

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000405

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

計畫名稱：多重抗藥、超級及全抗藥性結核病之監測

年度/全程研究報告

執行單位：衛生福利部疾病管制署愛滋及結核病組

計畫主持人：周如文

計畫共同主持人：吳玫華

研究人員：莊沛樺、林庚酉、范芯芫

執行期間：104年1月1日至104年11月25日

目 錄

	頁 碼
目次	
壹、中英文摘要	(iv)
貳、本文	
一、前言	(1)
二、材料與方法	(8)
三、結果	(15)
四、討論	(23)
五、結論與建議	(29)
六、參考文獻	(31)
七、圖、表	
圖一 2007-2015 年多重抗藥性結核病在臺灣各區空間上的分布變化	(37)
圖二 2007-2015 年新個案與再治療個案比例變化	(38)
圖三 2007-2015 年各年齡層多重抗藥性結核病個案送驗比例	(38)
圖四 2007-2015 年多重抗藥性結核病個案抹片陽性比	(39)
圖五 2007-2015 年多重抗藥性結核病個案抹片與培養皆陽性比例	(39)
圖六 2007-2015 年多重抗藥性結核菌抗藥性分析(1)所有個案(2)新個案(3)再治療個案	(40)
圖七 抗藥性與個案年齡相關性分析(1)新個案(2)再治療個案	(41)

圖八 多重抗藥(2013-2014)及超級抗藥(2007-2014)結核菌株之抗藥性分析	(42)
圖九 非 MDR、Simple MDR、pre-XDR、及 XDR 的藥物 MIC 分佈範圍	(43)
圖十 47 株 Fluoroquinolone 抗藥株與其他 Fluoroquinolone 類藥物的交叉抗藥比例	(44)
<u>表次</u>	
表一 肺外結核通報項目分析	(45)
表二 胸部 X 光檢驗結果	(45)
表三 藥物儲備溶液(stock solution)製備表	(46)
表四 REMA 藥物敏性試驗方法 96 孔盤配製表	(47)
表五 7H11 瓊脂平板法藥敏盤藥物配製濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)表	(48)
表六 協同作用藥敏盤配製 96 孔盤配製表	(49)
表七 H37Rv 結核菌之最小抑菌濃度測試結果	(50)
表八 多重抗藥結核菌株 REMA MIC50 及 MIC90	(51)
表九 The epidemiological cut-off value(ECOFF) of Simple MDR & pre-XDR	(53)
表十 Ethambutol 與 Clofazimine 合併之 FICI 值	(54)
附錄	(55)

壹、中英文摘要

摘要

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

研究方法 分析 2007-2015 年 1,425 株多重抗藥結核菌株之抗藥性資料。及收集臺灣非多重抗藥、多重抗藥、超級抗藥性結核菌株共 508 株，以甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 (trimethoprim-sulfamethoxazole)、美化喹寧 (mefloquine)、阿莫西林-克拉維酸鉀(amoxicillin-clavulanate)、美羅培南-克拉維酸鉀(meropenem-clavulanate)、氯法齊明(Clofazimine)、硫利達嗪 (thioridazine)、莫西沙星(moxifloxacin)、硝唑尼特 (nitazoxanide)、采福適(Linezolid)、異菸鹼醯(INH)及羥基得泰松(oxyphenbutazone)藥物，進行藥物敏感性試驗，以瞭解各項藥物對多重抗藥、超級抗藥性結核菌株的抑(殺)菌效果。主要實施方法為瓊脂平板法及 resazurin microtiter assay，在各藥物的序列稀釋濃度中，找出可抑制 99% MDR 結核菌株生長的最小抑制濃度 (minimum inhibition concentrations, MICs)、MIC50、MIC90，定義 The epidemiological cut-off value (ECOFF)及藥物協同作用以排除藥物併用的疑慮。

主要結果(1) 2007-2015 年間，共送驗 1,425 位多重及超級抗藥性個案結核菌株，包含新個案 1,003 位(70.4%)、再治療個案 422 位(29.6%)。女性占 391 位(27.4%)；男性 1034 位(72.6%)。大於 65 歲個案占最多數 27.5%，其次為 45-54 歲 21.9%。1,411 位送驗個案中，842 位(59.7%)為抗酸菌染色抹片陽性。刪除 2 位無胸部 X 光檢查結果之個案後，1,423 位送驗個案當中，胸部 X 光正常者 26 位(1.8%)或異常但無關結核病者 14 位(1.0%)。資料顯示，MDR 菌株對於各個抗結核藥物的抗藥比例，各年度分別為：pyrazinamide (PZA)

24.7%-47.6%、ofloxacin (OFX) 9.5-44.2%、moxifloxacin (MOX) 9.5-18.1%、
gatifloxacin (GAT) 為 1.5-5.0%、kanamycin (KM) 3.4-11.6%、amikacin (AM)
2.2-12.8%、capreomycin (CAP) 1.7-7.5%、para-aminosalicylate (PAS) 3.7-23.8%
及 ethionamide (EA) 15.0-36.8%。所幸尚未有對所有現階段測試之抗結核藥
物產生全抗藥性的個案。分析結果顯示，截至 2015 年，AM、KM、OFX、
PAS 及 PZA 的抗藥性比例皆有顯著下降(AM、EA、PZA, $P < 0.05$; OFX、PAS,
 $P < 0.0001$)。(2)建立 MDR 菌株於 11 種藥物 MIC 範圍及測試最小抑菌濃度之
方法學。新藥於多重抗藥、超級抗藥性及非多重抗藥性菌株的最小抑菌濃
度之分佈，分析結果未顯示差異性，液態微量滴定法的 MIC 分布梯度比標
準瓊脂法分布濃度較高；協同作用測試結果顯示，當 clofazimine 與
ethambutol 併用時具加成作用；以實驗方法建議出流行病學上的抗藥之臨
界濃度(ECCOFF)值，瞭解藥物治療適用性；由 196 株多重抗藥結核病個案抗
藥型態分析顯示，有 157(80.1%)株對 fluoroquinolone 及 second-line injectable
drug 敏感的個案可適用結核病短程治療。而有 28(15.1%)株對
fluoroquinolone 抗藥及 7(3.8%)株對 second-line injectable drugs 抗藥，並且
同時對 clofazimine 為敏感的個案，建議將 bedaquiline 納入此類個案的用藥
療程。

結論及建議事項多重抗藥性結核病臺灣各區的分佈變化，可以略為觀察防治
措施策略的成效。建議可以加強臺灣在結核病的抗藥性監測，確認是否有全
抗藥性的個案結核病人，以評估 DOT-Plus 治療多重抗藥等病人的策略成效。
MIC 值為進一步研究標準藥物敏感性試驗方法、培養基的選用及臨界濃度的
建立不可缺少的重要工具。提供重新定義藥物之 MIC₅₀、MIC₉₀、ECCOFF 值
及新舊藥併用之體外試驗結果，提供照護團隊參考，以評估最適用藥組合或
規劃短程治療計畫，以提高多重抗藥、超級抗藥性結核病治癒率嘉惠病人。

藉由歷年抗藥型態及最低抑菌濃度方法測試 clofazimine 抗藥結果分析資料，提供納入 bedaquiline 治療多重抗藥結核病個案用藥療程建議個案數，可進一步分析治療結果，最終規劃出治療多重抗藥結核病個案最適藥計畫。

關鍵詞：結核病、多重抗藥性、超級抗藥性、全抗藥性、MIC 分佈、clofazimine、ethambutol、協同作用

Abstract

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

Materials and Methods: We retrospectively analyzed drug susceptibility testing (DST) results of the second-line drugs, ofloxacin (OFX), kanamycin (KM), para-aminosalicylate (PAS), ethionamide (EA) and rifabutin (RBT), of MDR *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates tested in 2007-2015, and amikacin (AM) tested in 2008-2015; while moxifloxacin (MOX), gatifloxacin (GAT) and cycloserine (CS) tested in 2010-2015. One isolate of each case per year was included in this study. DST was performed using either the Middlebrook 7H10 agar or a liquid-based proportion method. A total of 287 *M. tuberculosis* isolates were tested. We use established procedures, resazurin microtitre assay and agar proportion method, to test *M. tuberculosis* isolates known to be resistant to at least isoniazid and rifampicin to serial concentrations of each candidate drug to determine the minimum concentration that inhibits growth of > 99% of bacilli.

Results and Discussion: We analyzed DST results of 1,425 cases including 1,003 (70.4%) new and 422 (29.6%) retreated cases. In this survey, 25.8%-47.6% were resistant to PZA, 9.5-44.2% were resistant to OFX, 9.5-18.1% resistant to MOX, 2.6-5.0% resistant to GAT, 4.4-11.6% resistant to KM, 3.7-12.8% resistant to AM, 1.7-7.5% resistant to CAP, 3.7-23.8% resistant to PAS and 15.0-36.8% resistant to EA.. Since GAT was not available in Taiwan, resistant to GAT might be resulted

from cross-resistance with other fluoroquinolones. Up to 2015, there were significant decrease of AM resistant rate ($P<0.05$), EA resistant rate ($P<0.05$), PZA resistant rate ($P<0.05$), OFX resistant rate ($P<0.00001$) and PAS resistant rate ($P<0.00001$). A policy implemented in 2007 to restrict the prescription of fluoroquinolones was proved to be effective. We preliminarily established both a liquid-based and an agar-based drug-resistant methods for testing repurpose drugs. More results were needed to suggest a resistant MIC value for each drug.

Conclusion and Suggestions: We observed decreasing trend of MDR-TB cases numbers from 2008 to 2015. This drug-resistance survey could be extended to analyze patient's clinical data to reveal causes of drug-resistance. The MIC results of repurpose drugs could be used to design suitable regimens for treating MDR-TB cases. Of 196 MDR-TB cases, 80.1% (157/196) of fluoroquinolone and second-line injectable drugs susceptible cases might be qualified to be treated with a short-course regimen. Whereas, 15.1%(28/185) of moxifloxacin, 14.6%(27/185) of ofloxacin, 4.9%(9/185) of gatifloxacin, 11.4% (21/185) of levofloxacin and 3.8%(7/185) of second-line injectable drugs resistant cases might be qualified to be treated with bedaquiline-containing regimen for 94.4%(185/196) of clofazimine susceptible cases.

