

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000105

行政院衛生署疾病管制局 104 年度科技研究發展計畫

開發簡易分枝桿菌鑑定方法

研究報告

執行機構：行政院衛生署愛滋及結核病組

計畫主持人：周如文

研究人員：范芯芄、黃偉倫

執行期間：103 年 1 月 1 日至 104 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

目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、中英文摘要 (3)

貳、本文

一、前言 (7)

二、材料與方法 (12)

三、結果 (15)

四、討論 (25)

五、結論與建議 (26)

六、計畫重要研究成果及具體建議 (28)

七、參考文獻 (29)

八、圖、表

圖一	NASBA 晶片檢測結果	(32)
圖二	第一代 RPA 原型產品檢測實驗步驟	(33)
圖三	第一代 RPA 原型產品設計及解讀方式	(34)
圖四	第一代 RPA 原型產品實際測試結果	(35)
圖五	第二代 RPA 原型產品設計及解讀方式	(36)
表一	以 PRA 檢測 105 件臨床痰檢體結果分析	(37)
表二	菌株培養及 RPA 試劑鑑定結果比較,含 Invalid 結果	(39)
表三	菌株培養及 RPA 試劑鑑定結果比較,不含 Invalid 結果	(40)
表四	Real-time PCR 及 RPA 試劑鑑定結果比較,含 Invalid 結果	(41)
表五	Real-time PCR 及 RPA 試劑鑑定結果比較,不含 Invalid 結果	(42)
表六	RPA 與 NTM species 結果	(43)
表七	4 個案 MTBC 或 NTM 培養與 MTBC IS6110 real-time PCR 結果不一性分析	(44)

摘要

臨床上非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)的分離率日增，常與結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)混合存在或誤判，造成結核病確診挑戰。此外，臨床上對 NTM 之鑑別診斷與治療，需求亦日殷。NTM 屬伺機性感染，一般免疫機能良好者無需治療；但在免疫機能不全者，則易感染而致病。因此，實驗室正確的鑑別除了可避免錯誤診斷成結核病造成公衛困擾外，更可避免錯誤的治療。近年來，臺灣醫院亦陸續報導 NTM 分離率，有逐年上升趨勢。目前現有的臨床使用之分枝桿菌鑑定方法，MTBC 生長緩慢而 NTM 又有多樣性，自痰檢體以生化方法鑑別檢測需數星期，且步驟繁瑣結果又不明確。目前較快的方法為將痰檢體經過培養後，以市售之檢測試劑偵測。缺點為價格不斐，需昂貴儀器配合，且最快仍需數日至兩星期。為改進以上缺點，本計畫使用一簡單快速便宜可偵測到 MTBC 及 NTM 且不需使用昂貴儀器的產品。期望藉由新分子診斷工具的開發，可引導疾病防治導向新穎策略及作為。

計畫目的：收集臺灣 NTM 分布及檢測方法資料，並設計以特定酶進行恆溫核酸擴增反應後，搭配獨特研發之檢測平台等，建立具敏感性及特異性之 MTBC 及 NTM 鑑定試劑。

實驗方法：包含個案檢體傳統細菌學檢測、菌株核酸鑑定、晶片設計製作與品管、臨床檢體試驗分析、細菌學資料收集、數據統計分析等。

研究結果：(1)國內文獻回顧整理發現：NTM 有逐年上升趨勢；臨床 NTM 的主要分離菌大致上為：*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. kansasii*、*M. gordonae*；(2) NASBA 晶片檢測方法分析 MTBC 及 NTM 菌株 RNA 之評估可行，可大幅降低現有市售晶片或線性探針(line-probe)檢測步驟改善報告時效，但仍需持續開發測試以改善檢測特異性；(3) RPA 恆溫核酸檢測法證實可設計發展成臨床檢體 point-of-care 試劑：初步證明檢測極限可到約 120 cfu/mL。如果是以菌株培養及 real-time PCR 鑑定結果為黃金標準，檢測特異度各別為 96.4%及 100%；陽性預測值則各別為 97.7%及 100%。

結論與建議：調查完成之主要臨床 NTM 種類，可供發展快速檢測試劑時參酌。畢竟 NTM 感染或造成共病(如 HIV/AIDS 等)，仍會造成臨床診治困擾，建議建立 NTM 監測系統及開發簡易檢測方法。本研究發展簡易恆溫 MTBC 鑑定及 NTM 快速檢測試劑，目前皆已有初步成果並證明其可行性。將有效提高 RPA MTBC 鑑定試劑之敏感性及測試其穩定性，持續進行臨床檢體測試，未來可望開發成價廉之簡易 point-of-care 試劑，推展為快速篩檢 MTBC 之利器。

關鍵字：分枝桿菌、結核菌、非結核分枝桿菌、鑑定、恆溫核酸擴增

Abstract

Aim: Tuberculosis (TB) remains a leading notifiable infectious disease in Taiwan.

Improved access to effective tests for TB diagnosis has been designated a public health priority. Due to high cost and technical demanding, implementing nucleic acid based TB tests have been restricted to centralised laboratories and specialised research settings. Isothermal DNA amplification technologies permit the use of simpler, less energy intensive detection platforms that allow the accurate diagnosis of a disease with short turnaround time. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA) are rapid, low temperature isothermal nucleic acid amplification reactions.

Methods: *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria strains and convenience sample of pulmonary specimens were used to validate and assess performances of the prototype NASBA and RPA kits. Discordant results were confirmed using IS6110 real-time PCR.

Results: The prevalence of NTM isolates among identified mycobacteria increased significantly in recent years. The most major NTM were *M. avium* · *M. intracellulare* · *M. fortuitum* · *M. chelonae* · *M. abscessus* · *M. kansasii* · *M. goodii*. A NASBA-based array was preliminarily proofed to be feasible for NTM identification. In addition, we developed a RPA-based prototype kit for MTBC rapid detection. Preliminary results indicated that the detection limit is 120 cfu/mL. When testing 105 sputum specimens from suspected TB patients, RPA demonstrated promising results. Compared to culture, sensitivity and specificity for the IS6110 RPA were 70.5% (95%CI: 57.4, 81.5) and 96.4% (95%CI: 81.7, 99.9) respectively (n = 89).

Conclusions and suggestions: The prototype RPA-based kit can differentiate MTBC from other acid fast bacteria effectively. The rapid and easy isothermal RPA assay only required

low energy requirement compared to other nucleic acid amplification technologies suggesting this assay could be of use for integration into a point-of-care test for use in resource constrained settings.

Keywords : Mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, Nontuberculous mycobacteria, Identification, isothermal nucleic acid amplification

貳、本文

一、前言

問題狀況或發展需求

由於結核病患會同時感染一種及多種非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacterium, NTM)，尤其是快速生長分枝桿菌，初期的臨床判別診斷需審慎。一般而言，NTM 對目前建議測試的第一線抗結核藥物皆會呈現抗藥的結果。因此，實驗室正確的鑑別除了可避免錯誤診斷成結核病造成公衛困擾外，更可避免錯誤的治療。

背景介紹

至今已約有 150 多種 NTM 被鑑定出，歸因於原屬於同一菌種的 NTM，只要 16S rRNA 有 1% 的差異，則可界定為新種。NTM 主要存在環境中的水中，但也存在土壤、灰塵、食物及某些動物身上等。倫永氏(Runyon)依 NTM 的生長速度及菌落產生顏色的特徵分為四群。第一群(group I)為緩慢生長的見光產色菌群(photochromogens)；第二群(group II)：緩慢生長的暗產色菌群(scotochromogens)；第三群(group III) 為緩慢生長的不產色菌群(nonchromogens)；第四群(group IV) 為快速生長菌(rapid growers)。一般認為它不會引起人與人之間的傳染，因此不須隔離治療。NTM 其臨床表現及細菌學檢查易與結核菌群產生混淆。雖然，NTM 感染的治療上，部份與結核病治療類似。然而，各菌種間變異很大，常須合併一般抗生素及外科治療。

雖然由病人檢體分離出 NTM，未必代表罹病，有些只是正常的拓增 (colonization)。據估計，1950 年代到 1960 年代發現的結核病，1-2%可能是 NTM 感染。非結核分枝桿菌常被視為環境污染菌，然隨著診斷技術的進展，NTM 感染可發生在免疫機能正常或低下的病患。尤其是臨床上有慢性肺疾患者，如支氣管擴張症、慢性阻塞性肺疾、塵肺症等，NTM 感染機會較高。再者，病患可分為先天免疫功能不全(如與干擾素 INF- γ 相關的

