

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000502

衛生福利部疾病管制署 103 年署內科技研究計畫

計畫名稱：多重抗藥、超級及全抗藥性結核病之監測

年度/全程研究報告

執行單位：衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：周如文

研究人員：吳玫華、張筱玉、王亭方、曾昭傑

執行期間：103年1月1日至103年11月15日

目 錄

	頁 碼
目次	
壹、中英文摘要	(iv)
貳、本文	
一、前言	(1)
二、材料與方法	(6)
三、結果	(11)
四、討論	(16)
五、結論與建議	(18)
六、參考文獻	(20)
<u>圖次</u>	
圖一 多重抗藥性結核病各年在臺灣各區的分布變化	(24)
圖二 2007-2013 年多重抗藥性結核菌抗藥性分析(1)所有個案 (2)新個案(3)再治療個案。	(25)
圖三 多重抗藥(2013-2014)及超級抗藥(2007-2014)結核菌株 之抗藥性分析	(26)
圖四 非 MDR、Simple MDR、pre-XDR、及 XDR 的藥物 MIC 分佈範圍	(27)
<u>表次</u>	
表一 以 REMA 測試之 287 抗藥性菌株分類	(30)
表二 藥物儲備溶液(stock solution)製備表	(30)
表三 REMA 藥物敏性試驗方法 96 孔盤配製表	(31)

表四 7H11 瓊脂平板法藥敏盤藥物配製濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)表	(32)
表五 各年齡層 MDR-TB 送驗個案數	(33)
表六 肺外結核通報項目分析	(33)
表七 胸部 X 光檢驗結果	(33)
表八 2007-2013 年各年度個案藥物抗藥比例(1)所有個案 (2)新個案(3)再治療個案	(34)
表九 H37Rv 結核菌之最小抑菌濃度測試結果	(35)
表十 多重抗藥結核菌株 REMA MIC 及標準瓊脂藥敏 試驗結果	(36)
表十一 超級抗藥結核菌株 REMA MIC 及標準瓊脂藥敏 試驗結果	(37)
表十二 非 MDR、MDR 與 XDR 結核菌株以 REMA 法測試 所得 MIC 值分佈個數的 p 值比較	(38)
附錄	(46)

壹、中英文摘要

摘要

研究目的 監測臺灣多重結核病抗藥性趨勢，建立重新定義已初步證實對結核菌具有抑(殺)菌效果之上市藥物之抗藥性檢測法，及評估測試對多重抗藥結核菌株的效果。

研究方法 分析 2007-2013 年 1,215 株多重抗藥結核菌株之抗藥性資料。及收集臺灣非多重抗藥、多重抗藥、超級抗藥性結核菌株共 287 株，以甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 (trimethoprim-sulfamethoxazole)、美化喹寧 (mefloquine)、阿莫西林-克拉維酸鉀(amoxicillin-clavulanate)、美羅培南-克拉維酸鉀(meropenem-clavulanate)、氯法齊明(clofazamine)、硫利達嗪 (thioridazine)、莫西沙星(moxifloxacin)、硝唑尼特 (nitazoxanide)、采福適(Linezolid)、異菸鹼醯(INH)及羥基得泰松(oxyphenbutazone)藥物，進行藥物敏感性試驗，以瞭解各項藥物對多重抗藥、超級抗藥性結核菌株的抑(殺)菌效果。主要實施方法為瓊脂平板法及 resazurin Microtiter assay，在各藥物的序列稀釋濃度中，找出可抑制 99% MDR 結核菌株生長的最小抑制濃度 (minimum inhibition concentrations, MICs)。

主要結果(1) 2007-2013 年間，共送驗 1,215 位多重及超級抗藥性個案結核菌株，包含新個案 833 (68.6%)位、再治療個案 382 (31.4%)位。女性占 334 位 (27.5%)。大於 65 歲個案占最多數 26.5%，其次為 45-54 歲 22.1%。1,202 位送驗個案有初痰抹片結果中，58.9%抹片陽性。刪除 2 位個案後，1,213 位送驗個案無胸部 X 光檢查結果，胸部 X 光正常者 23 位(1.9%)或異常但無關結核病者 11 位(0.9%)。資料顯示，MDR 菌株對於各個抗結核藥物的抗藥比例，各年度分別為：pyrazinamide 25.1%-48.1%、ofloxacin 9.4-42.0%、moxifloxacin 13.2-18.5%、gatifloxacin 為 1.6-5.1%、kanamycin 4.5-12.2%、amikacin

3.8-18.4%、capreomycin 3.1-7.0%、para-aminosalicylate 3.8-22.9% 及 ethionamide 16.5-37.2%。但尚未有對所有現階段測試之抗結核藥物產生全抗藥性的個案。分析結果顯示，自 2007 年至 2012 年，PZA、OFX 和 PAS 的抗藥性比例有顯著下降($P < 0.01$)。(2)建立 MDR 菌株於 11 種藥物 MIC 範圍及測試最小抑菌濃度之方法學。若參考其他細菌 MICs 檢測介於 3-5 梯度間之標準，認定自行配製藥物培養基的穩定性良好。並平行比較 INH 及 MOX 藥物敏感性，發現自行配製 REMA 法測試結果的正確性，優於商用 Sensititre® MYCOTBI 法。新藥於多重抗藥、超級抗藥性及非多重抗藥性菌株的最小抑菌濃度之分佈，分析結果顯示 Oxyphenbutazone 在 MDR、XDR 及非 MDR 的 MIC 分佈範圍有顯著差異，其餘 10 種藥物並未發現任何差異性。檢體接種至完成結果報告判讀時效平均為 14 - 15 天。

結論及建議事項多重抗藥性結核病臺灣各區的分布變化，可以略為觀察防治措施策略的成效。建議可以加強臺灣在結核病的抗藥性監測，確認是否有全抗藥性的個案結核病人，以評估 DOT-Plus 治療多重抗藥等病人的策略成效。MIC 值為進一步研究標準藥物敏感性試驗方法、培養基的選用及臨界濃度的建立不可缺少的重要工具。提供重新定義藥物之藥物敏感試驗結果，提供照護團隊參考，以評估最適用藥組合或規劃短程治療計畫，以提高多重抗藥、超級抗藥性結核病治癒率嘉惠病人。

關鍵詞：結核病、多重抗藥性、超級抗藥性、全抗藥性、MIC 分佈

Abstract

Purpose: The objectives of this study are (1) to conduct drug-resistant surveillance of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB); (2) to test activity of certain candidate drugs (e.g., trimethoprim-sulfamethoxazole, mefloquine, amoxicillin clavulanate, meropenem, moxifloxacin, cofazimine, thioridazine, nitazoxanide and oxyphenbutazone) against *Mycobacterium tuberculosis* isolates of patients with confirmed MDR-TB in Taiwan.

Materials and Methods: We retrospectively analyzed drug susceptibility testing (DST) results of the second-line drugs, ofloxacin (OFX), kanamycin (KM), para-aminosalicylate (PAS), ethionamide (EA) and rifabutin (RBT), of MDR *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates tested in 2007-2013, and amikacin (AM) tested in 2008-2013; while moxifloxacin (MOX), gatifloxacin (GAT) and cycloserine (CS) tested in 2010-2013. One isolate of each case per year was included in this study. DST was performed using either the Middlebrook 7H10 agar or a liquid-based proportion method. A total of 287 *M. tuberculosis* isolates were tested. We use established procedures, resazurin microtitre assay and agar proportion method, to test *M. tuberculosis* isolates known to be resistant to at least isoniazid and rifampicin to serial concentrations of each candidate drug to determine the minimum concentration that inhibits growth of > 99% of bacilli.

Results and Discussion: We analyzed DST results of 1,215 cases including 833 (68.6%) new and 382 (31.4%) and retreated cases. In this survey, ratios of resistance were 25.1%-48.1% to pyrazinamide, 9.4-42.0% to ofloxacin, 13.2-18.5% to moxifloxacin, 1.6-5.1% to gatifloxacin, 4.5-12.2% to kanamycin, 3.8-18.4% to amikacin, 3.1-7.0% to capreomycin, 3.8-22.9% to para-aminosalicylate and 16.5-37.2% to ethionamide. Significant decrease of

the PZA resistant rate ($P < 0.01$), OFX resistant rate ($P < 0.01$), and PAS resistant rate ($P < 0.01$) were observed. We preliminarily established both a liquid-based and an agar-based drug-resistant methods for testing repurpose drugs. More results were needed to suggest a resistant MIC value for each drug.

Conclusion and Suggestions: We observed decreasing trend of MDR-TB cases numbers from 2008 to 2013. This drug-resistance survey could be extended to analyze patient's clinical data to reveal causes of drug-resistance. The MIC results of repurpose drugs could be used to design a suitable regimen for treating MDR-TB cases.

Key Words: tuberculosis, multidrug-resistance, extensively drug-resistance, totally drug-resistance, MIC distribution

貳、本文

一、前言

多重抗藥性結核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR TB)是指病人感染對於目前最有效的第一線抗結核藥物 isoniazid 及 rifampin 同時具有抗藥性之結核菌株。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 30 萬 MDR TB 個案，共占總結核病案例的 3.6% (其中 0-28.3%為新案，而 0-61.6%為復發)；因 MDR TB 的治療困難度高與效果不佳，於 2008 年已造成 15 萬病患死亡，且治癒率僅達 60-69%【1】。

此外，防堵廣泛抗藥性結核病 (extensively-drug resistant TB, XDR TB)的傳播更是當務之急。因為 XDR TB 除了對第一線抗結核藥物 isoniazid 及 rifampicin 抗藥外，並同時對第二線藥中任一種 fluoroquinolone 及至少一種注射型二線藥物 (capreomycin、kanamycin 及 amikacin)產生抗藥性。因為對第一線與第二線藥物都產生抗藥性，可選擇的治療藥物受到嚴重的限制，所以 XDR TB 更難以獲得適當的治療。

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，其藥效有限、副作用較大且常供應短缺，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。由於新藥的研發是個必要且緩慢的過程，從實證研究到上市往往需要非常多年的時間，但抗藥性 TB 的治療與管理對於新藥的需求卻是非常迫切。

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、藥物會造成明顯的副作用或價格高昂等因素，因此未被納入常規治療使用。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可行性。而本研究使用包括甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 (trimethoprim-sulfamethoxazole)、美化喹寧 (mefloquine)、阿莫西林-

克拉維酸鉀 (amoxicillin-clavulanate)、美羅培南 (meropenem)、氯法齊明 (clofazamine)、硫利達嗪 (thioridazine)、莫西沙星(moxifloxacin)、硝唑尼特 (nitazoxanide) 及羥基得泰松 (oxyphenbutazone)，這些藥物已經被證實其安全性和低毒性，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。但是這些藥物缺乏對 MDR *Mycobacterium tuberculosis* 的殺（抑）菌效果相關完整研究，且並未確實地指出可能用於 MDR TB 的治療。如果實驗可證實這些藥物對於 MDR *M. tuberculosis* 的殺（抑）菌效果，將有可能被考慮納入治療 MDR TB 的藥物組合之一。

甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(trimethoprim-sulfamethoxazole, TMP-SMX)

TMP-SMX 結合從兩類抗生素：二氫葉酸還原酶(dihydrofolate reductase)抑制劑 (trimethoprim) 和磺酰胺(sulfonamide) (sulfamethoxazole)，兩者會抑制細菌 DNA 的合成所需之四氫葉酸(tetrahydrofolate)的合成。在 1960 年代首次引入 TMP-SMX 為固定劑量的組合(combination fixed dose)，被廣泛用於治療上和下呼吸道感染和泌尿系統感染，並且可能是最廣泛地用於治療和預防由 *P. jiroveccii* 引起的肺孢子蟲肺炎的藥物。研究已經反覆證明，TMP-SMX 可顯著降低愛滋病毒和結核病共同感染的死亡率【2-4】，這可能是因為它對結核病具有療效。在 1940 年代就已記載 sulfanomides 及 sulfones 治療結核病上的療效【5-9】，然而報告數據仍有些不一致。因此，是否使用這些藥物用於治療結核病，則因為更有效且安全的藥物(如 INH 和 RIF)的開發後，大致上放棄進一步驗證其適用性。後續在 1970 年代初期，有限的研究報導結核菌對 TMP 和 SMX 的抗藥性【10】，但未經過驗證。後續的報導認為 prevalent TB 可能對此類藥物產生抗藥性【11, 12】；然而自 1980 年代即有數據記載 SMX 對各種分枝桿菌（慢速和快速生長菌）是具有抑（殺）菌能力【13】。最近的研究指出，實驗室的結核菌對 TMP-SMX 具有易感性(susceptible)【14, 15】。總而言之，這些研究提供了重要的證據。其他最近的研究描述可能的藥物作用標的，這或許可以解釋 sulfonamides 對抗分枝桿菌的活性的機轉【16】。最近亦有研究表示 TMP-SMX 對 MDR TB 患者可能有療效【17】，但是效能仍未明。TMP-SMX 有良好的長期使用安全性，已無專利(off-patent)且便宜；如果發現對

