

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-123501

衛生福利部疾病管制署 107 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分子流行病學調查

研究報告

執行機構：行政院衛生福利部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：蔡興元、李威廷、林宛璇、莊珮君、詹岱華、吳玫華、江亭
誼、詹馨嬋

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 11 月 09 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 (5)

貳、本文

一、前言 (11)

二、材料與方法 (15)

三、研究結果 (22)

四、討論 (51)

五、結論與建議 (55)

六、計畫重要研究成果及具體建議 (57)

七、參考文獻 (58)

八、圖、表

表一 181 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 173 株複驗菌株之抗藥型態

表三 181 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 181 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 142 FLQs 抗藥菌株 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點分析

表六 142 例比較傳統及分子檢測結果之個案特性分析

表七 109 株抗藥型態分析

表八 不同藥物之分子檢驗與傳統藥敏不一致分析結果。

表九 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日非本國人 MDR 菌株基因型及年份分布

表十 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日 XDR 基因型及年份分布

表十一 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日 780 名 MDR 本國人之人口學及基因型資料分布

表十二 2018 年 1-10 月 40 株 clustered MDR 菌株與 2012 年至 2018 年有相同者及 4 株 2018 年新增之基因型

表十三 2018 年 32 種 clustered 菌株之個案縣市分布

圖一 156 株傳統藥敏表現型為 RIF-R 菌株之 MIC 分布對應至分子檢驗結果

圖二 151 株傳統藥敏表現型為 INH-R 菌株之 MIC 分布對應至分子檢驗結果

圖三 142 菌株之 MOX 藥 MIC 分布對應至分子檢驗結果

圖四 142 菌株之 OFX 藥 MIC 分布對應至分子檢驗結果

圖五 98 菌株之 LEV 藥 MIC 分布對應至分子檢驗結果

圖六 2012-2018 年聚集與非聚集菌株之比例

摘要

結核病為由結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)病原造成傳染性疾病。根據 WHO 的 2018 年度報告，2017 年結核病造成 160 萬人死亡(包含 30 萬 HIV 共同感染者)，1000 萬人發病。估計全球 2017 年約有 23 萬人死於多重抗藥 (MDR-TB)與 rifampicin (RIF)抗藥結核病(rifampicin-resistant TB, RR-TB)，該年的多重抗藥結核病及 RIF 抗藥結核病的個案估計 56 萬件，其中新確診與再治療個案各佔 3.5% 與 18%。其中廣泛行抗藥結核病(extensively drug-resistant TB, XDR-TB)個案數，則佔多重抗藥結核病個案(估計 46 萬)的 8.5%。2016 年，WHO 亦將 RR-TB 個案納入重點照護及防治項目。2016 年，臺灣新案結核患者有 10,382 例，每 10 萬人口有 44 例。有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。亦進行 MDR 菌株基因型分析，以了解 MDR 可能之傳播情形。**實驗方法**：包含個案檢體檢測、菌株核酸鑑定、抗藥性試驗(含最低抑菌濃度 MIC 測試)、抗藥基因分析、以基因體學分析抗藥機制及個案基本及細菌學資料收集等；菌株基因由分型菌株 spoligotyping 及 MIRU(10)基因型分析。**研究結果**：(1) 一線藥物 isoniazid (INH)與 rifampicin (RIF)抗藥部分：自 1,650 送複驗 MDR 菌株中，發現有 181 (11.0%)菌株之分子檢測與傳統 DST 判定是否為 MDR 的結果不一致，有 170 (93.9%)株經由分子檢測(GenoType 試劑組或核酸定序方法)分析，發現在 RIF 抗藥標的 *rpoB* 基因有鑑別出突變位點。而有 10 株 (5.5%; 佔全部送驗數 0.6%) 傳統 DST 抗藥菌株，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。抗 RIF 藥物相關基因突變探討，突變株 *rpoB* S531L 佔多數 112 (61.9%)株。基

因序列分析比 **GenoType** 檢測方法敏感，可多檢測出 8 株(4.4%)RIF 抗藥菌株。在 181 株發生不一致檢測結果之 MTBC 菌株中，有 45 株(24.9%)株經由分子檢測分析，發現在 INH 抗藥標的 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 基因有鑑別出突變位點，*katG* S315T 出現的頻率最高(10 株，5.5%)；但仍有多達 128 株(70.7%；佔全部送驗數 7.8%)以分子檢測(**GenoType** 試劑組或基因定序)，無發現突變位點。有 38 株菌在 MIC 檢測之分析中判定為敏感性與傳統 DST 結果之不一致率為 21.0%。基因序列分析比 **GenoType** 檢測方法敏感，可多檢測出 17 (9.4%)株 INH 抗藥菌株；(2) fluoroquinolones (FLQs)類抗藥部分:在 1009 菌株中有 142 (14%)株為 FLQ 抗藥菌株，其中分子無法檢測佔 6.3%。續分析分子檢驗與最低抑菌濃度(MIC)檢測結果，顯示對 **moxifloxacin**、**ofloxacin** 與 **levofloxacin** DST 結果不一致率分別為 49.3%、19.7% 及 6.1%。抗 FLQ 藥物相關基因突變以 *gyrA* D94G 為主佔 25.4%，A90V 有 6.9%，D94N 有 4.9%。*gyrA* D94, D90 及 D88，一般與高濃度抗藥相關；而 64 株分子未檢測出突變點，但為低濃度 MOX 抗藥，對不同 FLQ 藥物有不同的 MIC 分布；**LEV** 傳統與分子 DST 結果之一致性高；(3) 基因分型部分：自 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日止，分析 828 株 MDR MTBC。562 (67.9%)株為 clustered 菌株、265 (32.0%) 株為 non-clustered 菌株及 *M. bovis* 菌株 1 (0.1%)株。828 名 MDR-TB 中，本國籍個案共計 780 (94.2%)人，其餘 48 人為大陸人士或外籍人士。**spoligotype** 基因型以 **Beijing** 型居多佔 52.8%。再者，2018 年截至 10 月 31 日止，共分析 91 株 MDR 菌株，其中 40 (44.0%)株為 clustered 菌株 之基因型與 2012-2017 年 MDR 菌株有相同者；另有 4 (4.4%)株分屬 2 個 2018 年新出現之 clustered MDR 基因型 C01011 及 C01013。此外，C00041、C00002、C00009、C00121、C00035、C00013、C00123 皆為 MDR，未見於其他非 MDR 菌株中。**結論與建議**：探討抗藥結核菌株與抗藥性相關基因資料，發現新增之證據，已分析 INH、RIF 及 FLQs 抗藥基因資料及其相關抗藥程度，可優化現有快速檢測判定之敏感度。本計畫持續執行 MDR 菌株基因型分析，確實有助於 TB 傳播的探討及以加強防治作為。並藉由 MDR 菌株基因型之即時上傳於追管系統，以利公衛疫調人員即時啟動相關調查，有效執行 MDR 結核病防治。建議(1)使用基因序列分析方法檢測抗藥性；(2)當傳統與分子檢測結果不一致時，應執行 MIC 測試，由比對 MIC 結果提供更多訊息供臨床診治參考。(3)仍應加強相關監測及整合性分析，以釐清地緣性及持續擴大 clustered 基因型結果。期望

細菌學資料，可能當做預後及聚集性之預測因子，以加強 MDR-TB 照護及傳播鏈調查參考。

關鍵字：結核病、結核菌、多重抗藥性結核菌、抗藥性、基因型、分子流行病學

Abstract

Tuberculosis (TB) is a worldwide infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). According to the 2018 WHO global TB report, TB killed 1.6 million people (additional 300,000 deaths from TB with HIV-positive patients) in 2017; 10 million people are estimated to have fallen sick with this disease. In Taiwan, there are 10,328 new TB cases, with the incidence of 44 per 100 thousands people in 2016. 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. According to WHO 2018 report, there were 558,000 MDR/RR-TB cases, 3.5% were new TB cases and 18% were previously treated cases in 2017. There were approximately 230,000 deaths from MDR/RR-TB in the same year. Among the 460,000 MDR-TB cases in 2017, 8.5% were estimated to have extensively drug-resistant TB (XDR-TB). 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 studied 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 association between gene mutation and degree of drug resistance. This approach will help to develop new TB diagnostics for rapid identification of particular drug-resistant TB cases for early commencement of proper treatment and for better case management and to investigate genotypes of MDR MTBC and associations with MDR-TB clustering. Methods: 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 were carried out. We

performed spoligotyping and MIRU(10) genotyping methods to define the cluster of multi-drug resistant *M. tuberculosis* isolates. A cluster was defined as at least 2 isolates having identical genotypes. Results: (1) 181 (11.0%) Of the 1,650 MDR isolates showed discordant phenotypic and genotypic Isoniazid- and Rifampicin-resistant results. There was one case with RIF-S/INH-R according to phenotypic DST, but the genotypic results showed RIF-R/INH-R. Regarding RIF-resistant conferring mutations, there were 112 (61.9%) isolates with *rpoB* S531L, 9 (5.0%) isoaltes with D516V, and 7 (3.9%) isolates with H526D. Ten (5.5%) isolates contained no mutations in the *rpoB* gene according to the molecular testing results. With regard to INH-related genes mutations, 10 (5.5%) isolates with *katG* S315T mutation were collected and 3 (1.7%) isolates with *inhA* promoter region c-15t. There were 128 isolates had no mutations in INH-related genes using the genotypic tests in this study. (2) We selected 142 FLQ-resistant isolates from 1009 isolates based on the MIC and gene sequencing data in this study. The discordant ratios bwtween phenotypic and genotypic results were different and depended on FLQ drugs (moxifloxacin was 49.3%, ofloxacin was 19.7%, and levofloxacin was 6.1%). We found 36 (25.4%) isolates with *gyrA* D94G mutation, 10 (6.9%) isolates with *gyrA* V90V and 7 (4.9%) isolates with *gyrA* D90N. However, 64 low-level MOX-resistant isolates had no mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes. (3) We genotyped 828 MDR isolates collected from 2012 January 1 to 2018 October 31. The results revealed that 562 (67.9%) were clustered isolates and 265 (32.0%) were non-clustered isolates. One (0.1%) isolate was Bovis genotype. 780 (94.2%) of 828 were native, and 48 (5.8%) were foreigners mainly from Mainland China. The majority (52.8%) spoligotype is Beijing. In 2018, of the 91 MDR MTBC isolates genotyped, 40 (44.0%) were clustered isolates. We identified two new genotypes, C01011 and C01013, in 2018. Furthermore, C00041, C00002, C00009, C00121, C00035, C00013, and C00123 were MDR clusters which do not appear in non-MDR isolates. Conclusions and suggestions: Drug-resistant gene sequencing has better performance for detecting drug resistance. Based on the gene sequencing and MIC data, the level of drugs-resistance could be estimated. For MTBC with discordant results of molecular and conventional DST, it is necessary to provide MIC for better DR treatment. Continuously genotyping MDR isolates is needed to understand the distribution and dynamics of MDR transmission. Genotype information is uploaded in the National TB Registry. The public health officers can start timely epidemiological investigation

for each clustered MDR case to find out possible transmission.

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

貳、本文

一、

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 2018 年 TB 年報:在 2017 年全球有 160 萬人死於 TB (包含 30 萬 HIV 共同感染者)，同時估計該年約有 1000 萬人患有 TB。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 73 例，下降到 2016 年的 10,328 人，發生率每十萬人 44 例【3】。

抗藥性 TB 的發生大都肇因於不適當或不正確抗生素使用，使得防治工作變得更加棘手。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 (FLQ)類藥物及任一二線針劑藥物(second-line injectable drugs, SLIDs)包含：kanamycin (KM)、amikacin (AM)及 capreomycin (CM)產生抗藥性。WHO 在 2018 年的報告中指出，預估 2017 年全球 MDR-TB 與 RR-TB 的發生個案估計為 56 萬人，但僅有 16 萬件個案被通報。若是能檢驗所有已通報 TB 個案，其中超過半數分布在印度(24%)、中國(13%)與俄羅斯(10%)。目前全球的 MDR-TB 及 RR-TB 個案開始接受治療比例 25%，治癒率為 55% (2015 cohort)，XDR-TB 為 34% (2015 cohort)【2】。台灣抗藥性監測結果顯示：(1)新 TB 個案中，有 9%對 INH 抗藥，2%對 RIF 抗藥，2%對 ethambutol (EMB)抗藥，8%對 streptomycin (SM)，14%對任一一線藥物抗藥，1%則為 MDR；(2)再治療 TB 個案中，有 18%對 INH 抗藥，10%對 RIF 抗藥，7%對 ethambutol (EMB)抗藥，12%對 streptomycin (SM)，23%對任一一線藥物抗藥，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。由 Yu 等人研究顯示，在臺灣 MDR-TB 的治療成功率占研究案例 82.8% (案例總數為 686) 【6】。

抗藥性結核病之主要治療藥物包含: (1) FLQs 類藥物: FLQs 可抑制 MTBC 的 type II topoisomerase (DNA gyrase) 【6】，此類藥物包含 Ofloxacin (OFX)、Ciprofloxacin (CIP)、莫西沙星 Moxifloxacin (MOX)、Gatifloxacin (GAT)、左氧氟沙星 Levofloxacin (LEV)等。CIP 及 OFX 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【7】。研究指出 *gyrB* 上的 Asn-533-Thr 突變會使菌株對 MOX 及 GAT 產生抗性，但對 OFL 產生敏感性【8】。LEV 屬於新 FLQ 類，能在巨噬細胞內濃縮，抑制 MTBC 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 MDR-TB 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 TB，很快就會引發抗藥性。實驗篩選及臨床分離的 *gyrA* 突變株以 OFX 測試，則被發現會得到不同的 MIC 【9】。已知 MTBC 的 MfpA (屬 pentapeptide repeat family)可與 DNA gyrase 結合，因此被認為可能是造成 CIP 及 Sparfloxacin 抗藥性的原因【10】。MOX 在 1962 年首次發現，用於治療革蘭氏陰性導致的尿道感染【11】。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 FLQs 類藥物。MOX 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。MOX 雖被運用於治療抗藥性 TB 【12】，很少實驗室的研究其 MICs；(2) SLIDs: KM 及 AM 屬 aminoglycoside 類藥物，CM 屬 cyclic peptide 類，皆作為抗結核的二線藥使用。研究指出 KM 與 AM 或是 CM 具有交互抗藥【13, 14】，而隨 KM 與 AM 的濃度提高 *rrs* 上的 A1401G 突變頻率也會增加【15】。CM 與 Viomycin 因結構相似也具交互抗藥【16】，*tlyA* 可轉譯出 rRNA methyltransferase，此基因的突變會影響細菌對 CM 的抗性【17】。

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。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。

由於，分子快速檢測已被廣泛運用在檢驗 RR/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 MTBC 的抗藥圖譜具有相當的歧異度，除了 RR/MDR 及 XDR-TB 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)，MTBC 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 RIF 抗性的敏感度與精確度 (specificity) 分別為 92%及 99%【18, 19】；但是以基因突變預測 pyrazinamide 抗藥性的靈敏度，則只有 28%【20】。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，意味著有一半的低/臨界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【21, 22】。