免疫功能基因出現突變)和後天免疫功能不全(如愛滋病及免疫抑制劑治療等)，嚴重的瀰漫性 NTM 感染，應考慮病患是否為先天免疫功能不全或 HIV 感染。非結核分枝桿菌可導致多種器官感染，常見的有慢性肺部感染，淋巴腺感染，皮膚、軟組織、及骨骼感染、人工瓣膜及導管(catheter) 感染淋巴腺炎、皮膚病變或者瀰漫性的疾病等。

所有懷疑因 NTM 引致的肺外感染患者，其檢體除以傳統的病理檢查外，建議應進行抗酸菌鏡檢及分枝桿菌培養，培養陽性時則作菌種鑑定。NTM 是否具有臨床意義，以下列三種標準判定【1】：(1) 臨床標準：有相吻合之臨床症狀如咳嗽、發燒、喘且有漸趨惡化之勢，並合理地排除可能由其他疾病所造成之相似臨床症狀；(2) 放射線影像標準：持續存在或進行性之肺浸潤或結節、肺空洞。電腦斷層影像則應有多個肺結節或多發性支氣管擴張症；(3) 細菌學檢查：一年內至少有三次痰或支氣管沖洗液細菌培養陽性，或抗酸菌染色陽性，附加上兩次痰或支氣管沖洗液細菌培養陽性，或單一次支氣管沖洗液抗酸菌染色陽性 2+以上或細菌培養陽性，且菌落量 2+以上，或組織切片證實。需注意分離 NTM，需確認是否同時感染生長較緩慢的結核菌。診斷確定，治療方面就可依據各菌種給予適當的藥物或是配合外科治療。

傳統分枝桿菌的鑑定主要根據菌落形態與抗酸性染色抹片的顯微鏡下特徵，以及生理與生化特性作為鑑別，但因部分分枝桿菌生長緩慢，以傳統鑑定方法需要花費 2 到 4 周才能鑒別菌種，醫檢師也需要定時觀察生化反應結果而耗費大量時間，且部份生化結果不明確，常難以判定，容易導致錯誤的鑑定。另外，傳統方法液無法區分菌落外觀相似的混合菌 (mixed culture)。由於分子生物技術日漸發展成熟，國內外已發展一些應用於臨床微生物檢驗的產品。

分枝桿菌之菌種鑑定除參考產色及生長速率外，常用方法包含：

(1) 生物化學方法：細菌的生化反應常有不甚明確的困擾，且若只單靠一種試驗結果常會

誤判，需與標準菌株已知的反應特徵比對。結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)常使用 niacin 及 nitrate 反應法。niacin (nicotinic acid)為所有分枝桿菌屬合成代謝過程中，氧化還原反應的必要成份，可作為輔酶生合成的前驅物質。雖然所有分枝桿菌屬均會製造 nicotinic acid，但是由於代謝過程的阻斷現象，使 MTBC 能產生最大量的 niacin。以此可有利於 MTBC 的鑑定，但是不能只用 niacin 試驗來鑑定 MTBC。因為，其他有些菌種仍會有陽性反應(*M. simiae*、*M. chelonae* chemovar niacinogenes 及 *M. bovis* BCG)。所以，可加上硝酸鹽(nitrate)還原試驗及 68°C catalase 試驗，以鑑別 MTBC。分枝桿菌屬能還原硝酸鹽，其還原能力與培養的時間、溫度、酵素抑制劑、氫離子濃度等因子有關。用於本試驗的菌種應經過繼代培養且生長茂盛的新鮮菌落，再進行試驗。若為快速生長菌群而於兩週即生長完全者，亦可進行試驗。具還原硝酸鹽特性的分枝桿菌屬有：*M. tuberculosis*、*M. kansasii*、*M. szulgai*、*M. flavescens*、*M. terrae* complex，以及除了 *M. chelonae* 外的快速生長菌群。

(2) 分子生物方法:已有多種方法及市售商用設備與試劑可供運用，以下介紹常用的方法。

2.1 IS6110 核酸檢測法【2】

利用分子生物方法，直接從病人檢體中偵測是否含有 MTBC 的 DNA，以提高檢驗的敏感性與時效性。適用檢體種類包含：LJ 蛋基培養基培養出之 MTBC；痰檢體，並經消化去污染處理後之沉澱物；及適用於石蠟包埋組織切片，經二甲苯脫蠟後所萃取之核酸檢體。概述方法原理，IS6110 是存在於 MTBC 的專一性插入序列(insertion sequence, IS)，具有 0-25 個拷貝數目。此法以 IS6110 作為檢測方法的標的基因，設計具有對 MTBC IS6110 專一性的引子，進行即時 PCR 以增幅此段基因，或可配合巢式(nested) PCR 法的應用，可相對提高檢體檢測之專一性與敏感性。結果判定，係以 IS6110 為標的基因設計的引子，可以對結核菌群的模板(template) DNA 產生陽性 PCR 反應，其他非結核分枝桿菌則無法被偵測出來。

2.2 熱休克蛋白 65 聚合酶連鎖反應及限制酶分析(*hsp65* PCR-RFLP)【3】

以分子生物技術方式，鑑定並區分 MTBC 與 NTM。適用於 LJ 蛋基培養基培養出之分枝桿菌。概述方法的原理：利用分枝桿菌屬通有的 65 kDa 熱休克蛋白(heat shock protein) 基因 *hsp65*，以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方式增幅檢體中 *hsp65* 核酸片段 (439 bp)，再將此核酸片段以限制酶切割，不同菌種可切割成不同核酸片段，於電泳分析上判定特殊長度核酸片段，以比對並鑑定出特定分枝桿菌菌種。結果判定，係分別就 *BstEII* 及 *HaeIII* 限制酶切割之核酸片段與標準核酸片段比較，再上網至 <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> 進行菌種檢索，確認切割之核酸片段大小及判定分枝桿菌名稱。當限制酶切割之核酸片段無法對應標準核酸片段導致無法判定時，則結果標示為無法鑑定之型別 (unknown pattern)。

2.3 線性探針檢測法(line-probe assay) 【4】

市售 GenoType® Mycobacterium CM/AS (Hain Lifesience GmbH, Nehren, Germany) 方法，則係利用 23S rRNA 基因作為其鑑定菌種之標的。GenoType® Mycobacterium CM 套組可區分結核桿菌群與 14 種非結核分枝桿菌，而 GenoType® Mycobacterium AS 套組可區分 16 種非結核分枝桿菌。

2.4 DNA Sequencing 【5】

主要藉由偵測具有特異性的 16S rRNA 區段進行菌種鑑定，以及 *rpoB*、*gyrB*、*hsp65*、*recA*、*sodA*、*dnaJ*、16S-23S rRNA 基因區段來補強以 16S rRNA 為標的物的不足。

2.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; Time of Flight Mass Spectrometer 【6】

MALDI-TOF MS 藉由離子化分析物質，並且分析帶電物質的強弱圖譜進而鑑定出菌種，過去報導指出 MALDI-TOF MS 與 DNA sequencing 進行平行測試得到 94.9% 的一致性。

近年來，利用的核酸擴增技術(nucleic acid amplification techniques)外加如生物晶片及線性探針檢測法等檢測多種微生物的設計蓬勃發展。本計畫將發展一項快速偵測到 MTBC 及 NTM 且不需使用昂貴儀器的基因陣列等實驗室方法。以恆溫反應模式之試驗【7,8,9】，及以(1)獨特研發室溫即時核酸陣列(nucleic acid array)雜交偵測，利用晶片判讀

儀判讀，根據訊號呈現位置決定菌種鑑定；或(2)側流體免疫層析技術(lateral immunochromatographic test, ICT)的方法，開發敏感性及特異性高的 MTBC 偵測試劑方法。

與防疫工作之相關性

臨床上 NTM 的分離率日增，常與 MTBC 混合存在或誤判，造成結核病確診挑戰。此外，臨床上對非結核分枝桿菌之鑑別診斷與治療，需求亦日殷。NTM 疾病治療方面：NTM 屬伺機性感染，一般免疫機能良好者無需治療；但在免疫機能不全者，則易感染而致病。治療藥物中以大環內酯類(macrolide)為主，氨基酸配醣體類抗生素為輔。臨床上常造成肺部疾病的 NTM 為(1) *M. abscessus* 及 *M. fortuitum*：依據藥物感受性試驗結果給藥，建議使用 cefoxitin (或 imipenem)及 amikacin；(2) *M. kansasii*：常造成兩肺上葉結節開洞樣病灶，易與結核菌造成的病灶混淆。治療上建議使用 RMP 加上 INH 及 EMB；(3) *M. avium* complex (MAC)：常發生在於右肺中葉及左肺舌頁，因為較難排除痰液，反覆感染後造成肺葉浸潤及支氣管擴張。治療上使用 clarithromycin/azithromycin 加上 EMB 或 rifabutin/rifampin。目前，臨床實驗室限於分子技術及市售試劑昂貴(Xpert 等)及操作複雜(PCR, line-probe assay 等)的限制，尚未能普及分子生物臨床診斷，造成收件至鑑定報告時效性過長。發展簡易 point-of-care 試劑以區分 MTBC/NTM，有助於結核病防治。

