 primer sets 為：*inhAr*-F (5'-AAT TGC GCG GTC AGTTCC AC-3') and *inhAr*-R (5'-GTC GGT GAC GTC ACA TTC GA-3')。分析 *inhA* 基因突變的兩對 primer sets 為：*inhA1713*-F (5'-CCG AGG ATG CGA GCT ATA TC-3') and *inhA1713*-R (5'-GGC TCG GGT CGA AGT CCA TG-3')；*inhA2194*-F (5'-AGG CGC TGC TGC CGA TCA TG-3') and *inhA2194*-R (5'-CCG AAC GAC AGC AGC AGG AC-3')。分析 *oxyR-ahpC* 基因突變的 primer sets 為：*oxyR-ahpC*-F (5'-GCT TGA TGT CGG AGA GCA TCG-3') and *oxyR-ahpC*-R (5'-GGTCGC GTA GGC AGT GCC CC--3')。PCR 反應條件如下表所示：

Stage	Temperature	PCR cycle	Time
Stage1	95 °C	1	10分鐘
Stage2	95 °C		1分鐘
	視各基因而定*	33	1分鐘
	72 °C		1分鐘
Stage 3	72 °C	1	6分鐘
Stage 4	16 °C	1	∞

**rpoB* 基因為 64 °C；*katG* 基因為 55 °C；*inhAr*、*inhA1713*、*inhA2194* 及 *oxyR-ahpC* 基因為 60 °C。

PCR 產物經定序後，以 Sequencher (Gene Codes Corporation, USA) 軟體進行 assemble 及 edit。標的基因突變位點的鑑定，係自 NCBI 資料庫下載 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 參考菌株 (NC_000962) 之標的基因序列，運用 MEGA4 軟體，將測試菌株已完成定序的基因序列與 H37Rv 參考菌株相對序列進行比對，以取得各基因突變位點的資訊。

(五) 基因分型

進行結核菌以 spoligotyping 及 MIRU-VNTR 鑑定其基因分型：

(1) Spoligotyping 以商業試劑套組 (Ocimum Biosolutions, India) 進行操作，以 PCR 擴增後之 DNA 與預先固定好核酸探針的雜交膜反應，其 43 種探針可偵測衍伸自

分枝桿菌 *M. tuberculosis* H37Rv 與牛分枝桿菌 *M. bovis* P3 的 spacer 序列。雜交後的反應膜使用 ECL[®] Detection system (GE Healthcare, USA) 顯影【31】。

(2) 結核菌群散置重複單元-可變重複序列分子分型法 (mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeat, MIRU-VNTR)，係利用結核菌群染色體上 MIRU 及 VNTR 之位點 (locus) 在不同菌株可能具有不同序列重複數 (repeat number) 的多形性，以多重聚合酶連鎖反應法 (multiplex polymerase chain reaction, multiplex PCR)，將不同單元重複序列位點放大，依照估計出來之重複數，分別給予各位點一數字代碼。本方法選用自 29 個已發表的 MIRU 位點中，選擇對台灣地區結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) 菌株可達鑑別力與 IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 相當，且最符合經濟效益的 10 個位點所組合成的最佳化散置重複單元分子分型法，簡稱 MIRU(10)，10 個位點分別為 VNTR3820、QUB3232、QUB2163b、Mtub04、VNTR4120、MIRU39、QUB18、QUB-26、Mtub21、MIRU26。10 個位點的單元重複數組成一串數字代碼即為每個菌株的 MIRU(10) 基因型【32, 33】。

(六) 資料及統計分析

計算分子試驗以已知及新找出基因檢測抗藥性的靈敏度 (sensitivity)、特異性 (specificity)、陽性預測值 (positive predictive value, PPV)、陰性預測值 (negative predictive value, NPV)，及正確性。基因分型結果則使用 Bionumerics[®] (version 6.6; Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 軟體分析。兩分離菌株具有相同基因分型定義為同一群組 (cluster)。群組分析使用無權重群組算數平均 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means, UPGMA)，及 Dice 法 (Dice coefficient)。統計分析使用 EpiInfo (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>)，以雙尾費雪精確性檢定， $p < 0.05$ 定義據統計上顯著意義。關聯性則以勝算比 (odds ratio, OR) 及 95% 信賴區間作估量。

三、 研究結果

(一) 蒐集分子及傳統抗藥性結果不一致之結核菌株及資料

完成 2008 年 1 月至 2017 年 5 月間，以 1 例多重抗藥或 rifampin (RIF) 單一抗藥結核病個案，選擇 1 株結核菌株為原則進行分析。疾管署參考實驗室共收驗 1,544 例個案之抗藥性結核菌株，發現有 165 (10.7%) 株抗藥性菌株之以 GenoTypeDRplus (簡稱 GenoType) 試劑分子檢測結果與傳統抗藥性檢驗結果不一致，但以傳統檢驗再確認仍為抗藥。其中，僅有 1 株傳統抗藥試驗結果為 RIF-S/INH-R，而分子檢驗判定為 RIF-R/INH-R，即多重抗藥(multidrug-resistance, MDR)。此 165 個案特性及菌株之抗藥情形(排除 1 名無抗藥性資料)，綜合分析於表一及二。由結核病通報管理系統查詢 165 個案資料，包含：96 位(58.2%)新個案、68 位(41.2%)再治療個案及 1 位無個案資料(0.6%)。男(73.3%)女(26.7%)比例為 2.75；44 位女性中，30 位(75%)為新個案；而 121 位男性中，66 位(54.5%)為新個案。各年齡層新案送驗比例為：0-14 歲 1 位(0.6%)，為新個案、15-24 歲 8 位(5.5%)，其中 6 位為新個案、25-34 歲 12 位(7.3%)，其中 10 位為新個案、35-44 歲 16 位(9.7%)，其中 8 位為新個案、45-54 歲 27 位(16.4%)，其中 17 位為新個案、55-64 歲 40 位(24.2%)，其中 22 位為新個案及大於 65 歲之 60 位(36.4%)，其中 30 位為新個案。165 個案中，3 位(1.8%)有助膜積水，其中 2 位為新個案。6 位單純肺外結核個案：2 位(33.3%)骨及關節結核，各有 1 位(各占 16.7%)泌尿及生殖系結核、消化道結核、淋巴結核及結核性腦膜炎(表一)。165 位送驗個案中，5 個案於系統中無初次痰抹片抗酸菌鏡檢結果，而 102 位(61.8%)為抗酸菌染色抹片陽性，其中 60 位(58.8%)為新個案。165 位送驗個案中，胸部 X 光正常者 2 位(1.2%)含 1 位為新個案，異常但無空洞者 102 位(61.8%)含 59 位新個案，異常且有空洞者 57 位(34.5%)含 34 位新個案，異常但無關結核病者 2 位(1.2%)含 1 位新個案及 2 個案無胸部 X 光檢查結果。銷案原因：以其他完治 3 位(1.8%)皆為新個案，完成管理 101 位(61.2%)含 59 位新個案，死亡 46 位(27.9%)含 23 位新個案，其他(視同結果失落) 3 位(1.8%)皆為新個案及 12 位為管理中尚無銷案紀錄。初步資料顯示整體治療成功率略低於結核菌基因型分析，包含：Beijing 型 87 位(52.7%)、Beijing-Like 型 5 位(3%)、Non-Beijing 型 68 位(41.2%)、2 位為混合型及 3 位無資料(表一)。