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【23】。以 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 TB 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【20, 24, 25, 26, 27, 28】。所找出的候選基因根據所使用的傳統微生物學 DST 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 MTBC 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。

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 MTBC 與 TB 傳播的分析。結合 MTBC 基因分型結果，逐步建構抗藥性 MTBC 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 TB 群聚事件。此外，也發現在 MDR 與非 MDR 的 MTBC 菌株 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 TB 傳播。

針對現階段 TB 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 TB 個案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 TB 傳播動態監測。透過本計畫若能積極有效整合細菌及基因學資訊，可提供公衛調查時更多佐證。

二、材料與方法

(一) 研究設計

1. 建立檢測結果不一致菌株之抗結核病藥物最低抑制濃度(minimal inhibiting concentrations, MICs)詳細抗藥圖譜。
2. 蒐集送複驗之 MDR MTBC 菌株中，INH and RIF 分子及傳統抗藥性檢測結果不一致 MTBC 菌株及資料。不一致定義為：菌株經分子檢驗發現有抗藥相關的基因突變但傳統藥敏結果為敏感性；或分子檢驗無法測得相關基因突變，但傳統藥品試驗判定為抗藥菌株。
3. 蒐集 *gyrA*，*gyrB* 突變株與對 FLQ 類藥物有抗性 MTBC 菌株進行分析。
4. 蒐集抗藥 MTBC 株抗藥性基因體相關資料。
5. 抗藥性 MTBC 菌株基因型分析。

(二) 材料及方法

1. 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複驗之抗藥性 MTBC 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。

2. 實驗方法：

- (1) 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。
- (2) 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 MTBC 或 non-MTBC。

(3) 實驗步驟敘述如下：

- i. 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°C 不活化處理 20 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。
- ii. 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

- iii. 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)。
- iv. 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。
- v. 各反應管最後加入 5 μL 檢體。
- vi. 反應管置於微量離心機旋轉離心 (spin down)。
- vii. 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°C	2分鐘
Stage 2	95°C	10分鐘
Stage 3 (40 cycles)	95°C	15秒
	60°C	1分鐘

viii. 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 ≥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

3. 藥物敏感性試驗

(1) Middlebrook 7H11 瓊脂平板比例法

1.1 藥物品項

依據 WHO 建議測試藥物品項如下：AM、Cycloserine、Ethionamide、KM、MOX、para-Aminosalicylic acid、RIF、Rifabutin、CM、Clofazimine 及 LEV，測試結核菌株的藥物感受性結果。

1.2 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。

1.2.1 調製濁度 McFarland 1.0 菌液。

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

1.3 接種方式

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

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

1.3.3 接種完成之培養基，置於室溫直到菌液完全被培養基吸附。

1.3.4 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。

1.4 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。

1.4.1 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。

1.4.2 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。

1.4.3 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。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。

(2) Sensititre® MYCOTB MIC Plate

測試藥物含 AM、cycloserine、ethionamide、EMB、INH、kanamycin、MOX、OFL、para-Aminosalicylic acid、RIF，rifabutin、streptomycin。調製 MacFarland 1.0 菌液，接種 100 µL 菌液至 96 孔微量滴定藥敏測試盤，於 37°C 恆溫培養箱中靜置培養 7-21 天，判讀濁度以決定最低抑菌濃度(MIC)。

(3) 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 100 µg/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 1 µg/mL，但生長控制組試管不加任何藥物。

4. 抗藥基因檢測

(1) GenoType 檢測

GenoType 是利用 HAIN LIFESCIENCE 公司所研製的 GenoTypeMTBDR*plus* 試劑組，檢測結核菌群菌株於 RIF 及 INH 作用藥物相對應之標的基因中特定位點(*rpoB*, *katG* 及 *inhA*)的變異情況；另一項本研究中所使用的檢測試劑組為 GenoTypeMTBDR*s*，檢測結核菌對 2 線藥相對應基因(*gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*)特定突變

位點檢驗。原理是利用 PCR 先放大片段後，在試條紙上進行雜合反應並呈色判讀是否有突變位點發生(或野生型位點不見)。整個實驗步驟遵循使用說明書。

(2) 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 CG-3')與 *rpoB*-R (5'-GCG TAC ACC GAC CC-3')。分析 *rpoB* codon 170 突變的 primer sets 為：TB-176-F (5'-CTT CTC CGG GTC GAT G-3') 及 TB-176-R (5'-CGC GCT TGT CGA CGT C-3')。分析 *katG* 基因突變的 primer sets 為：*katG*-F (5'-GTC ACA CTT TCG C-3')與 *katG*-R (5'-TTG TCG CTA CCA... .. G-3')。分析 *inhA* promoter region 基因突變的 primer sets 為：*inhAr*-F (5'-AAT TGC GCG GTC AC-3')與 *inhAr*-R (5'-GTC GGT GAC GTC GA-3')。分析 *inhA* 基因突變的兩對 primer sets 為：*inhA1713*-F (5'-CCG AGG ATG CGA TC-3')與 *inhA1713*-R (5'-GGC TCG GGT CGA TG-3')；*inhA2194*-F (5'-AGG CGC TGC TGC TG-3')與 *inhA2194*-R (5'-CCG AAC GAC AGC AC-3')。分析 *oxyR-ahpC* 基因突變的 primer sets 為：*oxyR-ahpC*-F (5'-GCT TGA TGT CGG TCG-3')與 *oxyR-ahpC*-R (5'-GGTCGC GTA GGC CC-3')。分析 *gyrA* 基因突變的 primer sets 為：*gyrA*-F (5'-GAT GAC AGA CAC GC-3')與 *gyrA*-R (5'- AGC ATC TCC ATC G-3')；分析 *gyrB* 基因突變的 primer sets 為：*gyrB*-F (5'-AAG ACC AAG TTG AC-3') 與 *gyrB* (5'-CTG CCA CTT GAG CA-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或35+	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；*gyrA* 基因為 65°C；*gyrB* 基因為 62°C。+ *gyrA* 與 *gyrB* 基因跑 35 個循環。

PCR 產物先以毛細管電泳 (eGene HDA-GT12, Qiagen)確認產物後，再外送至生物科技公司進行定序。基因序列突變位點比對，係自 NCBI 資料庫下載 H37Rv 參考菌株 (NC_000962.3)的與抗藥相關基因之序列，運用 Sequencher (Gene Codes Corporation, USA)及 MEGA 7 軟體，把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，取得各基因突變位點的資訊。

5. 基因分型

持續建立基因體資料庫。且將例年 MDR MTBC 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 MDR MTBC 群菌株基因特性分析。

- (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【29】。
- (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【30, 31】。

6. 資料及統計分析

由 TB 通報管理系統取得各項個案人口學、細菌學、用藥、治療與管理等資料資料，配合本研究之不一致分析資料進行綜合分析。基因分型結果則使用 Bionumerics®(version 7.6; 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)。以 Prism Version 6.01 製圖。

三、研究結果

(一) RIF 及 INH 分子抗藥及傳統抗藥性檢測結果不一致分析

以 1 RR/MDR-TB 個案 1 MTBC 菌株方式進行分析。2008 年 1 月至 2018 年 9 月間，疾病管制署參考實驗室共收驗 1,650 例個案之抗藥性 MTBC 菌株，共發現有 **181 (11.0%, 181/1650)** 株菌株之初步分子檢測結果與傳統 DST 結果不一致，但再以傳統 DST 檢驗確認仍為抗藥。其中，僅有 1 株傳統 DST 結果為 RIF-S/INH-R，而分子檢驗判定為 RIF-R/INH-R，即 MDR。

1. 個案特性分析

由結核病通報管理系統查詢 181 個案資料，個案特性及菌株之抗藥情形，綜合分析於表一及二。181 個案中，包含：107 位(59.1%)為新個案、73 位(40.3%)為再治療個案及 1 位(0.6%)無個案資料。性別上，男佔 72.9%及女佔 27.1%，比例為 2.69；49 位女性中，34 位(69.4%)為新個案；而 132 位男性中，73 位(55.3%)為新個案。各年齡層新案送驗數及其佔總個案數的百分比為：0-14 歲 1 位(1.0%)、15-24 歲 9 位(8.4%)、25-34 歲 11 位(10.3%)、35-44 歲 9 位(8.4%)、45-54 歲 18 位(16.8%)、55-64 歲 24 位(22.4%)大於 65 歲 35 位(32.7%)。181 個案中，4 位(2.2%)有肋膜積水，其中 3 位為新個案。7 位肺外結核個案：2 位(28.5%)骨及關節結核，各有 1 位(各佔 14.3%)泌尿及生殖系結核、消化道結核、淋巴結核及結核性腦膜炎；還有 1 位為其他器官結核(14.3%)(表一)。181 位個案中，5 個案(2.8%)於系統中無初次痰抹片抗酸菌鏡檢結果，而 **112 (61.9%)位為抗酸菌染色抹片陽性，其中 64 (35.3%)位為新個案(表二)**。181 位個案中，胸部 X 光正常者 3 位(1.7%)中，有 1 位為新個案，異常但無空洞者 112 (61.9%)位中，有 65 位為新個案；異常且有空洞者 62 (34.5%)位中，有 34 位新個案；異常但無關結核病者 2 (1.1%)位中，有 1 位新個案及 2 個案無胸部 X 光檢查結果(表二)。銷案原因分析顯示：以其他完治 3 (1.7%)位皆為新個案；完成管理 111 (61.3%)位中，有 **61.3% (68/111)為新個案**；死亡 50 (27.6%)位中，有 **50% (25/50)為新個案**，其他(視同結果失落) 3 (1.8%)位皆為新個案、醫師診療排除 2 (1.1%)位中，有 1 位為新個案；及 12 (6.6%)位為管理中尚無銷案紀錄(表二)。此外，基因型分析結果為：**Beijing 型 98 位**

(54.1%)、Beijing-Like 型 6 位(3.3%)、Non-Beijing 型 72 位(39.8%)、2 位(1.1%)為混合型及 3 位(1.7%)無資料(表二)。

表一 181 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 N (%)	舊案 N (%)	無資料 N (%)	總人數 N (%)
	107 (59.1)	73 (40.3)	1 (0.6)	181 (100)
性別				
女	34 (31.8)	15 (20.5)	0	49 (27.1)
男	73 (68.2)	58 (79.5)	1 (100)	132 (72.9)
年齡				
0-14	1 (1.0)	0	0	1 (0.6)
15-24	9 (8.4)	1 (1.4)	0	10 (5.5)
25-34	11 (10.3)	3 (4.1)	0	14 (7.7)
35-44	9 (8.4)	8 (11.0)	0	17 (9.4)
45-54	18 (16.8)	10 (13.7)	0	28 (15.4)
55-64	24 (22.4)	19 (26.0)	0	43 (23.8)
>65	35 (32.7)	32 (43.8)	1 (100)	68 (37.6)
肋膜積水				
是	3 (2.8)	1 (1.4)	0	4 (2.2)
否	103 (96.3)	72 (98.6)	0	175 (96.7)
無資料	1 (0.9)	0	1 (100)	2 (1.1)
肺外結核				
皮膚及眼結核	0	0	0	0
其他器官結核	0	1 (20)	0	1 (14.3)
泌尿及生殖系結核	1 (50)	0	0	1 (14.3)
消化道結核	0	1 (20)	0	1 (14.3)
胸肋膜結核	0	0	0	0
骨及關節結核	0	2 (40)	0	2 (28.5)
淋巴結核	1 (50)	0	0	1 (14.3)
結核性腦膜炎	0	1 (20)	0	1 (14.3)
咽喉結核	0	0	0	0
無	104 (57.5)	68 (37.6)	0	172 (95.0)

表一 181 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(續)

	新案 N (%)	舊案 N (%)	無資料 N (%)	總人數 N (%)
--	-------------	-------------	--------------	--------------

	107 (59.1)	73 (40.3)	1 (0.6)	181 (100)
抹片				
陰性	38 (37.1)	26 (35.6)	0	64 (35.3)
陽性	68 (61.9)	44 (60.3)	0	112 (61.9)
無資料	1 (1)	3 (4.1)	1 (100)	5 (2.8)
胸部 X 光診斷				
正常	1 (0.9)	2 (2.7)	0	3 (1.7)
異常，但無空洞	65 (60.7)	47 (64.4)	0	112 (61.9)
異常，且有空洞	39 (36.4)	23 (31.5)	0	62 (34.2)
異常，無關結核病	1 (0.9)	1 (1.4)	0	2 (1.1)
無 X 光資料	1 (0.9)	0	1 (100)	2 (1.1)
銷案原因				
其他完治	3 (2.8)	0	0	3 (1.7)
完成管理	68 (63.6)	43 (58.9)	0	111 (61.3)
死亡	25 (23.4)	25 (34.2)	0	50 (27.6)
其他 (視同結果失落)	3 (2.8)	0	0	3 (1.7)
醫師診療排除	1 (0.9)	1 (1.4)	0	2 (1.1)
無資料*	7 (6.5)	4 (5.5)	1 (100)	12 (6.6)
結核菌基因型				
Beijing	60 (56.1)	38 (52.0)	0	98 (54.1)
Beijing-Like	5 (4.7)	1 (1.4)	0	6 (3.3)
Non-Beijing	40 (37.4)	31 (42.5)	1 (100)	72 (39.8)
Mixed type	1 (0.9)	1 (1.4)	0	2 (1.1)
無資料	1 (0.9)	2 (2.7)	0	3 (1.7)

2. 個案菌株抗藥性分析

181 個案對抗結核藥物的抗藥比例，列於表二。利用傳統 DST 試驗(Middlebrook 7H11 瓊脂平板比例法)確定的 MDR-TB 總個案數為 173 位(95.6%，但有 3 株無 EMB 或 SM 藥敏資料)，其中 86 (47.5%，但有一位無個案分類資料)位為單純 MDR 個案 (僅有 INH 及 RIF 抗藥)、1 (0.6%)位傳統 DST 結果為 RIF-S/INH-R、2 位(1.1%)傳統 DST 結果為 RIF-R/INH-S、MDR+EMB 抗藥有 39 位(21.6%)、MDR+SM 抗藥有 13 位(7.2%)、對 4 種一線藥物(INH+RIF+EMB+SM)皆有抗藥性則有 32 位(17.7%)；此外，MDR MTBC 只對 PZA 抗藥有 40 (22.1%)位、Pre-XDR INJ 個案有 13 (7.5%)位、Pre-XDR FQ 個案有

25 (13.8%)位及 XDR 有 3 (1.7%)位。

表二 173 株 MDR 複驗菌株之抗藥型態

Resistant Profile	Total	New cases	Previously treated cases*
	No. (%)	No. (%)	No. (%)
INH+RIF**	86 (47.5)	54 (29.8)	31 (17.1)
INH+RIF+EMB	39 (21.6)	18 (9.9)	21 (7.7)
INH+RIF+SM	13 (7.2)	9 (5.0)	4 (2.2)
INH+RIF+EMB+SM	32 (17.7)	22 (12.2)	10 (5.5)
MDR resistant to additional drugs			
(No. of isolate tested)			
Rifabutin (n=173)**	157* (86.7)	94 (51.9)	62 (34.3)
Pyrazinamide (n=173)	40 (22.1)	19 (10.5)	21 (11.6)
Kanamycin (n=173)	13 (7.2)	7 (3.9)	6 (3.3)
Amikacin (n=173)	9 (5.0)	6 (3.3)	3 (1.7)
Capreomycin (n=173)	8 (4.4)	5 (2.8)	3 (1.7)
Ofloxacin (n=172)	23 (12.7)	14 (7.7)	9 (5.0)
Gatifloxacin (n=107)	5 (2.8)	3 (1.7)	2 (1.1)
Moxifloxacin (n=98)	16 (8.8)	12 (6.6)	4 (2.2)
Levofloxacin (n=59)	10 (5.5)	7 (3.9)	3 (1.7)
Ciprofloxacin (n=40)	9 (5.0)	6 (3.3)	3 (1.7)
Ethionamide (n=173)	33 (18.2)	21 (11.6)	12 (6.6)
Para-aminosalicylate (n=173)	10 (5.5)	8 (4.4)	2 (1.1)
Cycloserine (n=129)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Linezolid (n=47)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

*Three previously treated cases with no drug susceptibility testing data of EMB and/or SM.