二、材料與方法

(一) 材料

1. 由 ATCC 等機構購入之標準分枝桿菌株及醫療院所結核病實驗室送至疾病管制署之檢體。
2. 臨床痰檢體 105 件：依抗酸菌抹片(smear, S)顯微鏡檢查結果收集，依各判讀分級收集 S(-) 6 件、scanty 20 件、S (1+) 20 件、S (2+) 20 件、S (3+) 18 件、S (4+) 19 件；含依培養結果收集 MTBC 70 件、NTM 29 件及培養陰性 6 件。

(二) 研究及實驗方法

1. 菌株及檢體處理

H37Rv 菌株(MacFarland 2.0; 6×10^8 cfu/mL) 95°C 加熱 20 分鐘去活化後，連續以 10 倍稀釋，做為 stock 溶液用以測定測試極限(detection limit)。

2. DNA/RNA 萃取【10】

取 500 μ L 菌液/陽性液態培養檢體或 100 μ L 消化去汙染檢體，加入含 zirconia/silica beads 之離心管中，95°C 加熱 20 分鐘，強力震盪 10 分鐘，13,500 rpm 離心 5 分鐘，取出上清液即為 DNA 樣本。RNA 萃取則將冷凍菌易沉澱物回溶於 400 μ L Catrimox-141 (VH Bio LTD) 混合液中，混合液比為 Catrimox-141 : TBS-Tween (50 μ M Tris (pH 8.0), 154 μ M NaCl, 0.05% Tween-80)，再加入玻璃珠後以震盪器劇烈震盪 1 分鐘後置於冰上 10 分鐘，靜待膠質粒子產生，之後於 4°C 離心將沉澱物以含 RNase inhibitor 之 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 水回溶。

3. Nucleic acid sequenced-based amplication (NASBA) 試驗【11,12,13】：初步實驗設計及步驟

3.1 Reaction mix: 最終反應體積為 20.3 μ L：內含 6.7 μ L Reaction buffer、3.3 μ L Nucleotide mixture、0.3 μ L 10 mM Biotin-11-UTP、1 μ L 5 μ M OT727 primer、1 μ L 5 μ M OT737(T7) primer 及 3 μ L RNA，之後再加入 5 μ L enzyme mixture。

3.2 NASBA 步驟: 65 °C 下，作用 2 分鐘。後續於 41 °C 下，放置 130 分鐘 (取出冷凍之

enzyme mixture 於冰上解凍，當41 °C 反應超過2分鐘後，加入即可。)；於4 °C下保存。

3.3 雜合反應及判讀

3.3.1 NASBA 之RNA產物，加熱65 °C 5分鐘後，置於冰上。

3.3.2 於晶片上加入40 µL blocking buffer及10 µL NASBA RNA 產物，於55 °C下，300 rpm震盪10分鐘，結束後關閉加熱器。

3.3.3 以PBS buffer清洗晶片。

3.3.4 加入Alkaline phosphatase streptavidin於室溫以300 rpm離心5分鐘。

3.3.5 以PBS buffer清洗晶片。

3.3.6 加入5 µL NBT/BCIP後，於室溫靜置3分鐘。

3.3.7 晶片浸泡於滅菌水，終止反應。

3.3.8 反應時間室溫下反應20分鐘。以肉眼直接目測結果，或以簡單便宜即時核酸雜交偵測儀檢測。

4. RPA 試驗【14】初步實驗設計及條件

4.1 DNA 處理

4.1.1 檢體收集及製備

由已消化去污染痰檢體中純化 DNA，製備完畢若未立即檢測，則需保存於-80°C下。取消化去污染痰檢體 100 µL 與等體積 TE buffer 震盪混勻 20 秒，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液。

4.1.2 DNA 萃取

離心管中加入 30 µL lysis buffer 回溶沉澱物，以 95°C 乾浴處理 20 分鐘，然後以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液。

4.2 RPA 核酸擴增反應

將取 4 µL DNA 與 15 µL RPA buffer A 輕輕混和，然後加入 1 µL MgOAc 後，於 38 °C 反應 20 分鐘。

4.3 加樣及檢測

將 10µL 核酸擴增的產物(2)與 50 µL running buffer 混和，滴入檢測試劑的「加樣

區」中。反應 3 分鐘後，再加 50 μ L 的 running buffer，反應 20 分鐘。(注意：勿直接滴入「判讀視窗」，以免影響判讀結果)當時間終止後，用肉眼觀察判讀視窗是否有色點出現(注意請在反應終止後 5 分鐘內判讀完畢，放置過久會影響判讀結果)。

5. 差異分析

在差異分析部分，若新發展方法之檢測與臨床傳統檢驗結果不符時，利用 16S 核酸定序或以其他分子檢測方法進行平行測試【14】。

6. 統計分析

晶片靈敏度(sensitivity)、特異性(specificity)、陽性預測值(positive predictive value, PPV)、陰性預測值(negative predictive value, NPV)分析：

(1) 靈敏度： $[\text{True positive}/(\text{True positive} + \text{False negative})] \times 100\%$ 。

(2) 特異性： $[\text{True negative}/(\text{True negative} + \text{False positive})] \times 100\%$ 。

(3) 陽性預測值： $[\text{True positive}/(\text{True positive} + \text{False positive})] \times 100\%$ 。

(4) 陰性預測值： $[\text{True negative}/(\text{True negative} + \text{False negative})] \times 100\%$ 。

三、結果

(一) 調查臨床上常見非結核分枝桿菌盛行情形

由於 NTM 被認定為鮮少會發生人傳人，因此並不如 MTBC 般被納入主要之監測與防治。因此，並無全臺灣之監測資料，僅有以醫院或城市為主之資料分析。已知臨床實驗室之 NTM 的分離率，如依時序：臺灣慢性病防治局 1996-1997 年檢驗室的資料顯示，疑似結核病送驗檢體之 NTM 分離率佔 5.6%；其中，快速生長分枝桿菌佔 45.5%，其次為 *M. avium* complex 佔 36.4%。2011 年，臺灣中部的醫院報導 2002-2007 年 NTM 分離率，有逐年上升趨勢，由 2002 年 17.5%提高至 2007 年 45.8%【15】。2010 年，臺大醫院報導 2002-2008 年間分枝桿菌培養陽性檢體中，NTM 分離菌之前 5 名為：*M. avium* complex (30.0%)、*Mycobacterium abscessus* (17.5%)、*Mycobacterium fortuitum* complex (13.0%)、*Mycobacterium chelonae* complex (9.6%)、*Mycobacterium kansasii* (5.6%)及 *Mycobacterium gordonae* (5.5%)【1】。2013 年，疾管署委託實驗室調查臺灣北、中、南 3 區發現，NTM 的臨床分離率各約為 56%、75%及 61%。臨床 NTM 分離量之前 5 名為：*Mycobacterium intracellulare* (30.7%)、*M. abscessus* (19.6%)、*M. fortuitum* (14.7%)、*M. kansasii* 及 *M. avium*。在 3 區中，發現 *M. fortuitum* 有增加趨勢，而 *M. gordonae* 有減少趨勢【2】。2014 年，臺大醫院後續發表 2002-2012 年間，實驗室分離 NTM 的比率為 56.9%。NTM 感染由 2002 年之 15.8%加至 2012 年之 29.4%；NTM colonization/contamination 則由 2002 年之 20.6%加至 2012 年之 38.1%。感染 NTM 個案之分離菌主要為：*M. avium-intracellulare* complex、*M. abscessus*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. kansasii* 及 *M. gordonae*；而 NTM colonization 個案之分離菌主要為：*M. avium-intracellulare* complex、*M. fortuitum*、*M. gordonae*、*M. abscessus*、*M. kansasii* 及 *M. chelonae*【3】。2013 年，臺大醫院進行的臨床快速試劑評估結果發現分離率最高之 NTM 為：*M. abscessus* complex (15.7%)、*M. avium* complex (%)、*M. intracellulare* (9.6%)、*M. avium* (4.1%)、*M. fortuitum* (3.4%)、*M. kansasii* (3.8%)及 *M. gordonae* (4.0%)【4】。另一臺大醫院續發表臨床分離主要之 NTM 為 *M. fortuitum* (35.1%)、*M. avium* complex (34.7%)、*M. chelonae-abscessus* (19.8%) 及 *M.*

kansasii (10.4%) 【4】。此外，該研究發現 *M. fortuitum* 之單次分離並無臨床特殊意義 (clinical significance)。2015 年報導分析台北市 2007-2010 年間，疑似 TB 個案最常見 NTM 分離率為 *M. avium* complex (32.4%)、*M. chelonae* complex (17.6%)、*M. fortuitum* complex (17.0%)及 *M. kansasii* (9.8%)，佔總 TB 通報量之 21.2% 【7】。