MDR-TB 是有效的，它可以成為有用的複合藥物處方之一【18, 19】。

甲氟喹(mefloquine)

Mefloquine 是在 1970 年代開發的一種奎寧(quinine)衍生物，係 4- 喹啉甲醇(4-quinoline methanol)，原是始用於瘧疾治療。但對非結核分枝桿菌（尤其是鳥分枝桿菌複合體(*M. avium complex*)）【20, 21】具有活性；有限的研究證明，它對的結核菌亦有效【20,22,23】。但是，它並未被大規模的研究或廣泛用於結核病的治療。然而，因為它具有抗結核病療效，致使研究人員試圖發展的 mefloquine 衍生物更有效對抗 *M. tuberculosis*【24-26】。Mefloquine 的作用機制仍不明【26】，被認為是部分作用於 ATP 合成酶【27】。

阿莫西林-克拉維酸鉀(amoxicillin-clavulanate)

Amoxicillin 是一種 β -lactam 類抗生素。由於分枝桿菌細胞壁的脂質和 β -lactamase 的存在，使得最初 amoxicillin 並不被認為能有效治療結核病。從 1960 年代的小老鼠的研究結果顯示， β -lactamase 的抑制作用反而促進 benzylpenicillins 對 *M. tuberculosis* 的活性【40, 41】。後續的 *in vitro* 研究發現，若使用強效的 β -lactamase 抑制劑(如 clavulanate)，則 β -lactam 類抗生素即可有顯著的療效【42, 43】。最近的研究證明，clavulanate 不可逆的抑制 *M. tuberculosis* 的 β -lactamase 作用【45】，引起 amoxicillin-clavulanate 用於治療結核病上新的興趣。

美羅培南/克拉維酸(meropenem/clavulanic acid)

meropenem 是屬於特定 β -lactam 類抗生素 carbapenems 類的一種抗生素。Carbapenems 作用於不活化 transpeptidases，使得肽聚糖 (peptidoglycan) 的 cross-linking 無法形成。最近的研究顯示，carbapenems 類對 *M. tuberculosis* 的 β -lactamases 具有一定程度的拮抗性【46】。因此，meropenem/clavulanic acid 的組合，可能可用於治療抗藥性結核病。

氯法齊明(clofazamine)

Clofazamine (原名稱為 B663) 係 riminophenazines 類藥物，是於 1954 年合成的抗結核藥物【31】，但是因為在動物試驗無藥效而被擱置【31, 33】，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【33】。然而 riminophenazine 抗結核活性的真正機轉，一直未明確被證明【31, 33】。其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【33-36】。重要的是 clofazamine 似乎很少會產生抗藥性【33】，也不會與 riminophenazines 類或其他抗結核藥物產生交互抗藥(cross-resistance)【37】；此外，已證明 clofazamine 可抑制 INH 產生的抗藥性及 *in vitro* 實驗證明其與 INH 有協同作用活性(synergistic activity)【38】。有趣的是 clofazamine 和其他 riminophenazines 類藥物具有在巨噬細胞內運輸藥物獨特的能力【33】。初步瞭解 clofazamine 可用於治療 MDR【39】。

硫利達嗪 (thioridazine)

Phenothiazines 類是 1950 年代首次合成的精神病用藥。phenothiazines 在臨床使用後不久，其抗菌的效能即被發現。但是，因為當時係為各類抗生素發展的新時代，而很少受到重視。然而，由於微生物抗藥性的問題日異嚴重，phenothiazines 類藥物才重新受到關注。根據研究報導指出，phenothiazines 作用於多項分枝桿菌細胞運轉過程中，包括抑制外排泵(efflux pump)活性【28, 29】、參與細菌呼吸的 NADH2-甲基萘醌氧化還原酶 (menaquinone oxidoreductase) 和脫氫酶 (dehydrogenase)【30-32】、阻止鈣與蛋白結合質的 calmodulin 拮抗【33, 34】，及作用於分枝桿菌細胞壁。因此，phenothiazines 類可以使用於多標的藥物複方中【31】，也因此有可能較不易產生抗藥性。phenothiazines 也可用為結核病治療的有效佐劑，因為在 *in vitro* 實驗中發現對 rifampin、streptomycin 及 amikacin 有協同作用效果【29】，此可能是因為提高藥物在細胞內的累積量所致。此外，phenothiazines 有可能改善因為治療藥物(如 cycloserine)導致的精神病(psychosis)【30】。

莫西沙星(moxifloxacin)

Moxifloxacin 在 1962 年首次發現，用於治療革蘭氏陰性導致的尿道感染【50】。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 TB【51】，很少實驗室的研究研究其 MICs。

硝唑尼特 (nitazoxanide)

Nitazoxanide 是在 1980 年代開發的一種 anti-protozoa 的水楊酰胺 (nitrothiazolyl-salicylamide) 衍生物，發現可以有效對抗蠕蟲(helminthic)和原蟲性腹瀉病。Nitazoxanide 是 pro-drug，可快速代謝成具活性的產物 tizoxanide。Tizoxanide 會干擾厭氧能量代謝系統運作的關鍵酵素 pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR)。在 2009 年，研究證明 nitazoxanide 對抗 *M. tuberculosis* 的效果，及在高接種量及低藥物濃度，並不會產生抗藥性【47】。Nitazoxanide 似乎對複製(replicating)和非複製的結核菌皆有抑菌效果。然而，尚未有結核病臨床試驗使用結果的報導。

羥基得泰松(oxyphenbutazone)

Oxyphenbutazon 被普遍認為是一種 non-steroidal anti-inflammatory 藥物，是由 phenylbutazone 代謝產生的 pyrazolone。最早是在 1960 年代初用於治療風濕。1963 年首次發表 oxyphenbutazone 用於結核病的治療【48】，可使臨床症狀改善，但是沒有統計學上的意義。最近，oxyphenbutazone 已經證明對 *M. tuberculosis* 有殺菌效果【49】，但並無臨床試驗的證實。

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。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、實證到上市是個緩慢的過程，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 結核病人是當務之急。目前，許多曾被使用在治療 MDR 結核病的二線藥物，多有藥效有限、副作用較大、高昂價格且常供應短缺的限制。本研究針對上述藥物，收集分送至疾病管制署分枝桿菌參考實驗室進行確認的 MDR-TB 及 XDR-TB 菌株，進行藥敏試驗測試研究、建置菌株庫及方法學建立，重新定義(re-purpose)既有藥物對結核菌株的殺(抑)菌效果。主要實施的藥物敏感性試驗方法為瓊脂平板法及 Resazurin Microtiter Assay (REMA)，利用各藥物的序列稀釋濃度中，找出可抑制 99% MDR 結核菌株生長的最小抑制濃度 (minimum inhibition concentrations, MICs)。預期成果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 結核病治癒率嘉惠病人。同時，藉由分析歷年的二線藥物抗藥比例及抗藥型態，加強臺灣的結核病抗藥性監測，確認是否有全抗藥性(totally drug-resistant, TDR)結核病菌株的產生，以評估 DOT-Plus 治療 MDR 等結核病人的策略成效。

二、材料與方法

(一) 材料

由醫療院所結核病實驗室分送菌株至疾病管制署，進行藥敏結果確認及二線藥敏檢驗之結核菌，含：2013 年 1 月至 2014 年 10 月期間之 MDR 及 RMP 單一抗藥菌株，及 2007 至 2014 年 XDR 菌株經鑑定及一、二線藥敏試驗後，再進行新定義之待測 11 種 MICs 藥物敏感性測試等，共計測試 287 株(表一)。

(二) 實驗方法：

1.自行配製之含藥物培養基之確效試驗

(1) 將 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) 序列稀釋 1%、2%、4%、6%、8%、10%、12%及 14%，接種 H37Rv 菌液，以測試結核菌是否會受藥物配製所使用的 DMSO 溶劑而影響生長。

(2) 使用 H37Rv (ATCC® 27294™)為品管測試組，測試自行配製藥物 96 孔盤藥物穩定

性。以瓊脂比例法(agar proportion method)為標準【56】，比較自行配製 REMA 測試盤及 MYCOTBI plate (Sensititre®)在 moxifloxacin 及 isoniazid 二項藥物的敏感性、專一性及正確率。

2. 藥物敏感性試驗

(1) 菌株培養

將待測試之臨床抗藥性結核菌，次培養於 Löwenstein-Jensen 或 MGIT® 培養基，進行增菌與純化。

(2) 菌種鑑定

將結核菌液，利用 IS6110 是存在於結核菌群的專一性插入序列 (insertion sequence, IS) 特性，以即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 為技術平台，設計具有對結核菌群 IS6110 專一性的引子，並針對 IS6110 產物設計具有專一性的 Taqman® 核酸探針，進行聚合酶連鎖反應與螢光標記核酸探針的雜交反應，以鑑定為結核菌或非結核分枝桿菌。

(3) 藥敏試驗實驗方法

3.1 Resazurin Microtiter Assay (REMA)

3.1.1 原理: 在 96 孔盤液態培養的狀態下，利用氧化還原指示劑 Resazurin 顏色的變化，來偵測結核菌的藥物敏感性試驗【57,58】。

3.1.2 藥物配製

根據查找文獻建議，選取已有研究提出的對結核菌有抑(殺)菌效果的 13 種藥物標準品及已有研究報告的 MICs 濃度範圍做藥敏測試，藥物品項為 trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX)【59】、mefloquine【錯誤! 找不到參照來源。】、amoxicillin/clavulanate (AMC/CLAV)【60】、clofazimine (CFM)【61,62,63】、meropenem/clavulanate(MEPM/CLAV)【64】、thioridazine (TDZ)【65】、nitazoxanide (NTZ)【66】、moxifloxacin (MOX)【67】、oxyphenbutazone

(OPBZ)【68】、Linezolid (LZD)及 INH。OPBZ 購買自 Tolunto 廠牌，Potassium clavulanate 購買自 Fluka 廠牌(Sigma-Aldrich Chemie GmbH)，INH 及 Resazurin 購買自 Sigma 廠牌(Sigma-Aldrich Chemie GmbH)，其餘 10 種藥物購買自 USP (U.S. Pharmacopeia) 廠牌。

配製時使用 DMSO 溶解藥物：DMSO 濃度在 nitazoxanide 的配製中使用 2%，其餘藥物均低於 2%。藥物儲備溶液 (stock solution)製備所需溶劑及濃度列於表二。藥物儲備溶液須先經 0.22 μ L 濾膜過濾後，冷凍於-80 $^{\circ}$ C 保存，其使用以解凍 1 次為原則。自行製備藥敏盤之藥物使用溶液 (working solution) 除了 Oxyphenbutazone 不以 2 倍連續稀釋而需個別配製外，藥物配製濃度為測試濃度之 4 倍。液態培養基使用 Middlebrook 7H9 (pH 6.6 \pm 0.2)，惟 Oxyphenbutazone 使用酸性 pH 5.9-6.0 之 7H9 (含 0.6% KH_2PO_4 、0.2% 甘油及 10% OADC (Oleic acid, Bovine albumin, Dextrose, Catalase))，接種菌液製備於 pH 6.6 \pm 0.2 之 7H9，與含藥培養基混合後，最終 pH 值為 6.1-6.2。Meropenem / Clavulanate 之 7H9 製備時含 Clavulanate 濃度固定在 5.0 μ g/mL，菌液與含藥培養基混合後，最終 Clavulanate 濃度為 2.5 μ g/mL【64】。除 Oxyphenbutazone 濃度不是 2 倍連續稀釋而需個別製備外，藥物儲備溶液 (stock solution)稀釋於 7H9 製備成藥物使用溶液 (working solution)，分裝在 96 孔盤進行 2 倍濃度的序列稀釋，96 孔盤外緣四邊孔格全數補足 200 μ L 之無菌水，以避免培養期間培養基因液體蒸發而體積減少。製備完畢之藥敏盤須於當日加入菌液進行培養測試。MIC 藥物品項、最終測試濃度 (final drug concentration)與 96 孔盤配製表如表三。