**One patient can not be classified as either new case or previously treated case.

3. 傳統與分子 DST 結果不一致分析

(1) RIF 抗藥

在 181 株發生不一致檢測結果之 MTBC 菌株中，有 170 (93.9%)株經由分子檢測(GenoType 試劑組或核酸定序方法)分析，發現在 RIF 抗藥標的 *rpoB* 基因有鑑別出突變位點(表三及圖一 156 株有 MIC 結果)。其中，已被證實的 *rpoB* 突變位點，以 S531L 頻率最高(112 株，61.9%)，其次為 D516V (9 株，5.0%)，第三則是 H526D (7 株，3.9%)。具有 S531L 突變的菌株中，其 MIC 值分布範圍介於 $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ 至 $>16 \mu\text{g/mL}$ 。其中又以 MIC $>16 \mu\text{g/mL}$ 者最多(90/112，80.4%)；而具有 D516V 菌株中，其 MIC 值分布範圍介於 $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ 至 $>16 \mu\text{g/mL}$ ，其中又以 MIC $>16 \mu\text{g/mL}$ 者最多(5/9，55.6%)；而具 H526D 菌株中，去除 1 株未有 MIC 檢驗結果的菌株，其餘的 6 株 MIC 值皆 $>16 \mu\text{g/mL}$ 。值得一提的是，有 8 株(表三中粗體標示之菌株)是必須依據 *rpoB* 基因序列分析，方能判斷出其具有 RIF 抗藥性；相較之下基因序列分析比 GenoType 檢測方法敏感，可多檢測出 8 株(4.4%) RIF 抗藥菌株。

此外，有 10 株 (5.5%) 傳統 DST 抗藥菌株，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，可能之標的及更多機轉探討分析，方能判斷 RIF 抗藥性。另有 1 株(0.6%)為 PCR-failure，導致無法以核酸定序方法分析，僅能根據 GenoType 的結果(ΔWT8)，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。

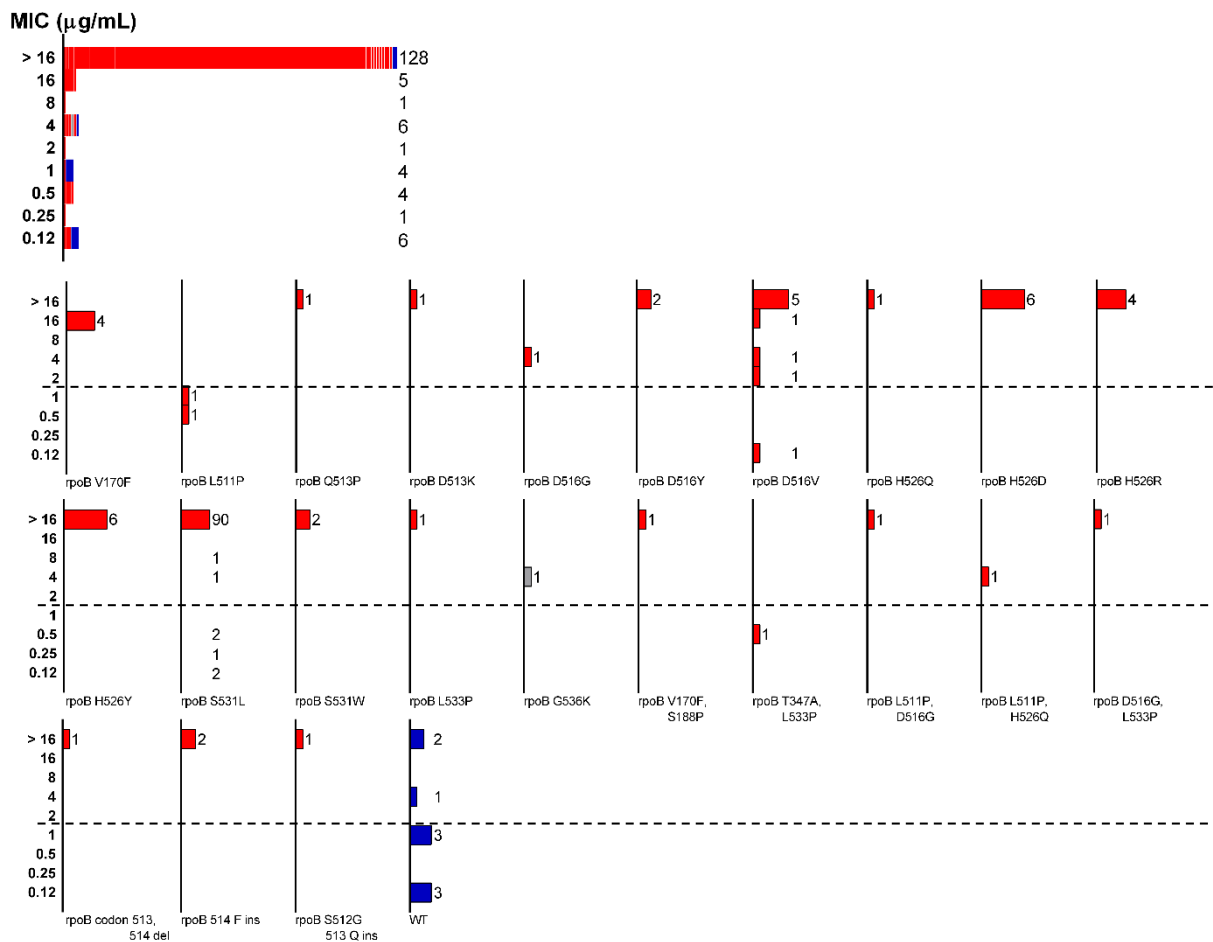
181 菌株中，排除 24 株未有 MIC 結果，剩餘的 157 株若依目前國際間以 RIF 藥物濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 做為傳統 DST 抗藥判讀依據之臨界濃度分析，即菌株敏感性為 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 或抗藥性為 $>1 \mu\text{g/mL}$ 。依此，可發現 13 株菌在 MIC 檢測之分析中判定為敏感性，與傳統檢驗抗藥或敏感之 DST 結果之不一致率為 8.3%。

表三 181 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

Gene mutation	RIF MIC	No. of isolate (%)	Total isolates (%)
All WT	≤ 0.12	3 (1.7)	10 (5.5)
	1	3 (1.7)	
	4	1 (0.6)	
	> 16	2 (1.1)	
	NA	1 (0.6)	
V170F*	16	4 (2.2)	6 (3.3)
	NA	2 (1.1)	

V168A*+V170F*	NA	1 (0.6)	1 (0.6)
V170F*+S188P*	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
T347A*+L533P	0.5	1 (0.6)	1 (0.6)
L511P	0.5	1 (0.6)	3 (1.7)
	1	1 (0.6)	
	NA	1 (0.6)	
Q513P	> 16	1 (0.6)	2 (1.10)
	NA	1 (0.6)	
Q513K	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
D516G	4	1 (0.6)	1 (0.6)
D516Y	> 16	2 (1.1)	2 (1.0)
D516V	≤ 0.12	1 (0.6)	9 (5.0)
	2	1 (0.6)	
	4	1 (0.6)	
	16	1 (0.6)	
	> 16	5 (2.8)	
S522L	NA	1 (0.6)	1 (0.6)
H526Q	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
H526D	> 16	6 (3.3)	7 (3.9)
	NA	1 (0.6)	
H526R	> 16	4 (2.2)	4 (2.2)
H526C	NA	1 (0.6)	1 (0.6)
H526Y	> 16	6 (3.3)	6 (3.3)
S531L	≤ 0.12	2 (1.1)	112 (61.9)
	0.25	1 (0.6)	
	0.5	2 (1.1)	
	4	1 (0.6)	
	8	1 (0.6)	
	> 16	90 (49.7)	
	NA	15 (8.3)	
S531W	> 16	2 (1.10)	2 (1.1)
L533P	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
G536K	4	1 (0.6)	1 (0.6)
L511P+D516G	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
L511P+H526Q	4	1 (0.6)	1 (0.6)
D516G+L533P	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
codon 513, 514 del	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
codon 514 F ins	> 16	2 (1.1)	2 (1.1)
S512G+codon 513 Q ins	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
PCR-failure	> 16	1 (0.6)	1 (0.6)
Total		181 (100)	181 (100)

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



圖一 156 株傳統藥敏表現型為 RIF-R 菌株之 MIC 分布對應至分子檢驗結果。用 RIF 的試驗濃度為 0.12–16 µg/mL，MIC 值 1 µg/mL 為臨界濃度，故該菌株 MIC 結果 > 1 µg/mL 即判定為抗藥菌株。被報導與抗 FLQ 類藥物相關突變位點，突變株數目與分布用紅色柱狀圖表示；WT 以藍色圖對應；未確認與抗 RIF 藥有關的突變位點以灰色柱狀圖表示。H37Rv MIC 值為 ≤ 0.5 µg/mL。

(2) INH-R 抗藥

在 181 株發生不一致檢測結果之 MTBC 菌株中，有 45 株(24.9%)株經由分子檢測(GenoType 試劑組或核酸定序方法)分析，發現在 INH 抗藥標的 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 基因有鑑別出突變位點(表四及圖二 151 株有 MIC 結果)。其中，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(10 株，5.5%)，其次為 *inhA* promoter region c-15t (3 株，1.7%)。具有 *katG* S315T 突變的菌株中，介於 4 µg/mL 至 > 4 µg/mL，其中又以 MIC = 4 µg/mL 者最多(5/10, 50.0%)；具有 *inhA* promoter region C-15T 突變的 3 菌株，其 MIC 值各為 0.25 µg/mL、0.5 µg/mL 及 > 4 µg/mL。

有多達 128 株(70.7%)以分子檢測(GenoType 試劑組或 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 定序)，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，以協助判斷 INH 抗藥性。此外，有 8 株(4.4%)為 PCR-failure，其中有 6 株雖經 GenoType 鑑定為 WT，但仍因 PCR-failure 而無法利用核酸定序方法加以確定其 INH 之感受性；有 1 株(0.6%) 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；有 1 株(0.6%)未有 GenoType 的實驗結果。值得一提的是，有 17 株(表五中粗體標示之菌株)是必須依據 *katG* 或 *inhA promoter region* 基因序列分析方能判斷出其具有 INH 抗藥性。相較之下，**基因序列分析比 GenoType 敏感，可多檢測出 17 株(9.4%) INH 抗藥性。**

181 菌株中，排除 22 株未有 MIC 結果，剩餘的 159 株若依目前國際間以 INH 藥物濃度 0.2 µg/mL 做為傳統 DST 抗藥判讀依據之臨界濃度分析，即菌株敏感性為 ≤ 0.2 µg/mL 或抗藥性為 > 0.2 µg/mL。依此，可發現有 **38 株菌在 MIC 檢測之分析中判定為敏感性與傳統檢驗 DST 結果之不一致率為 21.0%**，明顯高於 RIF 的不一致率。至於，INH 低濃度抗藥但高濃度敏感之傳統 DST 與分子檢驗結果不一致之關聯性，需收集更多此類菌株後才能確認。菌株之傳統 DST 結果，如為 INH 低濃度抗藥但高濃度敏感，若能提供臨床醫師進行提高給藥劑量評估，則病人仍可能有機會繼續使用 INH 的治療。

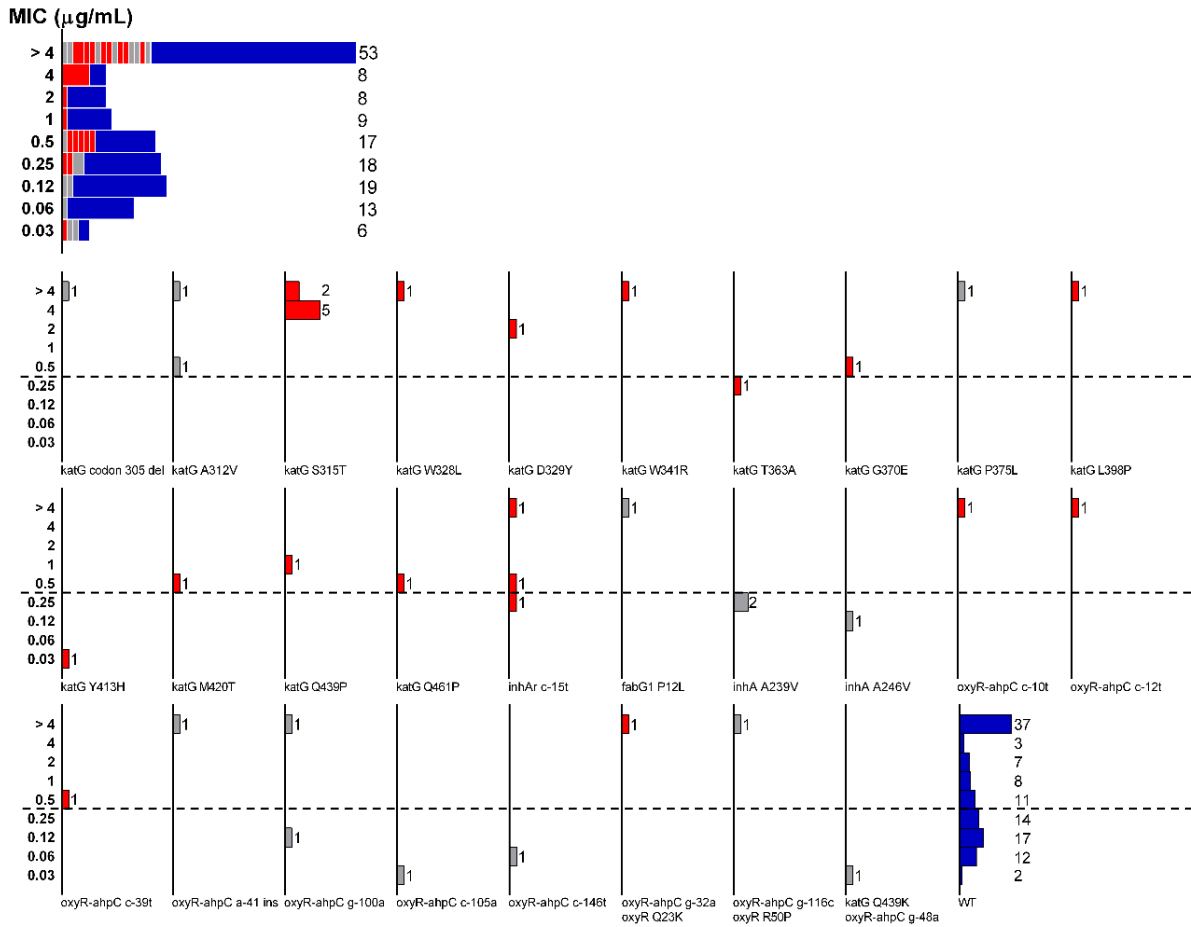
表四 181 株檢測結果不一致多重抗藥菌株之 INH 抗藥基因 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 分析