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

貳、本文

一、前言

多重抗藥性結核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)是指病人感染對於目前最有效的第一線抗結核藥物 isoniazid 及 rifampin 同時具有抗藥性之結核菌株。由於 MDR-TB 的案例逐年增加，已威脅到全球結核病的控制。依據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO)指出，2012 年粗估全球約出現 45 萬 MDR-TB 個案，共佔總結核病案例的 3.6% ，其中約有 20.2%是先前治療過結核病的個案；值得注意的是，約有 50%的 MDR-TB 個案集中在亞洲地區。因 MDR-TB 的治療困難度高與效果不佳，於 2012 年已造成 17 萬病患死亡，這些個案其中有些包括與 HIV 共病。且治癒率僅達 46%-56%【1】。

此外，防堵廣泛抗藥性結核病 (extensively-drug resistant TB, XDR-TB)的傳播更是當務之急。因為 XDR-TB 除了對一線抗結核藥物 isoniazid 及 rifampicin 抗藥外，並同時對二線藥中任一種 fluoroquinolone 及至少一種注射型二線藥物 (capreomycin、kanamycin 及 amikacin)產生抗藥性。因為對第一線與第二線藥物都產生抗藥性，可選擇的治療藥物受到嚴重的限制，所以 XDR-TB 更難以獲得適當的治療。

藥物使用不當及作用濃度不足容易導致結核菌產生抗藥性，而抗藥性的出現無異使結核病防治更加困難。因為許多曾被使用來治療 MDR-TB 的二線藥物，其藥效有限、副作用較大且常供應短缺，而限制了使用範圍。此外，抗藥性結核病治療所需巨額的成本，限制了 MDR-TB 照護與管理策略的推展，所以世界上絕大多數的 MDR-TB 沒有受到充分且適當的治療。由於新藥的研發是個必要且緩慢的過程，從實證研究到上市往往需要非常多年的時間，但抗藥性結核病患者的

治療與管理對於新藥的需求卻是非常迫切。

許多商業上已上市藥物已被證實具有抑（殺）結核菌的效果，但由於實驗室及臨床證據不足、藥物會造成明顯的副作用或價格高昂等因素，因此未被納入常規治療使用。通常一個藥物要被使用在 MDR-TB 臨床治療上，須具有完整抑（殺）菌能力試驗、嚴謹且廣泛的體外試驗及動物安全性試驗等以證實其可行性。而本研究使用包括甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 (trimethoprim-sulfamethoxazole)、美化喹寧 (mefloquine)、阿莫西林-克拉維酸鉀 (amoxicillin-clavulanate)、美羅培南 (meropenem)、氯法齊明 (clofazimine)、硫利達嗪 (thioridazine)、莫西沙星 (moxifloxacin)、硝唑尼特 (nitazoxanide) 及羥基得泰松 (oxyphenbutazone)，這些藥物已經被證實其安全性和低毒性，亦被美國食品藥物管理局 (Food And Drug Administration, FDA) 核可上市，並廣泛使用於非結核病的其他臨床適應症治療，且價格便宜。但是這些藥物缺乏對多重抗藥性結核菌的殺（抑）菌效果相關完整研究，且並未確實地指出可能用於 MDR-TB 的治療。如果實驗可證實這些藥物對於多重抗藥性結核菌的殺（抑）菌效果，將有可能被考慮納入治療 MDR-TB 的藥物組合之一。

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

TMP-SMX 結合從兩類抗生素：二氫葉酸還原酶 (dihydrofolate reductase) 抑制劑 (trimethoprim) 和磺酰胺 (sulfonamide)

(sulfamethoxazole)，兩者會抑制細菌 DNA 的合成所需之四氫葉酸 (tetrahydrofolate) 的合成。在 1960 年代首次引入 TMP-SMX 為固定劑量的組合 (combination fixed dose)，被廣泛用於治療上和下呼吸道感

染和泌尿系統感染，並且可能是最廣泛地用於治療和預防由 *P. jiroveccii* 引起的肺孢子蟲肺炎的藥物。研究已經反覆證明，TMP-SMX 可顯著降低愛滋病毒和結核病共同感染的死亡率【2-4】，這可能是因為它對結核病具有療效。在 1940 年代就已記載 sulfanomides 及 sulfones 治療結核病上的療效【5-9】，然而報告數據仍有些不一致。因此，是否使用這些藥物用於治療結核病，則因為有更有效且安全的藥物(如 INH 和 RIF)的開發後，大致上放棄進一步驗證其適用性。後續在 1970 年代初期，有限的研究報導結核菌對 TMP 和 SMX 的抗藥性【10】，但未經過驗證。後續的報導認為 prevalent TB 可能對此類藥物產生抗藥性【11, 12】；然而自 1980 年代即有數據記載 SMX 對各種分枝桿菌（慢速和快速生長菌）是具有抑（殺）菌能力【13】。最近的研究指出，實驗室的結核菌對 TMP-SMX 具有易感性 (susceptible)【14, 15】。總而言之，這些研究提供了重要的證據。其他最近的研究描述可能的藥物作用標的，這或許可以解釋 sulfonamides 對抗分枝桿菌的活性的機轉【16】。最近亦有研究表示 TMP-SMX 對 MDR TB 患者可能有療效【17】，但是效能仍未明。TMP-SMX 有良好的長期使用安全性，已無專利(off-patent)且便宜；如果發現對 MDR-TB 是有效的，它可以成為有用的複合藥物處方之一【18, 19】。

甲氟喹(mefloquine)

Mefloquine 是在 1970 年代開發的一種奎寧(quinine)衍生物，係 4-喹啉甲醇(4-quinoline methanol)，原是始用於瘧疾治療。但對非結核分枝桿菌（尤其是鳥分枝桿菌複合體(*M. avium* complex)【20, 21】具有活性；有限的研究證明，對結核菌亦有效【20,22,23】。但是，

它並未被大規模的研究或廣泛用於結核病的治療。然而，因為它具有抗結核病療效，致使研究人員試圖發展的 mefloquine 衍生物更有效對抗 *M. tuberculosis*【24-26】。Mefloquine 的作用機制仍不明【26】，被認為是部分作用於 ATP 合成酶【27】。

阿莫西林-克拉維酸鉀(amoxicillin-clavulanate)

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

美羅培南/克拉維酸(meropenem/clavulanic acid)

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

氯法齊明(clofazimine)

Clofazimine (原名稱為 B663) 係 rimirinophenazines 類藥物，是於

1954 年合成的抗結核藥物【31】，但是因為在動物試驗無藥效而被擱置【31, 33】，直到被證實對漢生病有療效才再受重視。

Riminophenazines 的特性包括：可在單核吞噬細胞的細胞內積累、抗藥性發生率較低、新陳代謝消除緩慢和具抗消炎活性【33】。然而 riminophenazine 抗結核活性的真正機轉，一直未明確被證明【31, 33】。其可能的作用機轉包括：生成細胞內的過氧化氫；或是與 DNA 的鳥嘌呤鹼基結合，抑制細菌複製【33-36】。重要的是 clofazimine 似乎很少會產生抗藥性【33】，也不會與 riminophenazines 類或其他抗結核藥物產生交互抗藥(cross-resistance)【37】；此外，已證明 clofazimine 可抑制 INH 產生的抗藥性及 *in vitro* 實驗證明其與 INH 有協同作用活性(synergistic activity)【38】。有趣的是 clofazimine 和其他 riminophenazines 類藥物具有在巨噬細胞內運輸藥物獨特的能力【33】。初步瞭解 clofazimine 可用於治療 MDR【39】。

硫利達嗪 (thioridazine)

Phenothiazines 類是 1950 年代首次合成的精神病用藥。phenothiazines 在臨床使用後不久，其抗菌的效能即被發現。但是，因為當時係為各類抗生素發展的新時代，而很少受到重視。然而，由於微生物抗藥性的問題日異嚴重，phenothiazines 類藥物才重新受到關注。根據研究報導指出，phenothiazines 作用於多項分枝桿菌細胞運轉過程中，包括抑制外排泵(efflux pump)活性【28, 29】、參與細菌呼吸的 NADH₂-甲基萘醌氧化還原酶 (menaquinone oxidoreductase) 和脫氫酶 (dehydrogenase)【30-32】、阻止鈣與蛋白質結合質的 calmodulin 拮抗【33, 34】，及作用於分枝桿菌細胞壁。因此，phenothiazines 類可以使用於多標的藥物複方中【31】，也因此

有可能較不易產生抗藥性。phenothiazines 也可用為結核病治療的有效佐劑，因為在 *in vitro* 實驗中發現對 rifampin、streptomycin 及 amikacin 有協同作用效果【29】，此可能是因為提高藥物在細胞內的累積量所致。此外，phenothiazines 有可能改善因為治療藥物(如 cycloserine)導致的精神病(psychosis)【30】。

莫西沙星(moxifloxacin)

Moxifloxacin 在 1962 年首次發現，用於治療革蘭氏陰性導致的尿道感染【50】。fluorine moiety 顯著增強藥物活性，並藉由各種側鏈(side chains)的設計，合成出許多不同的 fluoroquinolones 類藥物。Moxifloxacin 對廣泛的細菌具有活性，並越來越多的證據證明其安全性和適用範圍。雖被運用於治療抗藥性 TB【51】，很少實驗室的研究研究其 MICs。

硝唑尼特 (nitazoxanide)

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

羥基得泰松(oxyphenbutazone)

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

以上所列藥物皆對 *M. tuberculosis* 具有活性的理論基礎，但實驗及臨床證據尚有限，建議在現行使用的二線藥物外，進一步探討這些藥物對 MDR 及 XDR *M. tuberculosis* 的抗菌效果。Bedaquiline (Sirturo, TMC207) 為 diarylquinoline 類的藥物，作用機制是抑制結核菌 ATP 合成酶，在第二期的臨床試驗顯示對於 MDR 病患，在優化的藥物組合治療 8 週下，可加速個案痰陽的陰轉時間【81】。2015EUCAST(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)亦定出 Bedaquiline 的臨界濃度為 0.25 μ g/mL【84】。

世界上絕大多數的抗藥性結核病人仍未受到充分且適當的治療。由於新藥物從研究、實證到上市是個緩慢的過程，但是對於新藥的需求卻是必要與迫切的。因此，確認可有效治療抗藥性結核病的藥物，並使用於臨床治療與管理 MDR 結核病人是當務之急。目前，許多曾被使用在治療 MDR 結核病的二線藥物，多有藥效有限、副作用較大、高昂價格且常供應短缺的限制。本研究針對上述藥物，收集分送至疾病管制署分枝桿菌參考實驗室進行確認的 MDR-TB 及 XDR-TB 菌株，進行藥敏試驗測試研究、建置菌株庫及方法學建立，重新定義(re-purpose)既有藥物對結核菌株的殺(抑)菌效果。主要實施的藥物敏感性試驗方法為瓊脂平板法及

Resazurin Microtiter Assay (REMA)，利用各藥物的序列稀釋濃度中，找出可抑制 99% MDR 結核菌株生長的最小抑制濃度 (minimum inhibition concentrations, MICs)。當再定義的藥物對抗結核菌的作用被確認後，可能可與舊藥物合併使用於治療，以增加病患臨床療效及避免藥物的毒性與減少抗藥性的產生。因此，本研究進一步探討新藥與舊藥併用時，對結核菌的最低抑菌濃度是否可達到協同(synergy)、加成(additivity or indifference)及拮抗作用(antagonism)【82】。

預期成果可以提供重新定義藥物之藥物敏感試驗結果，供 MDR 照護團隊參考，評估最適用藥組合以提高 MDR 及 XDR 結核病治癒率嘉惠病人。同時，藉由分析歷年的二線藥物抗藥比例及抗藥型態，加強臺灣的結核病抗藥性監測，確認是否有全抗藥性 (totally drug-resistant, TDR)結核病菌株的產生，以評估 DOT-Plus 治療 MDR 等結核病人的策略成效。