3.1.3 藥物敏感性試驗步驟

3.1.3.1 挑選固態或液態培養基培養出之新鮮初代(primary)結核菌做為測試菌，於 BSL-3 實驗室中調製 Macfarland 1.0 測試菌液；再將菌液以 0.85%生理食鹽水稀釋為 1:20，然後接種 100 μ L 之 1:20 稀釋菌液入 96 孔盤，同時接種至 Sheep blood agar(BD[®])做無菌測試。接種菌液再繼續連續稀釋至 10⁻⁵ 菌液，接種至 Middlebrook 7H11 瓊脂平板培養基做接種菌液之菌落計數(colony count)，接種量需固定，以

免影響測試結果。

3.1.3.2 接種完畢之 96 孔盤用塑膠袋封好，置入 35-37°C 溫箱培養。

3.1.3.3 培養 7-10 天後，加入 0.02% 的 resazurin，於 48-72 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，最低的藥物敏感濃度(藍色)即為最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

3.1.3.4 將 Sheep blood agar(BD®)置入 35°C-37°C 溫箱中，培養 48 小時觀察有無污染菌生長。菌落計數之 Middlebrook 7H11 瓊脂平板培養基置入 35-37°C 溫箱中培養約 14 天，待單一菌落生長至肉眼可觀察及單一菌落間生長未融合前，以解剖顯微鏡輔助觀察菌落型態及菌落計數。藥物配製及菌液之接種流程，詳見**錯誤! 找不到參照來源**。標準操作步驟文件。

3.2 7H11 瓊脂平板法

3.2.1 藥物配製: 藥物品項及 stock solution 與 REMA 法相同。配製濃度列於**表四**。固態培養基使用 Middlebrook 7H11 (pH 6.6 ± 0.2)，惟 Oxyphenbutazone 使用酸性 pH 6.1-6.2 之 7H11 製備。OADC 為培養結核菌必須添加之營養添加劑，滅菌後之瓊脂再加入 10% OADC，為避免 OADC 於高溫變質 (變白)與瓊脂於過低溫而凝固，製備過程需搭配水浴槽的使用，使瓊脂保持液態於 55-65°C 之適當溫度範圍。製備完畢之藥敏盤待凝固後，倒放並冷藏儲存於 2-8°C 備用，藥敏盤效期為 1 個月。

3.2.2 藥物敏感性試驗步驟

3.2.2.1 挑選固態或液態培養基培養之新鮮初代(primary)結核菌做為測試菌，於 BSL-3 實驗室中調製 Macfarland 1.0 測試菌液。再將菌液以 0.85% 生理食鹽水稀釋為 1:100 (10^{-2}) 及 1:10000 (10^{-4})，然後分別接種三滴 (0.1 ml) 稀釋菌液，至含藥及不含藥控制組固態培養基。

3.2.2.2 接種完成之培養基，先置於室溫中，待接種菌液吸入瓊脂中。再將平板分別封入 CO₂ 可通透的塑膠袋中，於 35-37°C 之 5-10% CO₂ 恆溫培養箱中靜置培養 21 天。

3.2.2.3 結果判讀為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 菌落則記錄實際菌落數目。比較含藥與不含藥控制組培養基之生長菌落數，高於 1%為抗藥，反之為敏感：最低的藥物敏感濃度即為最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)【56】。

(4) 統計分析

利用 excel 及 SPSS 軟體進行計算及圖表分析製作，287 株菌株在各 MIC 序列稀釋濃度的個數以百分比進行統計，同質性檢定(test of homogeneity)計算其 MIC 值分佈的百分比是否有顯著差異， p -value <0.05 定義為有顯著差異。

5. 抗藥性監測

疾病管制署自 2007 年起，啟動 MDR 病人加強照護計畫。本研究計畫自「中央傳染病追蹤管理系統」取得個案基本資料，併同實驗室檢驗結果，綜合分析歷年 MDR 及 XDR 結核病人抗藥性趨勢及個案特性，監測抗藥性發生的變化情形。相關資料以 Excel 統計分析並進行卡方檢定。

三、結果

(一) 2007-2013 年多重抗藥性個案菌株抗藥性資料分析

2007-2013 年間，共送驗 1,215 位多重及超級抗藥性個案結核菌株，包含新個案 833 位(68.6%)、再治療個案 382 位(31.4%)。女性占 334 位(27.5%)，其中 247 位為新個案；男性 881 位(72.5%)，其中 586 位為新個案。各年度送驗個案分別為：2007 年 131 位含新案 78 位(59.5%)、2008 年 322 位含新案 198 位新案(61.5%)、2009 年 183 位含新案 122 位(66.7%)、2010 年 159 位含新案 114 位 (71.7%)、2011 年 158 位含新案 113 位 (71.5%)、2012 年 133 位含新案 106 位(79.7%)及 2013 年 129 位含新案 102 位 (79.1%)(表 C)。各年齡層送驗比例為：0-14 歲 6 位(0.5%)、15-24 歲 64 位(5.3%)、25-34 歲 146 位(12.0%)、35-44 歲 173 位(14.2%)、45-54 歲 269 位(22.1%)、55-64 歲 235 位(19.3%) 及大於 65 歲之 322 位(26.5%)(表五)。

個案中，60 位(4.9%)有肋膜積水、55 位(4.5%)併有肺外結核。而 55 位肺外結核個案以其他器官結核 19 位(34.5%)最多，後依序為淋巴結核 10 位(18.2%)、胸肋膜結核 8 位(14.5%)、骨及關節結核 8 位(14.5%)及消化道結核 4 位(7.3%)等(表六)。刪除 13 位無初痰抹片結果個案後，1,202 位送驗個案中，708 (58.9%)位為 AFB 抹片陽性。刪除 2 位無胸部 X 光檢查個案後，1,213 位送驗個案中，胸部 X 光正常者 23 位(1.9%)、異常但無空洞者 789 位(65.0%)、異常且有空洞者 390 位(32.3%)、異常但無關結核病者 11 位(0.9%)(表七)。

多重抗藥性結核病各年在臺灣各區的分布變化，如圖一所示。

分析 2007-2013 年送驗之 1,215 位多重及超級抗藥性個案結核菌株抗藥資料如圖一(1)，833 位新個案如圖一(2)及 382 位再治療個案如圖一(3)。資料顯示，MDR 菌株對於各個抗結核藥物的抗藥比例，各年度分別為：pyrazinamide (PZA) 25.1%-48.1%、ofloxacin (OFX) 9.4-42.0%、moxifloxacin (MOX) 13.2-18.5%、gatifloxacin (GAT) 為 1.6-5.1%、kanamycin (KM) 4.5-12.2%、amikacin (AM) 3.8-18.4%、capreomycin (CAP) 3.1-7.0%、para-aminosalicylate (PAS) 3.8-22.9%及 ethionamide (ETH) 165.0-37.2% (表

八)。此外，亦分析 2007-2013 年確認的 53 例 XDR-TB 個案，但尚未有對所有現階段測試之抗結核藥物產生全抗藥性的個案。分析結果顯示，自 2007 年至 2012 年，PZA、OFX 和 PAS 的抗藥性比例有顯著下降($P < 0.01$)。

(二) 建立抗藥性最低抑菌濃度檢測方法

(1) 建立 REMA 法與標準瓊脂試驗之間接藥物感受性試驗，測試結核菌最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)方法。

參考文獻設計液態 REMA 方法，利用氧化還原指示劑 Resazurin¹顏色的變化，判讀結核菌生長與否。使用培養基為含 10% OADC 的液態 7H9 培養液及 7H11 固態瓊脂培養基。其中，標準瓊脂試驗藥物濃度的測試範圍，係參考 REMA 初步的 MIC 結果。

(2) 測試 DMSO 是否會抑制結核菌株生長

自行配製藥物中，有 6 種藥物須使用 DMSO 為溶劑，菌液加入含藥物之 7H9 後，培養基內含的 DMSO 濃度在 NTZ 為 2.0%、MEPM-CLAV 為 1.6%、OPBZ 為 1.6%、TDZ 為 1.3%、CFM 為 0.4%、MOX 為 0.2%。隨機選取 6 株 MDR 菌株、2 株非 MDR 菌株及 1 株 H37Rv (ATCC® 27294™) 菌株，進行 DMSO 是否會抑制結核菌株生長的測試。MIC 測定結果在 H37Rv 為 14%、MDR 菌株為 4-14%、非 MDR 菌株為 12-14%。因此，本研究所使用之 2% DMSO 待測藥物溶劑，並不會對結核菌培養生長造成影響。

(3) 測試自行配製藥物培養基的穩定性

製備的新批號藥敏培養基，均以 H37Rv 標準菌株進行測試。REMA 法及標準瓊脂試驗法所測得之最低抑制濃度(MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$) 結果分佈如表四。REMA MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 分佈如下：Meropenem-Clavulanate 為 2/2.5-16/2.5 (n=20)、Oxyphenbutazone 為 40-90 (n=37)、Mefloquine 為 4-16 (n=23)、Amoxicillin-Clavulanate 為 8/4-64/32 (n=22)、Clofazamine 為

¹ Resazurin is an oxidation–reduction indicator used for the evaluation of cell growth, particularly in various cytotoxicity assays. It is a blue non-fluorescent and non-toxic dye that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells. Resorufin is further reduced to hydroresorufin (uncoloured and nonfluorescent).

0.12-1 (n=24)、Thioridazine 為 8-16 (n=24)、Nitazox 為 8-32 (n=24)、Moxifloxacin 為 0.03-0.25 (n=24)、Trimethoprim-Sulfamethoxazol 為 0.2/4-0.8/16 (n=24)、INH 為 $\leq 0.03-0.25$ (n=23)、Linezolid 為 0.25-1 (n=20)；而標準瓊脂試驗法最低抑制濃度(MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$)分佈如下：Meropenem-Clavulanate 為 16/2.5 (n=2)、Oxyphenbutazone 為 40-80 (n=3)、Mefloquine 為 4-8 (n=3)、Amox-Clavulanate 為 32/16-64/32 (n=2)、Clofazamine 為 0.25-1 (n=3)、Thioridazine 為 8-16 (n=3)、Nitazoxanide 為 8-16 (n=3)、Moxifloxacin 為 0.25 (n=3)、Trimethoprim-Sulfamethoxazole 為 0.4/8-0.8/16 (n=3)、INH 為 0.06-0.12 (n=3)、Linezolid 為 0.5-1 (n=2)。參考其他細菌 MICs 檢測介於 3-5 梯度間之標準，認定自行配製藥物培養基的穩定性良好。

(4) 平行比對培養基敏感性

以標準瓊脂試驗法為標準，將自行配製 REMA 法同時與商用 Sensititre® MYCOTBI 法比較其 INH 及 MOX 藥物敏感性測試結果的正確性。並參考世界衛生組織建議，以 MGIT™ 960 培養基進行藥敏測試的臨界濃度為基準：INH 為 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MOX 為 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。平行比對結果發現：自行配製 REMA 法在 INH 的正確率 92.3% (共 13 株含 resistant 7 株，susceptible 6 株)，MOX 的正確率 98.3% (共 60 株含 resistant 8 株，susceptible 52 株)；而商用 Sensititre® MYCOTBI 法，在 INH 的正確率 84.6% (共 13 株含 resistant 7 株，susceptible 6 株)，MOX 的正確率 50.0% (共 60 株含 resistant 8 株，susceptible 50 株)。據此，自行配製 REMA 法測試的結果的正確性應相當可信。

(三) 執行新定義之待測 11 種藥物 MICs 測試

(1) 選取 MDR 及 XDR 結核菌株進行 REMA MIC 測試。菌株測試以不重複個案為原則，如果有相同個案，但一或二線藥敏結果不同，則 2 株檢體均會進行新藥物測試。

(2) 完成 REMA 藥敏測試共計 287 株(表一)。包含(a) 47 株非 MDR 菌株：20 株非 MDR 菌及 35 株 RMP 單一抗藥菌株，及(b) 240 株 MDR 菌株：含 53 株為 XDR 菌株、39 株 pre-XDR (7 株為對 CAP, KM, AM 任一抗藥及 32 株為對 fluoroquinolone 任一抗藥)。