表一 165 例傳統及分子檢測結果不一致之多重抗藥性個案特性分析

新案	舊案	無資料	總人數
----	----	-----	-----

	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
	96 (58.2)	68 (41.2)	1	165 (100)
性別				
女	30 (31.3)	14 (20.6)	0	44 (26.7)
男	66 (68.8)	54 (79.4)	1	121 (73.3)
年齡				
0-14	1 (1)	0	0	1 (0.6)
15-24	8 (8.3)	1 (1.5)	0	9 (5.5)
25-34	10 (10.4)	2 (2.9)	0	12 (7.3)
35-44	8 (8.3)	8 (11.8)	0	16 (9.7)
45-54	17 (17.7)	10 (14.7)	0	27 (16.4)
55-64	22 (22.9)	18 (26.5)	0	40 (24.2)
>65	30 (31.3)	29 (42.6)	1 (100)	60 (36.4)
肋膜積水				
是	2 (2.1)	1 (1.5)	0	3 (1.8)
否	92 (95.8)	67 (98.5)	0	159 (96.4)
無資料	2 (2.1)	0	1 (100)	3 (1.8)
肺外結核				
皮膚及眼結核	0	0	0	0
其他器官結核	0	0	0	0
泌尿及生殖系結核	1 (50)	0	0	1 (16.7)
消化道結核	0	1 (25)	0	1 (16.7)
胸肋膜結核	0	0	0	0
骨及關節結核	0	2 (50)	0	2 (33.3)
淋巴結核	1 (50)	0	0	1 (16.7)
結核性腦膜炎	0	1 (25)	0	1 (16.7)
咽喉結核	0	0	0	0
無	94 (57)	64 (38.8)	0	158 (95.8)
抹片				
陰性	35 (36.5)	23 (33.8)	0	58 (35.2)
陽性	60 (62.5)	42 (61.8)	0	102 (61.8)
NULL	1 (1.0)	3 (4.4)	1 (100)	5 (3.0)
胸部 X 光診斷				
正常	1 (1.0)	1 (1.5)	0	2 (1.2)
異常，但無空洞	59 (61.5)	43 (63.2)	0	102 (61.8)
異常，且有空洞	34 (35.4)	23 (33.8)	0	57 (34.5)
異常，無關結核病	1 (1.0)	1 (1.5)	0	2 (1.2)
無 X 光資料	1 (1.0)	0	1 (100)	2 (1.2)
銷案原因				
其他完治	3 (3.1)	0	0	3 (1.8)
完成管理	59 (61.5)	42 (61.8)	0	101 (61.2)
死亡	23 (24)	23 (33.8)	0	46 (27.9)

其他 (視同結果失落)	3 (3.1)	0	0	3 (1.8)
無資料	8 (8.3)	3(4.4)	1 (100)	12 (7.3)
結核菌基因型				
Beijing	54 (56.3)	33 (48.5)	0	87 (52.7)
Beijing-Like	4 (4.2)	1 (1.5)	0	5 (3.0)
Non-Beijing	36 (37.5)	31 (45.6)	1 (100)	68 (41.2)
Mixed type	1 (1.0)	1 (1.5)	0	2 (1.2)
無資料	1 (1.0)	2 (2.9)	0	3 (1.8)

分析 164 個案 MDR 菌株，對於各個抗結核藥物的抗藥比例，資料顯示(表二)：56.4%為單純 MDR(INH+RIF)、9.7%對 4 種一線藥物(INH+RIF+EMB+SM)皆有抗藥性；MDR 及 SM 抗藥佔 13.9%及 MDR 及 EMB 抗藥佔 20.0%。164 MDR 菌株亦對 PZA 抗藥佔 23%、對二線針劑(KM)抗藥佔 7.3%、對 fluoroquinolone (OFX)抗藥佔 14.5%。preXDR 比例為 16.4%及 XDR 比例 1.8%。

表二 165 株檢測結果不一致多重抗藥菌株之抗藥型態

Isolated Profile	Total cases		New cases		Previously treated cases		No data	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
MDR								
INH+RIF	93	56.4	45	27.3	47	28.5	1	0.6
INH+RIF+EMB	33	20.0	25	15.2	8	4.8	0	0
INH+RIF+SM	23	13.9	14	8.5	9	5.5	0	0
INH+RIF+EMB+SM	16	9.7	12	7.3	4	2.4	0	0
MDR resistant to additional drugs								
Rifabutin	148	89.7	88	53.3	59	35.8	1	0.6
Pyrazinamide	38	23.0	19	11.5	19	11.5	0	0
Kanamycin	12	7.3	6	3.6	6	3.6	0	0
Amikacin	8	4.8	5	3	3	1.8	0	0
Capreomycin	8	4.8	5	3	3	1.8	0	0
Ofloxacin	24	14.5	15	9.1	9	5.5	0	0
Gatifloxacin	5	3	3	1.8	2	1.2	58	35.2
Moxifloxacin	15	9.1	11	6.7	4	2.4	73	44.2
Levofloxacin	9	5.5	6	3.6	3	1.8	111	67.3
Ciprofloxacin	9	5.5	6	3.6	3	1.8	124	75.2
Ethionamide	30	18.2	20	12.1	10	6.1	0	0
Para-aminosalicylate	10	6.1	8	4.8	2	1.2	0	0
Cycloserine	0	0	0	0	0	0	44	26.7
Linezolid	0	0	0	0	0	0	124	75.2

(二) 傳統與分子抗藥性檢驗結果不一致分析

1. 傳統抗藥性檢驗結果為 RIF-R 結核菌株之抗藥基因分析

在 165 株發生不一致檢測結果之 MDR 結核菌株中，有 154 (93.9%) 株經由 GenoType 試劑組或核酸定序方法分析，發現在 RIF 抗藥標的基因(*rpoB*)有鑑別出之突變位點(表三)。其中，已被證實與 RIF 的抗藥有關的突變位點，以 S531L 出現的頻率最高(68.2%)，其次為 D516V (4.85%)，第三則是 H526D (4.24%)。然而，有 10 株 (6.06%) 無論以 GenoType 試劑組或 *rpoB* 基因核酸定序方法分析，皆未發現突變，尚需探討除 *rpoB* 基因外，可能之標的及更多的分析，方能判斷 RIF 抗藥性。另有 1 (0.61%) 株為 PCR-failure，導致無法以核酸定序方法分析，僅能根據 GenoType 的結果，推測其 *rpoB* 基因 codon 530-533 的區域可能存在突變，但仍無法直接證實該突變與 RIF 抗藥有無關聯性。此外，*rpoB* 基因序列分析比 GenoType 敏感，可多檢測出 8 (4.8%) 株 RIF 抗藥性。

表三 165 株檢測結果不一致多重抗藥結核菌株之 RIF 抗藥 *rpoB* 基因分析

RIF DST	GenoType MTBDRplus	Gene sequencing	No. of isolate	%
R	WT	WT	10	6.1
R	WT	V170F*	6	3.6
R	WT	V168A*+V170F*	1	0.6
R	WT	V170F*+S188P*	1	0.6
R	ΔWT8	T347A*+L533P	1	0.6
R	ΔWT2	L511P	1	0.6
S	ΔWT2	L511P	1	0.6
R	ΔWT2, 3, 7, 8	Q513P	1	0.6
R	ΔWT2, 3	Q513K	1	0.6
R	ΔWT3, 4, 5, 6	D516G	1	0.6
R	ΔWT3, 4	D516Y	2	1.2
R	ΔWT3, 4, MUT1	D516V	8	4.9
R	ΔWT5, 6	S522L	1	0.6
R	ΔWT7	H526Q	1	0.6
R	ΔWT7, MUT2B	H526D	7	4.2
R	ΔWT7	H526R	1	0.6
R	ΔWT7, 8	H526R	1	0.6
R	ΔWT7	H526C	1	0.6
R	ΔWT7, MUT2A	H526Y	6	3.6
R	ΔWT8, MUT3	S531L	102	61.8
R	ΔWT8	S531W	1	0.6
R	ΔWT8, MUT3	S531W	1	0.6
R	ΔWT8	L533P	1	0.6
R	ΔWT2	L511P+D516G	1	0.6
R	ΔWT7	L511P+H526Q	1	0.6

R	Δ WT3, 4, 8	D516G+L533P	1	0.6
R	Δ WT2, 3	codon 513, 514 deletion	1	0.6
R	Δ WT3	codon 514 F insertion	2	1.2
R	Δ WT2	S512G+codon 513 Q insertion	1	0.6
R	Δ WT8	PCR-failure	1	0.6
Total			165	100