二、材料與方法

(一) 材料

由醫療院所結核病實驗室分送菌株至疾病管制署，進行藥敏結果確認及二線藥敏檢驗之結核菌，含：2013 年 1 月至 2015 年 10 月期間之 MDR 及 RMP 單一抗藥菌株，及 2007 至 2015 年 XDR 菌株經鑑定及一、二線藥敏試驗後，再進行新定義之待測 11 種 MICs 藥物敏感性測試等。各藥物 MIC 檢測結果筆數不同，以單一藥物最大筆數計測試 MDR(不含 XDR)341 株、非 MDR 測試 115 株、XDR 測試 52 株及 58 株 H37Rv (ATCC® 27294™)標準菌株。

(二) 實驗方法

1. 自行配製之含藥物培養基之確效試驗

- (1) 將 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) 序列稀釋 1%、2%、4%、6%、8%、10%、12% 及 14%，接種 H37Rv 菌液，以測試結核菌是否會受藥物配製所使用的 DMSO 溶劑而影響生長。
- (2) 使用 H37Rv (ATCC[®] 27294™) 為品管測試組，測試自行配製藥物 96 孔盤藥物穩定性。以瓊脂比例法 (agar proportion method) 為標準【56】，比較自行配製 REMA 測試盤及 MYCOTBI plate (Sensititre[®]) 在 moxifloxacin 及 isoniazid 二項藥物的敏感性、專一性及正確率。

2. 藥物敏感性試驗

(1) 菌株培養

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

(2) 菌種鑑定

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

(3) 藥敏試驗實驗方法

3.1 Resazurin Microtiter Assay (REMA)

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

3.1.2 藥物配製

根據查找文獻建議, 選取已有研究提出的對結核菌有抑(殺)菌效果的 13 種藥物標準品及已有研究報告的 MICs 濃度範圍做藥敏測試, 藥物品項為 trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX)【59】、mefloquine【18-21】、amoxicillin/clavulanate (AMC/CLAV)【60】、clofazimine (CFM)【61-63】、meropenem/clavulanate(MEPM/CLAV)【64】、thioridazine (TDZ)【65】、nitazoxanide (NTZ)【66】、moxifloxacin (MOX)【67】、oxyphenbutazone (OPBZ)【68】、linezolid (LZD)及 INH。OPBZ 購買自 Tolunto 廠牌, Potassium clavulanate 購買自 Fluka 廠牌 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), INH 及 Resazurin 購買自 Sigma 廠牌(Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 其餘 10 種藥物購買自 USP (U.S. Pharmacopeia) 廠牌。

配製時使用 DMSO 溶解藥物: DMSO 濃度在 nitazoxanide 的配製中使用 2%, 其餘藥物均低於 2%。藥物儲備溶液 (stock solution)製備所需溶劑及濃度列於表三。藥物儲備溶液須先經 0.22 μ L 濾膜過濾後, 冷凍於 -80 °C 保存, 其使用以解凍 1 次為原則。自行製備藥敏盤之藥物使用溶液 (working solution) 除了 Oxyphenbutazone 不以 2 倍連續稀釋而需個別配製外, 藥物配製濃度為測試濃度之 4 倍。液態培養基使用 Middlebrook 7H9

(pH 6.6 ± 0.2)，惟 Oxyphenbutazone 使用酸性 pH 6.1-6.15 之 7H9 (含 0.6% KH₂PO₄、0.2% 甘油及 10% OADC (Oleic acid, Bovine albumin, Dextrose, Catalase))，接種菌液製備於 pH 6.6 ± 0.2 之 7H9，與含藥培養基混合後，最終 pH 值為 6.1-6.15。Meropenem / Clavulanate 之 7H9 製備時含 Clavulanate 濃度固定在 5.0 µg/mL，菌液與含藥培養基混合後，最終 Clavulanate 濃度為 2.5 µg/mL【64】。除 Oxyphenbutazone 濃度不是 2 倍連續稀釋而需個別製備外，藥物儲備溶液 (stock solution) 稀釋於 7H9 製備成藥物使用溶液 (working solution)，分裝在 96 孔盤進行 2 倍濃度的序列稀釋，96 孔盤外緣四邊孔格全數補足 200 µL 之無菌水，以避免培養期間培養基因液體蒸發而體積減少。製備完畢之藥敏盤須於當日加入菌液進行培養測試。MIC 藥物品項、最終測試濃度 (final drug concentration)，單一藥物 96 孔盤配製如表四。將所有測試菌的 MIC 值由低至高排列，計算 MIC₅₀ 及 MIC₉₀。MIC₅₀ 是指可以抑制 50% 測試菌之最低抗生素濃度；MIC₉₀ 是指可以抑制 90% 測試菌之最低抗生素濃度【85】。再藉由 MIC 分布圖，將最高的抑菌濃度定義為 The epidemiological cut-off value (ECOFF)，以 ECOFF MIC 將野生株及抗藥株做區分【83】。

藥物協同作用縱橫交錯試驗 (checkerboard assay)，是於 96 孔盤配製藥物之排列如表六。評估 clofazimine 及 ethambutol 藥物協同作用則依 fractional inhibitory concentration index (FICI) 進行計算【79,80】：

$$FICI = \frac{\text{MIC drug A combination}}{\text{MIC drug A alone} + \text{MIC drug B combination}} / \frac{\text{MIC drug B alone}}$$

FICI \leq 0.5 為藥物間有協同作用；0.5<FICI \leq 2 則無顯著效益；FIC $>$ 2 為拮抗作用。

3.1.3 藥物敏感性試驗步驟

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

3.1.3.2 接種完畢之 96 孔盤用塑膠袋封好，置入 35-37 $^{\circ}$ C 溫箱培養。

3.1.3.3 培養 7-10 天後，加入 0.02%的 resazurin，於 48-72 小時後觀察顏色變化。若為藍色判定為敏感，若為粉紅色(需與對照組一樣粉紅)則判定為抗藥，最低的藥物敏感濃度(藍色)即為最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

3.1.3.4 將 Sheep blood agar(BD[®])置入 35 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C 溫箱中，培養 48 小時觀察有無污染菌生長。菌落計數之 Middlebrook 7H11 瓊脂平板培養基置入 35-37 $^{\circ}$ C 溫箱中培養約 14 天，待單一菌落生長至肉眼可觀察及單一菌落間生長未融合前，以解剖顯微鏡輔助觀察菌落型態及菌落計數。藥物配製及菌液之接種流程，詳見附錄標準操作流程文件。

3.2 7H11 瓊脂平板法

3.2.1 藥物配製: 藥物品項及 stock solution 與 REMA 法相同。配製濃度列於表五。固態培養基使用 Middlebrook 7H11 (pH 6.6 ± 0.2)，惟 Oxyphenbutazone 使用酸性 pH 6.1-6.15 之 7H11 製備。OADC 為培養結核菌必須添加之營養添加劑，滅菌後之瓊脂再加入 10% OADC，為避免 OADC 於高溫變質 (變白)與瓊脂於過低溫而凝固，製備過程需搭配水浴槽的使用，使瓊脂保持液態於 55-65°C 之適當溫度範圍。製備完畢之藥敏盤待凝固後，倒放並冷藏儲存於 2-8°C 備用，藥敏盤效期為 1 個月。

3.2.2 藥物敏感性試驗步驟

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

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

3.2.2.3 結果判讀為每四分格生長量記錄如下：>500 菌落 4+、200-500 菌落 3+、100-200 菌落 2+、50-100 菌落 1+，<50 菌落則記錄實際菌落數目。比較含藥與不含藥控制組培養基之生長菌落數，高於 1%為抗藥，反之為敏感；最低的藥物敏感濃度即為最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)【56】。

(4) 統計分析

利用 excel 進行計算及圖表分析製作，含 H37Rv(ATCC® 27294™)

共計 515 株菌株在各 MIC 序列稀釋濃度的個數以百分比進行統計，計算各藥物的 MIC 濃度分佈個數是否有顯著差異， p -value <0.05 定義為有顯著差異。

5. 抗藥性監測

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

三、結果

(一) 2007-2015 年多重抗藥性個案菌株抗藥性資料分析

自 2007 年至 2015 年 10 月 30 日止，共送驗 1,425 位多重及超級抗藥性個案結核菌株，包含新個案 1,003 位(70.4%)、再治療個案 422 位(29.6%)。女性占 391 位(27.4%)，其中 290 位為新個案；男性 1034 位(72.6%)，其中 713 位為新個案。各年度送驗個案分別為：2007 年 131 位含新案 78 位(59.5%)、2008 年 322 位含新案 198 位新案(61.5%)、2009 年 183 位含新案 122 位(66.7%)、2010 年 159 位含新案 114 位 (71.7%)、2011 年 158 位含新案 113 位 (71.5%)、2012 年 133 位含新案 106 位(79.7%)、2013 年 129 位含新案 102 位 (79.1%)、2014 年 116 位含新案 93 位(80.2%)及 2015 年 94 位含新案 77 位(81.9%)。統計結果顯示，2007 至 2015 年每年新個案比例逐年有顯著的上升趨勢；再治療個案則有顯著的下降趨勢(圖二)。

各年齡層送驗比例為：0-14 歲 6 位(0.4%)、15-24 歲 73 位 (5.1%)、25-34 歲 164 位(11.5%)、35-44 歲 198 位(13.9%)、45-54 歲 312 位(21.9%)、55-64 歲 280 位(19.7%)及大於 65 歲之 392 位(27.5%)，進一步觀察每年通報個案的年齡分布，結果顯示，大於 65 歲的個案佔每年通報個案中約 30%；而每年約有 40%的個案介於 45 至 64 歲之間(圖三)。個案中，71 位(5.0%)有肋膜積水、75 位(5.3%)併有肺外結核。而 575 位肺外結核個案以其他器官結核 22 位(29.3%)最多，後依序為胸肋膜結核 17 位(22.7%)、淋巴結核 14 位(18.7%)、骨及關節結核 10 位(13.3%)等(表一)。刪除 14 位無初痰抹片結果個案後，1,411 位送驗個案中，842 位(59.7%)為抗酸菌染色抹片陽性，資料顯示，多重抗藥性結核病個案之抗酸菌抹片陽性比例每年約有 60%(圖四)。此外，我們也發現，抹片與培養同時陽性的個案有逐年

上升的趨勢(圖五)。刪除 2 位無胸部 X 光檢查個案後，1,423 位送驗個案中，胸部 X 光正常者 26 位(1.8%)、異常但無空洞者 940 位(66.1%)、異常且有空洞者 443 位(31.1%)、異常但無關結核病者 14 位(1.0%)(表二)。

多重抗藥性結核病各年在臺灣各區空間上的分布變化，如圖一所示。分析 2007-2015 年送驗之 1,425 位多重及超級抗藥性個案結核菌株抗藥資料(圖六):