(3) 240 株 MDR 菌株測試結果分析

表十列出 90%以上測試菌株的 REMA MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 分佈，及隨機選取的 10 株菌株的標準瓊脂試驗法結果。(a) REMA 法 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)：在 Meropenem-Clavulanate 為 1/2.5 - 16/2.5 (n=176/194, 90.7%)、Oxyphenbutazone 為 20 - 80 (n=224/240, 93.3%)、Mefloquine 為 2 - 8 (n=227/240, 94.6%)、Amoxicillin-Clavulanate 為 8/4 - >64/32 (n=225/240, 93.8%)、Clofazamine 為 0.12 - 1 (n=218/240, 90.8%)、Thioridazine 為 4 - 8 (n=230/240, 95.8%)、Nitazox 為 8 - 32 (n=219/239, 91.6%)、Trimethoprim-Sulfamethoxazole 為 0.1/2 - 0.8/16 (n=219/240, 91.3%)、INH 為 0.12 - >4 (n=225/240, 93.8%)、Linezolid 為 0.12 - 0.5 (n=233/240, 97.1%)；(b) 標準瓊脂試驗法最低抑制濃度(MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$)共測試 10 株，在 Meropenem-Clavulanate 為 1/2.5 - 32、Oxyphenbutazone 為 ≤ 20 - 40、Mefloquine 為 8、Amox-Clavulanate 為 16/8 - >64/32、Clofazamine 為 0.25 - 2、Thioridazine 為 8 - 16、Nitazoxanid 為 8 - 16、Trimethoprim-Sulfamethoxazole 為 $\leq 0.05/1$ - 1.7/32、INH 為 1 - >4、Linezolid 為 0.25 - 1。

此部分實驗亦進行配製接種菌液的菌落計數共完成 185 株，已經完成菌落數目計算：19 株為 10^{-4} cfu/mL、102 株為 10^{-5} cfu/mL、64 株為 10^{-6} cfu/mL、1 株為 10^{-7} cfu/mL。證明操作技巧及方法穩定性良好。此外，在檢驗時效性方面，計算 233 株 MDR 菌株 REMA 方法所需培養天數，平均為 12 天，若加入 resazurin 再培養 48-72 小時，總共從檢體接種至完成結果報告判讀時效平均為 14 - 15 天。

(4) 53 株 XDR 結核菌株測試結果分析

以 REMA 法及標準瓊脂試驗法進行 53 株 XDR 菌株的 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 測定結果分佈列於表十一。採 >90% 測試菌株的 MICs 為範圍：在 Meropenem-Clavulanate 為 0.25/2.5 - 16/2.5 (n= 45/48, 93.8%)、Oxyphenbutazone 為 ≤ 20 - 80 (n= 52/53, 98.1%)、Mefloquine 為 2 - 8 (n= 48/53, 90.6%)、Amoxicillin-Clavulanate 為 8/4 - >64/32 (n= 49/53, 92.5%)、Clofazamine 為 0.12 - 2 (n= 50/53, 94.3%)、Thioridazine 為 4 - 8 (n= 51/53, 96.2%)、Nitazox 為 8 - 32 (n= 47/52, 90.4%)、Moxifloxacin 為 0.5 - 2 (n= 47/51, 92.2%)、TMP-SMX 為 0.1/2 -

0.8/16 (n= 49/53, 92.5%)、INH 為 1 - >4 (n= 52/53, 98.1%)、Linezolid 為 0.12 - 0.5 (n= 51/53, 96.2%) ; 標準瓊脂試驗法 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)測試完成 4 株：在 Meropenem 為 8 - 32、Oxyphenbutazone 為 20 - 40、Mefloquine 為 8、Amoxicillin-Clavulanate 為 32/16 - >64/32、Clofazamine 為 0.25 - 0.5、Thioridazine 為 8 - 16、Nitazox 為 8、Moxifloxacin 為 2 - >2、Trimethoprim-Sulfamethoxazole 為 $\leq 0.05/1$ - 0.8/16、INH 為 4 - >4、Linezolid 為 0.25 - 0.5、Moxifloxacin 為 2 - >2。287 株菌株藥物抗藥菌株比例(圖二)；而 MDR、XDR、pre-XDR 及非 MDR 各類抗藥菌株的 MIC 分佈，如圖三。

(四)統計分析

共完成 287 株菌株試驗。分析 11 種新測試藥物於 MDR、simple MDR (不含 XDR 及 pre-XDR 的 MDR)、XDR 及非 MDR 菌株，互相比較 MIC 分佈是否有顯著差異。依據 MIC 各個值分佈個數的百分比，計算的 p -value 結果列於表十二。MDR、simple MDR 與非 MDR (非 MDR 指 INH 與 RMP 敏感或沒有同時抗藥，INH 與 RMP 的抗藥型態，參見表一)。未統計 INH 的 MIC 分佈的 p 值；MDR、simple MDR 與 XDR 亦未統計 moxifloxacin 的 MIC 分佈的 p 值。統計結果顯示：MDR、simple MDR、XDR 及非 MDR 其對於測試的 11 種藥物，各個 MIC 值的分佈個數，計算分佈個數百分比無差異(p -value <0.05)。然而，MDR、SMDR、XDR 與非 MDR 菌株在 Oxyphenbutazone 藥物測試，互相比較其 MIC 分佈的百分比計算結果 p -value <0.001，有顯著差異。

四、討論

(一) 抗藥性監測

多重抗藥性結核病臺灣各區的分布變化，可以略為觀察防治措施策略的成效。唯，由群聚事件的調查分析經驗得知，MDR 確定群聚事件可在調查完成中斷數年後，延續通報確診之新案，目前追蹤最長已可達 8 年。由於結核病的細菌病原及宿主特性，這有可能是 MDR 有很高比例為新個案的原因之一。

MDR 確診個案數，逐年下降，但仍然占每年新確診結核病個案數的 1%。尤其 35-44 歲年齡層中，再治療個案有 39%。個案的管理在治療團隊照護下，應無虞。究竟是再感染或復發則值得探討；而無論是新案或是在聊個案皆以 >65 歲個案最多，各為 25.3% 及 29.1%，考慮共病等因素在治療管理上將是挑戰。

此外，MDR-TB 個案 AFB 痰塗片陽性個案占 58.9%，高於一般通報結核病個案的則約 40%，是否因病程嚴重或延遲診斷，所可能導致的傳播及實施感染控制措施是否得宜，宜審慎探討。MDR-TB 須由細菌學證據判定，具資料顯示 X-光正常或無關結核的個案比例共有 2.8%，宜思考快速細菌學或其他診斷工具的運用是否可輔助臨床診斷。

Simple MDR-TB 之 PZA 抗藥性達 26.1%，可思考是否會造成 MDR 短程治療策略之施行困擾(圖二)。XDR-TB 個案對各種藥物之抗藥比例，除 cycloserine 9.6%及 gatifloxacin 32.7%外，其餘皆高(47.2%-100%)。希望藉由新藥物的評估及引用，可以改善治療用藥上的困境。然而自 2007 年起，因政策實施限制 fluoroquinolone 類的使用，有效使得 OFX 抗藥比例下降，政策十分有效。持續監測抗藥比例的趨勢及適當的政策實施，能有效提升對於結核病防治及 MDR 個案的治療及管理成效。

(二) 抗藥性試驗

試驗方法學建立方面，使用 DMSO 為溶劑溶解藥物標準品最高濃度不可高於 2%。本研究建立的自行配製藥敏測試盤，可以準確測試待測試藥物的 MIC。已完成的標準

操作流程(SOP)文件 2 份。可供國內外研究單位及實驗室，做為測試一般抗生素或新藥開發所需執行結核菌藥敏試驗時，藥物配製及接種判讀參考依據。

微量滴定法自行製備藥敏盤於前置作業的準備至藥敏盤製備完畢，全程時間冗長、步驟繁瑣，並須在專用潔淨配藥區及操作箱維持無菌操作。由於微孔盤操作體積微量，因此製備人員除須具備無菌技術外，長時間的專注力與穩定性亦不可缺少。對於製備流程與分注儀器操作須要有高度的熟練度，才能提供高精準度與穩定度之藥敏測試盤。

液態培養比固態培養不易辨識污染的問題，除了要做無菌測試外，應在實驗的各流程留意無菌技術，以免有偽陽性的結果。OADC 為培養結核菌必須添加之營養添加劑，滅菌後之瓊脂再加入 10% OADC，為避免 OADC 於高溫變質 (變白)與瓊脂於過低溫而凝固，製備過程需搭配水浴槽的使用，使瓊脂保持液態於 55-65°C 之適當溫度範圍。

標準瓊脂試驗法之含藥瓊脂，相同藥物但須個別配製各濃度，相較於 REMA 試驗的連續稀釋，瓊脂試驗培養基須更多配製時間與人力。通常兩位人力，以半個工作天，可製備 15 個檢體量所需 11 種藥物 8 個稀釋濃度之 REMA 試驗法藥物盤；但相同人力下，一個工作天可製備標準瓊脂試驗法藥物盤則僅有 15 個檢體量中之一種藥物 8 個稀釋濃度。

自行配製藥物培養基的穩定性測試結果發現：(1) MIC 分佈範圍在 REMA 法，除了 AMC-CLAV 介於 4 個 2 倍稀釋梯度，Clofazamine 介於 3 個 2 倍稀釋梯度，其餘測試藥物均介於 1-3 個 2 倍稀釋梯度內。而標準瓊脂試驗法 MIC 分佈，則僅介於 1-2 個 2 倍稀釋梯度內。然而，此結果必須以瓊脂試驗法再操作更多菌株，才得以確認在測試結核菌藥敏試驗法時，固態的標準瓊脂試驗法比液態的 REMA 法有較集中及穩定的 MIC 分佈範圍。從世界衛生組織及美國 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)在結核菌一及二線藥的測試標準規範為固態的瓊脂或 Löwenstein-Jensen 培養基，液態則使用 MGIT® 培養基，以 macrodilution 的方式製作藥敏培養基，以比例法為藥敏測試及判讀方法。(2)

臨床菌株在 INH 及 MOX 的藥敏試驗結果顯示，自行配製 REMA 法的準確性高於商用 Sensititre® MYCOTBI 法。抗藥性試驗的結果，常會因為測試菌株包含有抗藥及非抗藥混合株並存、方法學特性，結果的再現性及正確性變化大，以 MIC 方式呈現抗藥性較具參考實用性。

由目前藥物測試已完成 287 株菌株在 11 種藥物的 MIC 分佈範圍得知，REMA 法介於 2-5 個 2 倍稀釋濃度；而標準瓊脂試驗法之 MIC 分佈範圍，除了 MEPM-CLAV 介於 5 個 2 倍稀釋梯度外，其餘測試藥物均介於 1-2 個 2 倍稀釋濃度內。卡方檢定計算新藥於 MDR、XDR、pre-XDR 及非 MDR 這 4 類檢體的 MIC 分佈，大部分新測物藥物上並無差異。

方法學確認可行，但在現階段施行頗為困難，昂貴且耗費時間及人力。第二年度將持續進行菌株分析，以累計相關結果，希望能訂出建議的抗藥性濃度。相關資料可提供動物臨床前試驗及臨床測試，如最終測試證實可行，則可提供醫師用來診治 MDR 及 XDR 病患時用藥參考。

五、結論與建議

多重抗藥性結核病臺灣各區的分布變化，可以略為觀察防治措施策略的成效。MDR 確診個案數，逐年下降，但仍然占每年新確診結核病個案數的 1%。尤其 35-44 歲年齡層中，再治療個案有 39%。個案的管理在治療團隊照護下，應無虞。究竟是再感染或復發則值得探討；而無論是新案或是在聊個案皆以 >65 歲個案最多，各為 25.3%及 29.1%，考慮共病等因素在治療管理上將是挑戰。

此外，MDR-TB 個案 AFB 痰塗片陽性個案占 58.9%，高於一般通報結核病個案的約 40%，是否因病程嚴重或延遲診斷，所可能導致的傳播及實施感染控制措施是否得宜，宜審慎探討。MDR-TB 須由細菌學證據判定，具資料顯示 X-光正常或無關結核的個案比例共有 2.8%，宜思考快速細菌學或其他診斷工具的運用是否可輔助臨床診斷。

Simple MDR-TB 之 PZA 抗藥性達 26.1%，可思考是否會造成 MDR 短程治療策略之施行困擾(圖二)。XDR-TB 個案對各種藥物之抗藥比例，除 cycloserine 9.6%及 gatifloxacin 32.7%外，其餘皆高(47.2%-100%)。希望新藥物的評估及引用，可以改善治療用藥上的困境。然而自 2007 年起，因政策實施限制 fluoroquinolone 類的使用，有效使得 OFX 抗藥比例下降，政策十分有效。建議持續監測抗藥比例的趨勢及適當的政策實施能有效提升對於結核病防治及 MDR 個案的治療及管理成效。