* *rpoB* codon number for *M. tuberculosis* H37Rv

2. 傳統抗藥性檢驗結果為 INH-R 菌株之抗藥基因分析

在 165 株發生不一致檢測結果之菌株中，有 36 (21.9%) 株經由 GenoType 試劑組或 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 基因核酸定序方法分析，發現標的基因上有突變位點(表四)。165 株中，已被證實與 INH 的抗藥有關的突變位點以 *katG* S315T 出現的頻率最高(5.45%)，其次為 *inhA promoter region* C-15T (1.82%)。然而，有多達 122 (73.9%) 株無論以 GenoType 試劑組或 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 基因定序方法，皆無發現突變位點。因此，尚需以其他檢測方法或分析其他基因之變異，以更多資訊協助判斷 INH 抗藥性。此外，本研究發現(1)有 6 (3.64%) 株菌株雖經 GenoType 鑑定為 WT，但因 PCR-failure 而無法利用核酸定序方法，無法判定；(2) 有 1 (0.61%) 株 GenoType 的結果為 *katG* control band 缺失，推測為 *katG* 基因發生 deletion 及其他變化，但仍因 PCR-failure 而無法以核酸定序方法加以確認。此外，基因序列分析比 GenoType 敏感，可多檢測出 23 (13.9%) 株 INH 抗藥性。

表四 165 株檢測結果不一致多重抗藥菌株之 INH 抗藥基因 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 分析

DST (INH)	GenoType MTBDRplus	Gene sequencing	No. of isolate	%
R	WT	WT	122	73.9
R	<i>katG</i> del #	<i>katG</i> codon 305 GGC/G deletion	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> A312V	2	1.2
R	Δ WT, MUT1/2	<i>katG</i> S315T	9	5.5
R	WT	<i>katG</i> W328L	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> D329Y	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> W341R	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> T363A	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> G370E	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> P375L	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> L398P	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> M420T	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> Q439P	1	0.6

R	WT	<i>katG</i> Q461P	1	0.6
R	Δ WT1, MUT1	<i>inhA</i> promoter region C-15T	3	1.8
R	WT	<i>inhA</i> promoter region <i>fabG1</i> P12L	1	0.6
R	WT	<i>inhA</i> A239V	1	0.6
R	WT	<i>inhA</i> A246V	1	0.6
R	WT	<i>oxyR-ahpC</i> C-10T	1	0.6
R	WT	<i>oxyR-ahpC</i> C-12T	1	0.6
R	WT	<i>oxyR-ahpC</i> G-100A	2	1.2
R	WT	<i>oxyR-ahpC</i> C-105A	1	0.6
R	WT	<i>oxyR-ahpC</i> G-32A+ <i>oxyR</i> Q23K	1	0.6
R	WT	<i>oxyR-ahpC</i> G-116C+ <i>oxyR</i> R50P	1	0.6
R	WT	<i>katG</i> Q439K + <i>oxyR-ahpC</i> G-48A	1	0.6
R	<i>katG</i> del #	PCR-failure	1	0.6
R	WT	PCR-failure	6	3.6
Total			165	100

katG del: Lack of *katG* control band

(三) 基因突變與最低抑菌濃度(MIC)關聯性分析

本計畫 165 株 MDR 菌株，除有 9 株無法次培養或無法於液態最低抑菌濃度(MIC)測試培養基上生長外，已完成 146 株傳統藥物敏感性試驗、MIC 及抗藥基因相關性分析：

1. Rifampin (RIF)

傳統藥物敏感性試驗結果為 MDR (RIF-R & INH-R) 菌株中，已完成 146 株菌之 MIC 檢測之分析結果：

(1) 傳統 RIF-R/分生 RIF-S (WT) 菌株共有 10 株，排除 1 株未有 MIC 結果，結果發現：3 株為 $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$ 、3 株為 $1\mu\text{g/mL}$ 、1 株為 $4\mu\text{g/mL}$ 及 2 株 $\geq 16\mu\text{g/mL}$ (圖一)。

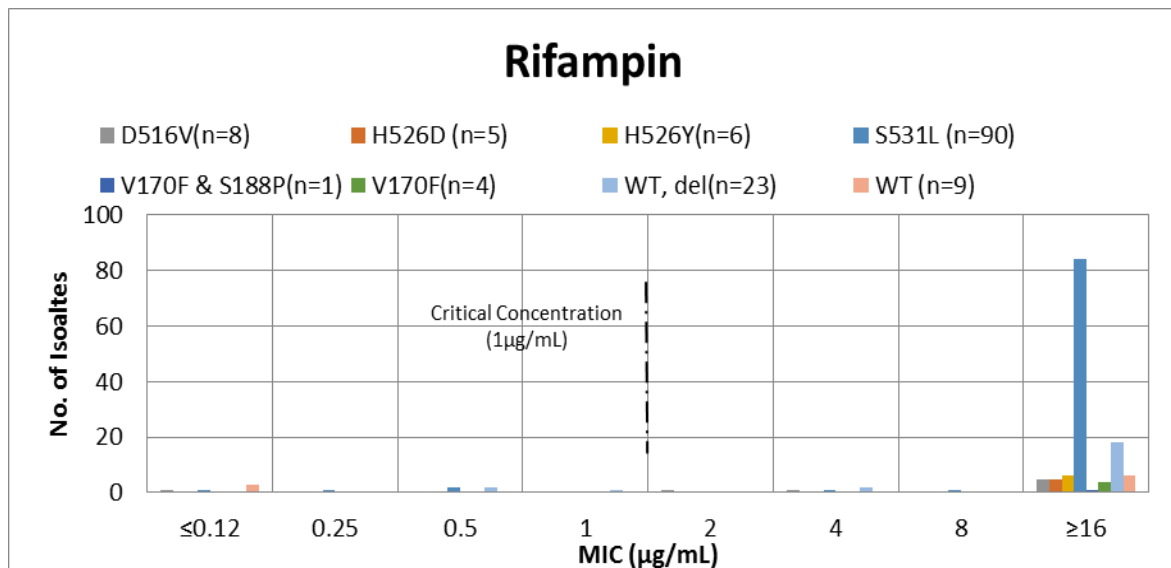
(2) 傳統 RIF-R/分生 RIF-R，MIC 分布範圍如表五及圖一。

表五 146 株傳統藥敏表現型為 RIF-R 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果分析

RIF gene sequence	Number of Isoates (n=146)	Median MIC(IQR*)	MIC Range
-------------------	------------------------------	------------------	-----------

D516V	8	≥16 (3.5, ≥16)	≤0.12-≥16
H526D	5	-	≥16
H526Y	6	-	≥16
S531L	90	≥16 (≥16, ≥16)	≤0.12-≥16
V170F & S188P	1	-	≥16
V170F	4	≥16 (≥16, ≥16)	≥16
ΔWT**	23	≥16 (≥16, ≥16)	≤0.5-≥16
WT	9	1 (0.12, 8.5)	≤0.12-≥16

Mutation Frequency 93.8% (137/146) *IQR, interquartile range; **Δ, lack of wild-type signal (3 ΔWT2, 2 ΔWT3, 1 ΔWT3&4, 1 ΔWT3&4&8, 3 ΔWT7, 1 ΔWT7&8, 3 ΔWT8); ***WT, wild type



圖一、146 株傳統藥敏表現型為 RIF-R 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果

146 株傳統 RIF-R 結核菌株，分析 MIC 分布範圍及與分子檢驗基因型比較顯示：

(i) 分子檢驗未偵測到突變位點有 10 株，排除 1 株未有 MIC 結果，其中 2 株之 MIC 為高程度抗藥(≥16μg/mL)，1 株為中程度抗藥(4μg/mL)，**3 株之 MIC 為低程度抗藥(1μg/mL) 及 3 株 MIC 為≤0.12μg/mL**。若以目前國際間抗藥性檢測之判定共識：1μg/mL RIF 藥物濃度為傳統抗藥試驗方法，用以區分菌株對藥物為敏感性(≤1μg/mL)或抗藥性(>1μg/mL)之藥物臨界濃度。並再根據文獻報告，證實當 MIC 接近臨界濃度(6 株)時，傳統檢驗抗藥或敏感之藥物感受性結果之一致性及再現性，比高程度抗藥菌株(2 株)之檢測結果較

不穩定。

(ii) 分子檢驗有偵測到 *rpoB* 抗藥基因突變位點共有 137 株，分子檢驗與傳統藥敏結果一致率為 **93.8%**；其中 90 株(90/137, **65.7%**)突變位點為 S531L，此突變位點與 MIC 比較顯示 **93.3%**(84/90)在表現型為**高程度抗藥($\geq 16\mu\text{g/mL}$)**；此 90 株中，僅各一株為表現型中、高程度抗藥(4 $\mu\text{g/mL}$ 及 8 $\mu\text{g/mL}$)，**4 株 MIC 為 $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$** ；另 5 株突變位點為 H526D、6 株突變位點為 H526Y、1 株突變位點為 V170F & S188P 及 4 株突變位點為 V170F 均呈現表現型高程度抗藥($\geq 16\mu\text{g/mL}$)。但是，D516V 的 MIC 分布為 5 株高程度抗藥($\geq 16\mu\text{g/mL}$)，2 株中程度抗藥(2 $\mu\text{g/mL}$ 及 4 $\mu\text{g/mL}$)，1 株 MIC 為 $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$ 。