(1) 分析 1,003 位新個案及 422 位再治療個案之資料顯示，MDR 菌株對於各個抗結核藥物的抗藥比例，分別為：pyrazinamide (PZA) 24.7%-47.6%、ofloxacin (OFX) 9.5-44.2%、moxifloxacin (MOX) 9.5-18.1%、gatifloxacin (GAT) 為 1.5-5.0%、kanamycin (KM) 3.4-11.6%、amikacin (AM) 2.2-12.8%、capreomycin (CAP) 1.7-7.5%、para-aminosalicylate (PAS) 3.7-23.8%及 ethionamide (EA) 15.0-36.8%。分析結果顯示，截至 2015 年，AM、KM、OFX、PAS 及 PZA 的抗藥性比例皆有顯著下降(AM、EA、PZA， $P < 0.05$ ；OFX、PAS， $P < 0.0001$)。資料也顯示，奎寧類藥物的抗藥性比例在 2015 年有上升的現象。進一步以個案的分類來做比較，結果顯示，OFX 及 PAS 在新個案及再治療個案皆有顯著的下降，其他藥物則沒有顯著的差異。另外，年齡層與抗藥性的相關性分析顯示，在新個案當中，四種奎寧類藥物的抗藥性比例，隨著年齡增加而顯著下降；而三種針劑藥物的抗藥性比例，反而隨著年齡增加而顯著上升。然而再治療個案則無此現象(圖七)。

(二) 建立抗藥性最低抑菌濃度及藥物協同作用檢測方法

(1) 建立 REMA 法與標準瓊脂試驗之間接藥物感受性試驗，測試

結核菌最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)方法。

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

(2) 測試 DMSO 是否會抑制結核菌株生長

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

(3) 測試自行配製藥物培養基的穩定性

製備的新批號藥敏培養基，均以 H37Rv 標準菌株進行測試。REMA 法及標準瓊脂試驗法所測得之最低抑制濃度(MIC, µg/mL)結果分佈如表七。REMA MIC (µg/mL)分佈如下：Meropenem-Clavulanate 為 1/2.5-16/2.5 (n=55)、Oxyphenbutazone 為 \leq 20-90 (n=57)、Mefloquine 為 4-16 (n=57)、Amoxicillin-Clavulanate 為 4/2-64/32 (n=56)、Clofazamine 為 0.06-2 (n=56)、Thioridazine 為 2-16 (n=58)、Nitazox 為 4-32 (n=57)、

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

Moxifloxacin 為 0.03-0.5 (n=57)、Trimethoprim-Sulfamethoxazol 為 0.1/2-0.8/16 (n=57)、INH 為 \leq 0.03-0.25 (n=56)、Linezolid 為 0.12-1 (n=57)。標準瓊脂試驗法分佈如下：Meropenem-Clavulanate 為 8/2.5- $>$ 16/2.5 (n=6)、Oxyphenbutazone 為 40-80 (n=6)、Mefloquine 為 4-8 (n=7)、Amoxicillin-Clavulanate 為 32/2-64/32 (n=6)、Clofazamine 為 \leq 0.12-1 (n=7)、Thioridazine 為 8-16 (n=7)、Nitazox 為 4-16 (n=7)、Moxifloxacin 為 0.25 (n=6)、Trimethoprim-Sulfamethoxazol 為 0.2/2-0.8/16 (n=7)、INH 為 0.06-0.12 (n=7)、Linezolid 為 0.5-1 (n=6)。由 MIC 分布結果顯示，11 種 repurpose 藥物的範圍分布：(1)在液態微量滴定 REMA 法介於 3-6 個 2 倍連續稀釋梯度；而(2)標準瓊脂法介於 2-5 個 2 倍連續稀釋梯度。日前常規 CLSI 已有確定臨界濃度之 moxifloxacin 及 INH，在標準瓊脂試驗法僅介於 1-2 個 2 倍連續稀釋梯度。液態微量滴定法的 MIC 分布梯度，比標準瓊脂法分布較廣，詳圖九。此為微量測試法運用時之可能限制。

(三) 執行新定義之待測 11 種藥物 MICs 測試

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

(2) 完成 REMA 藥敏測試共計 508 株。包含(a) 115 株非 MDR 菌株，及(b) 341 株 MDR 菌株，其中 60 株 pre-XDR (12 株為對 CAP, KM, AM 任一抗藥及 48 株為對 fluoroquinolone 任一抗藥)，及(c)52 株 XDR 菌株。

(3) 341 株 MDR 菌株測試結果分析

表八列出 MIC50 及 MIC90，及隨機選取的 20 株菌株的標準瓊脂試驗法結果。(a) REMA 法 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)：在 Meropenem-Clavulanate 為 $\leq 0.12/2.5 - > 16/2.5$ (n=335)、Oxyphenbutazone 為 $\leq 20 - 90$ (n=336)、Mefloquine 為 $\leq 0.5 - 16$ (n=337)、Amoxicillin-Clavulanate 為 $2/1 - > 64/32$ (n=335)、Clofazimine 為 $\leq 0.03 - 4$ (n=338)、Thioridazine 為 $\leq 1 - 16$ (n=336)、Nitazox 為 $\leq 1 - 64$ (n=338)、Trimethoprim-Sulfamethoxazole 為 $\leq 0.05/1 - 7/128$ (n=341)、INH 為 $\leq 0.03 - > 4$ (n=341)、Linezolid 為 $\leq 0.06 - 1$ (n=336)、Moxifloxacin 為 $\leq 0.015 - > 4$ (n=339)；(b) 而標準瓊脂試驗法最低抑制濃度(MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$)分佈如下：Meropenem-Clavulanate 為 $1/2.5 - > 16/2.5$ (n=11)、Oxyphenbutazone 為 $\leq 20 - 80$ (n=16)、Mefloquine 為 $8 - 16$ (n=20)、Amox-Clavulanate 為 $16/8 - > 64/32$ (n=16)、Clofazimine 為 $0.06 - > 2$ (n=20)、Thioridazine 為 $8 - 16$ (n=20)、Nitazoxanide 為 $4 - 16$ (n=20)、Moxifloxacin 為 $0.06 - > 2$ (n=16)、Trimethoprim-Sulfamethoxazole 為 $\leq 0.05/1 - 1.7/32$ (n=20)、INH 為 $0.06 - > 4$ (n=20)、Linezolid 為 $0.25 - 1$ (n=16)。MIC 分布結果顯示，除了 INH 及 Moxifloxacin 外，其他 9 種新藥的範圍分布在液態微量滴定 REMA 法介於 5-8 個 2 倍連續稀釋梯度；標準瓊脂法介於 2-6 個 2 倍連續稀釋梯度。液態微量滴定法的 MIC 分布梯度比標準瓊脂法分布較廣。

藉由 MIC 分布圖，將最高的抑菌濃度定義為 The epidemiological cut-off value (ECOFF)，以 ECOFF MIC 將野生株及抗藥株做區分，初步建立流行病學上的臨界濃度值(表九)。

此部分實驗亦進行配製接種菌液的菌落計數共完成 386 株，已經完成菌落數目計算：55 株為 10^4 cfu/mL、217 株為 10^5 cfu/mL、102 株為 10^6 cfu/mL、12 株為 10^7 cfu/mL。證明操作技巧及方法穩定性

良好。此外，在檢驗時效性方面，計算 338 株 MDR 菌株 REMA 方法所需培養天數含加入 resazurin 再培養 48-72 小時，REMA 總共從檢體接種至完成結果報告判讀時效平均為 13.3 天，而標準瓊脂法則需 21 天。

(4) 52 株 XDR 結核菌株測試結果分析

以 REMA 法及標準瓊脂試驗法進行 52 株 XDR 菌株的 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 測定結果 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 分佈(表八)。XDR、MDR(不含 XDR)、非 MDR 及 H37Rv 之間均僅介於 1 個 2 倍連續稀釋梯度。Clofazimine 在 XDR 及非 MDR 的 MIC₉₀ 比 MIC₅₀ 介於 3 個 2 倍連續稀釋梯度，其餘藥物的 MIC₉₀ 與 MIC₅₀ 僅介於相同至 1 個 2 倍連續稀釋梯度。此些 repurpose 藥物測試結果，XDR 菌株與非 XDR 菌株間之結果並無差異。

(5) 協同作用結果分析

以 REMA 法進行 31 株 MDR 菌株，測試 clofazimine 與 ethambutol 之 FICI 結果如表十。clofazimine 的臨界濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而 ethambutol 的臨界濃度為 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。結果顯示該 2 藥物有相互間有加成作用(additional effects)，但無協同或拮抗作用(synergistic or antagonist effects)。當加入 ethambutol 後，31 株的 clofazimine MIC 介於 0.03 -0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如果比較 clofazimine 單獨使用，與 clofazimine/ethambutol 合併使用的 MIC 結果，發現 clofazimine/ethambutol 合併使用後，其中有 29 (93.5%) MDR 菌株的 clofazimine 的 MIC 值會下降 2-4 個藥物 2 倍連續稀釋濃度。再比較 ethambutol 單獨使用，與 ethambutol/clofazimine 合併使用後

的 MIC 結果，顯示加入 clofazimine 後，31 株的 ethambutol 的 MIC 介於 0.25-8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。結論是 **ethambutol/clofazimine** 合併使用後，**31 株 ethambutol 的 MIC 值下降 2-3 個藥物 2 倍連續稀釋濃度，變成敏感菌株。**

(6) 分析 47 株 MDR(不含 XDR)菌株對 5 種 fluoroquinolone 類藥物的交叉抗藥比例：ofloxacin、moxifloxacin、levofloxacin、gatifloxacin 及 ciprofloxacin 同時抗藥的比例為 36.2%(17/47)。分析 47 株 ofloxacin 抗藥菌株與 4 種 fluoroquinolone 類藥物的交叉抗藥比例：其中，moxifloxacin 同時抗藥的比例為 97.9%、gatifloxacin 同時抗藥的比例為 36.2%、ciprofloxacin 同時抗藥的比例為 76.6%及 levofloxacin 同時抗藥的比例為 83.0% (圖十)。此分析顯示：**如果 MDR 菌株對 ofloxacin 產生抗藥，則 moxifloxacin 抗藥的可能性極高，建議臨床選用藥物時，可考慮使用 gatifloxacin。**

(7) 2013-2014 年 MDR-TB 個案之 249 株結核菌之 clofazimine 之 MIC，以了解做為 MDR-TB 治療之有效性。249 株中，有初步實驗結果發現，以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 做為 clofazimine 的藥物敏感性試驗之 breakpoint，則 MIC 分布於 0.06 ->4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間；其中，6.8% MDR-TB 個案之菌株對 clofazimine 具抗藥性，並此次分析發現與 ofloxacin 及 moxifloxacin 藥物之抗藥性相關($p=0.026$)。

(四) 統計分析

共完成 515 株菌株試驗。分析 11 種新測試藥物於 MDR(不含 XDR)、H37Rv、XDR 及非 MDR 菌株，依據 MIC 各個值分佈個數，計算的 p -value 結果。未統計 INH 的 MIC 分佈的 p 值；MDR、simple MDR

與 XDR 亦未統計 moxifloxacin 的 MIC 分佈的 p 值。統計結果顯示：
MDR(不含 XDR)、H37Rv、XDR 及非 MDR 菌株其對於測試的 11 種藥物，
各個 MIC 值的分佈個數，計算分佈個數無差異(p -value <0.05)。