Gene mutation	INH MIC	No. of isolate (%)	Total isolates (%)
All WT	≤ 0.03	2 (1.1)	128 (70.7)
	0.06	12 (6.6)	
	0.12	17 (9.4)	
	0.25	14 (7.7)	
	0.5	11 (6.1)	
	1	8 (4.4)	
	2	7 (3.9)	
	4	3 (1.7)	

	> 4	37 (20.4)	
	NA	17 (9.4)	
<i>katG</i>			
codon 305 GGC/G deletion [#]	> 4	1 (0.55)	1 (0.6)
A312V	0.5	1 (0.55)	2 (1.1)
	> 4	1 (0.55)	
S315T	4	5 (2.8)	10 (5.5)
	> 4	2 (1.1)	
	NA	3 (1.7)	
W328L	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
D329Y	2	1 (0.6)	1 (0.6)
W341R	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
T363A	0.25	1 (0.6)	1 (0.6)
G370E	0.5	1 (0.6)	1 (0.6)
P375L	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
L398P	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
Y413H	≤ 0.03	2 (1.1)	2 (1.1)
M420T	0.5	1 (0.6)	1 (0.6)
Q439P	1	1 (0.6)	1 (0.6)
Q461P	0.5	1 (0.6)	1 (0.6)
<i>inhA</i> promoter region			
C-5T	NA	1 (0.6)	1 (0.6)
C-15T	0.25	1 (0.6)	3 (1.7)
	0.5	1 (0.6)	
	> 4	1 (0.6)	
<i>fabG1</i> P12L	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
<i>inhA</i>			
A239V	0.25	2 (1.1)	2 (1.1)
A246V	0.12	1 (0.6)	1 (0.6)
<i>oxyR-ahpC</i>			
C-10T	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
C-12T	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
C-39T	0.5	1 (0.6)	1 (0.6)
A-41 Ins	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
G-100A	0.12	1 (0.6)	2 (1.1)
	> 4	1 (0.6)	
C-105A	≤ 0.03	1 (0.6)	1 (0.6)
G-32A+ <i>oxyR</i> Q23K	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
G-116C+ <i>oxyR</i> R50P	> 4	1 (0.6)	1 (0.6)
C-146T	0.06	1 (0.6)	2 (1.1)
	NA	1 (0.6)	
Multiple mutation			

<i>katG</i> Q439K + <i>oxyR-ahpC</i> G-48A	≤ 0.03	1 (0.6)	1 (0.6)
PCR-failure	0.12	1 (0.6)	8 (4.4)
	0.5	1 (0.6)	
	> 4	4 (2.2)	
	NA	2 (1.1)	
Total		181 (100)	181 (100)

GenoType *katG* del: Lack of *katG* control band



圖二 151 株傳統藥敏表現型為 INH-R 菌株之 MIC 分布對應至分子檢驗結果。實驗內用的 INH 濃度為 0.03 – 4 µg/mL，MIC 值 0.25 µg/mL 為臨界濃度，故該菌株 MIC 結果 > 0.25 µg/mL 即判定為抗藥菌株。被報導與抗 INH 藥物相關突變位點，突變株數目與分布用紅色柱狀圖表示；WT 以藍色圖對應；未確認與抗 FLQ 藥有關的突變位點以灰色柱狀圖表示。H37Rv MIC 值為 ≤ 0.5 µg/mL。

在 INH/RIF DST 不一致分析部分，有 50 例為死亡案例，其中有 13 (26%) 例被歸在不同基因型 cluster 群組下，尤以 C00030 cluster (全臺共 6 例) 有 3 例最多，主要發生於東部。其他，則為一或二例: C00011(2)、C00015 (1)、C00067 (1)、C00113 (1)、C00136 (1)、C00138 (2)、C00146 (1) 及 C01001(1)。

(二) 分子及傳統 MIC 檢測結果與 FLQs 抗藥關聯性分析

完成 2013 年 1 月至 2018 年 5 月間，以選擇 1 個案 1 株菌株進行分析。實驗室以傳統抗藥和分子(GenoTypeDRs/, 簡稱 GenoTypes/ 或 *gyrA*, *gyrB* 定序)檢測 FLQs 抗藥共 1009 株 MTBC 菌株。經由分子檢驗及/或 MIC 判定為 FLQs 任一抗藥，共有 **142 (14.1%, 142/1009) 菌株**。以該 142 株菌株為研究目標，經由傳統 DST 與基因突變互相對應分析，本研究探討以瞭解菌株相關基因突變與導致對 FLQ 類藥物抗藥程度之關聯性及 MIC 分布情形。

本研究分析 142 FLQ 抗藥菌株中，與 FLQs 抗藥主要相關 *gyrA* 與 *gyrB* 基因有發生突變佔 **54.9% (78/142)**，而野生型(Wild Type, WT)則有 45.1% (64/142)，如表五。

142 菌株中，*gyrA* 突變者有 71 株(50.0%)。由分子檢測發現：35.9% (51/142) 在 codon 94 發生突變，其中以 **D94G 佔最多 25.4% (36/142)**；其次為 codon 90 突變佔 7.0% (10/142)、codon 55 突變佔 0.7% (1/142)、codon 88 突變佔 2.1% (3/142) 及 codon 91 突變佔 2.1% (3/142)，而 **V55M 則尚無相關資訊證實與抗藥相關**。在 *gyrA* 突變株中，有 3 菌株同時帶有兩個突變點；1 株為 codon A71A, L109L 同義突變(synonymous mutation)，1 株同時有 A90V 與 D94G 突變，而另一株為同時 D94G 突變與 *gyrB* L431L 同義突變。

gyrB 單一突變 D500N、E540D 各為一株。1.4% (2/142) 為 *gyrB* codon 551 發生突變；一株為 codon G522S 突變，但尚無相關文獻報導。一株為 WT 與突變同時存在的菌株，其突變點有 T539N、A502* (stop codon) 與 P606P 同義突變。另一株為 *gyrB* L431L 同義突變並同時具有 D94G 突變。

表五 142 FLQs 抗藥菌株 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點分析

Gene mutation	No. of isolates (%)
<i>gyrA</i>	
V55M	1 (0.7)
G88A	1 (0.7)
G88C	2 (1.4)
D89N	1 (0.7)
A90V	10 (6.9)

	S91P	3 (2.1)
	D94A	4 (2.8)
	D94G	38 (26.4)
	D94H	1 (0.7)
	D94N	7 (4.9)
	D94Y	3 (2.1)
	A71A, L109L	1 (0.7)
	A90V, D94G	1 (0.7)
<i>gyrB</i>		1 (0.7)
	D500N	
	G522S	1 (0.7)
	E540D	1 (0.7)
	G551R	2 (1.4)
	T539N, WT+R463*, WT+R567R	1 (0.7)
Multiple myutations		
	<i>gyrA</i> D94G + <i>gyrB</i> L431L	1 (0.7)
	WT	64 (44.4)
	Total	142

1. 個案特性分析

142 FLQ 抗藥個案中，113 位(79.6%)為新個案及 29 位(20.4%)為再治療個案。性別上，男佔 75.4%及女佔 24.6%，比例為 3.06。35 位女性中，26 位(23.0%)為新個案；而 107 位男性中，87 位(77.0%)為新個案。各年齡層新案送驗數及其佔總個案數的百分比為：0-14 歲 0 位(0%)、15-24 歲 8 位(7.1%)、25-34 歲 14 位(12.4%)、35-44 歲 15 位(13.3%)、45-54 歲 17 位(15.0%)、55-64 歲 28 位(24.8%)大於 65 歲 31 位(27.4%)。142 個案中，3 位(2.7%)有肋膜積水，3 位皆為新個案。18 位肺外結核個案：1 位(0.9%)骨及關節結核、1 位(0.9%)泌尿及生殖系結核、5 位(4.4%)消化道結核、1 位(0.9%)淋巴結核、1 位(0.9%)皮膚及眼結核、有 4 位(3.5%)為其他器官結核(表六)。142 位個案中，9 個案(6.4%)於系統中無初次痰抹片抗酸菌鏡檢結果，而 80 位(56.3%)為抗酸菌染色抹片陽性，其中 65 位(57.5%)為新個案(表六)。142 位個案中，胸部 X 光正常者 5 位(3.5%)中，4 位為新個案，異常但無空洞者 97 位(68.3%)中，有 75 位為新個案；異常且有空洞者 39 位(27.5%)中，有 34 位新個案；異常但無關結核病者 1 位(0.7%)(表六)。銷案原因分析顯示：以其他完治 1 位

(0.7%)、完成管理有 74 位(52.1%)、死亡 43 位(30.3%)，其他(視同結果失落) 3 位(2.1%)、醫師診療排除 1 位(0.7%)中、7 位(4.9%)為轉出；13 位(9.2%)為管理中尚無銷案紀錄(表六)。該 142 個案基因型分析結果如下：**Beijing 型 81 位(57.0%)**、**Beijing-Like 型 3 位(2.1%)**、**Non-Beijing 型 58 位(41.9%)** (表六)。

表六 142 例比較傳統及分子檢測結果之個案特性分析

	新案 N (%)	舊案 N (%)	總人數 N (%)
	113 (79.6)	29 (20.4)	142 (100)
性別			
女	26 (23.0)	9 (31.0)	35 (24.6)
男	87 (77.0)	20 (69.0)	107 (75.4)
年齡			
0-14	0 (0)	0 (0)	0 (0)
15-24	8 (7.1)	1 (3.4)	9 (6.3)
25-34	14 (12.4)	2 (6.9)	16 (11.3)
35-44	15 (13.3)	2 (6.9)	17 (12.0)
45-54	17 (15.0)	7 (24.1)	24 (16.9)
55-64	28 (24.8)	4 (13.8)	32 (22.5)
>65	31 (27.4)	13 (44.8)	44 (31.0)
肋膜積水			
是	3 (2.7)	0 (0)	3 (2.1)
否	110 (97.3)	29 (100)	139 (97.9)
肺外結核			
皮膚及眼結核	1 (0.9)	0	1 (0.9)
其他器官結核	4 (3.5)	0	4 (3.5)
泌尿及生殖系結核	1 (0.9)	0	1 (0.9)
消化道結核	4 (3.5)	1 (0.9)	5 (4.4)
胸肋膜結核	5 (4.4)	0	5 (4.4)
骨及關節結核	0	1 (0.9)	1 (0.9)
淋巴結核	0	1 (0.9)	1 (0.9)
結核性腦膜炎	0	0	0
咽喉結核	0	0	0
無	98 (86.7)	26 (89.7)	124 (87.3)

表六 142 例比較傳統及分子檢測結果之個案特性分析 (續)

	新案 N (%)	舊案 N (%)	總人數 N (%)
	113 (79.6%)	29 (20.4%)	142 (100%)
抹片			
陰性	41 (36.3)	12 (41.4)	53 (37.3)
陽性	65 (57.5)	15 (51.7)	80 (56.3)
無資料	7 (6.2)	2 (6.9)	9 (6.4)
胸部 X 光診斷			
正常	4 (3.5)	1 (3.4)	5 (3.5)
異常，但無空洞	75 (66.4)	22 (75.9)	97 (68.3)
異常，且有空洞	34 (30.1)	5 (17.2)	39 (27.5)
異常，無關結核病	0	1 (3.4)	1 (0.7)
無 X 光資料	0	0	0
銷案原因			
其他完治	1 (0.9)	0	1 (0.7)
完成管理	59 (52.2)	15 (51.7)	74 (52.1)
死亡	32 (28.3)	11 (37.9)	43 (30.3)
其他 (視同結果失落)	2 (1.8)	1 (3.4)	3 (2.1)
醫師診療排除	1 (0.9)	0	1 (0.7)
轉出	7 (6.2)	0	7 (4.9)
無資料*	11 (9.7)	2 (6.9)	13 (9.2)
結核菌基因型			
Beijing	65 (57.5)	16 (55.2)	81 (57.0)
Beijing-Like	2 (1.8)	1 (3.4)	3 (2.1)
Non-Beijing	46 (40.7)	12 (41.4)	58 (41.9)

在 FLQ 抗藥分析部分，有 43 例為死亡案例，其中有 31 (72.1%) 例被歸在不同基因型 cluster 群組下，尤以 **C00041 cluster (全臺共 59 例)** 有 8 例最多，主要發生於東部。其他，則為一或二例: C00002 (2)、C00004 (1)、C00015 (1)、C00017 (1)、C00030 (1)、C00034 (2)、C00040 (1)、C00062 (1)、C00063 (1)、C00081 (1)、C00105 (1)、C00110 (1)、C00112 (1)、C00113 (1)、C00134 (1)、C00138 (1)、C00142 (1)、C00144 (1)、C00164 (1)、C00273 (1) 及 C01018 (1)。

2. 個案菌株抗藥性分析

142 FLQ 抗藥個案對抗結核藥物的抗藥比例，列於表七。利用傳統藥敏試驗 (Middlebrook 7H11 瓊脂平板比例法) 確定的 MDR 總個案數為 109 (76.8%) 位為 MDR 個案 (INH 及 RIF 抗藥)，有 25 (17.6%) 位為單純 MDR 個案、MDR+EMB 抗藥有 24 (16.9%) 位、MDR+SM 抗藥有 23 (16.2%) 位、對 4 種一線藥物 (INH+RIF+EMB+SM) 皆有抗藥性則有 37 (26.1%) 位；從 142 株內有 109 MDR-TB 個案 (排除 3 株沒有資料、21 株 RR-TB 與 9 株 RIF 敏感) 進行其他藥物抗藥分析，對 RFB 抗藥 88 位 (62.0%)、PZA 抗藥 37 (26.1%) 位、Pre-XDR INJ 有 8 (5.6%) 位、Pre-XDR FQ (MOX) 有 48 (33.8%) 位及 XDR 6 (4.2%) 位。