MDR、XDR、pre-XDR及非MDR菌株於11種藥物MIC範圍的建立，配合藥物動力學(pharmacokinetics, PK)及藥效學(pharmacodynamics, PD)的各項數據，提供動物臨床前試驗及臨床測試，最終決定最理想的臨床給藥方式。同時，MIC值為進一步研究標準藥物敏感性試驗方法、培養基的選用及臨界濃度的建立不可缺少的重要工具。

六、參考文獻

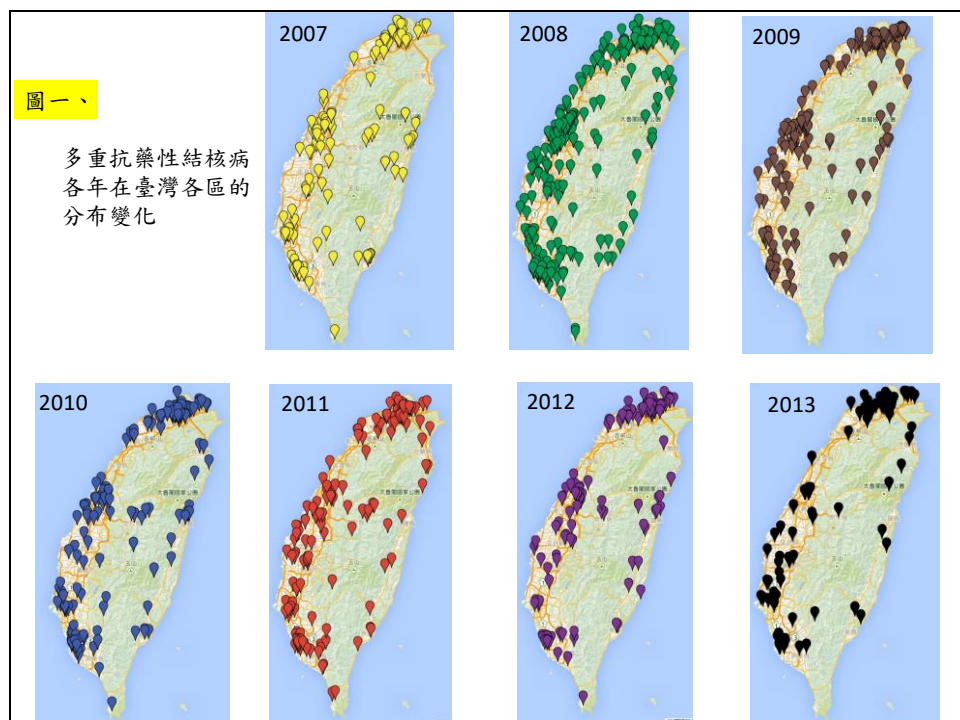
1. Multidrug and Extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
2. Nunn AJ, Mwaba P, Chintu C, Mwinga A, Darbyshire JH, Zumla A, et al. Role of co-trimoxazole prophylaxis in reducing mortality in HIV infected adults being treated for tuberculosis: randomised clinical trial. *Bmj*. 2008; **337**: a257.
3. Mwaungulu FB, Floyd S, Crampin AC, Kasimba S, Malema S, Kanyongoloka H, et al. Cotrimoxazole prophylaxis reduces mortality in human immunodeficiency virus-positive tuberculosis patients in Karonga District, Malawi. *Bulletin of the World Health Organization*. 2004; **82**(5): 354-63.
4. Grimwade K, Sturm AW, Nunn AJ, Mbatha D, Zungu D, Gilks CF. Effectiveness of cotrimoxazole prophylaxis on mortality in adults with tuberculosis in rural South Africa. *Aids*. 2005; **19**(2): 163-8.
5. Feldman WH. An evaluation of the efficacy in tuberculosis of sulfonamides, sulfones and certain other substances. *J R Inst Public Health*. 1946; **9**(10): 297-324.
6. Hinshaw H, Feldman W. TREATMENT OF EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS. *Journal of the American Medical Association*. 1941; **117**(13): 3.
7. Yegian D, Long RT. The specific resistance of tubercle bacilli to para-aminosalicylic acid and sulfonamides. *J Bacteriol*. 1951; **61**(6): 747-9.
8. Hart PD. Chemotherapy of tuberculosis; research during the past 100 years. *Br Med J*. 1946; **2**(4483): 805; 49.
9. Deliwala CV, Ganapathi K, Rajagopalan S. Chemotherapy of tuberculosis. *Curr Sci*. 1949; **18**(7): 233-7.
10. Bushby SR. Trimethoprim-sulfamethoxazole: in vitro microbiological aspects. *J Infect Dis*. 1973; **128**: Suppl:442-62 p.
11. Trimethoprim-sulphamethoxazole. *Drugs*. 1971; **1**(1): 8-53.
12. Smilack JD. Trimethoprim-sulfamethoxazole. *Mayo Clin Proc*. 1999; **74**(7): 730-4.
13. Wallace RJ, Jr., Wiss K, Bushby MB, Hollowell DC. In vitro activity of trimethoprim and sulfamethoxazole against the nontuberculous mycobacteria. *Rev Infect Dis*. 1982; **4**(2): 326-31.
14. Huang TS, Kunin CM, Yan BS, Chen YS, Lee SS, Syu W, Jr. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012; **67**(3): 633-7.
15. Forgacs P, Wengenack NL, Hall L, Zimmerman SK, Silverman ML, Roberts GD. Tuberculosis and Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; **53**(11): 4789-93.
16. Minakuchi T, Nishimori I, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Molecular cloning, characterization, and inhibition studies of the Rv1284 beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* with sulfonamides and a sulfamate. *J Med Chem*. 2009; **52**(8): 2226-32.
17. Alsaad N, van Altena R, Pranger AD, van Soolingen D, de Lange WC, van der Werf TS, et al. Evaluation of co-trimoxazole in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2012.
18. Ong W, Sievers A, Leslie DE, Forgacs P, Zimmerman SK, Silverman ML, et al. *Mycobacterium tuberculosis* and Sulfamethoxazole Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; **54**(6): 2748-9.
19. Young LS. Reconsidering Some Approved Antimicrobial Agents for Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; **53**(11): 4577-9.
20. Bermudez LE, Kolonoski P, Petrofsky M, Wu M, Inderlied CB, Young LS. Mefloquine, moxifloxacin, and ethambutol are a triple-drug alternative to macrolide-containing regimens for treatment of *Mycobacterium avium* disease. *J Infect Dis*. 2003; **187**(12): 1977-80.

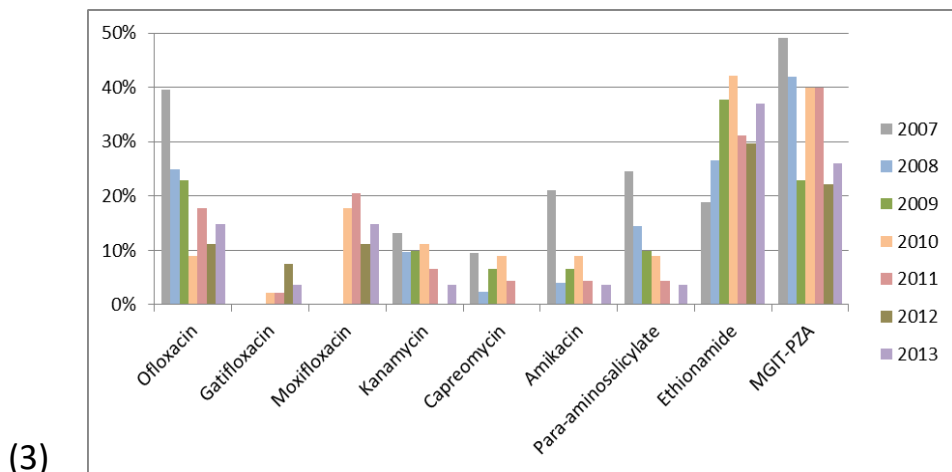
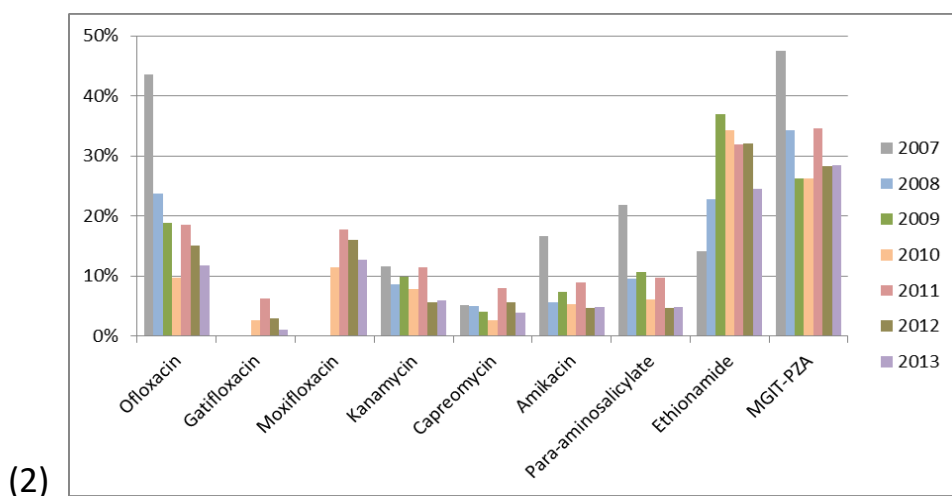
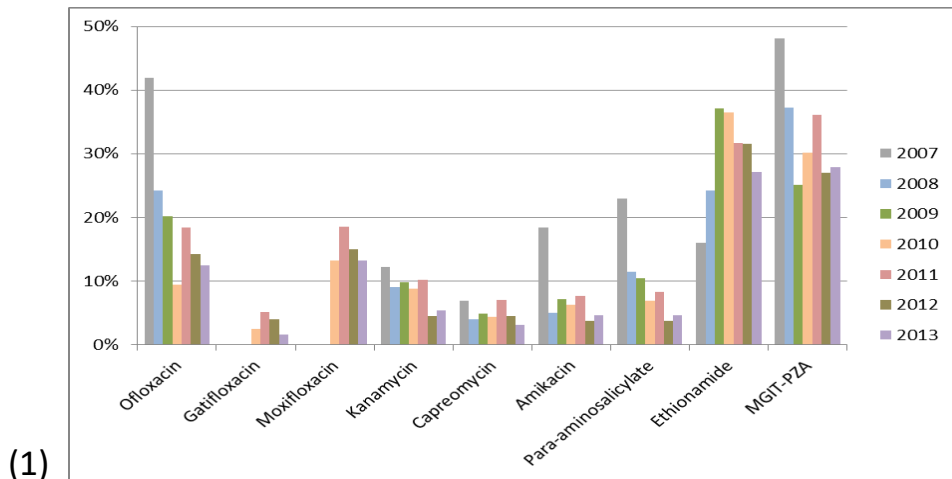
21. Nannini EC, Keating M, Binstock P, Samonis G, Kontoyiannis DP. Successful treatment of refractory disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with the addition of linezolid and mefloquine. *J Infect.* 2002; **44**(3): 201-3.
22. Lenaerts A, Woolhiser L, Gruppo V, Orme I, Goldman R, Lambros 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.
23. Mao J, Yuan H, Wang Y, Wan B, Pieroni M, Huang Q, et al. From serendipity to rational antituberculosis drug discovery of mefloquine-isoxazole carboxylic acid esters. *J Med Chem.* 2009; **52**(22): 6966-78.
24. Mao J, Wang Y, Wan B, Kozikowski AP, Franzblau SG. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of mefloquine-based ligands as novel antituberculosis agents. *ChemMedChem.* 2007; **2**(11): 1624-30.
25. Jayaprakash S, Iso Y, Wan B, Franzblau SG, Kozikowski AP. Design, synthesis, and SAR studies of mefloquine-based ligands as potential antituberculosis agents. *ChemMedChem.* 2006; **1**(6): 593-7.
26. Goncalves RS, Kaiser CR, Lourenco MC, de Souza MV, Wardell JL, Wardell SM, et al. Synthesis and antitubercular activity of new mefloquine-oxazolidine derivatives. *Eur J Med Chem.* 2010; **45**(12): 6095-100.
27. Danelishvili L, Wu M, Young LS, Bermudez LE. Genomic Approach to Identifying the Putative Target of and Mechanisms of Resistance to Mefloquine in Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005; **49**(9): 3707-14.
28. Amaral L, Boeree M, Gillespie S, Udawadia Z, van Soolingen D. Thioridazine cures extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) and the need for global trials is now! *International journal of antimicrobial agents.* 2010; **35**(6): 524-6.
29. Viveiros M, Amaral L. Enhancement of antibiotic activity against poly-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* by phenothiazines. *International journal of antimicrobial agents.* 2001; **17**(3): 225-8.
30. Tello F. Results of combined use of cycloserine in pulmonary tuberculosis. *Scandinavian journal of respiratory diseases Supplementum.* 1970; **71**: 162-7.
31. Clofazimine. *Tuberculosis.* 2008; **88**(2): 96-9.
32. Barry VC, Buggle K, Byrne J, Conalty ML, Winder F. Absorption, distribution and retention of the riminocompounds in the experimental animal. *Irish journal of medical science.* 1960; **416**: 345-52.
33. Reddy VM, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Antimycobacterial activities of riminophenazines. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 1999; **43**(5): 615-23.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Kasik JE, Weber M, Winberg E, Barclay WR. The synergistic effect of dicloxacillin and penicillin G on murine tuberculosis. *The American review of respiratory disease*. 1966; **94**(2): 260-1.
 41. Kasik JE, Weber M, Freehill PJ. The effect of the penicillinase-resistant penicillins and other chemotherapeutic substances on the penicillinase of the R1Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *The American review of respiratory disease*. 1967; **95**(1): 12-9.
 42. Casal M, Rodriguez F, Benavente M, Luna M. In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* to augmentin. *European journal of clinical microbiology*. 1986; **5**(4): 453-4.
 43. Cynamon MH, Palmer GS. In vitro activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983; **24**(3): 429-31.
 44. Chambers HF, Kocagoz T, Sipit T, Turner J, Hopewell PC. Activity of amoxicillin/clavulanate in patients with tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998; **26**(4): 874-7.
 45. Hugonnet JE, Blanchard JS. Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate. *Biochemistry*. 2007; **46**(43): 11998-2004.
 46. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Onyi GO. Susceptibilities of *Mycobacterium fortuitum* biovar. fortuitum and the two subgroups of *Mycobacterium chelonae* to imipenem, cefmetazole, cefoxitin, and amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; **35**(4): 773-5.
 47. de Carvalho LP, Lin G, Jiang X, Nathan C. Nitazoxanide kills replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and evades resistance. *Journal of medicinal chemistry*. 2009; **52**(19): 5789-92.
 48. Stupenengo RH, Wendy CD. [Experience with a Nonspecific Antiinflammatory Agent in Pulmonary Tuberculosis]. *Sem Med*. 1963; **123**: 114-7.
 49. Gold B, Pingle M, Brickner SJ, Shah N, Roberts J, Rundell M, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug sensitizes *Mycobacterium tuberculosis* to endogenous and exogenous antimicrobials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; **109**(40): 16004-11.
 50. Stamey TA, Nemoj NJ, Higgins M. The clinical use of nalidixic acid. A review and some observations. *Investigative urology*. 1969; **6**(6): 582-92.
 51. Fouad M, Gallagher JC. Moxifloxacin as an Alternative or Additive Therapy for Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Ann Pharmacother*. 2011; **45**(11): 1439-44.
 52. Wallace RJ, Jr., Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *Journal of clinical microbiology*. 1986; **24**(6): 976-81.
 53. David HL, Rastogi N, Clavel-Seres S, Clement F. Studies on clofazimine-resistance in mycobacteria: is the inability to isolate drug-resistance mutants related to its mode of action? *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*. 1987; **266**(1-2): 292-304.
 54. Rastogi N, Labrousse V, Goh KS. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Current microbiology*. 1996; **33**(3): 167-75.
 55. Jagannath C, Reddy MV, Kailasam S, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Chemotherapeutic activity of clofazimine and its analogues against *Mycobacterium tuberculosis*. In vitro, intracellular, and in vivo studies. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995; **151**(4): 1083-6.
 56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard—Second Edition*. CLSI document M24-A2 (ISBN 1-56238-746-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2011.