2. Isoniazid (INH)

傳統藥敏結果判定為 MDR 菌株中，完成 146 株菌 MIC 檢測之分析結果:

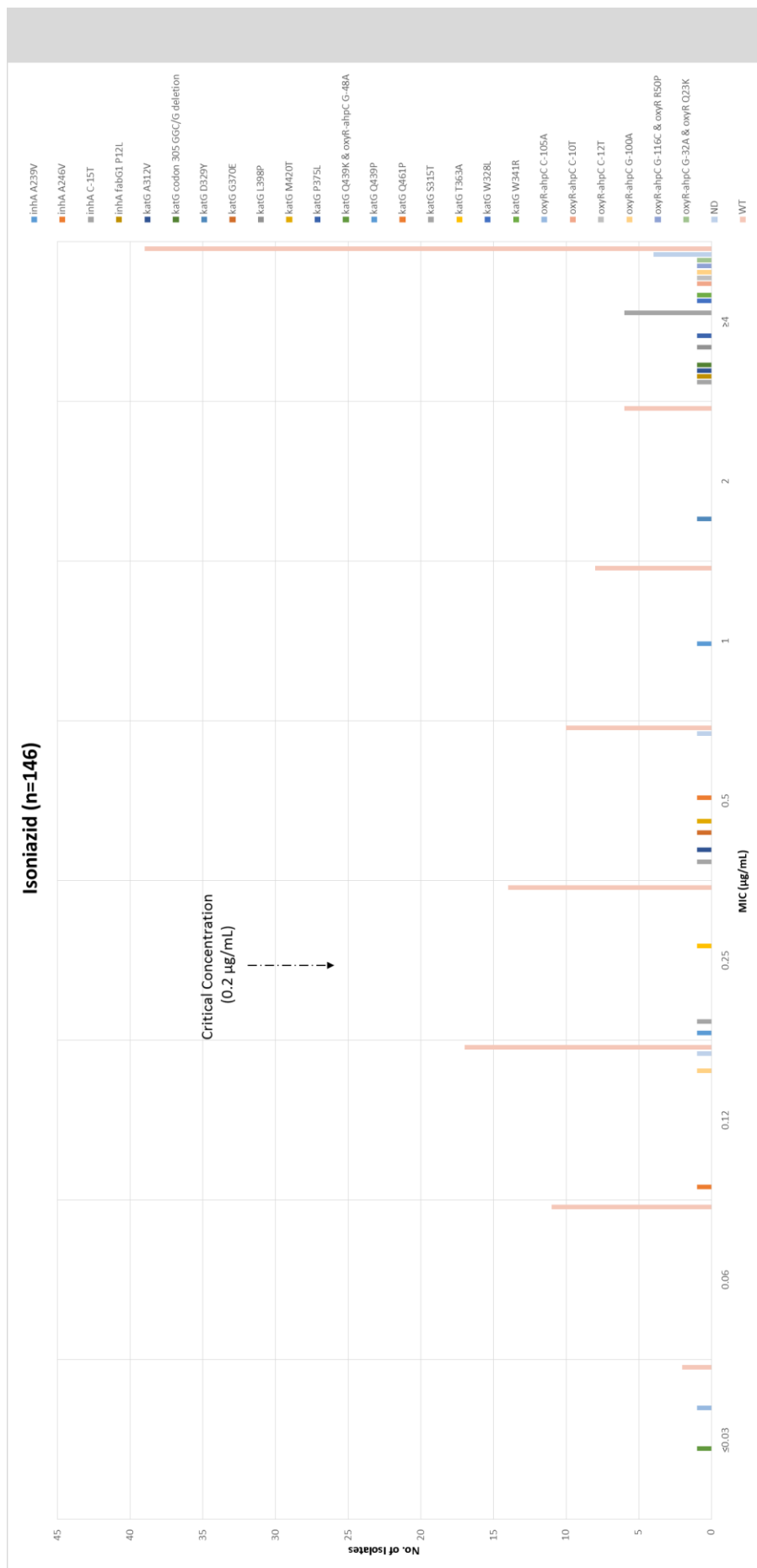
- (1) 傳統 INH-R/分生 INH-S (WT) 菌株中，有 39 (26.7%)株之 MIC $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ (圖二)。
- (2) 傳統 INH-R/分生 INH-R 菌株中，MIC 分布範圍如表六及圖二。

表六 146 株傳統藥敏為 INH-R 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果分析

INH-R gene sequence	Number of Isoales (n=146)	Median MIC(*IQR)	MIC Range
<i>inhA</i> A239V	1	-	0.25
<i>inhA</i> A246V	1	-	0.12
<i>inhA</i> C-15T	3	-	≥ 4
<i>inhA fabG1</i> P12L	1	-	≥ 4
<i>katG</i> A312V	2	-	0.5- ≥ 4
<i>katG</i> 305 GGC/G deletion	1	-	≥ 4
<i>katG</i> D329Y	1	-	2
<i>katG</i> G370E	1	-	0.5
<i>katG</i> L398P	1	-	≥ 4
<i>katG</i> M420T	1	-	0.5
<i>katG</i> P375L	1	-	≥ 4
<i>katG</i> Q439K & <i>oxyR-ahpC</i> G-48A	1	-	≤ 0.03
<i>katG</i> Q439P	1	-	1
<i>katG</i> Q461P	1	-	0.5
<i>katG</i> S315T	6	≥ 4 (≥ 4 , ≥ 4)	≥ 4
<i>katG</i> T363A	1	-	0.25
<i>katG</i> W328L	1	-	≥ 4

<i>katG</i> W341R	1	-	≥ 4
<i>oxyR-ahpC</i> C-105A	1	-	≤ 0.03
<i>oxyR-ahpC</i> C-10T	1	-	≥ 4
<i>oxyR-ahpC</i> C-12T	1	-	≥ 4
<i>oxyR-ahpC</i> G-100A	2	-	0.12- ≥ 4
<i>oxyR-ahpC</i> G-116C & <i>oxyR</i> R50P	1	-	≥ 4
<i>oxyR-ahpC</i> G-32A & <i>oxyR</i> Q23K	1	-	≥ 4
WT	107	0.5(0.12, ≥ 4)	≤ 0.03 - ≥ 4
**ND	6	≥ 4 (1.38, ≥ 4)	0.12- ≥ 4

Mutation frequency 22.6% (33/146) ; *IQR, interquartile range; **ND: PCR failed



圖二、傳統藥敏為 INH-R 的 146 菌株之最低抑菌濃度分布對應至分子檢驗結果

Isoniazid 傳統藥物敏感性試驗表現型為抗藥之 146 株結核菌株，分析 MIC 分布範圍並與分子檢驗基因型比較顯示：

(i) 扣除 6 株無法以抗藥基因序列分析之菌株，分子檢驗未偵測到突變位點有 107 株(107/146, **73.3%**)。107 株之 MIC 廣於分布於低、中及高程度抗藥($\leq 0.03 - \geq 4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)。目前國際共識之傳統抗藥試驗方法，區分菌株對藥物為敏感性或抗藥性之藥物臨界濃度訂在 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。再根據文獻報告，當 MIC 接近臨界濃度時，傳統藥敏試驗方法抗藥或敏感結果之一致性及再現性，比高程度抗藥菌株之結果較不穩定。本研究之 107 株 INH-R 菌中，有 2 株之 MIC 分布為 $\leq 0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，有 11 株之 MIC 分布為 $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，低於表現型臨界濃度；此 13 株 INH-R 菌株中，有 8 株在傳統定性之藥敏結果為低濃度抗藥($0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$)而高濃度敏感($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)。至於，INH 低濃度抗藥但高濃度敏感之傳統藥敏試驗與分子檢驗結果不一致之關聯性，需分析更多菌株後才能確認。菌株之傳統藥敏結果，如為 INH 低濃度抗藥但高濃度敏感，若能提供臨床醫師評估是否提高給藥劑量，則仍可能繼續使用 INH 的治療。