表七 109 株抗藥型態分析

Resistant Profile	總數	新案	舊案
	No. (%)	No. (%)	No. (%)
INH+RIF	25 (17.6)	17 (12.0)	8 (5.6)
INH+RIF+EMB	24 (16.9)	18 (12.7)	6 (4.2)
INH+RIF+SM	23 (16.2)	17 (12.0)	6 (4.2)
INH+RIF+EMB+SM	37 (26.1)	34 (23.9)	3 (2.1)
MDR resistant to additional drugs			
(No. of isolate tested)			
Rifabutin (n=96)	88 (62.0)	69 (48.6)	19 (13.4)
Pyrazinamide (n=94)	37 (26.1)	30 (21.1)	7 (4.9)
Kanamycin (n=96)	7 (4.9)	5 (3.5)	2 (1.4)
Amikacin (n=96)	5 (3.5)	4 (2.8)	1 (0.7)
Capreomycin (n=96)	5 (3.5)	4 (2.8)	1 (0.7)
Ofloxacin (n=87)	40 (28.2)	32 (22.4)	8 (5.6)
Gatifloxacin (n=87)	10 (7.04)	6 (4.23)	4 (2.8)
Moxifloxacin (n=94)	45 (31.7)	36 (25.4)	9 (6.3)
Levofloxacin (n=96)	39 (27.5)	30 (21.1)	9 (6.3)

Ciprofloxacin (n=85)	30 (21.1)	22 (15.5)	8 (5.6)
Ethionamide (n=96)	36 (25.4)	26 (18.3)	10 (7.0)
Para-aminosalicylate (n=96)	9 (6.3)	8 (5.6)	1 (0.7)
Cycloserine (n=96)	1 (0.7)	0	1 (0.7)
Linezolid (n=84)	0	0	0

3. FLQ 藥敏試驗與分子判定抗藥結果不一致分析

3.1 MOX 抗藥 142 株(MIC 結果> 0.5 µg/mL 即判定為抗藥菌株)

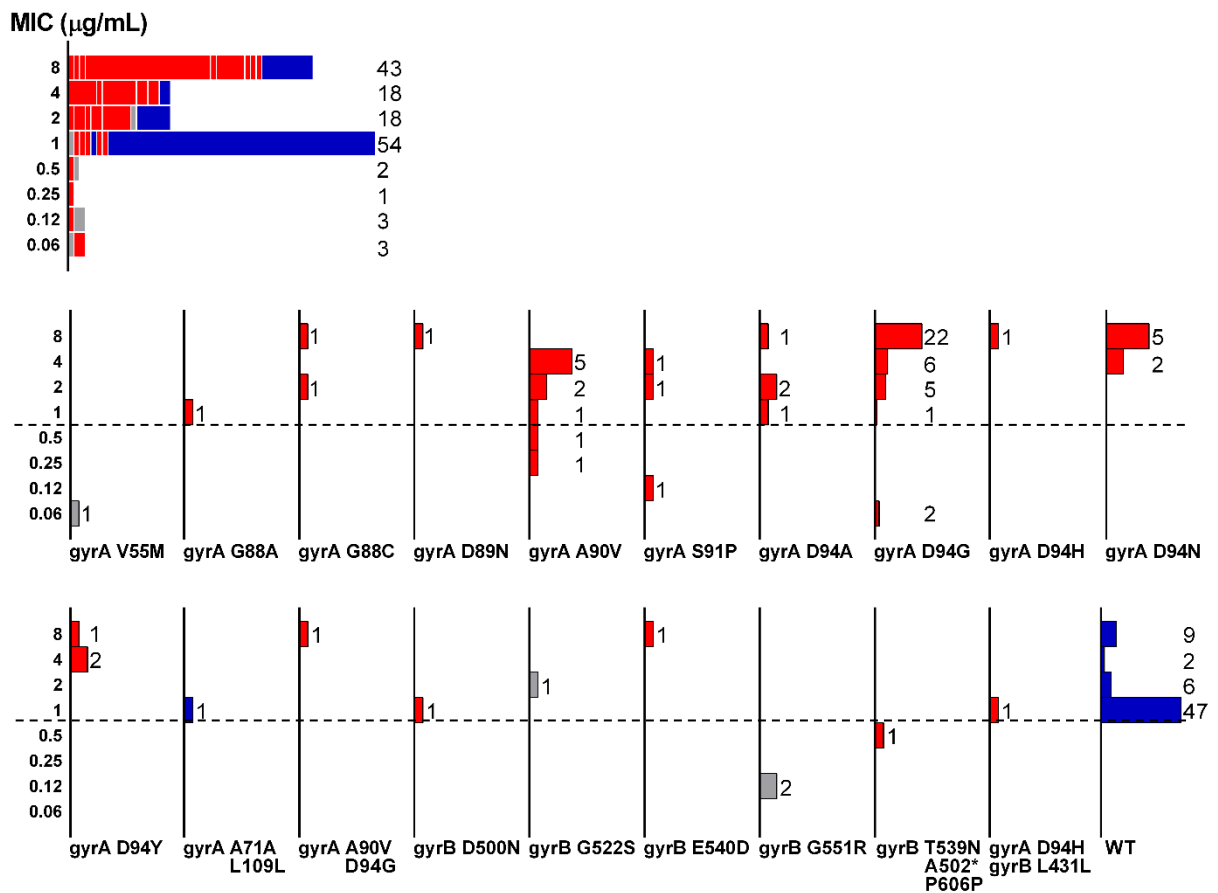
MIC 判定為 MOX-R/分生檢測 MOX-S (WT) 菌株有 64 株，MIC 結果皆為> 0.5 µg/mL。當 MIC 判定為 MOX-R/分生檢測 MOX-R，則共有 68 株菌。當 MIC 判定為 MOX-S/分生檢測 MOX-R，則有 6 株菌。有 4 株突變位點尚未被定論(2 株 *gyrB* G551R)或是未被報導過(1 株 *gyrA* V55M 與 1 株 *gyrB* G522S)則先不判定分子檢驗與 MIC 結果為不一致。分子檢驗與 MOX 的 MIC 結果對應，不一致率有 **49.3% (70/142)** (圖三)。

142 株傳統 MOX-R 結核菌株，分析 MIC 分布範圍及與分子檢驗結果比較顯示：

(1)分子檢驗未偵測到 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點有 **64 株**：47 (73.4%)株為 MIC 低程度抗藥(1 µg/mL)，17 株為較高濃度抗藥。抗藥性檢測以 MIC>0.5 µg/mL 藥物濃度為表現型抗藥來區分菌株對藥物為敏感性(≤ 0.5 µg/mL)或抗藥性(> 0.5 µg/mL)之藥物臨界濃度。根據文獻：當 MIC 接近臨界濃度時，抗藥或敏感的傳統藥敏結果一致性及再現性比高程度抗藥的結果較不穩定。本研究發現 WT 菌株，可以斟酌 MIC 要使用較高濃度來判定是否為 MOX 抗藥。

(2)分子檢驗有偵測到 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點有 **78 株**：51 株(35.9%, 51/142)突變位點為 *gyrA* codon 94，又以 **D94G 突變為主(25.4%，36/142)**，呈現高程度抗藥(MIC≥8 µg/mL 有 22 株、4 µg/mL 有 6 株、2 µg/mL 有 5 株)，但有 2 株卻對

MOX 敏感。第二多突變菌株為 A90V(7.0%, 10/142), 其中有 5 株 MIC 為 4 µg/mL。第三多突變菌株為 D94N (4.9%, 7/142) 皆為高濃度抗藥。3 株突變位點 *gyrA* codon 88 皆為抗藥性。未被報導過與抗藥相關的單一位點突變 *gyrA* V55M、*gyrB* D522S 與雙位點同義突變 *gyrA* A71A + L109L, 皆各有單一菌株, 依結果尚無法對藥物的抗藥強度下結論, 仍需持續增加收樣數。而 *gyrB* G551R 突變為對 MOX 敏感菌株, 可能與 MOX 抗藥性無相關。除 2 菌株 *gyrB* G511R 外, 與 *gyrB* 相關單一突變位點, 皆只有一株(圖三)。因臺灣鮮少有發生 *gyrB* 相關突變菌株, 故與抗藥相關性仍須探討。



圖三、142 菌株之 MOX 藥 MIC 分布對應至分子檢驗結果。使用 MOX 的試驗濃度為 0.06 – 8 µg/mL, MIC 值 0.5 µg/mL 為臨界濃度, 故該菌株 MIC 結果 > 0.5 µg/mL 即判定為抗藥菌株。被報導與抗 FLQ 類藥物相關突變位點, 突變株數目與分布用紅色柱狀圖表示; WT 及同義突變以藍色圖對應; 未確認與抗 FLQ 藥有關的突變位點以灰色柱狀圖表示。H37Rv MIC 值為 ≤ 0.12 µg/mL。

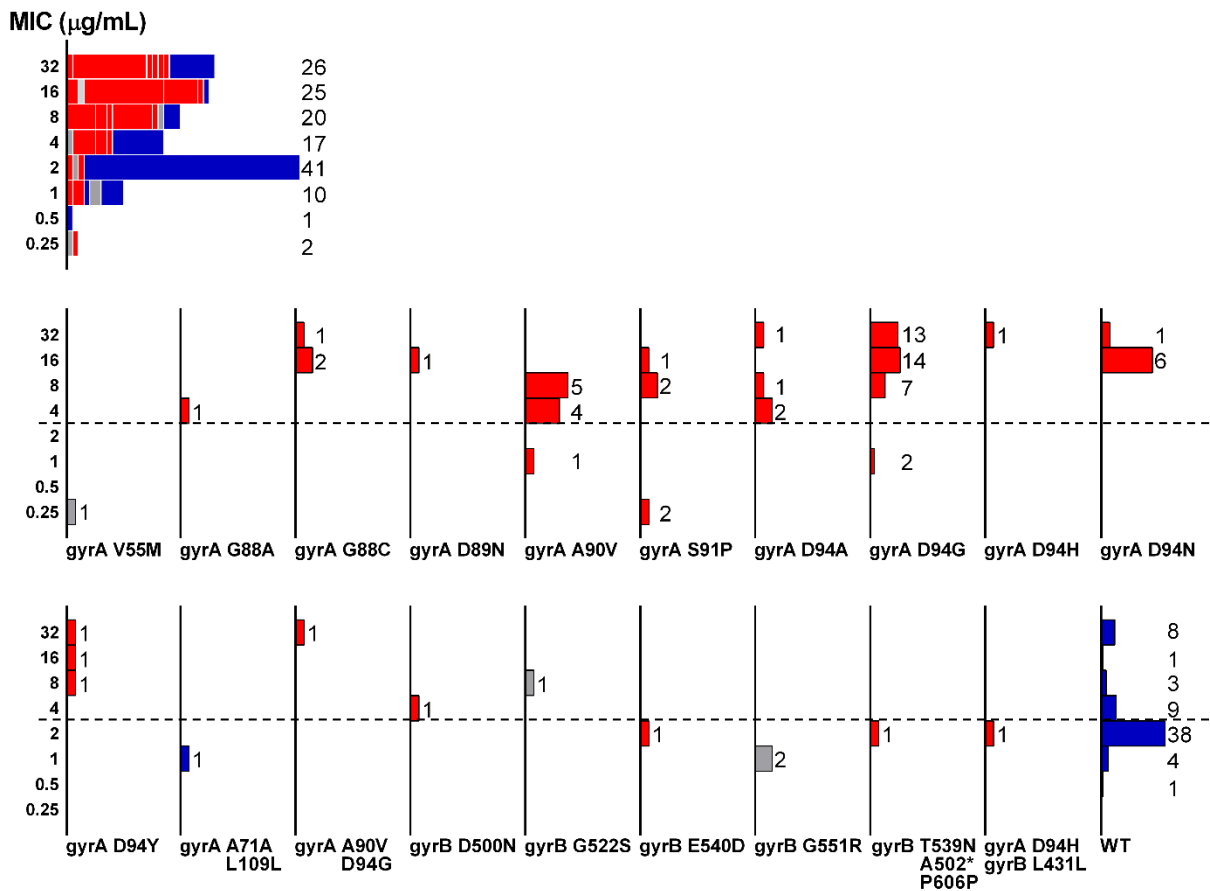
3.2 OFX 抗藥 142 株(MIC 結果 > 2 µg/mL 即判定為抗藥菌株)

MIC 判定為 OFX-R/分生檢測 OFX-S 有 21 株，其 MIC > 2 µg/mL。MIC 判定為 OFX-R/分生檢測 OFX-R 有 66 株，MIC 分布範圍如圖四。MIC 濃度為判定 OFX-S/分生檢測 OFX-R，則有 7 株菌。MIC 濃度為判定 OFX-S/分生檢測 OFX-S，則有 44 株菌。有 4 株突變位點尚未被定論(2 株 *gyrB* G551R)或是未被報導過(1 株 *gyrA* V55M 與 1 株 *gyrB* G522S)則先不判定分子檢驗與 MIC 結果為不一致。分子檢驗與 OFX 的 MIC 結果對應，不一致率有 19.7% (28/142)。

142 株傳統 FOX-R 菌株，分析 MIC 分布範圍及與分子檢驗結果比較顯示：

(1)分子檢驗未偵測到 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點有 64 株：其中 38 株之 MIC 為 2 µg/mL，4 株為 1 µg/mL，1 株為 0.5 µg/mL；而有 9 株為低濃度抗藥(4 µg/mL)，3 株為 8 µg/mL，1 株為 16 µg/mL，8 株為高濃度抗藥(32 µg/mL)。表現型抗藥試驗區分菌株對藥物為敏感性(≤2 µg/mL)或抗藥性(>2 µg/mL)。如前面提到 MIC 接近臨界濃度時，傳統與分子 DST 結果一致性不穩定。另有整體來看，經由分子檢驗為 WT 菌株之 OFX 抗藥性菌株，MIC 試驗結果發現但仍有高濃度抗藥菌株出現(圖四)。

(2)分子檢驗有偵測到 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點有 78 株：51 株具 *gyrA* codon 94 突變，其中 D94G 有 36 株皆呈現高程度抗藥(MIC ≥ 32 µg/mL 有 13 株、16 µg/mL 有 14 株、8 µg/mL 有 7 株)，但仍有 2 株為對 OFX 敏感。第二多突變菌株為 A90V，1 株為 MIC 1 µg/mL，第三多突變菌株為 D94N，7 株菌皆對 OFX 有較高濃度抗藥(MIC ≥ 16 µg/mL)。此外，*gyrA* V55M、*gyrB* G522S 與雙位點同義突變 *gyrA* A71A+L109L 皆發生於單一菌株，尚無法判定突變對 OFX 抗藥強度相關性。至於，*gyrB* G551R 則對 MOX 及 OFX 皆敏感。



圖四、142 菌株之 OFX 藥 MIC 分布對應至分子檢驗結果。使用 OFX 的試驗濃度為 0.25–32 $\mu\text{g/mL}$ ，MIC 值 2 $\mu\text{g/mL}$ 為臨界濃度，故該菌株 MIC 結果 > 2 $\mu\text{g/mL}$ 即判定為抗藥菌株。被報導與抗 FLQ 類藥物相關突變位點，突變株數目與分布用紅色柱狀圖表示；WT 及同義突變以藍色圖對應；未確認與抗 FLQ 藥有關的突變位點以灰色柱狀圖表示。H37Rv MIC 值為 0.25–1 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3 LEV 抗藥 98 株(MIC 結果 > 1 $\mu\text{g/mL}$ 即判定為抗藥菌株)