已知 NTM 的流行具地域性差異，例如：*M. avium* complex 佔澳洲的 NTM 分離率之 91%、佔日本之 81%、佔南韓之 65.0-73%、佔新加坡之 39.0-43.5%、佔泰國之 41%、佔香港之 31.5%、佔印度之 20%及佔大陸之 13.1%，臺灣視區域約 30-40% 【16】。然而，卻非印度及伊朗之主要 NTM。此外，綜觀亞洲地區(含臺灣、大陸、韓國、日本、香港、新加坡、伊朗及沙烏地阿拉伯)的文獻報導資料顯示，臨床 NTM 的主要分離菌大致上為：*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. kansasii*、*M. gordonae* 等。

依據所收集資料之分析結果，著手設計快速簡易之分枝桿菌檢測方法，並以 point-of-care 試劑為開發最終目標，已取代現有操作繁複及昂貴之試劑(line-probe、晶片等)與設備(MOLTI-TOF、thermocycler 等)。

(二) 發展快速檢測方法

1.快速 NASBA 檢測方法

(1) 原理:以 NASBA 方法又稱為 self-sustained sequenced replication (3SR)或 transcription mediated amplication (TMA)之恆溫反應檢測 RNA 方法。

(2) Primer 設計: 預計可同時檢測結核菌群及臨床上主要分離之 7 種 NTM。

OT727	AAC.....TGCA
OT737(T7)	AAT.....CCCTCTCA

(3) Probe 設計

<i>M. tuberculosis</i> complex	MTBC	ACG.....GGT
<i>M. avium</i>	M. avi	TCA.....GGT
<i>M. intracellulare</i>	M. int	TTA.....GGT
<i>M. bscessus</i>	M. abs	ACA.....GGT
<i>M. kansasii</i>	M. kan	ACT.....GGT
<i>M. gordonae</i>	M. gor	ACA.....GGT
<i>M. fortuitum</i>	M. for	ACG.....GGT
<i>M. peregrinum</i>	M. per	GCG.....GGT
Myco positive control	PC	TAT.....GGT

(4)原形晶片佈局(layout)

	A	B	C	D
1	Marker (1)	Postive Control (1)	Postive Control (2)	Marker (2)
2	MTBC (1)	M. int (1)	M. in (2)	MTBC (2)
3	M. abs (1)	M. kan (1)	M. kan (2)	M. abs (2)
4	M. avi (1)	M. for (1)	M. for (2)	M. avi (2)
5	M. gor (1)	M. per (1)	M. per (2)	M. gor (2)

(5)晶片測試結果(圖一)

第一代的 MTBC/NTM 原型晶片設計在初步測試後發現：以常溫方式進行反應下，發現可能有交叉反應之問題，或是方法較敏感可同時偵測出 2 種 NTM，或是檢體內含 2 種菌株未被臨床實驗室原有鑑定方法檢出。而且考量此分子試劑在結核病檢驗之市

場需求及晶片操作流程後，遂優先開發簡易 MTBC 鑑定試劑為主，開發 NTM 晶片為輔。

2.發展 Recombinase Polymerase Amplification 快速檢測結核菌 DNA 方法

(1)原理: 採集臨床檢體並萃取 DNA 後，即可進行 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)反應。其中，包含可放大 MTBC 及 Internal Control (IC)核酸片段並做特殊標定的引子，經由重組酶與聚合酶反覆產生雙股 DNA。

(2)設計: 由含有結核菌的痰檢體中，純化得到的 DNA 經 Polymerase Chain Reaction (PCR) 或 RPA 核酸擴增反應放大，產生帶有特定標記之 MTBC DNA 產物，本產品將特異性抗體固定於多孔性薄膜上，並以膠體金做為追蹤呈色劑。當核酸擴增反應產物於多孔性薄膜上流動時，得以追蹤固定抗體，並且結合檢體中 MTBC 之 DNA，再藉由固定抗體與帶有標記之 MTBC DNA-膠體金結合體，結合後進行呈色，以達成鑑定的功效。

(3) 測試之 105 痰檢體經傳統培養及鑑定結果為: 70 株為 MTBC 及 29 件 NTM 檢體分別為: 8 株 *M. abscessus*、3 株 *M. avium complex*、4 株 *M. fortuitum*、6 株 *M. intracellulare*、5 株 *M. kansasii*、2 株 *M. terrae* 及 1 株 *M. chelonae*。此外，有 6 件為培養陰性。

(4)第一代 PRA 原型試劑

4.1 strip 試劑製備: 此試劑以區分 MTBC/NTM 為標的，製備完成之原型產品以 H₂O 為 negative control 及以 MTBC 中之 *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis*, and *M. caprae*) 及 NTM (*M. avium complex (MAC)*、*M. abscessus*、*M. chelonae*、*M. fortuitum*、*M. gastri*、*M. gordonae*、*M. kansasii*、*M. marinum*、*M. nonchromogenicum*、*M. peregrinum*、*M. scrofulaceum*、*M. simiae*、*M. smegmatis*、*M. szulgai*、*M. lentiflavum*、*M. terrae*、*M. xenopi*、*M. malmoense*、*M. agri*、*M. brumae*、*M. celatum*、*M. chitae*、*M. chlorophenicum*、*M. confluentis*、*M. gadium*、*M. goodii*、*M. hiberniae*、*M. intermedium*、*M. phlei*、*M. pulveris*、*M. rhodesiae*、*M. thermoresistibile*、*M. triviale*、*M. vaccae*、*M. vanbaalenii*)進行品管測試。確認後製備成原型試劑。

4.2 試劑操作流程圖及判讀方式 (圖二及三): strip 含 internal control (IC), MTBC 及

pan-mycobacteria (panM)。

(5) 第一代原型試劑產品臨床檢體評估結果

5.2.1 測試極限(detection limit)分析

以 IC、MTBC、PanM 皆呈色為基準，則測試極限為 1,200 cfu/mL；若以僅 IC 及 MTBC 呈色為基準，則測試極限為 120 cfu/mL。

5.2.2 以 PRA 原型試劑測試 105 件痰檢體之結果

表一分列 MTBC、NTM 及培養陰性痰檢體測試結果，以傳統培養鑑定結果為參考，不一致之結果以 IS6110 PCR 進行確認。70 株 MTBC 中，RPA 檢測出 43 株(61.4%)；29 株 NTM 中，RPA 檢測出 21 株(72.4%) panM，invalid 檢體中 RPA 檢測出 2 株 panM；6 株培養陰性中，RPA 檢測出 4 株 panM。亦即 35 株 non-MTBC 中，RPA 檢測出 27 株(77.1%) panM。整體試劑敏感度為 61.4% (95% CI: 49.0, 72.8)、特異度 97.1% (95% CI: 85.1, 99.9)，陽性及陰性預測值分別為 97.7% (95% CI: 88, 99.9)及 55.7% (95% CI: 42.5, 68.5) (表二)。如果分析排除 Invalid 結果：則 61 株 MTBC 中，RPA 檢測出 43 株(70.4%)；28 株 NTM 及 culture (-)中，RPA 檢測出 25 株(89.3%) panM。整體試劑敏感度為 70.5% (95% CI: 57.4, 81.5)、特異度 96.4% (95% CI: 81.7, 99.9)，陽性及陰性預測值分別為 97.7% (95% CI: 88, 99.9)及 60.0% (95% CI: 44.3, 74.3) (表三)。

以 IS 6110 real-time PCR 鑑定 MTBC 結果為黃金標準，則 72 株 MTBC 中，RPA 檢測出 44 株(61.1%)；33 株 non-MTBC 中，RPA 檢測出 26 株(78.8%) panM。整體試劑敏感度為 61.1% (95% CI: 48.9, 72.4)、特異度 100.0% (95% CI: 89.4, 100)，陽性及陰性預測值分別為 100.0% (95% CI: 92, 100)及 54.1% (95% CI: 40.9, 66.9) (表四)。如果分析排除 Invalid 結果：則 63 株 MTBC 中，RPA 檢測出 44 株(69.8%)；26 株 non-MTBC 中，RPA 檢測出 24 株(92.3%) panM，2 件檢體 RPA 陰性。整體試劑敏感度為 69.8% (95% CI: 57, 80.8)、特異度 100.0% (95% CI: 86.8, 100)，陽性及陰性預測值分別為 100.0% (95% CI: 92, 100)及