(ii) 有 33 株可由分子檢驗偵測到突變位點，分別為：*inhA* A239V 有 1 株，MIC 為低($0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*inhA* A246V 有 1 株，MIC 為 $0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；*inhA* C-15T 有 3 株，MIC 分別為低($0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$)、中($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)及高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*inhA* fabG1 P12L 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* A312V 有 2 株，MIC 分別為中($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)及高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* codon 305 deletion 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥，*katG* D329Y 有 1 株，MIC 為高($2 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* G370E 有 1 株，MIC 為中($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 程度抗藥；*katG* L398P 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* M420T 有 1 株，MIC 為中($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 程度抗藥；*katG* P375L 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* Q439K & *oxyR-ahpC* G-48A 有 1 株，MIC 為 $\leq 0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；*katG* Q439P 有 1 株，MIC 為中($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* Q461P 有 1 株，MIC 為中($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 程度抗藥；*katG* S315T 有 6 株，MIC 皆為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* T363A 有 1 株，MIC 為低($0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* W328L 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*katG* W341R 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*oxyR-ahpC* C-105A 有 1 株，MIC 為 $\leq 0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；*oxyR-ahpC* C-10T 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*oxyR-ahpC* C-12T 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*oxyR-ahpC* G-100A 有 2 株，MIC 分別為 $0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*oxyR-ahpC* G-116C & *oxyR* R50P 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)程度抗藥；*oxyR-ahpC*

G-32A & *oxyR* Q23K 有 1 株，MIC 為高($\geq 4 \mu\text{g/mL}$)程度抗藥；PCR failed 有 6 株，MIC 分別為 1 株 $0.12 \mu\text{g/mL}$ 、1 株中($0.5 \mu\text{g/mL}$) 程度抗藥及 4 株高($\geq 4 \mu\text{g/mL}$)程度抗藥。分子檢驗有偵測到突變位點與傳統藥敏結果一致率僅為 22.6% (33/146)。

(二) 蒐集抗藥結核菌株抗藥性相關基因資料

由於 RIF 抗藥相關 *rpoB* 基因主要之抗藥相關之熱區(hot-spot)位於 codon 507 至 codon 533 區間(大腸桿菌之 codon)，此 27 個胺基酸對 RIF 抗藥濃度之影響程度不同。文獻指出 codon S531L 與 codon H526 D/Y 對所有 rifamycins 藥物與高濃度抗藥相關，然而 codon H526L、H526N/S 與 RIF 低濃度抗藥有關；而因 codon 516 任何突變產生的胺基酸，都被認為與 RIF 高濃度抗藥相關，但卻對 rifabutin (RBT) 抗藥結果無影響。此外，codon 533 突變只會輕微影響 rifamycin 抗藥性。因此，雖然抗藥性個案菌株在 codon 516 及/或 codon 533 發生突變，但臨床上 RBT 仍可用於治療。除此 4 個胺基酸在臨床有較多研究且有明確抗藥關聯性結論外，*rpoB* 基因熱區內之其餘 23 個胺基酸，以及熱區外的 *rpoB* 基因序列，已由結核菌全基因定序抗藥性分析研究中【38】，統整與 RIF 抗藥有關之各分子抗藥突變資料如下表。

表七 與 RIF 抗藥有關之非熱區及熱區外之分子抗藥突變

H37Rv codon	<i>E. coli</i> codon	<i>rpoB</i> mutations
Val170	Val176	Phe
Ala286		Val
Phe424	Phe505	Leu
Thr427	Thr508	Pro
Ser428	Ser509	Arg
Gln429	Gln510	His
Leu430	Leu511	Pro/Arg
Ser431	Ser512	Gly
Gln432	Gln513	Glu/Lys/Leu
Met434	Met515	Ile
Asp435*	Asp516*	Gly/Tyr/Val
Ser441	Ser522	Leu
Gly442	Gly523	Ala
His445*	His526*	Asp/Asn/Gln/Arg/Tyr/Pro

Ser450*	Ser531*	Leu/Typ/Stop
Ser452	Leu533	Pro
Pro454	Pro535	Leu
Glu460	Glu541	Gly
Ile480	Ile561	Thr

H37Rv:結核菌標準菌株；灰色區域:*rpoB* 基因熱區；*: 與 RIF 高濃度抗藥相關

再者，其他具地域性特殊之 RIF 抗藥相關 *rpoB* 突變位點，如史瓦濟南盛行之 *rpoB* Ile491Phe 突變，並未包含在 WHO 推薦商用試劑組，因此檢測時須特別留意地緣性特有菌株之特性。

INH 產生抗藥之機轉複雜，主要對應之抗藥基因突變為 *katG* S315T 及 *inhA* promoter -16/-15/-8 等，但亦僅能對臺灣 MDR 菌株提供 80-85% INH 抗藥鑑別度。其他突變發生於 *oxyR-aphC*, *kasA*, *ndh*, *iniABC*, *fade*, *furA*, *nat*, *fabD*, *accD*, *Rv1592c* 及 *Rv1772*，亦有與抗藥關聯之相關報導；但僅有少數突變已運用 functional genetics 被證實與抗藥性相關(表八)。

表八 已被證實與 INH 產生抗藥有關之突變或機制

Locus	Mutations/mechanisms	Frequency (%)
<i>katG</i>	S315T (decreasd INH-NAD adductformation)	64.3 (55.5-78.4)
	T275P (unstable KATG protein)	0.20
	W300G (decreased INH-NAD adduct formation)	0.07
<i>furA-katG</i> IR	g-7a, a-10c,g-12c (decreased <i>katG</i> expression)	0.18, 0.11, 0.11
<i>furA-katG</i> upstream deletion	Deletion of the 134bp (-134 to -1 of <i>furA</i>) as part of a larger 7.2kb deletion upstream of <i>katG</i>	unknown
<i>inhA</i>	c-15t (increased <i>inhA</i> expression)	19.2 (13.0-24.6)
	S94A (dreased INH-NAD adduct binding to InhA)	1.21
<i>mabA/fabG1</i>	G609a/L203L (increased <i>inhA</i> expressionfrom novel promoter)	0.12

此外，近期文獻提及 *embB* 基因位點突變除會影響 EMB 抗藥外，亦會對 INH 抗

藥性產生影響。本計畫遂選取 10 株 MDR 結核菌株，INH-R 但於 *katG* 與 *inhA* promoter 未發現突變，進行 *embB* 抗藥基因定序及 MIC 試驗，以瞭解 *embB* 胺基酸之變異是否對 INH 抗藥濃度產生 epigenetic 影響(表九)。分析結果顯示，3 株 MDR 菌株發生 *embB* 抗藥基因突變，且均發生在 *embB* 306 位點(1 株 M306I 及 2 株 M306V)。若搭配 MIC 測試結果發現：當菌株對 EMB 產生較高濃度抗藥時，而 INH 為低濃度抗藥時，並無法由 *katG* 與 *inhA* promoter 基因偵測到 INH 抗藥性，但卻可能由 *embB* 306 檢出 INH 抗藥性。由此初步結果顯示，若 MDR 菌株之 INH 抗藥性，未能在 *katG* 與 *inhA* promoter 發現突變，若再加做 *embB* 抗藥基因定序試驗，初步可增加 33% INH 抗藥性之預測值，但實際應用之可行性，仍需進行較多數量菌株之分析方能確定。