四、討論

(一) 抗藥性監測

先前的文獻已指出，臺灣相對於其他國家有較高的 MDR-TB 新個案盛行率【70】。呼應本監測資料顯示，MDR-TB 通報個案數雖然逐年下降，但仍然佔每年新通報結核病個案數的 1%，佔再治療個案的 6-7%，且每年新個案通報比例顯著上升(圖二)。此外，文獻亦指出再治療個案與治療過程中產生抗藥性有關，而新案的發病通常與抗藥性無關，可能是由其他共病因素造成的【70】。MDR-TB 個案分布多集中於都會區(圖一)，與本署所認可之 33 家結核病實驗室分布大致相同，有助於 MDR-TB 個案及早的被發現與治療。

臺灣每年通報一般結核病的比例約有 50%的個案大於 65 歲，相對於一般結核病，本監測報告發現 MDR-TB 個案的年齡分布，超過 50% 個案為 35-64 歲。尤其在 2015 年 35-54 歲的個案數有增加的現象，此發現更與先前研究指出小於 65 歲的個案更容易發展成 MDR-TB 的結果互相應證【72】。此外，根據 WHO 的報導，在大部分國家 MDR-TB 個案比例，亦有隨著族群年紀增加而減少的趨勢【73】。

根據胸部 X 光檢驗結果顯示，在 1,423 名個案當中，仍有將近 3% 的個案被診斷為正常或無關結核病，顯然並無法完全依賴胸部 X 光做為排除結核病個案的條件，建議宜搭配快速細菌學或其他分子診斷工具的運用，輔助臨床診斷。此外，MDR-TB 個案抗酸菌抹片陽性平均為 59%，高於一般通報 TB 個案的約 40%；資料亦顯示，自 2008 年起，MDR-TB 個案抹片及培養同時陽性的比例，有逐年升高的趨勢。至 2015 年更是超過 80%。一方面可能是實驗室的檢驗實驗室工具運用得宜且品質全面提升，使得結核菌檢出率變高；另一方面則可能是因為個案宿主特性或延遲診斷等因素。抗酸菌抹片陽性所可能導致的傳播，反

應在新案數目上，防治策略宜再思考。

自 2007 年起，因結核病治療政策實施，明定結核病個案在被確診之前不得使用 fluoroquinolone 類藥物做為處方，而本抗藥性監測資料指出，個案對於 ofloxacin 的抗藥性比例的確有顯著的下降。過去文獻指出都治政策確實可有效降低菌株抗藥性，同時我們也觀察到截至 2015 年，PZA、KM、AM 及 PAS 等藥物之抗藥性比例皆有明顯的下降，【71】。值得注意的是，2015 年 fluoroquinolone 類藥物的抗藥性比例有回升的現象。由於 fluoroquinolone 類藥物產生抗藥的個案，有高可能性會發展成廣泛性抗藥性結核病(XDR-TB)，照護的挑戰較高。雖然多篇文獻指出 fluoroquinolone 仍可作為治療 XDR-TB 的藥物【74-76】，但 fluoroquinolone 類藥物的 MIC 分布結果，難以界定菌株之抗藥性與敏感性，WHO 甚至將 moxifloxacin 的臨界濃度提高為 2 mg/L【77】。

根據先前文獻報導，新個案對於任一項一線抗結核藥物的抗藥性比例，有隨著年齡上升而下降的趨勢【78】。本研究發現，MDR-TB 新個案對於二線 fluoroquinolone 類藥物的抗藥性比例，亦隨著個案年齡增加而有下降趨勢；然而，對於二線針劑藥物的抗藥性比例，反而是隨著個案年紀增加而有上升趨勢，造成因素在不同年齡層與新舊案之差異，值得更深入探討。

(二) 抗藥性試驗

進行新藥測試的 MDR 菌株，其瓊脂平板法二線藥抗藥型態統計，其中，含 286 株 simple MDR(對二線針劑及二線 fluoroquinolone 敏感的 MDR 菌株)、52 株 XDR 及 60 株 pre-XDR(pre-extensively drug resistant)，pre-XDR 中有 12 株對任一種二線針劑抗藥、48 株對任一種

二線 fluoroquinolone 抗藥，二線藥藥敏試驗結果詳圖八。試驗方法學建立方面，使用 DMSO 為溶劑溶解藥物標準品最高濃度不可高於 2%。本研究建立的自行配製藥敏測試盤，可以準確測試待測試藥物的 MIC。已完成的標準操作流程(SOP)文件 3 份。可供國內外研究單位及實驗室，做為測試一般抗生素或新藥開發所需執行結核菌藥敏試驗時間，藥物配製及接種判讀參考依據。

H37Rv 菌株的 MIC 分布結果顯示 11 種新藥的範圍分布在液態微量滴定 REMA 法介於 3-6 個 2 倍連續稀釋梯度；標準瓊脂法介於 2-5 個 2 倍連續稀釋梯度。常規已有操作之 moxifloxacin 及 INH 在使用 H37Rv 的標準瓊脂試驗法結果僅介於 1-2 個 2 倍連續稀釋梯度。不同方法學的 MIC 可能產生結果的差異，但應不會相差 1 個梯度以上的連續二倍稀釋【83】，實驗結果顯示標準瓊脂試驗法與 REMA 法符合 1 個梯度的連續二倍稀釋範圍。然而，REMA 法的 MIC 分布濃度比標準瓊脂試驗法偏高，可能原因為 REMA 法根據呈色反應，瓊脂試驗法根據含藥實際菌落數目與不含藥控制組比較的結果，REMA 法有較高的敏感度，瓊脂試驗法一旦有微小菌落生長，更難以明確判斷菌落數目。對於制菌型的抗生素更容易有微小菌落的生長【56】。REMA 法在本研究實驗使用時，尤其測試複合藥物如: meropenem-clavulanate 及 amoxicillin-clavulanate 時，常有呈色拖尾的情形。本研究採用之 MIC 判讀機準，係比較含藥物小格與不含藥物之控制組小格的顏色深淺，當與不含藥控制組呈色深淺相同時，判讀為 MIC 值。不同人員判讀的結果對呈色深淺也有不同的主觀因素，雖有可能產生差異，但不會相差 1 個梯度以上的連續二倍稀釋。如果呈色判讀依據，以分光光度計的吸光值來比較，是否有較客觀的判讀結果，則需後續進行藥敏試驗加以確認。CLSI 已訂定 moxifloxacin 及 INH 常規操作之標準操作流程

之臨界濃度【56】，本研究結果顯示 moxifloxacin 及 INH 亦有穩定的 MIC 分布範圍。

MDR 菌株的 MIC 分布在液態微量滴定法的 MIC 分布梯度亦比標準瓊脂法分布較廣。結果與 H37Rv 相同，方法學的差異可能仍為主要原因。再比較 REMA 法與標準瓊脂法的報告時效，REMA 法 13.3 天比標準瓊脂法 21 天縮短，可能原因為液態呈色法比固態標準瓊脂法觀察菌落生長有較高的敏感度，因此可以縮短結果判讀時效。在新藥的開發和體外抗藥性試驗上，無論在配製流程、藥敏操作及獲得初步結果時效上 REMA 法皆比標準瓊脂法佳，因此仍廣泛應用於新藥測試。

分析 Fluoroquinolone 藥物之間的交叉抗藥比例，moxifloxacin 與 ofloxacin 的交叉抗藥比例均比其他 Fluoroquinolone 類藥物高；gatifloxacin 與 ofloxacin 的交叉抗藥比例，則均比其他 Fluoroquinolone 類藥物低。此結果可供臨床醫師選擇最適用藥組合。

Clofazimine 在 XDR 及非 MDR 的 MIC₉₀ 與 MIC₅₀ 比較上，XDR 的 MIC₉₀ 比 MIC₅₀ 高於 3 個 2 倍連續稀釋梯度，而 MDR(不含 XDR)與 H37Rv 的 MIC₉₀ 比 MIC₅₀ 僅高於 1 個 2 倍連續稀釋梯度；而其餘 10 種測試藥物的 MIC₉₀ 與 MIC₅₀，則相同或僅是介於 1 個 2 倍連續稀釋梯度。Clofazimine 在 XDR 及非 MDR 的藥物作用之效力上，可能與菌株之其他一及二線藥抗藥型態(profiles)有關。進一步分析 2013-2014 年 249 株 MDR-TB 個案菌株發現有 6.8% 對 clofazimine 具抗藥性。然而，統計結果顯示 clofazimine 抗藥與 ofloxacin 及 moxifloxacin 的抗藥可能相關。Clofazimine 建議使用於新的 MDR-TB 短程治療上，因此須有效的 Fluoroquinolone 管制使用。再者，協同作用實驗選取 31 株 MDR 其 clofazimine 均為敏感性($\leq 1 \mu\text{g/mL}$)菌株，其中 14 株原為 ethambutol 抗藥菌株(MICs $> 8 \mu\text{g/mL}$)， ethambutol 與 clofazimine 合併使用後，

其 ethambutol 的 MIC 值轉變為敏感(MICs \leq 8 μ g/mL) , 此結果說明 ethambutol 適合加入於正在使用 clofazimine 治療的病人(表十)【79,80】。

為了解 clofazimine 與 bedaquiline 在臨床應用，分析 2013-2014 年共 196 株 MDR-TB 個案抗藥型態，以評估對於 fluoroquinolone 或 second-line injectable drug 已經具抗藥性之困難 MDR-TB 個案，可行之治療用藥方案。由抗藥型態顯示，fluoroquinolone 抗藥比例為 5.6-16.3%、kanamycin 抗藥比例為 3.6%、amikacin 抗藥比例為 2.6%及 capreomycin 抗藥比例為 1.5%。最低抑菌濃度分布分析結果，有 5.6% 的 MDR-TB 個案對 clofazimine 抗藥，但對於 linezolid 均為敏感株(MIC \leq 1 μ g/mL)。由 196 株 MDR-TB 個案抗藥型態分析顯示，有 157 (80.1%) 株對 fluoroquinolone 及 second-line injectable drug 敏感的個案可能適用結核病短程治療；而有 28 (15.1%)個案對 fluoroquinolone 抗藥及 7 (3.8%)個案對 second-line injectable drugs 抗藥，但是對 clofazimine 為敏感的個案，建議可以考慮將 bedaquiline 納入用藥療程。

卡方檢定計算新藥於 MDR、XDR、H37Rv 及非 MDR 這 4 類菌株的 MIC 分佈，新測 11 種藥物上並無差異。體外試驗與人體內藥物的藥物動力學、藥效學及結核病併用多種藥物治療的情形下，仍很難取得以可能抗藥及可能敏感的菌株，進行藥物 MIC 測試，從而訂出區分敏感株與抗藥株的臨界濃度。目前除了 bedaquiline 外，尚未針對本研究測試之 repurpose 藥物，有建議測試之臨界濃度。因此，ECCOFF 值為流行病學上客觀的臨界藥物測試濃度，臨床醫師可合併參考 ECCOFF 值與藥物的 MIC 分布範圍，輔以藥物動力學等各項數據，判斷該藥物對病患治療的有效性。