57.8% (95% CI:42.2 , 72.3) (表五)。

經 real-time PCR 分析 PRA 所測得之不一致結果後，發現低敏感度及低陰性預測值係因為 PRA 原型試劑測試極限所致。

5.3 結果不一致分析

Invalid 結果皆為 IC 未呈現所致。以 MTBC IS6110 real-time PCR 分析不一致性結果，發現(1) 9 件 MTBC invalid 大多數為 DNA 量過低而未能偵測為主，理想中應該是呈現 (IC+/MTBC+/PanM+)，而 real-time PCR 確認皆為 MTBC 陽性；(2) 7 件 NTM invalid 則有 1 件為(IC-/MTBC-/PanM+)、1 件為(IC-/MTBC-/PanM 弱+)、及另 5 件為(IC-/MTBC-/PanM-)，以 MTBC IS6110 real-time PCR 分析結果則皆為陰性，理想中則應該呈現 (IC+/MTBC-/PanM+)。

MTBC 或 NTM 培養與 RPA 鑑定不一致性結果，若以 MTBC IS6110 real-time PCR 分析發現:(1) 18 件 MTBC 檢體中只有 1 件為 real-time PCR true 陰性，其它 17 件的 Cp 值範圍為 24.46 - 33.48，中位數為 29.36；(2) 1 件 NTM 檢體(IC+/MTBC+/PanM+)為 real-time 陽性(Cp 值為 33.05)，1 件 NTM 檢體(IC+/MTBC-/PanM-)為 real-time PCR 陰性。

5.4 Invalid 結果分析

以 MTBC IS6110 real-time PCR 分析發現:(1) 9 件 MTBC 檢體皆為 real-time PCR 陽性，Cp 值範圍為 24.03 – 34.53，中位數為 28.94；(2) 7 件 NTM 檢體皆為 real-time 陰性，含 *M. intracellulare* 3 件、*M. kansasii* 2 件、*M. chelonae* 1 件及 *M. avium* 1 件。

四、討論

(一) 非結核分枝桿菌盛行率

一般認為 NTM 不會引起人與人之間的傳染，因此不須隔離治療。NTM 其臨床表現及細菌學檢查容易與結核菌群產生混淆。雖然，NTM 感染的治療上，部份與結核病治療類似。然而，各菌種間變異很大，常須合併一般抗生素及外科治療。NTM 在臺灣的臨床分離率日漸升高，可能是實驗室使用之培養方法，增加分離率或是有與結核菌併存。經文獻及報告之回顧，瞭解臨床主要之 NTM 鑑定出之菌株為: *M. avium*、*M. intracellulare*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. kansasii*、*M. goodii*。其中，台灣最常見的為 *M. avium* (MAC)、*M. abscessus* 及 *M. fortuitum* 【16,17,18,19】。NTM 佔全部 Mycobacteria 檢出率，從 2002 年到 2007 年增加 2.6 倍 (17.5%及 45.8%)【20】。2007 至 2010 年間，台北市的 4216 通報培養陽性肺結核病例中，有 894 (21.2%) 感染 NTM，無論男女皆隨年齡增加而增加，且女高於男 (分別為 27.6%及 17.8%)，此外，extrapulmonary specimens 的 NTM 檢出比例有顯著增加的情形(P<0.01) 【16】。部分研究顯示 MAC、*M. kansasii* 是非愛滋病感染者常見的致病菌【21】，藉由血液培養有助於早期的診斷並降低死亡率【22】。NTM 的感染也已知與癌症(肺癌、血液癌症和胃腸道癌等)及泌尿生殖系感染有關，大多數癌症患者肺部 NTM 感染是由 MAC 引起【18,23】。因此，應開發或選用更快速敏感的 NTM、NTM/NTM 及 MTBC/NTM 檢測及鑑別方法。由文獻之分析，初步瞭解臺灣臨床之主要 NTM 流行情形；將來可藉由全國之監測資料及建立必要之檢測及抗藥性試驗等，有助於醫師進行個案診治。

(二) 快速分子檢測方法之開發

依據 Treatment Action Group (TAG) 出刊的 HIV/HCV/TB 2015 pipeline report 中與 TB diagnostics 相關內容指出，因應 TB 防治極需優先發展簡易、價廉的 point-of-care triage test 以便 rule-out TB。遂依此原則，進行新檢測工具開發。

PCR 是常見之臨床核酸增幅檢測方法，可取代時效冗長之傳統結核病檢驗，但是因為需要特別的實驗環境規劃與設備(如聚合酶連鎖反應機 thermocycler)，使得 PCR 不適用於資源有限地區或發展成簡易 point-of-care 使用。因此，科學家遂持續發展不需要改變反應溫度之專一序列(sequence-specific)核酸放大方法，即是所謂恆溫核酸增幅技術(Isothermal amplification protocols)。雖然不同恆溫核酸增幅技術有不同優點，但共通的是非常快速且無須使用昂貴之 thermocycler。常見之技術如：(1) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)：使用 4-6 對 primers 針對 6-8 不同區域之目標 DNA 設計，因高專一性可形成 loop 結構，反應溫度為 65°C，可於 15-60 分鐘完成增幅，結果使用呈色法，可以肉眼直接觀察。因此，適合可發展成 field diagnostics。(2) 鏈置換擴增方法(strand displacement amplification, SDA)：使用 *Bst* DNA 聚合酶進行 DNA 體外恆溫擴增方法，在目標 DNA 兩端產生被化學修飾的限制性核酸內切酶識別之序列，核酸內切酶在其識別位點將鏈 DNA 打開缺口後，DNA 聚合酶繼續延伸缺口 3'端及置換下一條 DNA。被替換的 DNA 單鏈，可與 primer 結合並被 DNA 聚合酶延伸成雙鏈。此過程反覆進行，以高效率擴增目標 DNA。(3) Helicase-dependent amplification (HDA)：傳統 PCR 操作方式必須先加熱使 DNA 變性後，再冷卻合成。而 HDA 則模仿自然界 DNA 合成方式，使用 2 對 primers 及解旋酶(helicase)使 DNA 變性。因此，整個 HDA 反應在同一溫度 37°C 下進行，不用昂貴且耗費功率的 thermocycler。(4) 切口酶增幅反應(Nicking enzyme amplification reaction, NEAR)：利用 Vent (exo-)聚合酶、Nt.BstNBI 切口內切酶以及具有標的物的 deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP)衍生物進行 10-22 nucleotides 合成。利用切口酶快速產生許多短的目標序列核酸，做為後續 PCR 的引子。以及本實驗室經評估後採用之(5) Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)：使用 3 種酶 AMV reverse transcriptase、RNaseH 及 T7 DNA dependent RNA polymerase，於恆溫 41°C 下執行 RNA 檢測之方法；(6) recombinase polymerase amplification (RPA)：使用 3 種酶 recombinase、single-stranded DNA-binding protein 及 strand-displacing polymerase，於恆溫 37-39°C 下執行 DNA 檢測之方法，應可於 15 分鐘內完成反應。

本 proof of concept 的研究嘗試發展 point-of care 新 TB 診斷工具，以 NASBA-based RNA 檢測方法及 RPA-based DNA 檢測試劑套組，以鑑別診斷 MTBC/NTM。在開發過程中，觀察到 NTM 的檢測的市場需求階段，尚未到達 point-of care 的必要性，有市售產品如國外 HAIN Lifescience 之 GenoType Mycobacterium MTBC 及 AS/CM、Alere Vircell 之 speedoligo 試劑等，國內晶宇之 Dr. TBDR/NTM IVD kit、鑫堂之必優達分枝桿菌鑑定試驗試劑系列(滅菌)等；此外，MOLTI-TOF 在醫學中心已例行性的使用於 NTM 的鑑定。有鑑於產品階段需求性及市場擴展性，決定第一年以開發 TB 快速診斷產品為優先，並採用可達學理上理想之 single molecule 檢測敏感度之 RPA-based 技術。以便達成普及 MTBC/NTM 篩檢，簡化檢測流程並兼顧檢測的準確率的發展目標。

目前，世界衛生組織(World Health Organization, WHO)建議使用之 TB 診斷工具，如：(1) ICT 需要培養大量菌體後(至少 $10^5 - 10^6$ CFU)，才可進行鑑定，可能偽陽性是值得關注的問題。再者，許多 TB 盛行資源落後國家，甚至缺乏細菌培養量能；(2) 傳統 PCR 需要設備、設施及技術良好人員，較難推廣成 field diagnostics；(3) Xpert MTB/RIF 為“類 point-of care”，雖然操作簡易但所需資源十分龐大，產出之醫療廢棄物亦多。因此，TB 商用試劑的發展多朝向以恆溫 DNA 擴增技術為主，無須特殊熱源，甚至文獻報導 RPA DNA 增幅法，可利用體溫完成【24】。