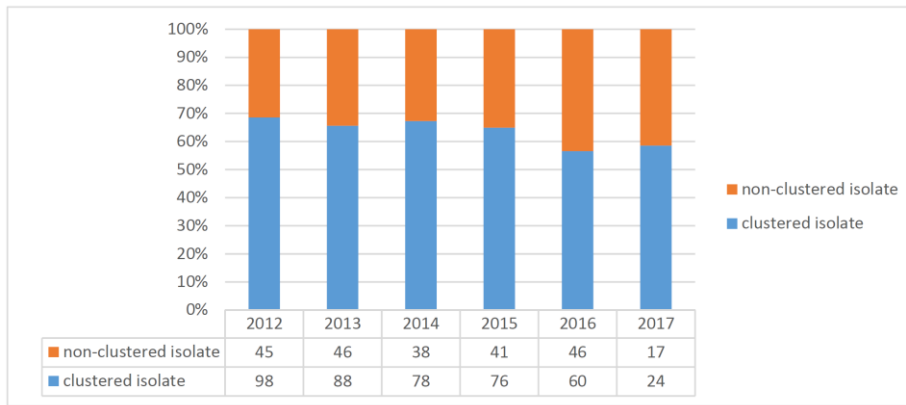
表九 由 *embB* 基因突變分析 INH 抗藥性

Strain No	<i>embB</i> sequencing	MIC (µg/mL)		
		EMB	INH	RIF
1	WT	<=0.5	=0.06	>16
2	WT	=2	=0.25	>16
3	WT	=1	>4	>16
4	WT	<=0.5	>4	>16
5	<i>embB</i> M306I	=2	=0.06	>16
6	<i>embB</i> M306V	=8	<=0.03	>16
7	WT	<=0.5	=0.25	>16
8	WT	=1	>4	>16
9	<i>embB</i> M306V	=4	=0.06	>16
10	WT	<=0.5	>4	>16

(四) 抗藥性結核菌株基因型分析

1. 2012-2017 分析

累積完成 2012 至 2017 年 6 月 15 日止，MDR 送驗菌株之基因型分析共 657 株：包含 424 株 (64.5%) 聚集(clustered) 及 233 株 (35.5%) 基因型為 unique 之非聚集(non-clustered) 菌株。2016 年與 2017 年聚集菌株之比例呈下降趨勢，但未達統計顯著差異。2012-2017 年聚集與非聚集菌株之比例如圖三：



年份	2012	2013	2014	2015	2016	2017	總計
non-clustered isolate	31.5%	34.3%	32.8%	35.0%	43.4%	41.5%	35.5%
clustered isolate	68.5%	65.7%	67.2%	65.0%	56.6%	58.5%	64.5%

圖三 2012-2017 年聚集與非聚集菌株之比例

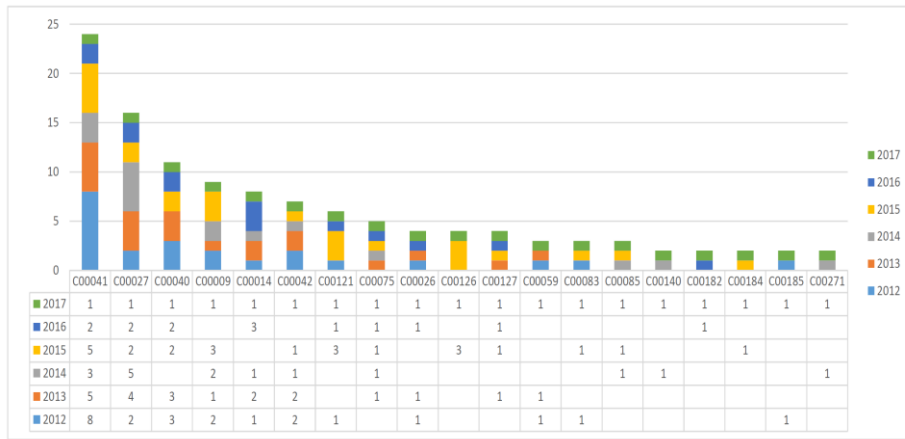
424 株聚集菌株分別屬於 159 個聚集：最大聚集包含 24 株 MDR 結核菌，其次為 16 株、15 株及 11 株。聚集大小分布如下表十。其中，聚集大小為 1 者係指與非 MDR 菌株基因型相同者：

表十 MDR 結核菌聚集大小分布

cluster size	no (%)
>20	1 (0.6%)
11-19	3 (1.9%)
5-10	18 (11.3%)
3-4	26 (16.4%)
2	44 (27.7%)
1	67 (42.1%)
總計	159 (100.0%)

2. 2017 分析

2017 年截至 6 月 15 日止，共分析 MDR 菌株 41 株：(1) 24 株 clustered 菌株中，19 株 (46.3%, 19/41) 之基因型與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同者；(2) 5 株 (12.2%, 5/41) 基因型與其他非 MDR 菌株相同；(3) 其餘 15 株 (41.5%) 基因型為 unique。2017 年尚未出現當年 2 株以上相同基因型者。2017 年 19 株與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同者之基因型分布如下(圖四)：

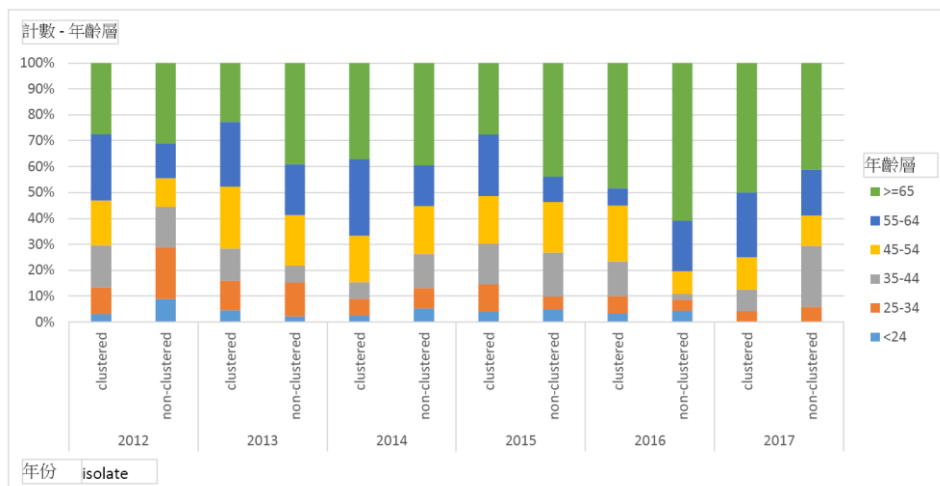


圖四 2017 年 19 株與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同者之基因型分布

分析顯示最大的 MDR 聚集 C00041 仍持續出現，其次為 C00027 及 C00040。以上 3 個基因型之 MDR 菌株數，皆已累積超過 10 株。

2017 年截至 6 月 15 日止，19 株與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同之基因型者，其中 6 株個案位在高雄市、5 株個案位在新北市、2 株個案位在花蓮縣、2 株個案位在桃園市、各有 1 株個案位在台北市、台中市、彰化縣、台南市。

2017 年截至 6 月 15 日止，有 19 株與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同之基因型者：65 歲以上 10 人 (52.6%)、55-64 歲 5 人 (26.3%)、45-54 歲 3 人 (15.8%)及 25-34 歲 1 人 (0.05%)。比對 2012-2017 年聚集與非聚集菌株個案年齡層分布如圖五，結果顯示 2016 年與 2017 年聚集菌株之個案，65 歲以上所占比例較 2012-2015 年偏高：



圖五 2012-2017 年聚集與非聚集菌株個案年齡層分布

進一步分析 2017 年截至 6 月 15 日止 19 株基因型與 2012-2016 年 MDR 菌株有

相同者，分屬之 19 個聚集中，有 2 個聚集(C00182、C00185) 皆包含 2 名 65 歲以上個案；另有 2 個 MDR-TB 個案數最多的聚集 (C00041、C00027)，65 歲以上個案也是佔該聚集最多數，分別為 45.8% (11/24)、37.5% (6/16)。

3. 運用基因與空間資料探討 MDR-TB 之動態傳播

收集 2012-2015 年間 474 位 MDR 個案之 466 (98.3%)結核菌株基因型資料，結合個案之 3 種地址(居住、戶籍及職業所在地址)，以數字座標編碼標示於地圖後，運用單及多變量邏輯回歸分析發生群聚之潛在風險因子。排除 34 位外籍人士後，分析結果發現：在 432 本國籍個案中，有 245 位在 70 個聚集，41%為新進傳播所致。主要之基因型為 51.9% Beijing 及 7% EAI。63.3% EAI 基因型感染個案會造成聚集。若個案之居住及職業所在地址不同，則 66.4%可能會造成聚集；而相同者，54.2%會造成聚集。單變相分析結果顯示，東臺灣及住址不同可能是產生聚集之風險因子。在年齡大於 65 歲和 T 基因型個案中發現聚集之可能性降低。在多變量回歸分析中，年齡大於 65 歲族群與 TB 集聚發生率低相關（比值比：0.48; 95%CI：0.23-0.95），但居住和職業所在地址不同，會與 TB 聚集增加有關（比值比：1.45，95%CI：0.86-2.49）。

表 11 Univariate and multivariable logistic regression analysis of risk factors associated with the clustering of MDR-TB cases, excluding foreign-born population, 2012-2015.