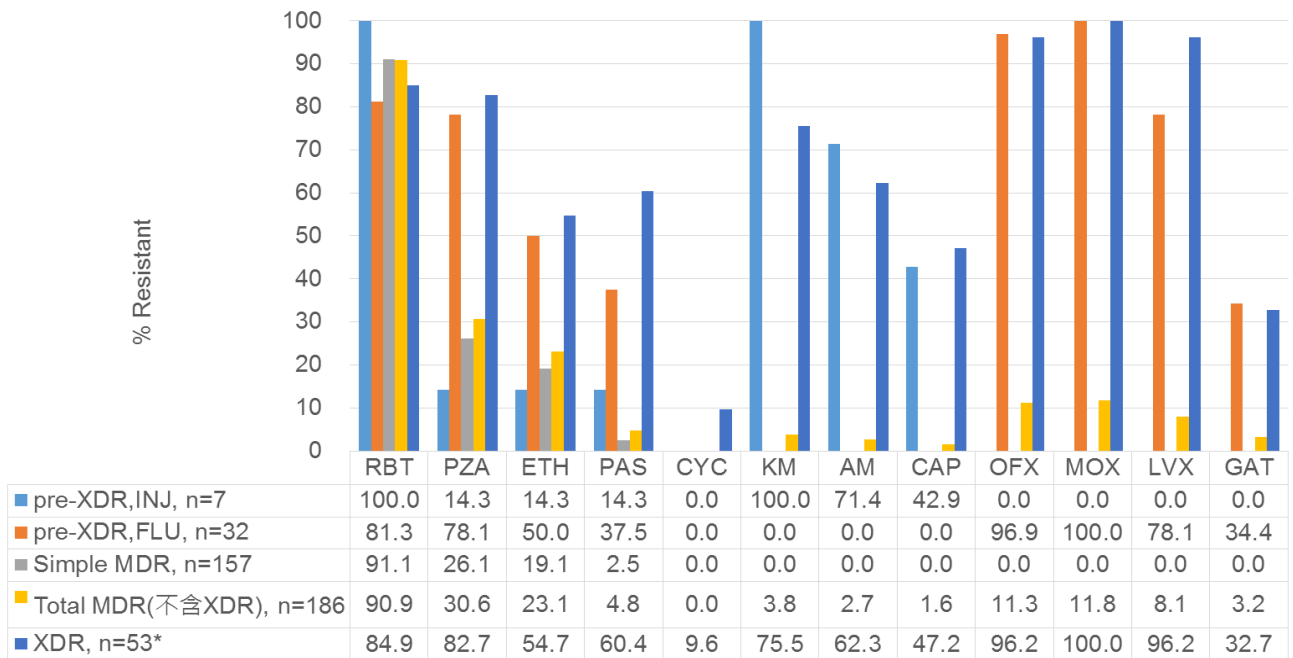
57. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2720–2722.
58. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267:5421–5426.
59. Wallace RJ, Jr., Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *Journal of clinical microbiology*. 1986; 24(6): 976-81.
60. Chambers HF, Kocagoz T, Sipit T, Turner J, Hopewell PC. Activity of amoxicillin/clavulanate in patients with tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998; 26(4): 874-7.
61. David HL, Rastogi N, Clavel-Seres S, Clement F. Studies on clofazimine-resistance in mycobacteria: is the inability to isolate drug-resistance mutants related to its mode of action? *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*. 1987; 266(1-2): 292-304.
62. Rastogi N, Labrousse V, Goh KS. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Current microbiology*. 1996; 33(3): 167-75.
63. Jagannath C, Reddy MV, Kailasam S, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Chemotherapeutic activity of clofazimine and its analogues against *Mycobacterium tuberculosis*. In vitro, intracellular, and in vivo studies. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995; 151(4): 1083-6.
64. Hugonnet JE, Tremblay LW, Boshoff HI, Barry CE, 3rd, Blanchard JS. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2009; 323(5918): 1215-8.
65. Ratnakar P, Rao SP, Sriramarao P, Murthy PS. Structure-antitubercular activity relationship of phenothiazine-type calmodulin antagonists. *International clinical psychopharmacology*. 1995; 10(1): 39-43.
66. de Carvalho LP, Lin G, Jiang X, Nathan C. Nitazoxanide kills replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and evades resistance. *Journal of medicinal chemistry*. 2009; 52(19): 5789-92.
67. Pranger AD, van Altena R, Aarnoutse RE, van Soolingen D, Uges DR, Kosterink JG, et al. Evaluation of moxifloxacin for the treatment of tuberculosis: 3 years of experience. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2011; 38(4): 888-94.
68. Gold B, Pingle M, Brickner SJ, Shah N, Roberts J, Rundell M, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug sensitizes *Mycobacterium tuberculosis* to endogenous and exogenous antimicrobials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(40): 16004-11.
69. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs: World Health Organization; 2008.

七、圖、表





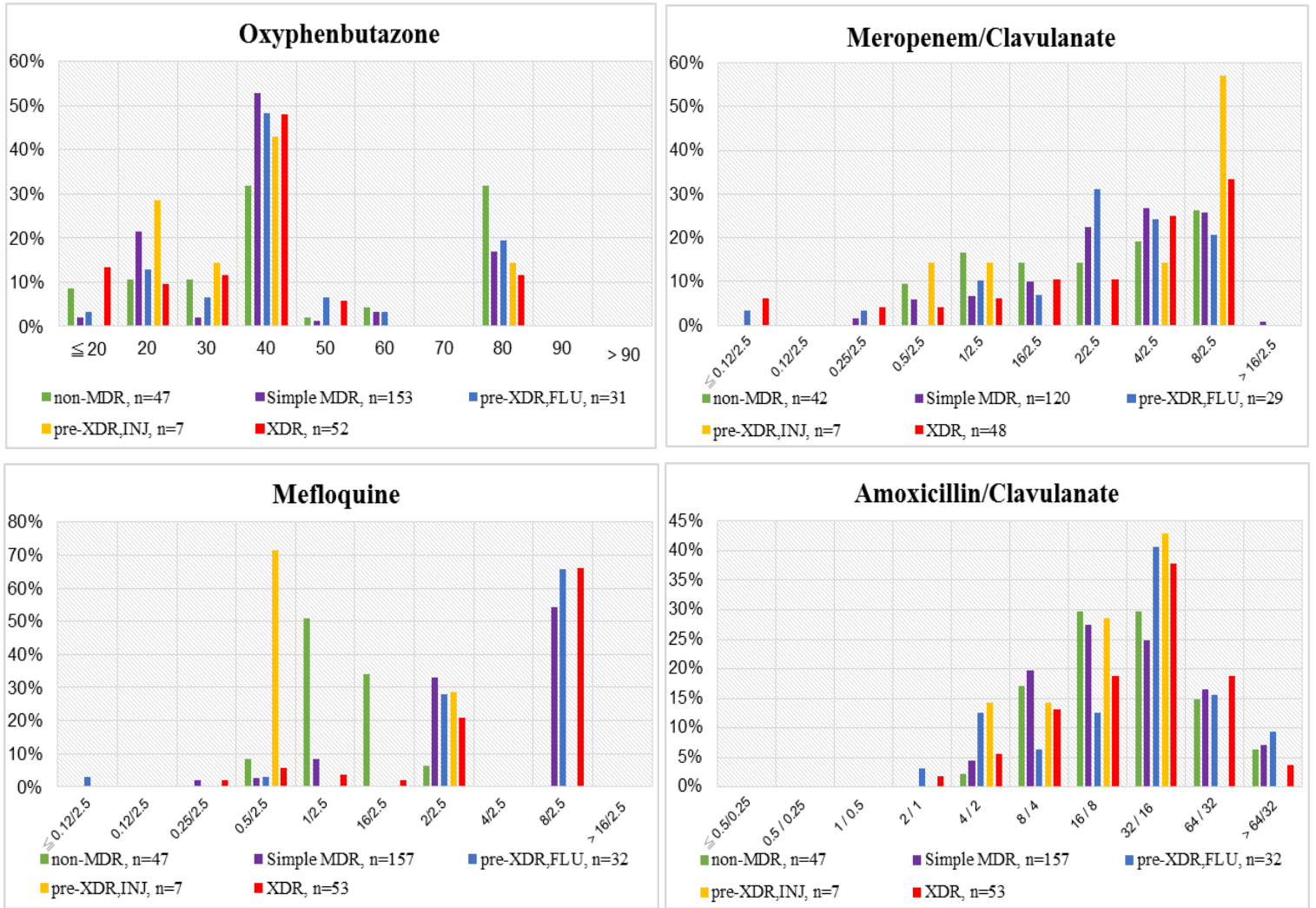
圖二 2007-2013 年多重抗藥性結核菌抗藥性分析(1)所有個案(2)新個案(3)再治療個案。