本研究初步證實以第一代的快速及簡易之 RPA 試劑，可準確極有效率的由臨床痰檢體檢測出 MTBC 的 DNA，偵測極限為 120 cfu/mL。此極限對相較於現有商用試劑 Cepheid Xpert (50-150 cfu/mL)、Eiken LAMP-TB (50-150 cfu/mL)、HAIN line-probe (10,000 cfu/mL)，有其競爭力。更大的優勢是唯一的設備是恆溫加熱器(heating block)，價格低廉(新台幣 15,000-50,000 元)且一人 1 天至少可處理及檢測 72 件檢體。

由第一代 RPA 原型產品的測試結果可知，(1) Detection limit 結果顯示，以 IC+/MTBC+ 作為判別基準能達到較好的測試效果(120 cfu/mL，Cp 值約為 29.57)；(2)排除 invalid 結果後，以菌株培養及 real-time PCR 鑑定結果為黃金標準，此試劑特異性及陽性預測值極高

(檢測特異度各別為 96.4%及 100%；陽性預測值則各別為 97.7%及 100%)，表示此試劑適用為臨床上的檢測工具。

另可歸類出以下幾點探討:(1)有些 MTBC 檢體測試結果為 IC+/MTBC+/PanM-，推測可能為 MTBC、PanM 進行反應作用時，相互競爭所造成，建議重新設計去除 PanM 的測試點；(2)根據 MTBC 檢體 real-time PCR 結果，invalid (24.03 – 34.53，中位數為 28.94)Cp 值範圍與結果不一致者(24.46 - 33.48，中位數為 29.36)幾乎一致，原型產品測試極限以 Cp 25 為準，因此原型產品本身的偵測極限可能為造成敏感度(70.5%)及陰性預測值(60.0%)稍低的原因，承前述，如果去除 PanM 測試點可能有助於改善 MTBC 反應。此外，RPA-based 檢測所需之 amplicons 為 80-400 bp，核酸擴增的 efficiency，可以藉由試劑的調配來改善；(3) Invalid 比例過高(105 件中佔 16 件，佔 15.2%)，其中只有 2 件 NTM 檢體有測得 PnaM+ 及 PanM 弱+的反應，此外，比較 detection limit 及臨床檢體檢測結果，測試極限 Cp 值分別為 29.57 及 25，推測檢體品質(殘留的蛋白質等)可能造成 RPA 反應受到抑制。

綜合上述，建議第二代 RPA 原型產品的開發可朝以下方向發展: (1)為降低試劑偵測極限，重新檢討試劑成分及測試流程調整，以因應不同檢體的測試；(2)去除 PanM 測試點，將試劑改為 MTBC、negative 及 invalid 檢測判讀(strip 含 IC、MTBC，如圖五)。

NTM 培養與 RPA 鑑定不一致性結果，2 件為 *M. abscessus* 經 RPA 測得為 MTBC 及 negative (real-time 結果皆為 MTBC 陽性)。Invalid 的 7 件檢體中包含 *M. avium complex* 1 件、*M. intracellulare* 3 件(1 件為 IC-/MTBC-/PanM 弱+)、*M. kansasii* 2 件(1 件為 IC-/MTBC-/PanM+)及 *M. chelonae* 1 件。初步看來，檢測結果不一致及 invalid 情形與 NTM species 並無關聯性。

進一步分析，MTBC 或 NTM 培養與 MTBC IS6110 real-time PCR 不一致結果共 4 個案: MTBC 1 人、NTM 2 人及培養陰性 1 人(L-J 培養尚未發報告)。其中 **3 人已通報為 TB 個案且皆為新案**，1 人於今年 9 月已先發 smear 跟 MGIT 陰性(L-J 培養尚未發報告)。由 TB 通報紀錄發現: (1) 2 次 real-time PCR 檢測為陰性之 MTBC 檢體，採檢日為 2015 年 2 月 5 日，在 2015 年 2 月至 3 月間，共通報 5 次且皆為 MTBC 陽性結果；此次 RPA 結果為

IC+/MTBC-/PanM+；(2) real-time PCR 檢測為陰性之 2 件 NTM 檢體，採檢日分別為 2015 年 3 月 26 及 11 日培養鑑定結果皆為 *M. abscessus*，過去通報紀錄中皆曾培養出 MTBC 陽性，RPA 結果為 IC+/MTBC-/PanM+及 IC+/MTBC-/PanM-(表七)。此 4 件檢體皆為治療一段時間後採檢，造成分子檢測結果不一。因此，在使用分生工具進行個案檢測時，須瞭解採檢時間點；此外，real-time PCR 或 RPA 檢出微量 *M. tuberculosis* DNA，可使用於治療成效監測(monitor)用。然而，疑似個案於初次檢查時，如果檢體內僅有微量 MTBC 伴隨相對大量之 NTM 之 colonization/contamination，則傳統方法極有可能培養後鑑定為 NTM，不得不慎。因此，分子快速核酸之檢測結果，須回溯及整合療程訊息，以進行個案終判。

綜觀，本研究現階段係使用消化去污後痰檢體進行 DNA 萃取實驗，目前初步結果與塗片陰性及陽性結果並無相關性。如果不考慮抗酸菌鏡檢及後續培養所需，則可直接進行原始檢體之核酸萃取及 RPA 試驗，於 1-2 小時內完成報告。初步結果證實臨床適用性，亦可運用於菌株的鑑定上，避免或改善現有生化或 ICT 等 MTBC 鑑定方法的偽陰性。

五、結論與建議

近年來 NTM 的在臨床實驗室的分離率有顯著增加，宜加強各級臨床實驗室診斷 TB 及 NTM 的鑑別診斷技巧及能力。建議針對常見之 NTM 分離菌：*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. kansasii*、*M. goodii* 等，建立常態性監測及分析。NASBA 晶片檢測方法分析 MTBC 及 NTM 菌株 RNA 之評估可行，可大幅降低現有市售晶片或線性探針(line-probe)檢測步驟改善報告時效，但仍需持續開發測試以改善檢測特異性；RPA 恆溫核酸檢測法證實可設計發展成臨床檢體 point-of-care 試劑：初步證明檢測極限可到約 120 cfu/mL。如果是以菌株培養及 real-time PCR 鑑定結果為黃金標準，檢測特異度各別為 96.4%及 100%；陽性預測值則各別為 97.7%及 100%。不一致分析結果顯示，在使用分生工具進行個案檢測時，須瞭解採檢時間點；此外，real-time PCR 或 RPA 檢出微量 *M. tuberculosis* DNA，可使用於治療成效監測(monitor)用。然而，疑似個案於初次檢查時，如果檢體內僅有微量 MTBC 伴隨相對大量 NTM 之 colonization/contamination，則傳統方法極有可能培養後鑑定為 NTM，不得不慎。因此，分子快速核酸之檢測結果，須回溯整合療程訊息，進行終判。再者，RPA 試驗，於 1-2 小時內完成報告。初步結果證實臨床適用性，亦可運用於菌株的鑑定上，避免或改善現有生化或 ICT 等 MTBC 鑑定方法的偽陰性。

調查完成之主要臨床 NTM 種類，可供發展快速檢測試劑時參酌。必竟 NTM 感染或造成共病(如 HIV/AIDS 等)，仍會造成臨床診治困擾。現有 NTM 試劑或設備，大都有價格昂貴及技術需求之門檻。開發簡易鑑別法或可設立 NTM 代檢實驗室執行 species 鑑定，以提供臨床診治服務。本研究發展簡易恆溫 MTBC 鑑定及 NTM 快速檢測試劑，目前皆已有初步成果並證明其可行性。將有效提高 RPA-based MTBC 鑑定試劑之特異性及測試其穩定性，持續進行臨床檢體測試，未來可望開發成價廉之簡易 point-of-care 試劑，推展為快速篩檢 MTBC 之利器。此外，新 TB 分子診斷工具之研發宜針對臨床直接檢體設計，並且除肺內痰檢體外，亦須考慮包含肺外檢體之適用性。因此，除核酸偵測平台外，

前端的檢體處理亦是關鍵。目前已初步之原型試劑，具良好特異性及極高陽性預測值，可用於 point-of-care 時檢測 TB 用。

六、計畫重要研究成果及具體建議

(一) 成果

近年來 NTM 的在臨床實驗室的分離率有顯著增加，宜加強各級臨床實驗室診斷 TB 及 NTM 的鑑別診斷技巧及能力。建議針對常見之 NTM 分離菌：*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. kansasii*、*M. goodii* 等，建立常態性監測及分析。NASBA 晶片檢測方法分析 MTBC 及 NTM 菌株 RNA 之評估可行，可大幅降低現有市售晶片或線性探針(line-probe)檢測步驟改善報告時效，但仍需持續開發測試以改善檢測特異性；RPA 恆溫核酸檢測法證實可設計發展成臨床檢體 point-of-care 試劑：初步證明檢測極限可到約 120 cfu/mL。如果是以菌株培養及 real-time PCR 鑑定結果為黃金標準，檢測特異度各別為 96.4%及 100%；陽性預測值則各別為 97.7% 及 100%。