前述 142 探討菌株中，98 菌株具有 LEV 藥物的 MIC 結果，故以總數 98 株菌來探討基因突變與抗 LEV 藥物強弱的關係。

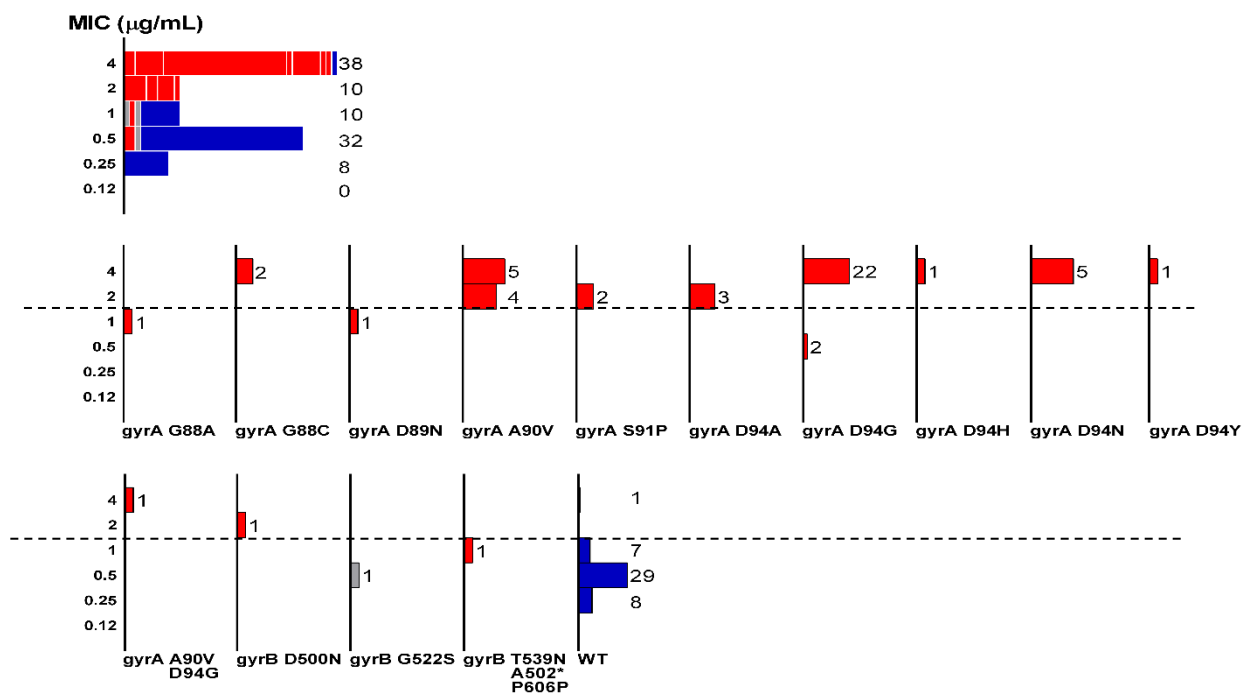
MIC 判定為 LEV-R/分生檢測 LEV-S 有 1 株，其 MIC = 4 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。MIC 判定為 LEV-R/分生檢測 LEV-R 有 47 株，MIC 分布範圍如圖五。MIC 判定為 LEV-S/分生檢測 LEV-R，則有 5 株菌。MIC 判定為 LEV-S/分生檢測 LEV-S 有 44 株。有 1 株 *gyrB* G522S 突變，則先不判定分子檢驗與 MIC 結果為不一致。分子檢驗與 LEV 的 MIC 結果對應，不一致率為 6.1% (6/98) (圖五)。

142 株傳統 LEV-R 結核菌株，分析 MIC 分布範圍及與分子檢驗比較顯示：

示：

(1) 分子檢驗未偵測到 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點有 45 株：其中 1 株 MIC 為 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而有 44 株為對 LEV 敏感。表現型抗藥試驗區分菌株對藥物為敏感性 ($\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 或抗藥性 ($> 1 \mu\text{g}/\text{mL}$)。如前面提到 MIC 接近臨界濃度時，傳統藥敏結果一致性較不穩定；經由分子檢驗為 WT 菌株，與 MIC 試驗判定為 LEV 敏感性菌株大致吻合(除了 1 株 WT 為高濃度抗藥)。

(2) 分子檢驗有偵測到 *gyrA* 或 *gyrB* 突變位點有 53 株：34 株(34.7%, 34/98) 突變位點為 *gyrA* codon 94，其中 D94G 佔 24.5%(24/98)，有 22 株呈現高程度抗藥(MIC $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)，但 2 株為對 LEV 敏感性菌株。第二多突變菌株為點 *gyrA* A90V，9 株皆為抗藥(MIC $> 1 \mu\text{g}/\text{mL}$)；*gyrA* D94A 及 D94N 為第三多突變，皆為 LEV 抗藥(MIC $> 1 \mu\text{g}/\text{mL}$)。同時具有多突變位點 *gyrA* D94H+ *gyrB* L431L 與 *gyrB* T539N+A502*+P606 的兩菌株，則對 LEV 敏感。2 株 G88C 為 LEV 抗藥菌株，但 G88A 為對 LEV 敏感。*gyrA* V55M 與 *gyrB* G522S 皆只發生於單一菌株，尚並無法確認突變與 LEV 抗藥強度相關性。



圖五、98 菌株之 LEV 藥 MIC 分布對應至分子檢驗結果。LEV 的試驗濃度為 0.12 – 4 µg/mL，MIC 值 1 µg/mL 為臨界濃度，故該菌株 MIC 結果 > 1 µg/mL 即判定為抗藥菌株。被報導與抗 FLQ 類藥物相關突變位點，突變株數目與分布用紅色柱狀圖表示；WT 以藍色圖對應；未確認與抗 FLQ 藥有關的突變位點以灰色柱狀圖表示。H37Rv MIC 值為 0.12 – 1 µg/mL。

4. 藥敏試驗與分子判定抗藥結果不一致

RIP 與/或 INH 初步分子檢驗與傳統藥敏不一致結果在調查年間所收集的總抗藥 MTBC 菌株中，共有 181 株(11.0%)。在本研究 181 株菌內，同時 RIP 與 INH 分析結果不一致則有 4 株(2.2%)；單純 RIP 分析結果不一致有 10 株，然而 INH 不一致則高達 128 株 (表八)。

FLQs 抗藥研究所收集的菌株共 1009 株，其中有 76 株(7.5%)為對任一 FLQs 藥物之分子檢驗與傳統藥敏不一致。本研究內所分析的 142 株內，FLQs 抗藥探討以分子檢驗對應 MIC 結果所得到的不一致率如下：MOX 為 49.3%、OFX 為 19.7%與 LEV 為 6.1% (表八)。

表八 不同藥物之分子檢驗與傳統藥敏不一致分析結果。

Drugs	Discordance (%, N)
	Genotype/Sanger sequencing VS DST cases
RIP and/or INH	181 (11.0, 1650)*
RIP and INH	4 (2.2, 181)
RIP	10 (5.5, 181)
INH	128 (70.7, 181)
	Genotype/Sanger sequencing VS MIC cases
Any FLQs	76 (7.5, 1009)**
MOX	70 (49.3, 142)
OFX	28 (19.7, 142)
LEV	6 (6.1, 98)

*為 2008 年 1 月至 2018 年 9 月間所收集的抗藥性 MTBC 菌株總數。**為 2013 年 1 月至 2018 年 5 月間所收集 FLQs 抗藥檢測的菌株總數。

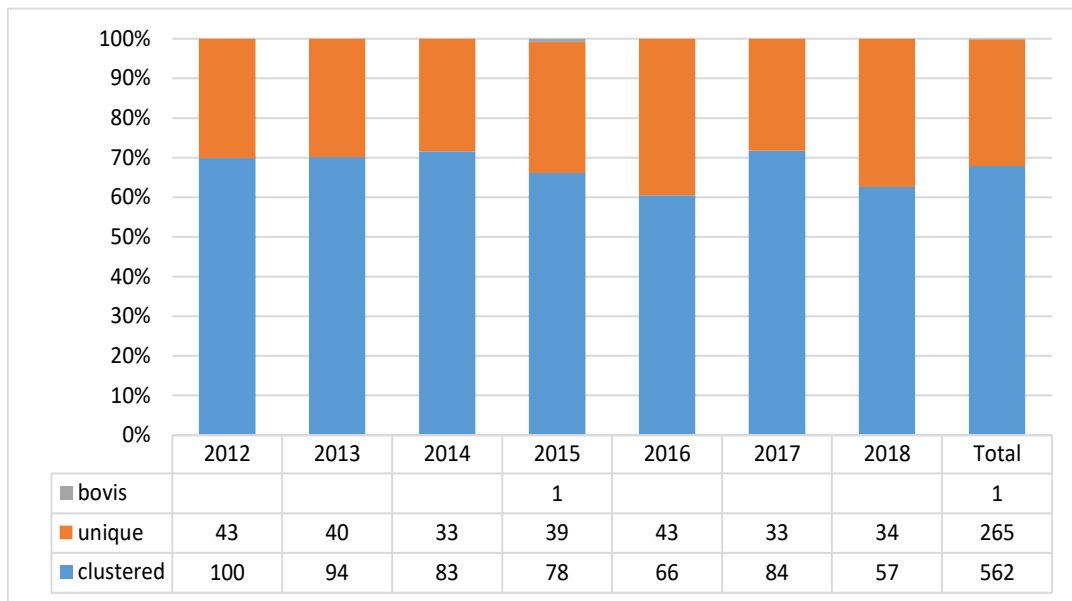
(三) 多重抗藥性結核菌株基因型分析

1. 2012 至 2018 年分析

完成 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日止，送驗 828 MDRMTBC 菌株，逐年各分析 143、134、116、118、109、117、91 MDR MTBC 菌株。結果顯示：**clustered 菌株 562 株 (67.9%)、non-clustered (即基因型 unique 者) 菌株 265 株 (32.0%)及 *Mycobacterium bovis* (bovis) 菌株 1 株 (0.1%)**。各年 clustered 與 non-clustered 之

比例如下：

Year	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total case No.
Clustered cases (N, %)	100 (69.9)	94 (70.1)	83 (71.6)	78 (66.1)	66 (60.6)	84 (71.8)	57 (62.6)	562 (67.9)
Unique (N, %)	43 (30.1)	40 (29.9)	33 (28.4)	39 (33.1)	43 (39.4)	33 (28.2)	34 (37.4)	265 (32.0)
Bovis (N, %)				1 (0.8)				1
Total N.	143	134	116	118	109	117	91	828 (100)



圖六 2012-2018 年聚集與非聚集菌株之比例

562 株 clustered 菌株分屬於 211 個 cluster 型別，最大 cluster 包含 31 株 (C00041)，其次為 20 株 (C00027)、19 株 (C00113) 及 12 株 (C00040)。211 clusters 大小分布如下，： >20 菌株共有 2 clusters (0.9%); 11-19 菌株共有 4 clusters (1.9%); 5-10 菌株共有 25 clusters (11.8%); 3-4 菌株共有 28 clusters (13.3%); 2 菌株共有 50

clusters (23.7%)及 1 菌株(係指與 2012 年之前 MDR 或其他非 MDR 菌株基因型相同者)共有 102 clusters (48.3%)。

依國籍分析: 於 828 名 MDR 個案中, **48 (5.8%)** 人為非本國人, 包含: 14 名大陸人士及 34 名為外籍人士。其中, **10 (20.8%)**人之菌株為 **clustered** 基因型, 包含 1 名大陸人士、7 名越南籍、1 名菲律賓籍及 1 名泰國籍個案。其中 **C00159** 與 **C01007** 分別來自 **2 名越南籍個案**, 且 **C01007** 未見於本國人中; 而其餘 38 (79.2%) 人之菌株基因型皆為 unique。各年份基因型分布列於表九。本國籍個案共計 780 人。男性佔 76.5%, 女性佔 23.5%; 男女比例為 3.62。年齡層以 **65 歲以上**居多佔 **38.2%**, 其次為 55-64 歲佔 22.3%、45-54 歲佔 17.9%、35-44 歲佔 11.4%。**MDR 個案多位於台北區**, 佔 28.7%, 高屏區、中區、南區次之, 分別佔 18.3%、17.6%、15.4%。**spoligotype 基因型以 Beijing 型**居多, 佔 **52.8%**, 其次為 Harlem 型佔 15.6%、EAI 型佔 6.7%、T 型佔 4.5%, undefined 者佔 11.3%。人口學資料及基因型資料詳如表十。

於 828 名 MDR-TB 個案中, **XDR-TB 個案有 17 (2.1%)**人, 2012 至 2018 年分別為 3、3、2、2、3、4 人; 其中除 1 名 2015 年確診個案為大陸人士外, 其餘皆為本國人。**16 名本國 XDR-TB 中, 12 (75%)**具有 **clustered** 基因型, 其中已知 2 人為家庭群聚 (C00113)、1 人為社區群聚 (C00015)、1 人 XDR 為家庭 MDR 群聚 (C00002, 2012) 但配偶為非 XDR。2018 年 4 名 XDR 中, 2 人菌株基因型分別為 C00002 及 C00130, 另 2 人為 unique (表十一)。

2. 2018 MDR MTB 菌株基因分型分析

2018 年截至 10 月 31 日止, MDR 菌株共分析 91 株。其中, **40 (44.0%)**株為 **clustered** 菌株, 基因型與 2012-2017 年 MDR 菌株有相同者; 13 株 (14.3%) 為與 2012 年之前 MDR 或其他非 MDR 菌株基因型相同; 另有 4 株 (4.4%) 分屬 **2 個 2018 年新出現之 clustered MDR 新基因型 C01011 及 C01013**, 其餘 34 株 (37.4%)

(包含 4 名大陸人士或外籍人士) 基因型為 unique。

2018 年 91 株分屬 32 個基因型(表十二): 有 17 個 C00041、C00027、C00057、C00002、C00033、C00040、C00009、C00121、C00130、C00035、C00013、C00025、C00123、C00039、C00124、C00003、C00053 為自 2012 起即出現，而其中 **C00041**、**C00002**、**C00009**、**C00121**、**C00035**、**C00013**、**C00123** 皆為 MDR，未見於其他非 MDR 菌株。

依地緣性分析：2018 年新出現之基因型 C01011 所含 2 名個案，皆來自台南市安平區，分別為 54 歲男性及 59 歲女性。而 C01013 所含 2 名個案，則分別來自宜蘭縣及高雄市。表十三為 32 clustered 菌株個案之縣市分布分析，其中有 17 個基因型 C00041、C00027、C00002、C00033、C00040、C00130、C00111、C00035、C00101、C00105、C00013、C00025、C00039、C00196、C00190、C00065、C01016，2018 年 clustered 之 MDR 個案所在縣市，於 2012 至 2017 年至少出現過一個同基因型個案。又其中 **C00101** (南投縣)、**C00190** (花蓮縣)、**C00065** (桃園市)、**C01016** (台中市) 僅出現在單一個縣市。另最大之 MDR cluster (**C00041**)，於 2018 年仍持續出現 3 名個案且皆位於花蓮縣。