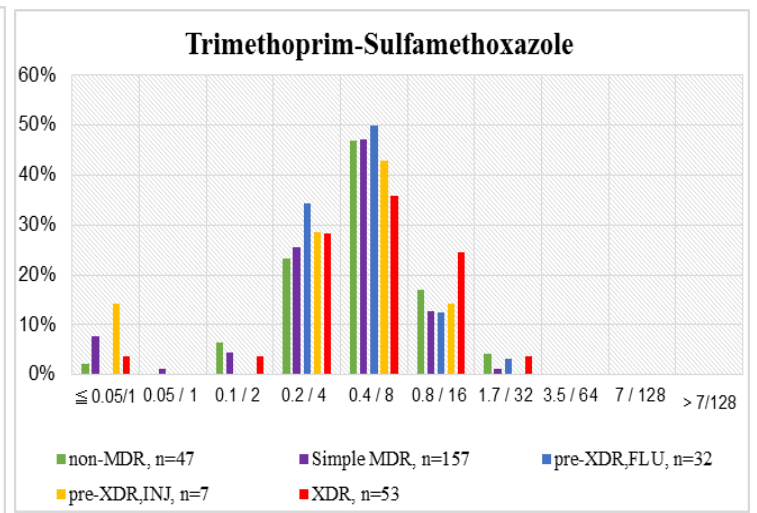
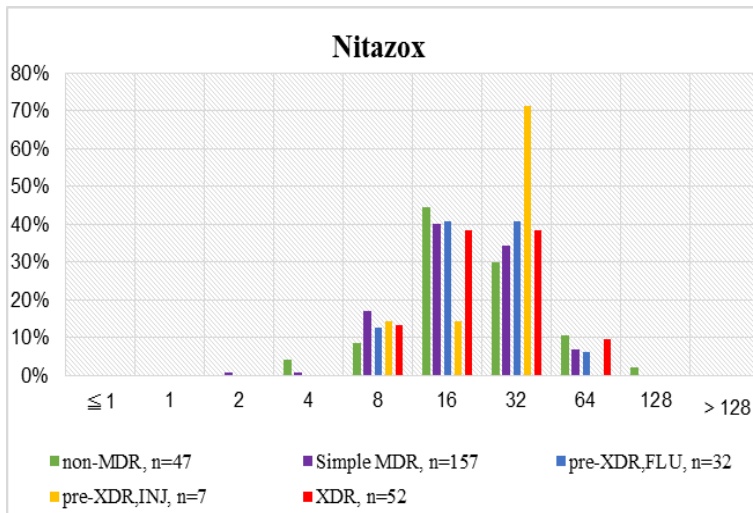
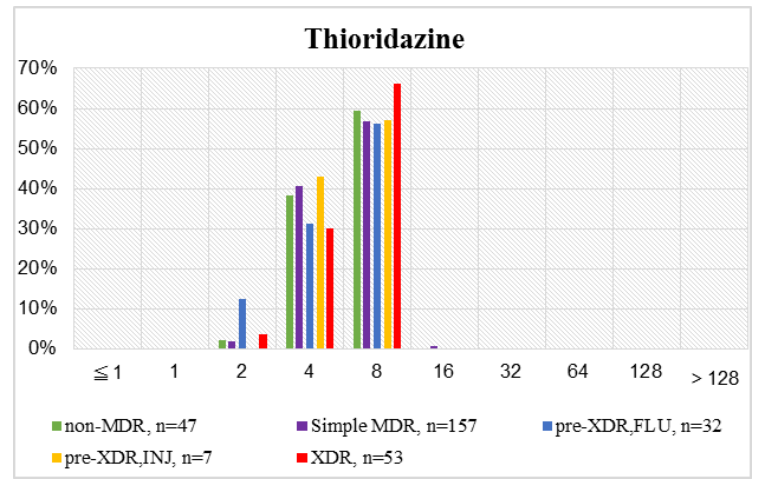
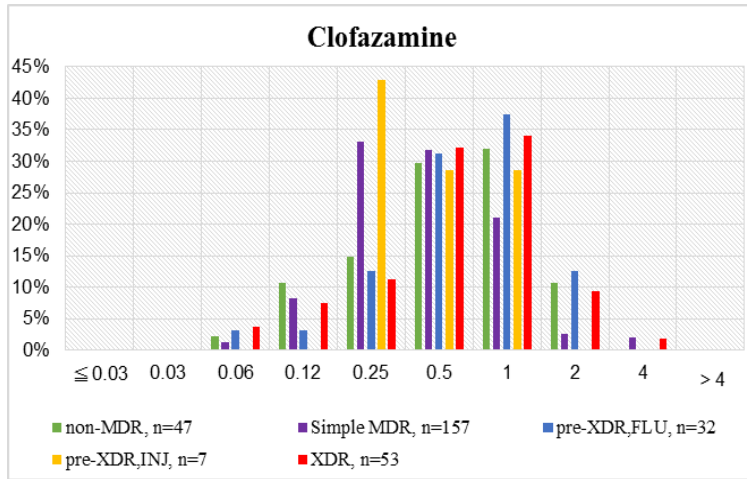
pyrazinamide (PZA) 、 ofloxacin (OFX) 、 moxifloxacin (MOX) 、 gatifloxacin (GAT) 、 kanamycin (KM) 、 amikacin (AM) 、 capreomycin (CAP) 、 para-aminosalicylate (PAS) 、 ethionamide (ETH) 、 rifabutin (RBT) 、 cycloserine (CYC) 、 levofloxacin (LVX) 、 Pre-XDR,FLU: MDR & resistance to fluoroquinolone but not second-line injectable agent 、 Pre-XDR,INJ: MDR & resistance to second-line injectable agent but not fluoroquinolone.

*: Moxifloxacin, n=48; Cycloserine, Gatifloxacin, Levofloxacin & PZA, n=52.

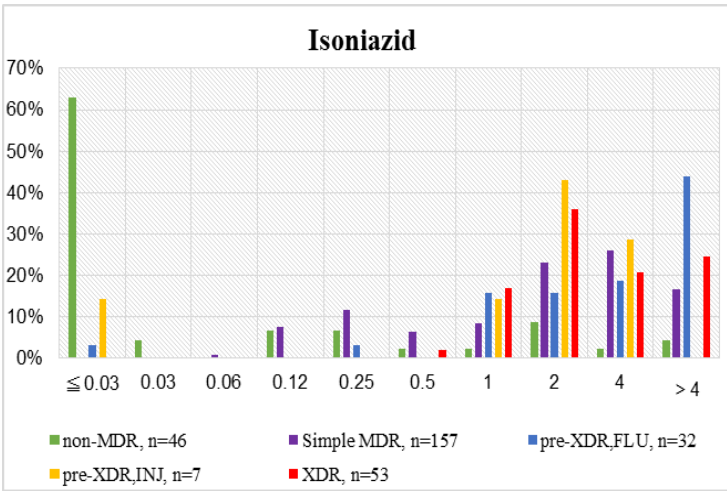
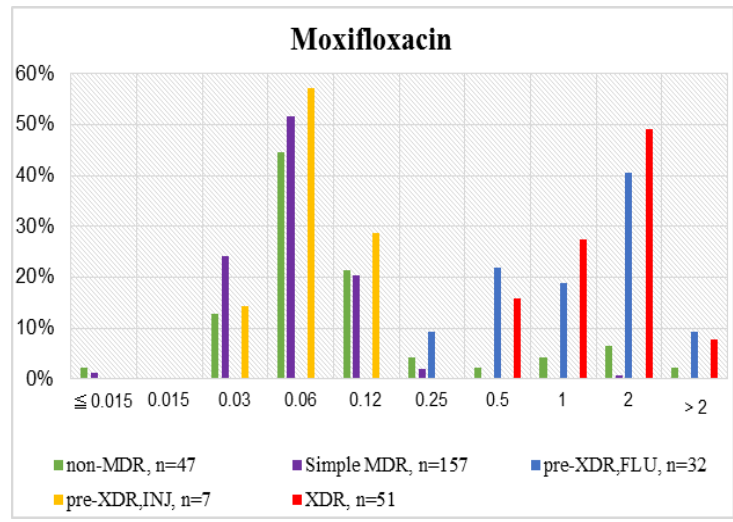
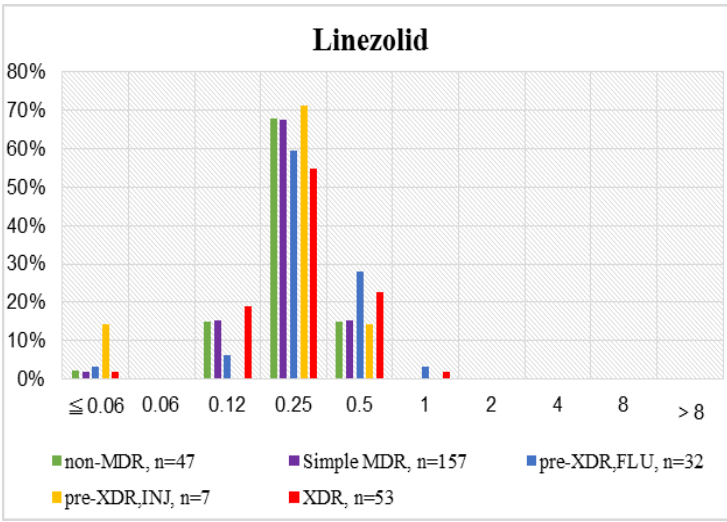
圖三 多重抗藥(2013-2014)及超級抗藥(2007-2014)結核菌株之抗藥性分析



圖四(1) 非 MDR、Simple MDR、pre-XDR、及 XDR 的藥物 MIC 分佈範圍



圖四(2) 非 MDR、Simple MDR、pre-XDR、及 XDR 的藥物 MIC 分佈範圍



圖四(3) 非 MDR、Simple MDR、pre-XDR、及 XDR 的藥物 MIC 分佈範圍

表一 以 REMA 測試之 287 抗藥性菌株分類

Category of drug resistance	XDR	MDR	Non-MDR		
			INH: susceptible	INH: resistant	INH: susceptible
			RMP: resistant	RMP: susceptible	RMP: susceptible
No. of isolates	53	187	35	7	5
Total no. of isolates	287				

表二 藥物儲備溶液(stock solution)製備表

藥物名稱	溶劑種類	藥物貯存液濃度 (mg/ml)
Trimethoprim (TMP)	0.1N HCl	1
Sulfamethoxazole (SMX)	4% NaOH	10
Mefloquine	Ethanol ^a	1
Amoxicillin (AMC)	0.1N HCl	10
Potassium Clavulanate (CLAV)	D/W ^b	10
Clofazamine (CFM)	DMSO ^c	1
Thioridazine (TDZ)	DMSO	10
Nitazoxanide (NTZ)	DMSO	10
Meropenem (MEPM)	DMSO	1
Potassium Clavulanate (CLAV)	D/W	1
Moxifloxacin (MOX)	DMSO	1
Oxyphenbutazone (OPBZ)	DMSO	10
Isoniazid (INH)	D/W	1
Linezolid (LZD)	D/W	1

^a: purity > 99.5%; ^b: distilled water; ^c: Dimethyl sulfoxide.