(二) 具體建議

1. NTM 的分離率增加，宜加強各級臨床實驗室診斷 TB 及 NTM 的鑑別診斷技巧及能力。現有 NTM 試劑或設備，大都有價格昂貴級技術需求之門檻。建議可設立 NTM 代檢實驗室執行 species 鑑定，以提供臨床診治服務。
2. 新 TB 分子診斷工具之研發建議宜針對臨床直接檢體，使用恆溫增幅原理設計。

七、參考文獻

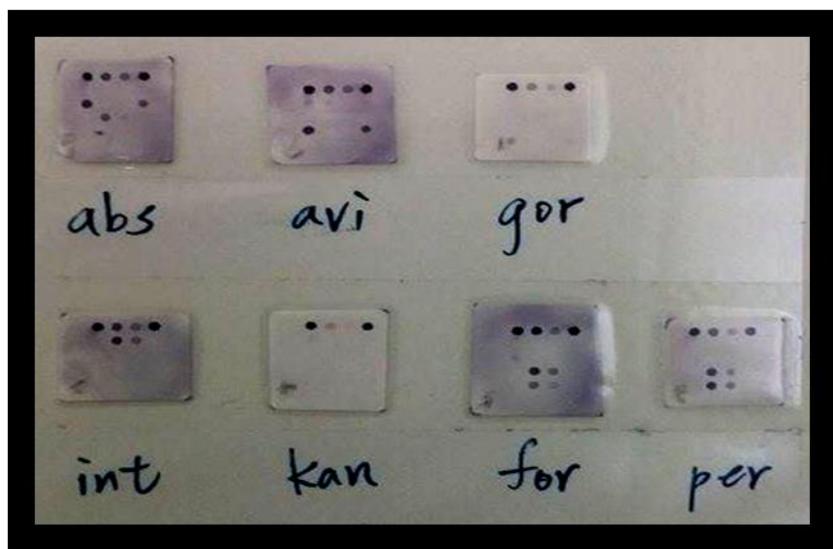
依一般科學論文之參考文獻撰寫方式，列出所引用之參考文獻，並於計畫內容引用處標註之。

1. Wallace RJ Jr, Cook JL, Glassroth J, et al. 1997. American Thoracic Society Statement: diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:S1-S25.
2. Cleary TJ, Roudel G, Casillas O, Miller N. 2003. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe. *J Clin Microbiol.* 41:4783-6.
3. Telenti, A., et al. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175–178.
4. Russo C, Tortoli E, Menichella D. 2006. Evaluation of the new GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 44:334-9.
5. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Williams, D. L., Kreiswirth, B. N. and Musser, J. M. 1996. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(4):1024–1026.
6. Bapat, P.R., Satav, A.R., Husain, A.A., Shekhawat, S.D., Kawle, A.P., Chu, J.J., Purohit, H.J., Daginawala, H.F., Taori, G.M. and Kashyap, R.S. 2015. Differential Levels of Alpha-2-Macroglobulin, Haptoglobin and Sero-Transferrin as Adjunct Markers for TB Diagnosis and Disease Progression in the Malnourished Tribal Population of Melghat, India. *PLoS One.* 10(8):e0133928
7. Compton J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 350:91–92.
8. Guatelli J., Whitfield K., Kwoh D., Barringer K., Richman D. and Gingeras T. 1990. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retrovirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1874–1878.

9. Gill P, Ghaemi A. 2008. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 27:224-243.
10. Payton, M. and Pinterk K. 1999. A rapid novel method for the extraction of RNA from wild-type and genetically modified kanamycin resistant mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 180:141-146.
11. Tao, S.C., Li, Y., Liu, Y.H., Ma, X. M. and Cheng, J. 2003 Room-temperature hybridization of target DNA with microarrays in concentrated solutions of guanidine thiocyanate. *Bio-Tech.* 34, 1260-1262.
12. Fakriddin MD, Mazumdar RM, Chowdhury A, Mannan KSB. 2012. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)-prospects and applications. *IJLPR*. 2:L106-121.
13. Van Der Vliet, G.M.E., Schukkink, R.A.F., Van Gemen, B., Schpers, P. and Klatser, P.R. 1993. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 139:2423-2429.
14. Lu, P.L., Lin, Y. C., Yang, Y. C., Jou R., Huang, S. C., Jenh, Y. S., Huang, H. H. and Chang, T. C. 2013. Evaluation of membrane array for detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria in positive liquid culture. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 75:337-341.
15. Tsai CF, Shiau MY, Chang YH, Wang YL, Huang TL, Liaw YC, Tsao SM, Yang TP, Yang SC, Lin DB. 2011. Trends of mycobacterial clinical isolates in Taiwan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105:148-52.
16. Chien JY, Lai CC, Sheng WH, Yu CJ, Hsueh PR. 2014. Pulmonary infection and colonization with nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2012. *Emerg Infect Dis.* 20:1382-5.
17. Chiang, C.Y., Yu, M.C., Yang, S.L., Yen, M.Y. and Bai, K.J. 2015. Surveillance of Tuberculosis in Taipei: The Influence of Nontuberculous Mycobacteria. *PLoS One*. 10(11):e0142324.

18. Lai, C.C., Tan, C.K., Cheng, A., Chung, K.P., Chen, C.Y., Liao, C.H., Huang, Y.T. and Hsueh, P.R. 2012. Nontuberculous mycobacterial infections in cancer patients in a medical center in Taiwan, 2005-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 72(2):161-5.
19. Chen, C.Y., Chen, H.Y., Chou, C.H., Huang, C.T., Lai, C.C. and Hsueh, P.R. 2012. Pulmonary infection caused by nontuberculous mycobacteria in a medical center in Taiwan, 2005-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 72(1):47-51.
20. Tsai, C.F., Shiau, M.Y., Chang, Y.H., Wang, Y.L., Huang, T.L., Liaw, Y.C., Tsao, S.M., Yang, T.P., Yang, S.C. and Lin, D.B. 2011. Trends of mycobacterial clinical isolates in Taiwan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(3):148-52.
21. Lin, S.H., Lai, C.C., Huang, S.H., Hung, C.C. and Hsueh, P.R. 2014. Mycobacterial bone marrow infections at a medical centre in Taiwan, 2001-2009. *Epidemiol Infect.* 142(7):1524-32.
22. Lai, C.C., Lee, L.N., Ding, L.W., Yu, C.J., Hsueh, P.R. and Yang, P.C. 2006. Emergence of disseminated infections due to nontuberculous mycobacteria in non-HIV-infected patients, including immunocompetent and immunocompromised patients in a university hospital in Taiwan. *J Infect.* 53(2):77-84.
23. Huang, C.T., Chen, C.Y., Chen, H.Y., Chou, C.H., Ruan, S.Y., Lai, C.C. and Hsueh, P.R. 2010. Genitourinary infections caused by nontuberculous mycobacteria at a university hospital in Taiwan, 1996-2008. *Clin. Microbiol. Infect.* 16(10):1585-90.
24. Crannell, Z. A., Rohrman, B. and Richards-Kortum, R. 2014. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. *PLoS One* 9, e112146.