Variable Name		Total (n=432)	Clustered (n=245)	Unique (n=187)	% Clustered	Univariate Analysis	Multivariable Analysis
Residential and Activity Addresses	Different	104 (24.07)	69 (28.16)	35 (18.72)	66.4	1.67 [1.03 - 2.75, p=0.04]	1.45 [0.86 - 2.49, p=0.17]
	Same	205 (47.45)	111 (45.31)	94 (50.27)	54.2	reference	reference
Age	35-44	50 (11.57)	33 (13.47)	17 (9.09)	66	reference	reference
	>=65	154 (35.65)	74 (30.2)	80 (42.78)	48.1	0.48 [0.24-0.92, p=0.03]	0.48 [0.23 - 0.95, p=0.04]

四、討論

(一) 分子及傳統抗藥性結果不一致之多重抗藥結核菌株分析

在 165 株發生不一致檢測結果之 MDR 結核菌株中，有 154 (93.9%) 株經由 GenoType 試劑組或核酸定序方法分析。其中，以 S531L 出現的頻率最高(68.2%)，其次為 D516V (4.85%)，第三則是 H526D (4.24%)。然而，有 10 株 (6.06%) 無論以 GenoType 試劑組或 *rpoB* 基因核酸定序方法分析，皆未發現突變。此外，*rpoB* 基因序列分析比 GenoType 敏感，可多檢測出 8 (4.8%) 株 RIF 抗藥性。有 36 (21.9%) 株經由 GenoType 試劑組或 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 基因核酸定序方法分析，發現標的基因上有突變位點(表四)。突變位點以 *katG* S315T 出現的頻率最高 (5.45%)，其次為 *inhA promoter region C-15T* (1.82%)。然而，有多達 122 (73.9%) 株無論以 GenoType 試劑組或 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 基因定序方法，皆無發現突變位點。此外，抗藥基因序列分析比 GenoType 敏感，可多檢測出 23 (13.9%) 株 INH 抗藥性。雖然，GenoType 是 WHO 建議的試劑，但是敏感度仍差強人意，抗藥基因序列分析可各提高 4.8% INH 及 13.9% RIF 抗藥性之檢測率。

尤其是藥物的抗藥性生成，並非導因單一基因之變化，而且是 step-wise process。菌株之基因型、補償性演化等皆可能是影響因子。例如：*rpoA* 或 *rpoC* 對 *rpoB* 的影響，EMB 抗藥對 INH 抗藥性的影響等。此外，抗藥性之生成先由低濃度開始，在傳統方法檢測上只使用固定濃度可能不易判定，可能因而導致病人治療失敗。**建議探討 DST 檢測結果不一致個案之臨床診治分析。**

至於 MIC 分布與基因突變關聯性，證實位於非熱區之 *rpoB* V170F 與高濃度抗藥相關。至於有 4 株突變位點為 *rpoB* S531L 菌株 MIC $\leq 0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ，是否為菌株生長之問題，或為 broadline 抗藥，需再確認。*ahpC* regulatory region (*oxyR'*)及 *ahpC* 被認為是 compensates for physiological KatG inactivity，幾乎都有高 MIC 值，*oxyR-ahpC* 將持續納入分子快速檢測之一。

(二) 抗藥結核菌株抗藥性相關基因資料

RIF 的抗藥性分子與傳統檢測一致性高。更多資料顯示 *rpoB* D435Y, *rpoB* A286V S450L, *rpoB* D435V, *rpoB* D435Y H445D, *rpoB* Q432E, *rpoB* Q432E G442A, *rpoB* Q432K, *rpoB* Q432L, *rpoB* H445R, *rpoB* H445D, *rpoB* H445Y, *rpoB* H445P, *rpoB* H445P, *rpoB* L430P D435G, *rpoB* L430P, *rpoB* L430P H445N, *rpoB* L430P H445Q, *rpoB* S431G H445R, *rpoB* L452P, *rpoB* S450L, *rpoB* S450W, *rpoB* T427P H445Y, *rpoB* V170F 皆與 RIF 抗藥具相關性，將納入 *rpoB* 抗藥基因序列分析報告，增加檢測敏感度。

INH 是 prodrug，可用於治療結核病及潛伏感染，是相對低毒性之口服用藥。依國家之不同，INH 抗藥性介於 7-45%。臺灣 INH 抗藥在新及在治療個案個案中，則各佔 9%及 18%。INH 抗藥與後續治療成功率及獲得(acquired)其他藥物抗藥性，有相關聯性。主要與 INH 抗藥相關的基因包含：*katG* regulatory region (*Rv1901c*, *furA*)、INH activation (*katG*)、*inhA* regulatory region (*fabG1*)、active INH 之標的 (*inhA*)。其他可能間接與 INH 抗藥相關：*ahpC* regulatory region (*oxyR'*)、compensates for physiological KatG inactivity (*ahpC*)及 helps keep AhpC reduced and active (*ahpD*)，或未明機轉之 *fabG3*。一般而言，僅分析 *katG* 及 *inhA* 即可快速檢測約 90%的 INH 抗藥性。剩餘約 10%，則須尋找新的(novel)或已觀察但尚未確認之 uncharacterized 突變位點，以確認抗藥相關性。在臺灣以分子方法檢測 INH 抗藥性效能較低約為 85%，因此造成快速檢測之限制，恐造成個案治療有效用藥與可能傳播期管理之疑慮。本研究，藉由針對分子檢測結果與傳統抗藥性再確認之檢驗結果仍不一致菌株，由主要抗藥基因序列分析，探討現有工具之敏感度及適用範圍。由結核菌全基因體序列資料庫及 functional genomics 研究結果，抗藥性相關基因資料，仍持續有新增之證據，持續收集可優化快速檢測判定之敏感度。可改進目前例行性提供之基因突變位

點與抗藥關聯報告內容，例如：加入 *kasA*、*oxyR-ahpC* 及 *fabG1 promoter* 等基因序列分析結果。

(三) MDR-TB 個案菌株基因型分析

累積完成 657 株 MDR 菌株之基因型分析，聚集菌株 424 株 (64.5%)。2016 年與 2017 年聚集菌株之比例呈下降趨勢，但未達統計顯著差異。424 株聚集菌株分別屬於 159 個聚集：最大包含 24 株。2017 年截至 6 月 15 日止，共分析 MDR 菌株 41 株：(1) 24 株聚集菌株中，19 株 (46.3%, 19/41) 之基因型與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同者；(2) 5 株 (12.2%, 5/41) 基因型與其他非 MDR 菌株相同；(3) 其餘 15 株 (41.5%) 基因型為 unique。分析 MDR 聚集 C00041 仍持續出現。2017 年截至 6 月 15 日止，19 株基因型與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同者。19 株基因型與 2012-2016 年 MDR 菌株有相同者：65 歲以上 10 人 (52.6%)。比對 2012-2017 年聚集菌株個案年齡層，顯示 2016 年與 2017 年聚集菌株之個案，65 歲以上所占比例較 2012-2015 年偏高。由於臺灣 MDR 個案發生比例仍高，主要之聚集之個案仍持續增加，且須注意高年齡個案占率高。雖然，運用基因與空間資料探討 2012-2015 年 MDR-TB 之動態傳播分析，發現年齡大於 65 歲族群與 TB 集聚(outbreak) 發生率低。建議仍應加強相關監測及整合性分析，以釐清現有觀察結果。

五、結論與建議

(一) 分子及傳統抗藥性結果不一致之多重抗藥結核菌株分析

2008 年 1 月至 2017 年 5 月間,10.7%抗藥性菌株分子及傳統抗藥性檢驗結果不一致。傳統抗藥性判為 RIF 及 INH 抗藥之菌株,分別有 **10.9%及 85%**無法以現有例行分子方法檢測。MIC 檢測結果顯示:分子抗藥性判為 RIF 及 INH 抗藥之菌株,與表現型檢測之一致率各為 **90.4%及 8.9%**。此外,抗藥基因序列分析比 GenoType 敏感,可多檢測出 23 (13.9%)株 INH 抗藥性。雖然,GenoType 是 WHO 建議的試劑,但是敏感度仍差強人意,抗藥基因序列分析可各提高 **4.8% INH 及 13.9% RIF** 抗藥性之檢測率。**建議使用基因序列分析方法檢測抗藥性,及探討 DST 檢測結果不一致個案之臨床診治分析。**