表三 REMA 藥物敏性試驗方法 96 孔盤配製表

SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW
SDW	OPBZ 90 µg/mL	80	70	60	50	40	30	20	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	MEPM-CLAV 16/2.5 µg/mL	8/2.5	4/2.5	2/2.5	1/2.5	0.5/2.5	0.25/2.5	0.12/2.5	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	Mefloquine 64 µg/mL	32	16	8	4	2	1	0.5	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	AMC-CLAV 64/32 µg/mL	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0.5	0.5/0.25	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	CFM 4 µg/mL	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	TDZ 128 µg/mL	64	32	16	8	4	2	1	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW

SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW
SDW	NTZ 128 µg/mL	64	32	16	8	4	2	1	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	MOX 2 µg/mL	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	TMP-SMX 7/128 µg/mL	3.5/64	1.7/32	0.8/16	0.4/8	0.2/4	0.1/2	0.05/1	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	INH 4 µg/mL	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW	LZD 8 µg/mL	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	GC (+)	GC (-)	SDW
SDW											SDW
SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW

1. OPBZ: Oxyphenbutazone, MEPM: Meropenem, CLAV: Potassium Clavulanate, AMC: Amoxicillin, CFM : Clofazamin, TDZ: Thioridazine, NTZ: Nitazoxanide, MOX: Moxifloxacin, TMP: Trimethoprim, SMX: Sulfamethoxazole, INH: Isoniazid, LZD: Linezolid,
2. Growth control: GC.
3. SDW: Sterilized deionized H₂O.
4. OPBZ 列之 GC (+)及 GC (-)分別為 100 µL 及 200 µL 之 pH5.9-6.0 7H9 培養基。
5. 其餘藥物列之 GC (+)及 GC (-)分別為 100 µL 及 200 µL 之 pH 6.6 ± 0.2 7H9 培養基。

表四 7H11 瓊脂平板法藥敏盤藥物配製濃度(μg/mL)表

7H11 agar, pH 6.1-6.2	7H11 agar, pH 6.6 ± 0.2									
OPBZ	MEPM/CLAV	Mefloquine	AMC/CLAV	CFM	TDZ	NTZ	MOX	TMP/SMX	INH	LZD
90	16/2.5	16	64/32	4	16	64	2	1.7 / 32	4	1
80	8 / 2.5	8	32 / 16	2	8	32	1	0.8 / 16	2	0.5
70	4 /2.5	4	16 / 8	1	4	16	0.5	0.4 / 8	1	0.25
60	2 /2.5	2	8 / 4	0.5	2	8	0.25	0.2 / 4	0.5	0.12
50	1 / 2.5	1	-	0.25	-	4	0.12	0.1 / 2	0.25	-
40	0.5 /2.5	-	-	0.12	-	-	0.06	0.05 / 1	0.12	-
30	-	-	-	-	-	-	0.03	-	0.06	-
20	-	-	-	-	-	-	0.015	-	0.03	-

OPBZ: Oxyphenbutazone, MEPM: Meropenem, CLAV - Potassium Clavulanate, AMC: Amoxicillin, CFM : Clofazamin, TDZ: Thioridazine, NTZ: Nitazoxanide, MOX: Moxifloxacin, TMP: Trimethoprim, SMX: Sulfamethoxazole, INH: Isoniazid, LZD: Linezolid.

表五 各年齡層 MDR-TB 送驗個案數

年齡(歲)	新個案(%)	再治療個案(%)	總人數(%)
0-14	6(0.7)	0(0.0)	6(0.5)
15-24	57(6.8)	7(1.8)	64(5.3)
25-34	108(13.0)	38(9.9)	146(12.0)
35-44	105(12.6)	68(17.8)	173(14.2)
45-54	190(22.8)	79(20.7)	269(22.1)
55-64	156(18.7)	79(20.7)	235(19.3)
>65	211(25.3)	111(29.1)	322(26.5)
總計	833	382	1215

表六 肺外結核通報項目分析

肺外結核通報項目	新個案(%)	再治療個案(%)	總人數(%)
皮膚及眼結核(017)	1(2.4)	0(0.0)	1(1.8)
其他器官結核(017)	15(35.7)	4(30.8)	19(34.5)
泌尿及生殖系結核(016)	0(0.0)	1(7.7)	1(1.8)
消化道結核(014)	3(7.1)	1(7.7)	4(7.3)
胸肋膜結核	8(19.0)	0(0.0)	8(14.5)
骨及關節結核(015)	3(7.1)	5(38.5)	8(14.5)
淋巴結核(014)	9(21.4)	1(7.7)	10(18.2)
結核性腦膜炎(013)	2(4.8)	1(7.7)	3(5.5)
咽喉結核	1(2.4)	0(0.0)	1(1.8)
總計	42	13	55(100)

表七 胸部 X 光檢驗結果

X 光檢查	新個案(%)	再治療個案(%)	總人數(%)
正常	19(2.3)	4(1.1)	23(1.9)
異常，但無空洞	541(64.9)	248(65.3)	789(65.0)
異常，且有空洞	265(31.8)	125(32.9)	390(32.2)
異常，無關結核病	8(1.0)	3(0.8)	11(0.9)
總計	833	380	1213

表八 2007-2013 年各年度個案藥物抗藥比例(1)所有個案(2)新個案(3)再治療個案。

(1)

Year	Ofloxacin	Gatifloxacin	Moxifloxacin	Kanamycin	Capreomycin	Amikacin	Para-aminosalicylate	Ethionamide	MGIT-PZA
2007	42.0%	ND	ND	12.2%	6.9%	18.4%	22.9%	16.0%	48.1%
2008	24.2%	ND	ND	9.0%	4.0%	5.0%	11.5%	24.2%	37.3%
2009	20.2%	ND	ND	9.8%	4.9%	7.1%	10.4%	37.2%	25.1%
2010	9.4%	2.5%	13.2%	8.8%	4.4%	6.3%	6.9%	36.5%	30.2%
2011	18.4%	5.1%	18.5%	10.1%	7.0%	7.6%	8.2%	31.6%	36.1%
2012	14.3%	3.9%	15.0%	4.5%	4.5%	3.8%	3.8%	31.6%	27.0%
2013	12.4%	1.6%	13.2%	5.4%	3.1%	4.7%	4.7%	27.1%	27.9%

(2)

Year	Ofloxacin	Gatifloxacin	Moxifloxacin	Kanamycin	Capreomycin	Amikacin	Para-aminosalicylate	Ethionamide	MGIT-PZA
2007	43.6%	ND	ND	11.5%	5.1%	16.7%	21.8%	14.1%	47.4%
2008	23.7%	ND	ND	8.6%	5.1%	5.6%	9.6%	22.7%	34.3%
2009	18.9%	ND	ND	9.8%	4.1%	7.4%	10.7%	36.9%	26.2%
2010	9.6%	2.6%	11.4%	7.9%	2.6%	5.3%	6.1%	34.2%	26.3%
2011	18.6%	6.2%	17.7%	11.5%	8.0%	8.8%	9.7%	31.9%	34.5%
2012	15.1%	3.0%	16.0%	5.7%	5.7%	4.7%	4.7%	32.1%	28.3%
2013	11.8%	1.0%	12.7%	5.9%	3.9%	4.9%	4.9%	24.5%	28.4%

(3)

Year	Ofloxacin	Gatifloxacin	Moxifloxacin	Kanamycin	Capreomycin	Amikacin	Para-aminosalicylate	Ethionamide	MGIT-PZA
2007	39.6%	ND	ND	13.2%	9.4%	21.1%	24.5%	18.9%	49.1%
2008	25.0%	ND	ND	9.7%	2.4%	4.1%	14.5%	26.6%	41.9%
2009	23.0%	ND	ND	9.8%	6.6%	6.6%	9.8%	37.7%	23.0%
2010	8.9%	2.2%	17.8%	11.1%	8.9%	8.9%	8.9%	42.2%	40.0%
2011	17.8%	2.2%	20.5%	6.7%	4.4%	4.4%	4.4%	31.1%	40.0%
2012	11.1%	7.4%	11.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	29.6%	22.2%
2013	14.8%	3.7%	14.8%	3.7%	0.0%	3.7%	3.7%	37.0%	25.9%

ND: not done

表九 H37Rv 結核菌之最小抑菌濃度測試結果

Drug	REMA	標準瓊脂試驗
MEPM-CLAV	2/2.5 - 16/2.5 (n= 20)	16/2.5 (n= 2)
OPBZ	40 - 90 (n= 37)	40 - 80 (n= 3)
Mefloquine	4 - 16 (n= 23)	4 - 8 (n= 3)
AMC-CLAV	8/4 - 64/32 (n= 22)	32/16 - 64/32 (n= 2)
CFM	0.12 - 1 (n= 24)	0.25 - 1 (n= 3)
TDZ	8 - 16 (n= 24)	8 - 16 (n= 3)
NTZ	8 - 32 (n= 24)	8 - 16 (n= 3)
MOX	0.03 - 0.25 (n= 24)	0.25 (n= 3)
TMP-SMX	0.2/4 - 0.8/16 (n= 24)	0.4/8 - 0.8/16 (n= 3)
INH	≤ 0.03 - 0.25 (n= 23)	0.06 - 0.12 (n= 3)
LZD	0.25 - 1(n= 20)	0.5 - 1 (n= 2)

OPBZ: Oxyphenbutazone, MEPM: Meropenem, CLAV: Potassium Clavulanate, AMC: Amoxicillin, CFM : Clofazamin, TDZ: Thioridazine, NTZ: Nitazoxanide, MOX: Moxifloxacin, TMP: Trimethoprim, SMX: Sulfamethoxazole, INH: Isoniazid, LZD: Linezolid

表十 多重抗藥結核菌株 REMA MIC 及標準瓊脂藥敏試驗結果

Drug \ μg/mL	REMA (MICs [#] , no.*, %)	標準瓊脂試驗(n=10)
MEPM/CLAV	1/2.5-16/2.5 (n=176/194, 90.7%)	1/2.5-32(不含 CLAV)
OPBZ	20-80 (n=224/240, 93.3%)	≤ 20-40
Mefloquine	2-8 (n=227/240, 94.6%)	8
AMC/CLAV	8/4- > 64/32 (n=225/240,93.8%)	16/8- > 64/32
CFM	0.12-1 (n=218/240, 90.8%)	0.25-2
TDZ	4-8 (n=230/240, 95.8%)	8-16
NTZ	8-32 (n=219/239, 91.6%)	8-16
TMP-SMX	0.1/2-0.8/16 (n=219/240, 91.3%)	≤ 0.05/1 -1.7/32
INH	0.12- > 4 (n=225/240, 93.8%)	1- > 4
LZD	0.12-0.5 (n=233/240, 97.1%)	0.25-1

OPBZ: Oxyphenbutazone, MEPM: Meropenem, CLAV: Potassium Clavulanate, AMC: Amoxicillin, CFM : Clofazamin, TDZ: Thioridazine, NTZ: Nitazoxanide, MOX: Moxifloxacin, TMP: Trimethoprim, SMX: Sulfamethoxazole, INH: Isoniazid, LZD: Linezolid

#：抑制至少 90% 結核菌生長的 MIC 值分佈範圍。

*：MIC 值的檢體數/總檢體數，至少要達到 90%。

表十一 超級抗藥結核菌株 REMA MIC 及標準瓊脂藥敏試驗結果

Drug \ $\mu\text{g/mL}$	REMA (n= 16-53, %)	標準瓊脂試驗 (n= 4)
MEPM/CLAV	0.25/2.5 - 16/2.5 (n= 45/48, 93.8%)	8 - 32 (不含 CLAV)
OPBZ	≤ 20 - 80 (n=52/53, 98.1%)	20 - 40
Mefloquine	2-8 (n= 48/53, 90.6%)	8
AMC/CLAV	8/4 - >64/32 (n= 49/53, 92.5%)	32/16 - >64/32
CFM	0.12-2 (n=50/53, 94.3%)	0.25 - 0.5
TDZ	4 - 8 (n=51/53, 96.2%)	8 - 16
NTZ	8 - 32 (n=47/52, 90.4%)	8
TMP-SMX	0.1/2 - 0.8/16 (n=49/53, 92.5%)	$\leq 0.05/1$ - 0.8/16
INH	1 - >4 (n=52/53, 98.1%)	4- > 4
LZD	0.12 - 0.5 (n=51/53, 96.2%)	0.25-0.5
MOX	0.5 - 2 (n=47/51, 92.2%)	2 - > 2

OPBZ: Oxyphenbutazone, MEPM: Meropenem, CLAV: Potassium Clavulanate, AMC: Amoxicillin, CFM : Clofazamin, TDZ: Thioridazine, NTZ: Nitazoxanide, MOX: Moxifloxacin, TMP: Trimethoprim, SMX: Sulfamethoxazole, INH: Isoniazid, LZD: Linezolid

表十二 非 MDR、MDR 與 XDR 結核菌株以 REMA 法測試所得 MIC 值分佈個數的 p 值比較

	MDR vs XDR	SMDR vs XDR	MDR vs SMDR	MDR vs 非 MDR	SMDR vs 非 MDR
Oxyphenbutazone	0.018	0.026	1	<0.001	<0.001
Meropenem/Clavulanate	0.589	0.498	1	0.688	0.755
Mefloquine	0.949	0.981	1	0.671	0.788
Amoxicillin/Clavulanate	0.356	0.283	1	0.77	0.805
Clofazamine	0.484	0.315	0.997	0.864	0.608
Thioridazine	0.933	0.966	0.951	0.948	0.937
Nitazox	0.973	0.983	0.99	0.624	0.742
Moxifloxacin	<0.001	<0.001	0.452	0.999	0.609
TMP-SMX*	0.203	0.175	1	0.801	0.773
Isoziazid	0.25	0.123	0.999	<0.001	<0.001
Linezolid	0.733	0.751	0.998	0.997	0.978

*TMP-SMX: Trimethoprim-Sulfamethoxazole

附錄

結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏盤製備 (REMA 法)

結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏盤製備 (瓊脂平板法)