方法學確認可行，但在現階段臨床實驗室較困難施行。已依

ECCOFF 值建議抗藥性測試濃度。相關資料可提供臨床前試驗及臨床測試參考，如最終測試證實可行，則可提供醫師用來診治 MDR 及 XDR 病患時用藥參考。

五、結論與建議

1. 根據胸部 X 光檢驗結果顯示，仍有將近 3% 的個案被診斷為正常或無關結核病，顯然並無法完全依賴胸部 X 光做為排除結核病個案的條件，**建議宜搭配快速細菌學或其他分子診斷工具的運用**，輔助臨床診斷。MDR-TB 個案抹片及培養同時陽性的比例，有逐年升高的趨勢。至 2015 年更是超過 80%。一方面可能是實驗室的檢驗實驗室工具運用得宜且品質全面提升，使得結核菌檢出率變高；另一方面則可能是因為個案宿主特性或延遲診斷等因素。**抗酸菌抹片陽性所可能導致的傳播，反應在新案數目上，建議防治策略及做為參考。**

2. Ofloxacin 的抗藥性比例逐年下降，但是 2015 年 fluoroquinolone 類藥物的抗藥性比例有回升的現象。由於 fluoroquinolone 類藥物產生抗藥的個案，有高可能性會發展成廣泛性抗藥性結核病(XDR-TB)，照護的挑戰較高。此外，MDR-TB 新個案對於二線 fluoroquinolone 類藥物的抗藥性比例，亦隨著個案年齡增加而有下降趨勢；然而，對於二線針劑藥物的抗藥性比例，反而是隨著個案年紀增加而有上升趨勢。**建議持續加強監測及用藥宣導。**

3. MDR 菌株的 MIC 分布在液態微量滴定法的 MIC 分布梯度亦比標準瓊脂法分布較廣。再比較 REMA 法與標準瓊脂法的報告時效，REMA 法 13.3 天比標準瓊脂法 21 天縮短。**建議 REMA 使用於新藥或複方藥物之，以取得較準確之 MICs。**

4. 分析 Fluoroquinolone 藥物之間的交叉抗藥比例，moxifloxacin 與 ofloxacin 的交叉抗藥比例均比其他 Fluoroquinolone 類藥物高，而

gatifloxacin 類藥物低。建議臨床醫師選擇最適用藥組合時，當 ofloxacin 抗藥時可考慮使用 gatifloxacin。

5. 統計結果顯示 clofazimine 抗藥與 ofloxacin 及 moxifloxacin 的抗藥可能相關。Clofazimine 可使用於新的 MDR-TB 短程治療上，建議因此須有效的 Fluoroquinolone 管制使用。再由協同作用實驗得知 ethambutol 與 clofazimine 合併使用後，其 ethambutol 的 MIC 值轉變為敏感，建議 ethambutol 適合加入於正在使用 clofazimine 治療的病人。

6. 為了解 clofazimine 與 bedaquiline 在臨床應用，臺灣有多數對 fluoroquinolone 及 second-line injectable drug 敏感的個案可能適用結核病短程治療；建議對 fluoroquinolone 抗藥及對 second-line injectable drugs 抗藥，但是對 clofazimine 為敏感的個案，可以考慮將 bedaquiline 納入 MDR/XDR-TB 用藥療程。

7. 本研究測試之 repurpose 藥於 MDR、XDR、H37Rv 及非 MDR 這 4 類菌株的 MIC 分佈並無差異。且已訂出 ECCOFF 值。建議出藥物測試之臨界濃度。建議藉由本研究建立之方法及所得資料，可以供臨床前或臨床試驗之設計參考。

六、參考文獻

1. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014.
2. Nunn AJ, Mwaba P, Chintu C, Mwinga A, Darbyshire JH, Zumla A, et al. Role of co-trimoxazole prophylaxis in reducing mortality in HIV infected adults being treated for tuberculosis: randomised clinical trial. *Bmj*. 2008; **337**: a257.
3. Mwaungulu FB, Floyd S, Crampin AC, Kasimba S, Malema S, Kanyongoloka H, et al. Cotrimoxazole prophylaxis reduces mortality in human immunodeficiency virus-positive tuberculosis patients in Karonga District, Malawi. *Bulletin of the World Health Organization*. 2004; **82**(5): 354-63.
4. Grimwade K, Sturm AW, Nunn AJ, Mbatha D, Zungu D, Gilks CF. Effectiveness of cotrimoxazole prophylaxis on mortality in adults with tuberculosis in rural South Africa. *Aids*. 2005; **19**(2): 163-8.
5. Feldman WH. An evaluation of the efficacy in tuberculosis of sulfonamides, sulfones and certain other substances. *J R Inst Public Health*. 1946; **9**(10): 297-324.
6. Hinshaw H, Feldman W. TREATMENT OF EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS. *Journal of the American Medical Association*. 1941; **117**(13): 3.
7. Yegian D, Long RT. The specific resistance of tubercle bacilli to para-aminosalicylic acid and sulfonamides. *J Bacteriol*. 1951; **61**(6): 747-9.
8. Hart PD. Chemotherapy of tuberculosis; research during the past 100 years. *Br Med J*. 1946; **2**(4483): 805; 49.
9. Deliwala CV, Ganapathi K, Rajagopalan S. Chemotherapy of tuberculosis. *Curr Sci*. 1949; **18**(7): 233-7.
10. Bushby SR. Trimethoprim-sulfamethoxazole: in vitro microbiological aspects. *J Infect Dis*. 1973; **128**: Suppl:442-62 p.
11. Trimethoprim-sulphamethoxazole. *Drugs*. 1971; **1**(1): 8-53.
12. Smilack JD. Trimethoprim-sulfamethoxazole. *Mayo Clin Proc*. 1999; **74**(7): 730-4.
13. Wallace RJ, Jr., Wiss K, Bushby MB, Hollowell DC. In vitro activity of trimethoprim and sulfamethoxazole against the nontuberculous mycobacteria. *Rev Infect Dis*. 1982; **4**(2): 326-31.
14. Huang TS, Kunin CM, Yan BS, Chen YS, Lee SS, Syu W, Jr. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012; **67**(3): 633-7.
15. Forgacs P, Wengenack NL, Hall L, Zimmerman SK, Silverman ML, Roberts GD. Tuberculosis and Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; **53**(11): 4789-93.
16. Minakuchi T, Nishimori I, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Molecular cloning, characterization, and inhibition studies of the Rv1284 beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* with sulfonamides and a sulfamate. *J Med Chem*. 2009; **52**(8): 2226-32.
17. Alsaad N, van Altena R, Pranger AD, van Soolingen D, de Lange WC, van der Werf TS, et al. Evaluation of co-trimoxazole in treatment of

- multidrug-resistant tuberculosis. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 2012.
18. Ong W, Sievers A, Leslie DE, Forgacs P, Zimmerman SK, Silverman ML, et al. *Mycobacterium tuberculosis* and Sulfamethoxazole Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; **54**(6): 2748-9.
 19. Young LS. Reconsidering Some Approved Antimicrobial Agents for Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; **53**(11): 4577-9.
 20. Bermudez LE, Kolonoski P, Petrofsky M, Wu M, Inderlied CB, Young LS. Mefloquine, moxifloxacin, and ethambutol are a triple-drug alternative to macrolide-containing regimens for treatment of *Mycobacterium avium* disease. *J Infect Dis*. 2003; **187**(12): 1977-80.
 21. Nannini EC, Keating M, Binstock P, Samonis G, Kontoyiannis DP. Successful treatment of refractory disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with the addition of linezolid and mefloquine. *J Infect*. 2002; **44**(3): 201-3.
 22. Lenaerts A, Woolhiser L, Gruppo V, Orme I, Goldman R, Lambros C. Mefloquine, moxifloxacin and pyrazinamide is a triple-drug alternative to isoniazid- and rifampin-containing regimens for treatment of tuberculosis in mice, abstr. B-1873. 49th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. San Francisco, USA; 2009.
 23. Mao J, Yuan H, Wang Y, Wan B, Pieroni M, Huang Q, et al. From serendipity to rational antituberculosis drug discovery of mefloquine-isoxazole carboxylic acid esters. *J Med Chem*. 2009; **52**(22): 6966-78.
 24. Mao J, Wang Y, Wan B, Kozikowski AP, Franzblau SG. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of mefloquine-based ligands as novel antituberculosis agents. *ChemMedChem*. 2007; **2**(11): 1624-30.
 25. Jayaprakash S, Iso Y, Wan B, Franzblau SG, Kozikowski AP. Design, synthesis, and SAR studies of mefloquine-based ligands as potential antituberculosis agents. *ChemMedChem*. 2006; **1**(6): 593-7.
 26. Goncalves RS, Kaiser CR, Lourenco MC, de Souza MV, Wardell JL, Wardell SM, et al. Synthesis and antitubercular activity of new mefloquine-oxazolidine derivatives. *Eur J Med Chem*. 2010; **45**(12): 6095-100.
 27. Danelishvili L, Wu M, Young LS, Bermudez LE. Genomic Approach to Identifying the Putative Target of and Mechanisms of Resistance to Mefloquine in *Mycobacteria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; **49**(9): 3707-14.
 28. Amaral L, Boeree M, Gillespie S, Udhwadia Z, van Soolingen D. Thioridazine cures extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) and the need for global trials is now! *International journal of antimicrobial agents*. 2010; **35**(6): 524-6.
 29. Viveiros M, Amaral L. Enhancement of antibiotic activity against poly-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* by phenothiazines. *International journal of antimicrobial agents*. 2001; **17**(3): 225-8.
 30. Tello F. Results of combined use of cycloserine in pulmonary tuberculosis. *Scandinavian journal of respiratory diseases Supplementum*. 1970; **71**: 162-7.
 31. Clofazimine. *Tuberculosis*. 2008; **88**(2): 96-9.
 32. Barry VC, Buggle K, Byrne J, Conalty ML, Winder F. Absorption, distribution