表九 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日非本國人 MDR 菌株基因型及年份分布

基因型	大陸人士	越南	菲律賓	泰國	韓國	印尼	蒙古	外籍人士	Total
C00159		2							2
2014		1							1
2016		1							1
C00165	1								1
2016	1								1
C00167				1					1
2015				1					1
C00195		1							1
2017		1							1
C00198		1							1
2013		1							1
C00200		1							1
2013		1							1
C00291			1						1
2017			1						1
C01007		2							2
2014		1							1
2017		1							1
unique	13	11	7	1	1	1	1	3	38
2012	6	1	1		1		1	1	11
2013	1		1						2
2014	2	1	2						5
2015	3	2	1	1				2	9
2016		2							2
2017		3	2						5
2018	1	2				1			4
Total	14	18	8	2	1	1	1	3	48

表十 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日 780 名 MDR 本國人之人口學及基因型資料分布

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
No	132 (16.9%)	130 (16.7%)	109 (14.0%)	108 (13.8%)	105 (13.5%)	109 (14.0%)	87 (11.2%)	780 (100.0%)
Sex								
Male	104 (78.8%)	98 (75.4%)	79 (72.5%)	83 (76.9%)	81 (77.1%)	81 (74.3%)	71 (81.6%)	597 (76.5%)
Female	28 (21.2%)	32 (24.6%)	30 (27.5%)	25 (23.1%)	24 (22.9%)	28 (25.7%)	16 (18.4%)	183 (23.5%)
Age								
<=24	5 (3.8%)	5 (3.8%)	3 (2.8%)	4 (3.7%)	2 (1.9%)	1 (0.9%)	5 (5.7%)	25 (3.2%)
25-34	13 (9.8%)	12 (9.2%)	6 (5.5%)	8 (7.4%)	6 (5.7%)	7 (6.4%)	2 (2.3%)	54 (6.9%)
35-44	22 (16.7%)	14 (10.8%)	9 (8.3%)	15 (13.9%)	8 (7.6%)	13 (11.9%)	8 (9.2%)	89 (11.4%)
45-54	20 (15.2%)	30 (23.1%)	21 (19.3%)	20 (18.5%)	18 (17.1%)	19 (17.4%)	12 (13.8%)	140 (17.9%)
55-64	31 (23.5%)	31 (23.8%)	27 (24.8%)	23 (21.3%)	14 (13.3%)	25 (22.9%)	23 (26.4%)	174 (22.3%)
>=65	41 (31.1%)	38 (29.2%)	43 (39.4%)	38 (35.2%)	57 (54.3%)	44 (40.4%)	37 (42.5%)	298 (38.2%)
Region								
台北區	38 (28.8%)	40 (30.8%)	29 (26.6%)	25 (23.1%)	33 (31.4%)	33 (30.3%)	26 (29.9%)	224 (28.7%)
北區	12 (9.1%)	12 (9.2%)	10 (9.2%)	12 (11.1%)	12 (11.4%)	11 (10.1%)	14 (16.1%)	83 (10.6%)
中區	25 (18.9%)	16 (12.3%)	22 (20.2%)	23 (21.3%)	25 (23.8%)	13 (11.9%)	13 (14.9%)	137 (17.6%)
南區	18 (13.6%)	23 (17.7%)	17 (15.6%)	15 (13.9%)	17 (16.2%)	19 (17.4%)	11 (12.6%)	120 (15.4%)
高屏區	24 (18.2%)	25 (19.2%)	24 (22.0%)	18 (16.7%)	13 (12.4%)	24 (22.0%)	15 (17.2%)	143 (18.3%)
東區	15 (11.4%)	14 (10.8%)	7 (6.4%)	15 (13.9%)	5 (4.8%)	9 (8.3%)	8 (9.2%)	73 (9.4%)
Spoligotype								
Beijing	75 (56.8%)	67 (51.5%)	55 (50.5%)	56 (51.9%)	56 (53.3%)	57 (52.3%)	46 (52.9%)	412 (52.8%)
Manu_ancestor	3 (2.3%)	4 (3.1%)	6 (5.5%)	8 (7.4%)	2 (1.9%)	6 (5.5%)	2 (2.3%)	31 (4.0%)
Haarlem	23 (17.4%)	22 (16.9%)	21 (19.3%)	14 (13.0%)	15 (14.3%)	12 (11.0%)	15 (17.2%)	122 (15.6%)
EAI	6 (4.5%)	10 (7.7%)	11 (10.1%)	7 (6.5%)	2 (1.9%)	6 (5.5%)	10 (11.5%)	52 (6.7%)
T	5 (3.8%)	9 (6.9%)	3 (2.8%)	5 (4.6%)	4 (3.8%)	3 (2.8%)	6 (6.9%)	35 (4.5%)
LAM	1 (0.8%)	1 (0.8%)	0 (0.0%)	2 (1.9%)	1 (1.0%)	1 (0.9%)	0 (0.0%)	6 (0.8%)
Bovis	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.1%)
Unknown	3 (2.3%)	2 (1.5%)	2 (1.8%)	7 (6.5%)	7 (6.7%)	7 (6.4%)	2 (2.3%)	30 (3.8%)
undefined	16 (12.1%)	15 (11.5%)	11 (10.1%)	7 (6.5%)	17 (16.2%)	17 (15.6%)	5 (5.7%)	88 (11.3%)
negative	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.9%)	1 (1.0%)	0 (0.0%)	1 (1.1%)	3 (0.4%)
clustering								
clustered	100 (75.8%)	92 (70.8%)	81 (74.3%)	77 (71.3%)	64 (61.0%)	81 (74.3%)	57 (65.5%)	552 (70.8%)
non-clustered	32 (24.2%)	38 (29.2%)	28 (25.7%)	31 (28.7%)	41 (39.0%)	28 (25.7%)	30 (34.5%)	228 (29.2%)

表十一 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日 XDR 基因型及年份分布

基因型	ST NO	Lineage	2012	2013	2014	2015	2016	2018	Total
C00002	2090	H3	1				2	1	4
C00004	50	H3			1				1
C00015	1	Beijing		1					1
C00113	1	Beijing	1	1					2
C00130	941	Beijing				1*		1	2
C00157	250	Beijing	1						1
C01004	1	Beijing					1		1
unique	1	Beijing		1	1	1		1	4
	190	Beijing						1	1
Total			3	3	2	2	3	4	17

*大陸人士

表十二 2018 年 1-10 月 40 株 clustered MDR 菌株與 2012 年至 2018 年有相同者及 4 株 2018 年新增之基因型

基因型	ST NO	Lineage	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
C00041	1	Beijing	8	5	3	5	3	3	4	31
C00027	1	Beijing	2	4	5	2	2	2	3	20
C00057	1	Beijing	1	2	1	1	2	1	3	11
C00002	2090	H3	1	1	1		2	1	3	9
C00033	1	Beijing	1	3			3		2	9
C01011	1	Beijing							2	2
C01013	511	H3							2	2
C00040	1	Beijing	3	3		2	2	1	1	12
C00009	316	H3	2	1	2	3		2	1	11
C00121	1487	Unknown	1			3	2	3	1	10
C00130	941	Beijing	1	2	1	2	1		1	8
C00111	19	EAI2-Manila			3	1	1	1	1	7
C00015	1	Beijing		2	1	1	1		1	6
C00051	742	H		1	1		2	1	1	6
C00035	undefined	undefined	2	2	1				1	6
C00101	1	Beijing			1	2	1	1	1	6
C00105	50	H3		1	3				1	5
C00013	250	Beijing	2		2				1	5
C00025	1	Beijing	1	2		1			1	5
C00123	523	Manu_ancestor	1		1			1	1	4
C00039	523	Manu_ancestor	2			1			1	4
C00196	1226	Unknown						3	1	4
C00058	1	Beijing		1		1		1	1	4
C00124	19	EAI2-Manila	1		1				1	3
C00190	2040	T3						2	1	3
C00065	250	Beijing		1				1	1	3
C00023	1	Beijing		1	1				1	3
C00003	2090	H3	1	1					1	3
C00301	19	EAI2-Manila						1	1	2
C01020	2393(TW5)	T1		1					1	2
C00053	50	H3	1						1	2
C01016	1	Beijing				1			1	2

表十三 2018 年 32 種 clustered 菌株之個案縣市分布

基因型	ST NO	Lineage	縣市別	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
C01011	1	Beijing	台南市							2	2
C01011 合計										2	2
C01013	511	H3	宜蘭縣 高雄市							1 1	1 1
C01013 合計										2	2
C00041	1	Beijing	新北市 桃園市 桃園縣 苗栗縣 台南市 高雄市 台東縣 屏東縣 花蓮縣		1						1
C00041 合計				8	5	3	5	3	3	4	31
C00027	1	Beijing	台北市 新北市 桃園市 台中市 新竹縣 高雄市 屏東縣 花蓮縣	1	1	2	1			1	2
C00027 合計				2	4	5	2	2	2	3	20
C00057	1	Beijing	台北市 新北市 桃園市 彰化縣 雲林縣 苗栗縣	1	2		1		1	1	4
C00057 合計				1	2	1	1	2	1	3	11
C00002	2090	H3	台北縣 新北市 桃園市 台中市 彰化縣 南投縣 雲林縣		1	1		1	1	1	1
C00002 合計				1	1	1		2	1	3	9
C00033	1	Beijing	宜蘭縣 新北市 桃園市 台東縣	1	2			1		1	3
C00033 合計				1	3			3		2	9
C00040	1	Beijing	基隆市 台北市 新北市 台中市 嘉義市 台南市	2	2		1	1			5
C00040 合計				3	3		2	2	1	1	12
C00009	316	H3	宜蘭縣 台中市 花蓮縣			1				1	1
C00009 合計				2	1	2	3		2	1	11
C00121	1487	Unknown	基隆市 台北市 新北市 桃園縣				1	1		1	1
C00121 合計				1			3	2	3	1	10
C00130	941	Beijing	宜蘭縣 台北市 新北市 彰化縣 高雄市 台東縣		1			1			1
C00130 合計				1	2	1	2	1		1	8

表十三 2018 年 32 種 clustered 菌株之個案縣市分布 (續)

基因型	ST NO	Lineage	縣市別	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
C00111	19	EAI2-Mar	彰化縣			1					1
			台南市				1				1
			高雄市					1		1	2
			屏東縣						1		1
C00111 合計						3	1	1	1	1	7
C00015	1	Beijing	台北市		1						1
			桃園市				1				1
			台中市					1			1
			雲林縣		1	1					2
			花蓮縣							1	1
C00015 合計					2	1	1	1		1	6
C00051	742	H	基隆市		1	1		2	1		5
			新北市							1	1
C00051 合計					1	1		2	1	1	6
C00035	undefined	undefined	新北市	1							1
			台中市		1						1
			高雄市		1	1					2
			屏東縣	1						1	2
C00035 合計				2	2	1				1	6
C00101	1	Beijing	南投縣			1	2	1	1	1	6
C00101 合計						1	2	1	1	1	6
C00105	50	H3	台北市		1						1
			新北市			1					1
			嘉義縣			1				1	2
			台東縣			1					1
C00105 合計					1	3				1	5
C00013	250	Beijing	高雄市			1					1
			屏東縣	2		1				1	4
C00013 合計				2		2				1	5
C00025	1	Beijing	台南市		1						1
			高雄市	1			1				3
			屏東縣		1						1
C00025 合計				1	2		1			1	5
C00123	523	Manu_anc	新北市	1							1
			新竹縣							1	1
			苗栗縣			1					1
			台南市						1		1
C00123 合計				1		1			1	1	4
C00039	523	Manu_anc	台北市	1							1
			高雄市				1			1	2
			花蓮縣	1							1
C00039 合計				2			1			1	4
C00196	1226	Unknown	高雄市						1	1	2
			屏東縣						2		2
C00196 合計									3	1	4
C00058	1	Beijing	新北市							1	1
			桃園市				1				2
			桃園縣		1				1		1
C00058 合計					1		1		1	1	4
C00124	19	EAI2-Mar	新北市			1					1
			嘉義縣							1	1
			高雄市	1							1
C00124 合計				1		1				1	3
C00190	2040	T3	花蓮縣						2	1	3
C00190 合計									2	1	3
C00065	250	Beijing	桃園市		1				1	1	3
C00065 合計					1				1	1	3
C00023	1	Beijing	桃園縣		1	1					2
			彰化縣							1	1
C00023 合計					1	1				1	3
C00003	2090	H3	宜蘭縣	1							1
			台北縣		1						1
			桃園市							1	1
C00003 合計				1	1					1	3
C00301	19	EAI2-Mar	台中市							1	1
			雲林縣						1		1
C00301 合計									1	1	2
C01020	2393(TW:T1)		桃園市							1	1
			雲林縣		1						1
C01020 合計					1					1	2
C00053	50	H3	台北市	1							1
			新北市							1	1
C00053 合計				1						1	2
C01016	1	Beijing	台中市				1			1	2
C01016 合計							1			1	2

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(MDR-TB)分析

在 181 株發生不一致檢測結果之 MDR 結核菌株中，RIF 抗藥以 *rpoB* S531L 出現的頻率最高(61.88%, 112/181)，其次為 D516V (4.97%, 9/181)，第三則是 H526D (3.87%, 6/181)。然而，有 10 株 **(5.05%)RIF 抗藥菌株**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(表十三)。

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。*rpoB* S531L 及 H526D 與與高濃度抗藥相關。至於有 5 株突變位點為 *rpoB* S531L 菌株與 1 株突變位點為 D516V 的 MIC ≤ 0.5 µg/mL，是菌株生長限制之問題或為 broadline 抗藥，需進一步探討。爭議性突變位點(disputed mutation)近期來受到關注，該突變跟抗藥性判定有困擾，通常傳統表現型抗藥為敏感，造成治療與管理上之困擾。爭議性突變常見相關的位點有 *rpoB* L511P、D516Y、H526L、H526N 及 L533P [32]。本研究內 *rpoB* L511P 對應的 MIC 值低，但是 2 株 D516Y 與一株 L533P 卻皆為高濃度抗藥。爭議性突變位點與用藥治療關聯性，應值得持續探討。

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，然而還是須尋找新的或已在觀察但尚未確認之突變位點，以了解結核菌抗藥相關性，增加臨床用藥的準確度。INH 抗藥突變位點以 *katG* S315T 出現的頻率最高 (5.52%, 10/181)，其次為 *inhA* promoter region c-15t (1.66%, 3/181)。然而，有多達 **128 (70.72%, 128/181)** 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，但為抗 INH 菌株 (表十三)。*ahpC* regulatory

region (*oxyR*)及 *ahpC* 被認為是 compensates for physiological KatG inactivity，但無變大多具高 MIC 值，因此 *oxyR-ahpC* 將持續納入分子快速檢測之一。