(二) 抗藥結核菌株抗藥性相關基因資料

抗藥結核菌株抗藥性相關基因資料,仍持續有新增之證據,持續收集可優化快速檢測判定之敏感度。**建議納入更多抗藥基因序列結果以提共完整抗藥性檢測報告,及設計新檢測工具以縮短檢測時效。**

(三) MDR-TB 個案菌株基因型的分析

2016 至 2017 年非聚集 MDR 菌株比例增加,可與快速個案發現同時評估防治策略之效益。2017 年上半年仍出現菌株基因型 C00041 及 C00027 個案,顯示自 2012 年起最大的 MDR cluster 仍持續存在。此 2 個基因型之個案多數為 65 歲以上,且今年出現之個案亦為 65 歲以上。自 106 年起 MDR 個案的追蹤調查已納入菌株基因型與公衛資料,期能有效找出可能的傳播源。首次使用空間資訊初探 MDR-TB 傳播因子,瞭解東區及非固定住址個案有較高產生集聚。**建議仍應加強相關監測及整**

合性分析，以釐清現有觀察結果。細菌學之資料，可能當做聚集性之預測因子，可加強 MDR-TB 照護及傳播鏈調查參考。

六、計畫重要研究成果及具體建議

(一) 成果

1. 傳統抗藥性判為 RIF 及 INH 抗藥之菌株，分別有 **10.9%及 85%**無法以現有例行分子方法檢測。MIC 檢測結果顯示：分子抗藥性判為 RIF 及 INH 抗藥之菌株，與表現型檢測之一致率各為 90.4%及 8.9%。此外，抗藥基因序列分析比 GenoType 敏感，可多檢測出 23 (13.9%)株 INH 抗藥性。雖然，GenoType 是 WHO 建議的試劑，但是敏感度仍差強人意，抗藥基因序列分析可各提高 4.8% INH 及 13.9% RIF 抗藥性之檢測率。

2. 探討抗藥結核菌株抗藥性相關基因資料，仍持續有新增之證據，已收集 INH 及 RIF 新抗藥基因資訊，可優化快速檢測判定之敏感度。

3. 2016 至 2017 年非聚集 MDR 菌株比例增加，可與快速個案發現同時評估防治策略之效益。2017 年上半年仍出現菌株基因型 C00041 及 C00027 個案，顯示自 2012 年起最大的 MDR cluster 仍持續存在。此 2 個基因型之個案多數為 65 歲以上，且今年出現之個案亦為 65 歲以上。自 106 年起 MDR 個案的追蹤調查已納入菌株基因型與公衛資料，期能有效找出可能的傳播源。首次使用空間資訊初探 MDR-TB 傳播因子，瞭解東區及非固定住址個案有較高產生集聚。

(二) 具體建議

1. 建議使用基因序列分析方法檢測抗藥性，及探討 DST 檢測結果不一致個案之臨床診治分析。

1. 增加抗藥性監測及分析，以 whole genome sequencing 數據了解抗藥關之機轉。

2. 建議仍應加強相關監測及整合性分析，以釐清現有觀察結果。細菌學之資料，可能當做預後及聚集性之預測因子，可加強 MDR-TB 照護及傳播鏈調查參考。

七、參考文獻

1. 行政院衛生署(2006)，結核病十年減半全民動員計畫。
www.cdc.gov.tw/downloadfile.aspx?fid=3E051FC98B0F8696
2. World Health Organization. (2015) Global tuberculosis report 2015.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf.
3. 衛生福利部疾病管制署，傳染病統計資料查詢系統。<http://nidss.cdc.gov.tw/ch/>
4. Yu MC, Wu MH, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 849-850.
5. 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. PMID: 15047530
6. 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. PMID: PMC314927
7. 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. PMID: 19687244
8. 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. PMID: 18164184
9. Hegde SS, Vetting MW, Roderick S, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 2005; 308: 1480–3. PMID: 15933203
10. Stamey TA, Nemoy NJ, Higgins M. The clinical use of nalidixic acid. A review and some observations. *Investigative urology*. 1969; 6(6): 582-92. PMID: 4976942
11. Fouad M, Gallagher JC. Moxifloxacin as an Alternative or Additive Therapy for Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Ann Pharmacother*. 2011; 45(11): 1439-44.18. PMID: 21990937
12. 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. PMID: 9593173
13. 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. PMID: 16048924

14. 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. PMID: 19752274
15. McClatchy JK, Kanes W, Davidson PT, et al. Cross-resistance in *M. tuberculosis* to kanamycin, capreomycin and viomycin. Tubercle 1977; 58: 29–34. PMID: 68613
16. 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. PMID: 16857584
17. Van Deun A, et al. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: Challenging the gold standard. J. Clin Micro. 2013; 51(8):2633-40. PMID: 23761144
18. Domínguez J, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. Int J Tuberc Lung Dis. 2016; 20(1):24-42. PMID: 26688526
19. Walker TM, Kohl TA, et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. Lancet Infect Dis. 2015; 14: 1001–1008. PMID: 26116186
20. Rodwell TC, Valafar F, et al. Predicting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes with genetic mutations. J Clin Microbiol. 2014; 52:781-789. PMID: 24353002
21. Kambli P, Ajbani K, et al. Defining multidrug-resistant tuberculosis: correlating GenoType MTBDR_{plus} assay results with minimum inhibitory concentrations. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 82:49-53. PMID: 25749461
22. Fenner L, Egger M, et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56:3047-53. PMID: 22470121
23. Farhat MR, Shapiro BJ, et al. Genomic analysis identifies targets of convergent positive selection in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Genet. 2013; 45:1183-9. PMID: 23995135
24. Zhang H, Li D, Zhao L, et al. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug

- resistance. *Nat Genet.* 2013; 45:1255-60. PMID: 23995137
25. Safi H, Lingaraju S, Amin A, et al. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl- β -D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. *Nat Genet.* 2013; 45:1190-7. PMID: 23995136
 26. Wozniak M, Tiuryn J, Wong L. GWAMAR: genome-wide assessment of mutations associated with drug resistance in bacteria. *BMC Genomics.* 2014; 15 Suppl 10:S10. PMID: 25559874
 27. Regmi SM, Coker OO, Kulawonganunchai S, et al. Polymorphisms in drug-resistant-related genes shared among drug-resistant and pan-susceptible strains of sequence type 10, Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Myco.* 2015; 4:67-72. doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.11.050
 28. Huang WL, Hsu ZJ, et al. Rapid and accurate detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using an oligonucleotide array. *Clin Micro and Infect.* 2014; 20(9):O542-9. PMID: 24372766
 29. Kurbatova VK, J. Cegielski P, et al. Evaluation of sputum culture conversion as a prognostic marker for end-of-treatment outcome in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *The Lancet Respir Med.* 2015; 3(3):201-9. PMID: 25726085
 30. Ekaterina VK, Dalton T, et al. Additional drug resistance of multidrug-resistant tuberculosis in patients in 9 countries, *Emerg Infect Dis*, 21(6):977-83, 2015. PMID: 25988299
 31. Kamerbeek J, et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:907-914. PMID: 9157152
 32. Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998; 144:1189-1196. PMID: 9611793
 33. Supply P, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44, 4498-4510. PMID: 17005759
 34. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf. Date last

updated: April 11, 2014.

35. Lange C, Abubakar I, et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J*, 2014; erj01883-2013.
36. Centers for Disease Control. Taiwan tuberculosis control report 2012. <http://www.cdc.gov.tw/uploads/files/201303/9ea28ba2-69c7-4f27-af3b-55be5ec7e35c.pdf>. Date last updated: April 11, 2014.
37. Mokrousov I, Vyazovaya A, et al. Real-time PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:1691-3. PMID: 24523461
38. Coll, F. et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med*. 2015. doi:10.1186/s13073-015-0164-0