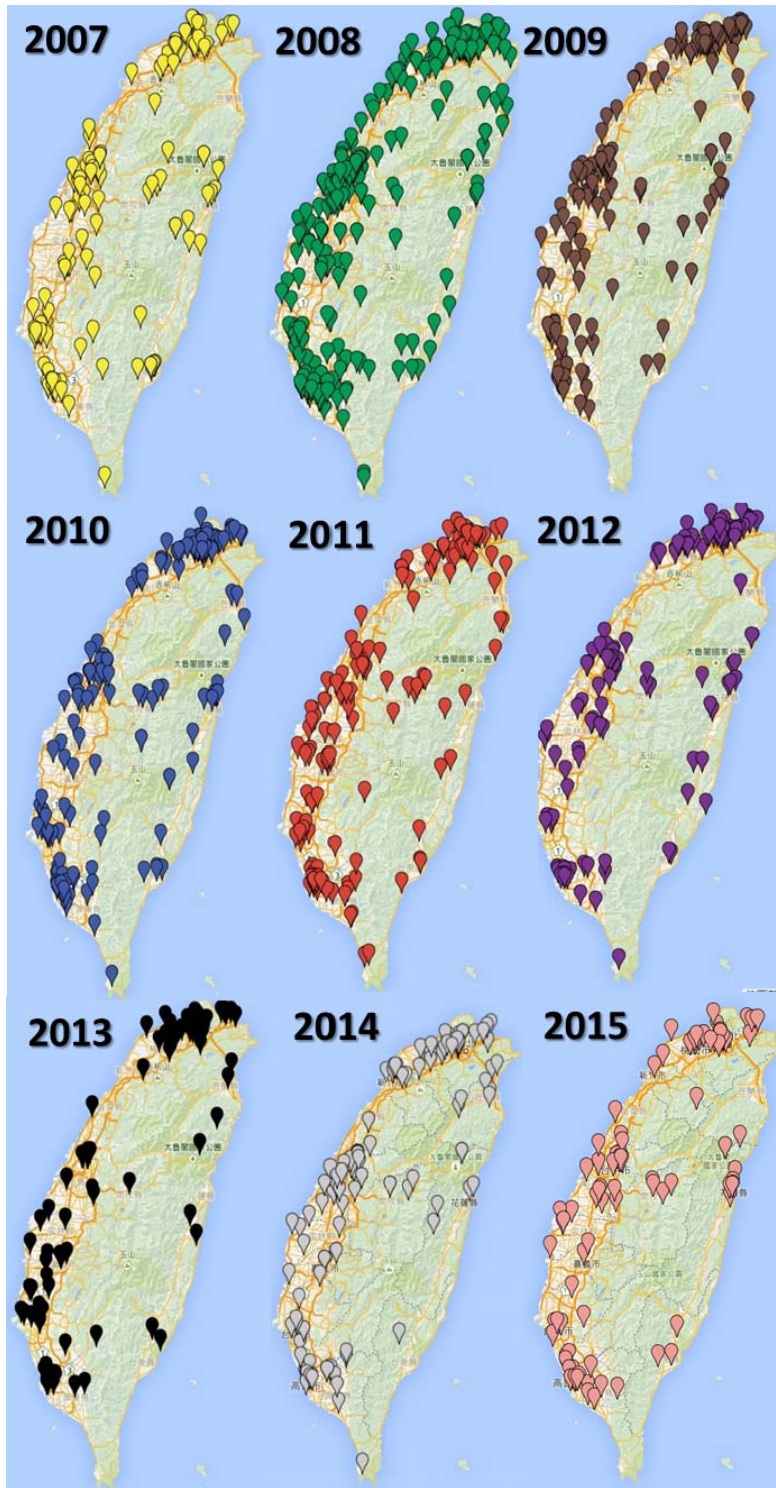
- and retention of the riminocompounds in the experimental animal. Irish journal of medical science. 1960; **416**: 345-52.
33. Reddy VM, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Antimycobacterial activities of riminophenazines. Journal of antimicrobial chemotherapy. 1999; **43**(5): 615-23.
 34. Wadee AA, Anderson R, Rabson AR. Clofazimine reverses the inhibitory effect of *Mycobacterium tuberculosis* derived factors on phagocyte intracellular killing mechanisms. Journal of antimicrobial chemotherapy. 1988; **21**(1): 65-74.
 35. Morrison NE, Marley GM. The mode of action of clofazimine DNA binding studies. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases. 1976; **44**(1-2): 133-4.
 36. Yano T, Kassovska-Bratinova S, Teh JS, Winkler J, Sullivan K, Isaacs A, et al. Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH:quinone oxidoreductase: a pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species. The Journal of biological chemistry. 2011; **286**(12): 10276-87.
 37. van Rensburg CE, Joon GK, Sirgel FA, Matlola NM, O'Sullivan JF. In vitro investigation of the antimicrobial activities of novel tetramethylpiperidine-substituted phenazines against *Mycobacterium tuberculosis*. Chemotherapy. 2000; **46**(1): 43-8.
 38. Bulatovic V, Wengenack N, Uhl J, Hall L, Roberts G, Cockerill F, et al. Oxidative stress increases susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002; **46**(9): 2765-71.
 39. Van Deun A, Maug AK, Salim MA, Das PK, Sarker MR, Daru P, et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine. 2010; **182**(5): 684-92.
 40. Kasik JE, Weber M, Winberg E, Barclay WR. The synergistic effect of dicloxacillin and penicillin G on murine tuberculosis. The American review of respiratory disease. 1966; **94**(2): 260-1.
 41. Kasik JE, Weber M, Freehill PJ. The effect of the penicillinase-resistant penicillins and other chemotherapeutic substances on the penicillinase of the R1Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. The American review of respiratory disease. 1967; **95**(1): 12-9.
 42. Casal M, Rodriguez F, Benavente M, Luna M. In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* to augmentin. European journal of clinical microbiology. 1986; **5**(4): 453-4.
 43. Cynamon MH, Palmer GS. In vitro activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1983; **24**(3): 429-31.
 44. Chambers HF, Kocagoz T, Sipit T, Turner J, Hopewell PC. Activity of amoxicillin/clavulanate in patients with tuberculosis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1998; **26**(4): 874-7.
 45. Hugonnet JE, Blanchard JS. Irreversible inhibition of the *Mycobacterium*

- tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate. *Biochemistry*. 2007; **46**(43): 11998-2004.
46. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Onyi GO. Susceptibilities of *Mycobacterium fortuitum* biovar. *fortuitum* and the two subgroups of *Mycobacterium chelonae* to imipenem, cefmetazole, ceftioxin, and amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; **35**(4): 773-5.
 47. de Carvalho LP, Lin G, Jiang X, Nathan C. Nitazoxanide kills replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and evades resistance. *Journal of medicinal chemistry*. 2009; **52**(19): 5789-92.
 48. Stupenengo RH, Wendy CD. [Experience with a Nonspecific Antiinflammatory Agent in Pulmonary Tuberculosis]. *Sem Med*. 1963; **123**: 114-7.
 49. Gold B, Pingle M, Brickner SJ, Shah N, Roberts J, Rundell M, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug sensitizes *Mycobacterium tuberculosis* to endogenous and exogenous antimicrobials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; **109**(40): 16004-11.
 50. Stamey TA, Nemoy NJ, Higgins M. The clinical use of nalidixic acid. A review and some observations. *Investigative urology*. 1969; **6**(6): 582-92.
 51. Fouad M, Gallagher JC. Moxifloxacin as an Alternative or Additive Therapy for Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Ann Pharmacother*. 2011; **45**(11): 1439-44.
 52. Wallace RJ, Jr., Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *Journal of clinical microbiology*. 1986; **24**(6): 976-81.
 53. David HL, Rastogi N, Clavel-Seres S, Clement F. Studies on clofazimine-resistance in mycobacteria: is the inability to isolate drug-resistance mutants related to its mode of action? *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*. 1987; **266**(1-2): 292-304.
 54. Rastogi N, Labrousse V, Goh KS. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Current microbiology*. 1996; **33**(3): 167-75.
 55. Jagannath C, Reddy MV, Kailasam S, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Chemotherapeutic activity of clofazimine and its analogues against *Mycobacterium tuberculosis*. In vitro, intracellular, and in vivo studies. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995; **151**(4): 1083-6.
 56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard—Second Edition*. CLSI document M24-A2 (ISBN 1-56238-746-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2011.
 57. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*.

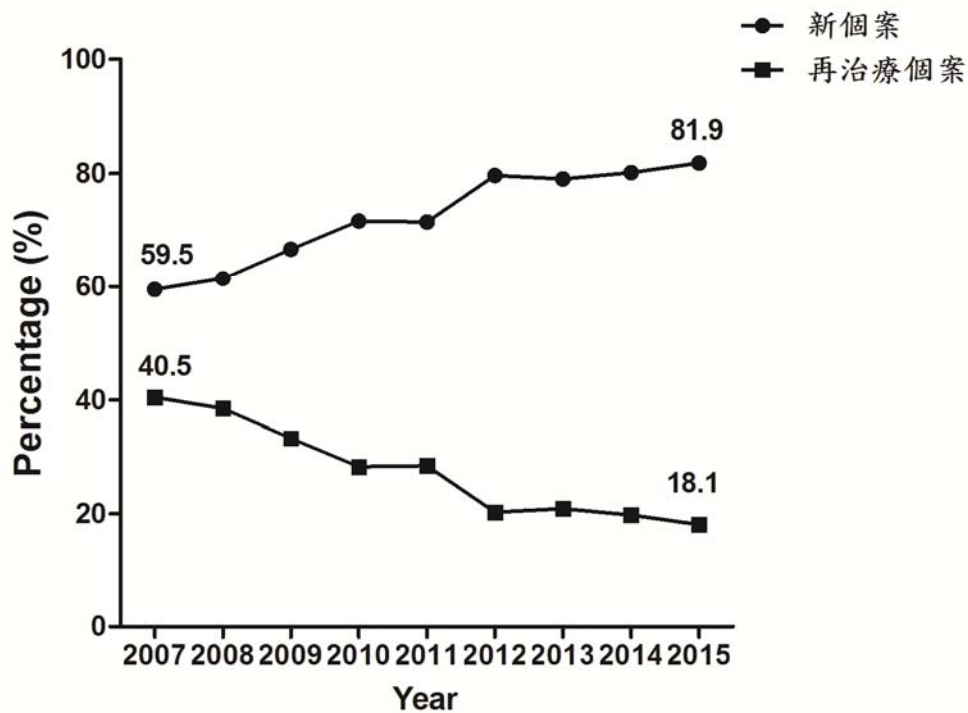
- 2002;46(8):2720–2722.
58. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267:5421–5426.
 59. Wallace RJ, Jr., Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly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

- Mefloquine, moxifloxacin, and ethambutol are a triple-drug alternative to macrolide-containing regimens for treatment of *Mycobacterium avium* disease. *J Infect Dis*. 2003; **187**(12): 1977-80.
71. Yu,C.C.; Chang,C.Y.; Liu,C.E.; Shih,L.F.; Hsiao,J.H.; Chen,C.H. Drug resistance pattern of mycobacterium tuberculosis complex at a medical center in central Taiwan, 2003-2007. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 Aug;43(4):285-90. doi: 10.1016/S1684-1182(10)60045-X.
 72. Liaw YS1, Hsueh PR, Yu CJ, Wang SK, Yang PC, Luh KT. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in a university hospital in Taiwan, 1998-2002. *J Formos Med Assoc*. 2004 Sep;103(9):671-7.
 73. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND RESPONSE.
 74. Bastos ML, Hussain H, Weyer K et al. Treatment outcomes of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis according to drug susceptibility testing to first- and second-line drugs: an individual patient data meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 1364–74.
 75. Ahuja SD, Ashkin D, Avendano M et al. Multidrug resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients. *PLoS Med* 2012; 9: e1001300.
 76. Organization WH. Companion Handbook to the WHO Guidelines for the Programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2014.
 77. Sirgel FA, Warren RM, Streicher EM et al. *gyrA* mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1088–93.
 78. Tuberculosis Research Committee (RYOKEN), Tokyo, Japan. Nationwide survey of anti-tuberculosis drug resistance in Japan. *INT J TUBERC LUNG DIS* 19(2):157–162, 2015
 79. Zhang, Z., et al., In vitro synergistic activity of clofazimine and other antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 2015. 45(1): p. 71-5.
 80. Grosset, J.H., T.G. Singer, and W.R. Bishai, New drugs for the treatment of tuberculosis: hope and reality. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2012. 16(8): p. 1005-14.
 81. Diacon, A. H. ., et al., Multidrug-resistant tuberculosis and culture conversion with bedaquiline. *N Engl J Med*, 2014. 371(8): p.723-32.
 82. 楊玉鳳、鄧新棠、黃玉成：抗黴菌藥物合併治療可行嗎？。感控雜誌 2006;16(2)。
 83. <http://mic.eucast.org/Eucast2/>, epidemiological cut-off values (ECOFFs)
 84. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
 85. 陳怡心、莊銀清：抗生素抑(殺)菌效果的體外測試。感控雜誌 2004;14(6)。