八、圖、表



圖一 NASBA 晶片檢測結果

臨床檢體測試結果說明

臨床菌株	傳統培養及鑑定結果	NASBA 晶片測試結果
1	<i>M. abscessus</i>	Mixed culture: <i>M. abscessus</i> & <i>M. fortuitum</i>
2	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
3	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
4	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
5	<i>M. kansasii</i>	failed
6	<i>M. fortuitum</i>	Mixed culture: <i>M. fortuitum</i> & <i>M. peregrinum</i>
7	<i>M. peregrinum</i>	Mixed culture: <i>M. peregrinum</i> & <i>M. fortuitum</i>

檢體製備

加入消化去污染痰檢體 100 μ l 與等體積 TE buffer，震盪混勻 20 秒



13,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液



DNA 萃取

加入 30 μ l lysis buffer 回溶沉澱物



95°C 乾浴處理 20 分鐘



以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液



RPA 核酸擴增反應

4 μ l DNA 加至 15 μ l RPA buffer A



加入 1 μ l MgOAc，38°C 反應 20 分鐘



加樣及檢測

將 10 μ l 核酸擴增的產物與 50 μ l running buffer 滴入「加樣區」

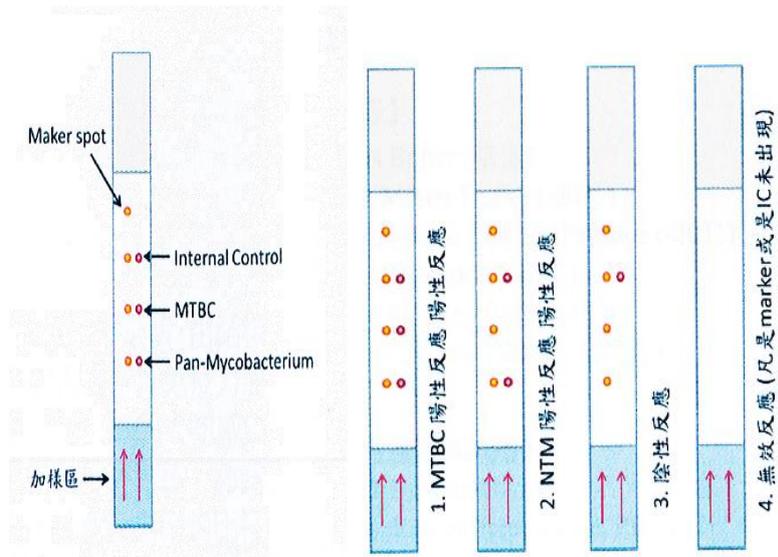


反應 3 分鐘，再加 50 μ l 的 running buffer



反應 20 分鐘後肉眼判讀結果

圖二 第一代 RPA 試劑檢測實驗步驟



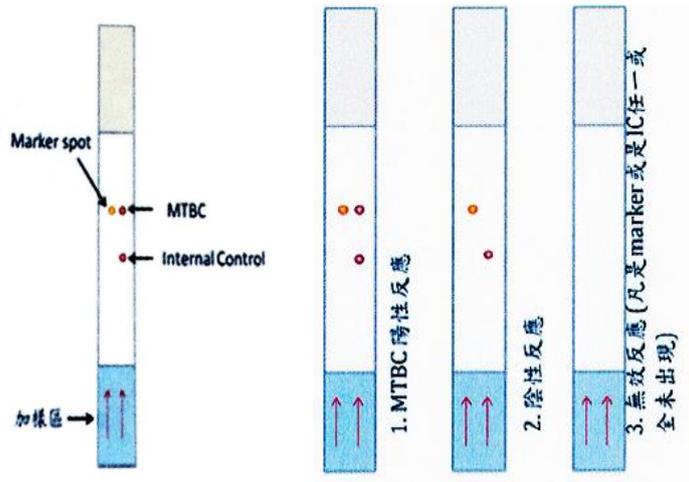
圖三 第一代 RPA 原型產品設計及解讀方式



臨床檢體測試結果說明

檢體編號	傳統培養及鑑定結果	第一代 RPA 測試結果
1	MTBC (4+)	MTBC (<u>IC+/MTBC+/PanM+</u>)
2	MTBC (1+)	MTBC (<u>IC+/MTBC+/PanM+</u>)
3	<i>M. fortuitum</i> (3+)	PanM (<u>IC+/MTBC-/PanM+</u>)
4	<i>M. abscessus</i> (2+)	PanM (<u>IC+/MTBC-/PanM+</u>)
5	Culture (-)	Negative (<u>IC+/MTBC-/PanM-</u>)

圖四 第一代 RPA 原型產品實際測試結果



圖五 第二代 RPA 原型產品設計及解讀方式

表一 以 PRA 檢測 105 件臨床痰檢體結果分析

培養鑑定菌名 (檢體數)	RPA result (檢體數)	抹片價數 (檢體數)	備註說明
MTBC (70)	MTBC (43)	Scanty (1)	
		1+ (5)	
		2+ (10)	7 件檢體為 IC-/MTBC+/PanM-
		3+ (10)	
		4+ (17)	
	PanM (17)	Scanty (6)	
		1+ (5)	
		2+ (3)	IS6110 real-time +: 16 件
		3+ (2)	(除 1 件 3+檢體外)
		4+ (1)	
Negative (1)	3+ (1)	IS6110 real-time +	
Invalid (9)	Scanty (4)		
	1+ (2)		
	2+ (1)	IS6110 real-time +	
	3+ (1)		
	4+ (1)		
NTM (29)	MTBC (1)	Scanty (1)	IS6110 real-time +
	PanM (20)	Scanty (8)	
		1+ (5)	
		2+ (2)	
		3+ (4)	
		4+ (1)	

	Negative (1)	1+ (1)	IS6110 real-time +
	Invalid (7)	1+ (2)	
		2+ (4)	IS6110 real-time -
		3+ (1)	
Culture (-) (6)	PanM (4)	Negative (4)	IS6110 real-time +: 1 件 IS6110 real-time -: 3 件
	Negative (2)	Negative (2)	

以菌株培養及鑑定結果為黃金標準，如果分析包含 Invalid 結果：則 70 株

表二 菌株培養及 RPA 試劑鑑定結果比較,含 Invalid 結果

Culture result	RPA result			Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Predictive value (%)	
	MTBC	Non-MTBC	Invalid				Positive	Negative
MTBC	43	<u>18</u>	9	70	61.4	97.1	97.7	55.7
Non-MTBC	1	27	7	35				
Total	44	45	16	105				

表三 菌株培養及 RPA 試劑鑑定結果比較,不含 Invalid 結果

Culture result	RPA result		Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Predictive value (%)	
	MTBC	Non-MTBC				Positive	Negative
MTBC	43	<u>18</u>	61	70.5	96.4	97.7	60.0
Non-MTBC	1	27	28				
Total	44	45	89				

表四 Real-time PCR 及 RPA 試劑鑑定結果比較,含 Invalid 結果

IS6110 Real-time result	RPA result			Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Predictive value (%)	
	MTBC	Non- MTBC	Invalid				Positive	Negative
MTBC	44	<u>19</u>	9	72	61.1	100.0	100.0	54.1
Non-M TBC	0	26	7	33				
Total	44	45	16	105				

表五 Real-time PCR 及 RPA 試劑鑑定結果比較,不含 Invalid 結果

IS6110 Real-time result	RPA result		Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Predictive value (%)	
	MTBC	Non-MTBC				Positive	Negative
MTBC	44	<u>19</u>	63	69.8	100.0	100.0	57.8
Non-MTBC	0	26	26				
Total	44	45	89				

表六 RPA 與 NTM species 結果

培養鑑定菌名(檢體數)	RPA result (檢體數)	NTM 菌種及數量
NTM (29)	MTBC (1)	<i>M. abscessus</i>
	Pan-M (20)	<i>M. abscessus</i> : 6 件
		<i>M. avium complex</i> : 2 件
		<i>M. fortuitum</i> : 4 件
<i>M. intracellulare</i> : 3 件		
<i>M. kansasii</i> : 3 件		
	<i>M. terrae</i> : 2 件	
	Negative (1)	<i>M. abscessus</i>
Invalid (7)		<i>M. avium complex</i> : 1 件
		<i>M. intracellulare</i> : 3 件
		<i>M. kansasii</i> : 2 件
		<i>M. chelonae</i> : 1 件

表七 4 個案 MTBC 或 NTM 培養與 MTBC IS6110 real-time PCR 結果不一性分析

Case	檢體 種類	Smear 價數	鑑定	RPA 結果	IS6110 Real-time		完成確診 日期	新舊 案	採檢日	鑑定 結果	備註
					Cp 值	結果					
1	Sputum	3+	MTBC	PanM	Undet.	-	2015/2/6	新案	2015/2/4	MTBC	實驗檢體採 檢日： 2015/2/5
									2015/2/4	MTBC	
									2015/2/5	MTBC	
									2015/2/5	MTBC	
									2015/2/6	MTBC	
2015/3/27	MTBC										
2	Sputum	S	NTM (<i>M. abscessus</i>)	MTBC	33.05	+	2015/3/17	新案	2015/2/26	MTBC	實驗檢體採
									2015/3/27	NTM	檢日：
									2015/3/27	NTM	2015/3/26
3	Sputum	1+	NTM (<i>M. abscessus</i>)	Negative	30.71	+	2015/1/12	新案	2014/12/16	MTBC	實驗檢體採 檢日： 2015/3/11
									2015/1/8	MTBC	
									2015/2/2	MTBC	
									2015/6/14	NTM	
2015/6/15	NTM										
4	Sputum	-	Culture (-)	PanM	36.57	+	未確診		2015/9/4	NA	實驗檢體採 檢日： 2015/9/3, 已
									2015/9/5	NA	發 smear 跟
											MGIT 陰性 (LJ 尚未發報 告)