(二) FLQ 抗藥結核菌株抗藥性相關基因資料

gyrA codon 90、91 與 94 為最常被報導與抗 FLQ 類藥物有關的突變點，以 D94G 與 A90V 是相對熱門的突變型式，與 FLQ 類藥物高濃度抗藥有關係[33]。本實驗證明 **D94G 為臺灣 *gyrA* 最常見的突變位點**，對 MOX、OFX 與 LEV 皆有較高抗藥性，與參考文獻相吻合；然而還是有 2 株 *gyrA* D94G 突變菌株同時對本研究三種 FLQ 藥物具有敏感性，造成原因還需再深入討論。次多為 A90V 突變株，有 80%(8/10)被判定為 MOX 抗藥菌株；由 OFX 的 MIC 結果對應 A90V 突變，發現有 90%(9/10)為 OFX 抗藥菌株，但 100%(9/9)為 LEV 抗藥菌株。*gyrA* D94N 及 D94A 也是發生率相對較高的突變菌株並有明顯抗 FLQ 藥物能力。*gyrA* V55M、D89N、D94H、D94Y 與同義突變 A71A+L109L 只有一個案例，需再收集數據以增加用藥準確度；V55M 突變為本研究發現之新突變，但是對應 3 種測試 FLQ 藥物之 MIC 結果，皆具敏感性。***gyrA* D94H 單獨存在具有抗較高濃度的 MOX 與 OFX**；然而同時帶有 *gyrB* L431L 同義突變之菌株，則會降低對 MOX 及 OFX 的敏感度。

gyrB 突變菌株較少，在本研究菌株與 *gyrB* 相關的突變位點含：D500N、G522S、E540D、G551R 及一株多重突變位點(T539N+A502* +P606P)突變株。D500N、E540D 與 T539N 皆被報導過與抗 FLQ 藥物有關係[33,34]，但在本研究對不同 FLQ 藥物有不同反應並僅有單一菌株，需要進行增加菌株數研究探討。此外，*gyrB* T539N 突變菌株，同時有 A502 位點變成 stop codon 及 P606P 同義突變，突變對菌株抗藥能力影響仍待瞭解。根據文獻報導，同時存有兩個突變位點的菌株，反而因為蛋白構型與藥物結合力提高進而造成該菌株對藥物敏感，如 *gyrB* N538I + *gyrA* D94A 兩突變同時存在[35]。本次研究收集到兩株 *gyrB* G551R 突變株，皆為對本試驗內的三種 FLQ 藥物為敏感，若根據前人研究 *gyrB* G551R 應是地緣性菌株特性[36]。此外，**本研究發現之 *gyrB* G522S 新突變位點**，但 MIC 測試結果具低濃度 FLQ 抗藥，值得更深入研究。

由分子檢驗與傳統 DST 結果比對，MOX、OFX 與 LEV 藥物的不一致性發生率分別為 49.3%、19.7%與 6.1% (表十三)。gyrA D94, D90 及 D88，一般與高濃度抗藥相關。排除較少研究數量 LEV 菌株，收集 64 株野生型(WT)菌株皆判定為抗低濃度 MOX 菌株；由 OFX 測試結果顯示，有 21 野生型菌株是低濃度 OFX 抗藥，其餘 43 株為對 OFX 敏感菌株。該 64 株野生型菌株的低濃度抗藥，是否與 MIC 判定之模糊區間有關，MIC 判讀方式是否儀設定為抗藥、中間值及敏感，國際合作計畫正在討論研究中。文獻報導約有 30% FLQ 菌株無對應之抗藥基因突變，預測可能與 efflux pump 相關[37]。至於，本研究發現 23%菌株無抗藥基因，皆為 MOX 低濃度抗藥，可能存在患者體內時發生其他遺傳變異(within-host bacterial genetic variation)而間接導致。

本研究從分子檢測結果與傳統抗藥性不一致菌株，探討主要抗藥基因序列與抗藥結果。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導資料。菌株抗藥性的生成，並非導因單一基因之變化，菌株之基因型、補償性演化等皆可能是影響因子[38]。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。除了持續進行抗藥性監測及分析，未來可以全基因體定序數據了解抗藥相關之機轉。部分位點的突變菌株鮮少出現，如要了解該突變位點是否造成抗藥性，可以藉基因工程誘發藥物敏感性菌株突變，進行蛋白質功能分析，確認該突變位點是否造成菌體抗藥，減少因突變點的不確定而影響用藥精準度與造成抗藥菌株出現。

(三) MDR-TB 個案菌株基因型分析

2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日止，MD-TB 個案為本國籍者共 780 人，仍以 65 歲以上居多佔 38.2%，隨年齡層下降而遞減；地理區域上仍以台北區最多 (28.7%)，2018 年截至 10 月底高屏區個案數 15 人 (17.2%, 15/87)，較 2017 年 24 人 (22.0%, 24/109) 略為下降，但與 2015 年 (16.7%, 18/108) 相當。2018 年北區個案數 14 人

與 2012 至 2017 年相近，但整體比例略為增加至 16.1% (14/87)；主要盛行 spoligotype 基因型仍以 Beijing 型比例最高佔 52.8%；2018 年 EAI 型比例佔 11.5% (10/87) 較 2016 年 1.9% (2/105) 及 2017 年 5.5% (6/109) 略高。2018 年仍需完成至年底以確認是否有顯著上的差異。

MDR 個案非本國籍有 48 (5.8%) 人，14 (29.2%) 人為大陸人士及 34 (70.8%) 人為外籍人士。其中，10 (20.8%) 人具 clustered 基因型，其餘 38 人 (79.2%) 菌株基因型仍為 unique 基因型，現有防治策略可能限制境外 MDR-TB 移入之傳播。

2018 年截至 10 月 31 日止，共分析之 91 株 MDR 菌株中，有 65.5% (57/87) 屬於 clustered 菌株，略低於 2017 年之 74.3% (81/109)，亦較 2012 至 2018 年合計之 70.8% (552/780) 為低。2018 年仍需完成至年底以確認是否有顯著上的差異。32 個 clusters 為自 2012 起即出現之 cluster 基因型。其中，有 7 型 C00041、C00002、C00009、C00121、C00035、C00013、C00123 皆為 MDR，但未見於其他非 MDR 菌株中，顯示 MDR 之傳播基因型仍具特定性。例如：C00041 及 C00009 分別有 64.5% (20/31) 及 81.8% (9/11) 之個案來自花蓮縣；至於 2018 年新出現之 C00009 雖為台中市列管，但依身分證字號為 U 開頭，推測應原來自於花蓮縣。另，C00121 有 80% (8/10) 個案位於台北市及新北市，C00013 則有 4 名 (80%, 4/5) 個案位於屏東縣，推論此等 MDR 特有基因型之傳播亦有地理分布上的特異性。2018 年新出現之基因型 C01011 之 2 名個案皆位於台南市安平區，分別為 54 歲男性及 59 歲女性。在時間與空間上皆有關聯性，需要進一步藉公衛調查以了解可能傳播原因。

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 2018 年 9 月間所收集 MDR 案例，11.0% (181/1650) 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 **5.5% 及 70.7%** 無法以現有例行分子方法檢測判定抗藥性。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 74.6% (135/181) 及 11.6% (21/181)。 *rpoB* S531L 及 H526D 與高濃度抗藥相關。爭議性突變位點(disputed mutation)有抗藥性判定困擾，通常傳統表現型抗藥為敏感，造成治療與管理上之困擾，宜由傳統表現型再佐證或個案流病及臨床證據共同參酌。此外，抗藥基因序列分析比 GenoType 敏感，可多檢測出 4.4% RIF 及 9.4% INH 抗藥性。**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。也建議藉由 MIC 結果來比對突變位點，了解抗藥性強弱。並逐步提供 MIC 檢測結果供治療抗藥性病人個人化用藥參酌。**

(二) 以分子及 MIC 藥敏結果預測 FLQs 抗藥關聯性

由選取之 142 FLQ 抗藥菌株，其分子檢驗與最低抑菌濃度(MIC)檢測結果顯示，對 moxifloxacin、ofloxacin 與 levofloxacin **DST 結果不一致率分別為 49.3%、19.7% 及 6.1%**。抗 FLQ 藥物相關基因突變以 *gyrA* D94G 最多(25.4%)，A90V 有 6.9%，D94N 有 4.9%；***gyrA* D94, D90 及 D88**，一般與高濃度抗藥相關。而 64 株分子未檢測出突變點，但為低濃度 MOX 抗藥，對不同 FLQ 藥物有不同的 MIC 分布；**LEV 傳統與分子 DST 結果之一致性高**。結核菌株抗藥性相關基因資料，仍持續有新增，持續收集抗藥菌株與增加文獻搜尋將可優化快速檢測判定。**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，並發展新檢測工具以增強檢測效率與效果。**

(三) MDR-TB 個案菌株基因型的分析

持續性執行 MDR 菌株基因型分析，確實有助於結核病傳播分析的探討及加強防治作為。並藉由 MDR 菌株基因型即時上傳追管系統，以利疫調人員即時啟動相關調查，確實掌握病人，有效執行 MDR 結核病防治。自 2012 年起，最大之 MDR cluster C00041 已累積達 31 人，且於 2018 年仍持續出現 4 個案，其中 3 人位於花蓮縣，2012 至 2018 年共計有 20 人 (64.5%) 位於該縣市，顯示該地區該基因型之防治策略仍具有挑戰。**建議仍應加強相關監測及整合性分析，以釐清地緣性及持續擴大 clustered 基因型結果。**

六、計畫重要研究成果及具體建議

(一) 重要成果

1. 一線藥物 RIF 與 INH 抗藥部分:自 1,650 送複驗 MDR 菌株中，發現有 181 (11.0%) 菌株之分子檢測與傳統 DST 判定是否為 MDR 的結果不一致，有 170 (93.9%)株經由分子檢測(GenoType 試劑組或核酸定序方法)分析，發現在 RIF 抗藥標的 *rpoB* 基因有鑑別出突變位點，但有 1 株 PCR 無法成功增幅 *rpoB* 片段。而有 10 株 (5.5%; 佔全部送驗數 0.6%) 傳統 DST 抗藥菌株，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。抗 RIF 藥物相關基因突變探討，突變株 *rpoB* S531L 佔多數 112 (61.9%)株。基因序列分析比 GenoType 檢測方法敏感，可多檢測出 8 株(4.4%)RIF 抗藥菌株。在 181 株發生不一致檢測結果之 MTBC 菌株中，有 45 株(24.9%)株經由分子檢測分析，發現在 INH 抗藥標的 *katG*, *inhA promoter*, *inhA*, *oxyR-ahpC* 基因有鑑別出突變位點，*katG* S315T 出現的頻率最高(10 株，5.5%)；但仍有多達 128 株(70.7%; 佔全部送驗數 7.8%)以分子檢測(GenoType 試劑組或基因定序)，無發現突變位點。有 38 株菌在 MIC 檢測之分析中判定為敏感性與傳統 DST 結果之不一致率為 21.0%。基因序列分析比 GenoType 檢測方法敏感，可多檢測出 17 (9.4%)株 INH 抗藥菌株。
2. fluoroquinolones (FLQs)類抗藥部分:在 1009 菌株中有 142 (14%)株為 FLQ 抗藥菌株，其中分子無法檢測佔 6.3%。續分析分子檢驗與最低抑菌濃度(MIC)檢測結果，顯示對 *moxifloxacin*、*ofloxacin* 與 *levofloxacin* DST 結果不一致率分別為 49.3%、19.7%及 6.1%。抗 FLQ 藥物相關基因突變以 *gyrA* D94G 為主佔 25.4%，A90V 有 6.9%，D94N 有 4.9%。*gyrA* D94, D90 及 D88，一般與高濃度抗藥相關；而 64 株分子未檢測出突變點，但為低濃度 MOX 抗藥，對不同 FLQ 藥物有不同的 MIC 分布；LEV 傳統與分子 DST 結果之一致性高。
- (3) 基因分型部分:自 2012 年 1 月至 2018 年 10 月 31 日止，分析 828 株 MDR MTBC。562 (67.9%)株為 clustered 菌株、265 (32.0%)株為 non-clustered 菌株及 *M. bovis* 菌株 1 (0.1%)株。828 名 MDR-TB 中，本國籍個案共計 780 (94.2%)人，其餘 48 人為大陸人士或外籍人士。spoligotype 基因型以 Beijing 型居多佔 52.8%。再者，2018

年截至 10 月 31 日止，共分析 91 株 MDR 菌株，其中 40 (44.0%)株為 clustered 菌株之基因型與 2012-2017 年 MDR 菌株有相同者；另有 4 (4.4%)株分屬 2 個 2018 年新出現之 clustered MDR 基因型 C01011 及 C01013。此外，C00041、C00002、C00009、C00121、C00035、C00013、C00123 皆為 MDR，未見於其他非 MDR 菌株中。傳統抗藥性判為 RIF 及 INH 抗藥之菌株，分別有 5.5%及 70.7%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 74.6%及 11.6%。了解 *gyrA* 及 *gyrB* 基因突變對不同 FLQ 藥物的抗藥性影響。

(二) 具體建議

1. 建議使用基因序列分析方法檢測抗藥性，並逐步提供 MIC 檢測結果，供治療抗藥性病人之個人化用藥參酌。
2. 建議持續執行抗藥性分子及 MIC 監測及分析數據，提高檢測準度。並以全基因體定序找尋與抗藥相關基因突變並了解抗藥機轉；可著手進行蛋白質功能分析，確定突變位點與抗藥相關性，提準診治外亦可供發展診斷試劑及新藥參考。
3. 建議藉由 MDR 菌株基因型分析了解 MDR 菌株之特異性，可能與 MDR 之傳播能力有關，建議未來可精進基因分型工具(如 WGS)，以正確及精準追蹤感染途徑。

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. (2018) Global tuberculosis report 2018.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1>
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. Yu MC, Chiang CY, Lee JJ, Chien ST, Lin CJ, Lee SW, et al. Treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis in Taiwan: tackling loss to follow-up. *Clin Infect Dis* 2018; 67: 202-210.
6. 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
7. 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. PMCID: PMC314927
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. 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

30. 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
31. 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
32. Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, Degano M, and Cirillo DM. Role of disputed mutations in the *rpoB* gene in the interpretation of automated liquid MGIT culture results for rifampicin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology. J Clin Microbiol* 2018; 56: 01599-17.
33. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J, et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLoS One* 2015; 10, e0120470.
34. Maitre T, Petitjean G, Chauffour A, Bernard C, El Helali N, Jarlier V, et al. Are moxifloxacin and levofloxacin equally effective to treat XDR tuberculosis? *J Antimicrob Chemother* 2017; 72, 2326-33.
35. Hameed H, Islam MM, Chhotaray C, Wang C, Liu Y, Tan Y, et al. Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* Strains. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8, 114.
36. Disratthakit A, Prammananan T, Tribuddharat C, Thaipisuttikul I, Doi N, Leechawengwongs M, et al. Gyrase mutations in pre-extensively and extensively drug-resistant tuberculosis in Thai clinical isolates: insights into the role of *gyrB* mutations in quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 00539-16.
37. Pule CM, Sampson SL, Warren RM, Black PA, Helden van PD, Victor TC, and Louw GE (). Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *J Antimicrob Chemother* 2015; 71, 17-26.
38. Li QJ, Jiao WW, Yin QQ, Xu F, Li JQ, Sun L, et al. Compensatory mutations of rifampin

resistance are associated with transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60, 2807-12.