七、圖、表

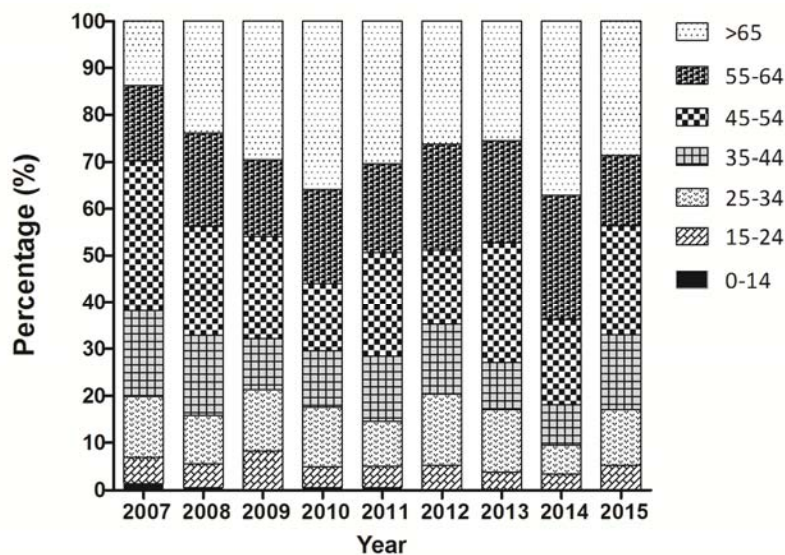


圖一 2007-2015 年多重抗藥性結核病在臺灣各區空間上的分布變化

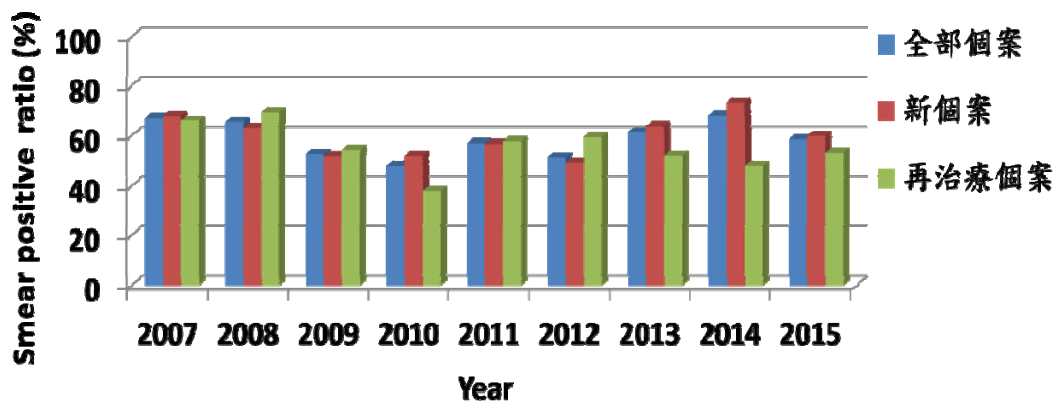


* Significant increasing trend in new cases and decreasing trend in previously treated cases ($p < 0.00001$)

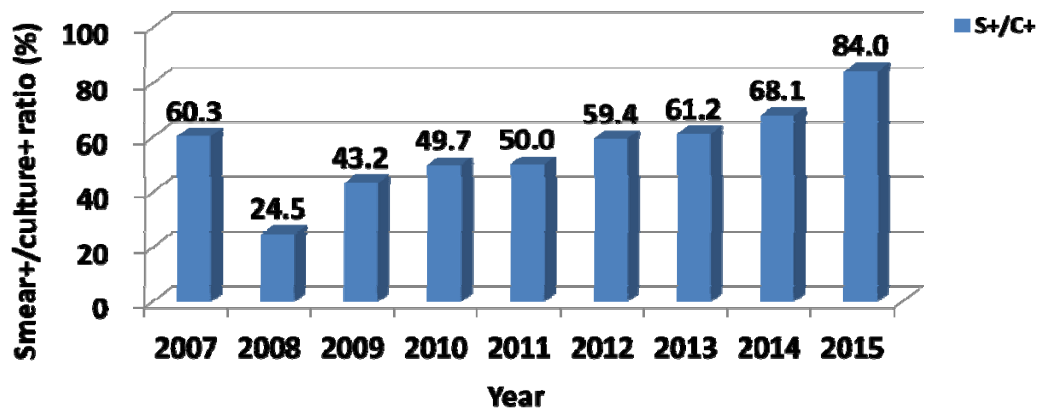
圖二 2007-2015 年新個案與再治療個案比例變化



圖三 2007-2015 年各年齡層多重抗藥性結核病個案送驗比例

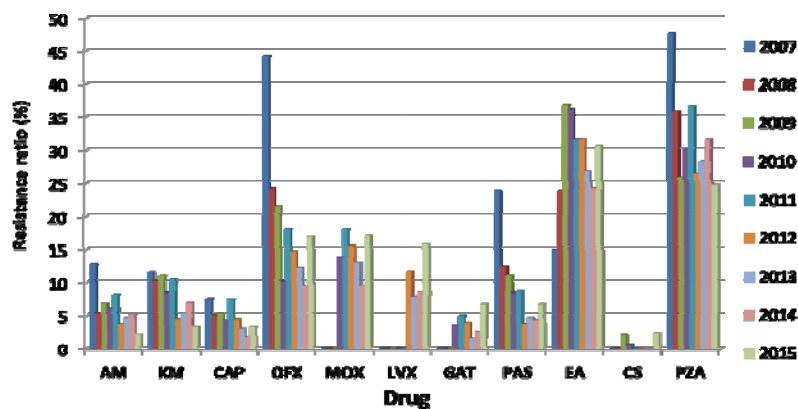


圖四 2007-2015 年多重抗藥性結核病個案抹片陽性比

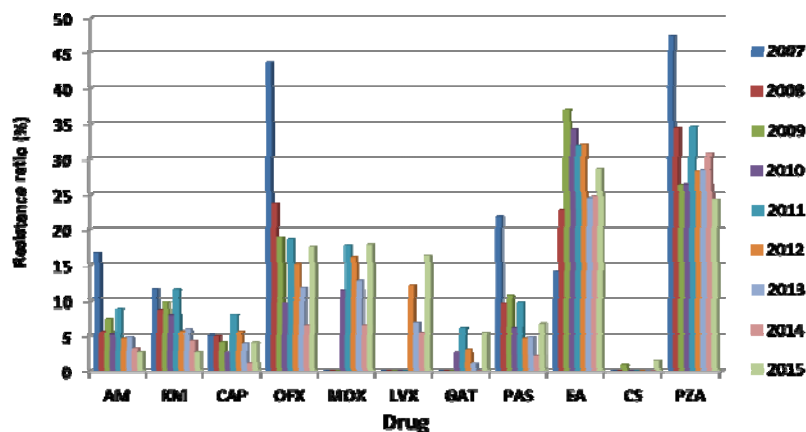


圖五 2007-2015 年多重抗藥性結核病個案抹片與培養皆陽性比例

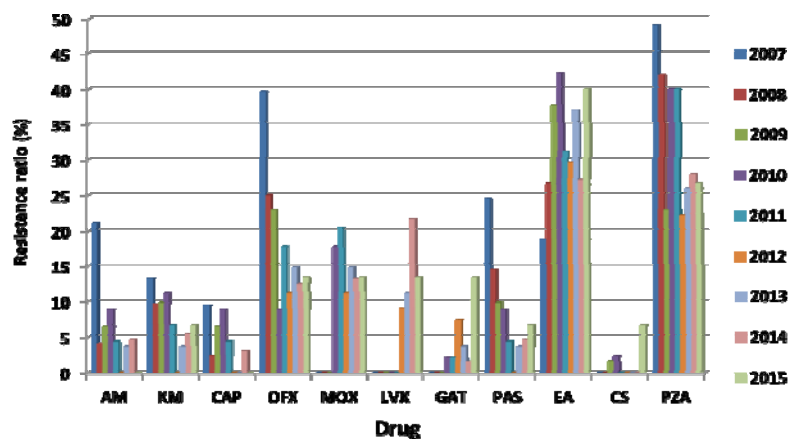
(1)



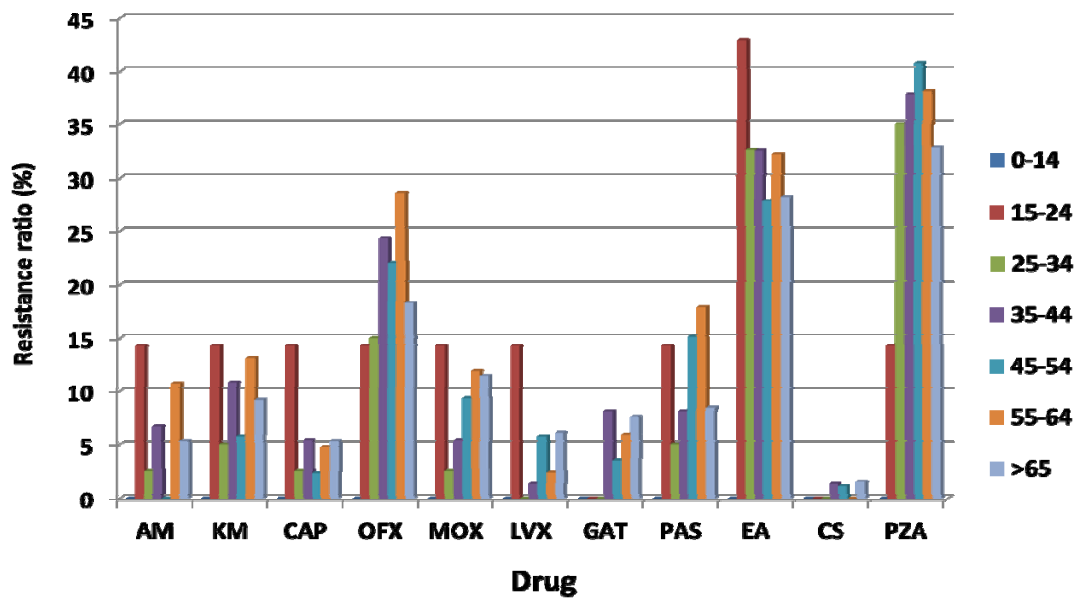
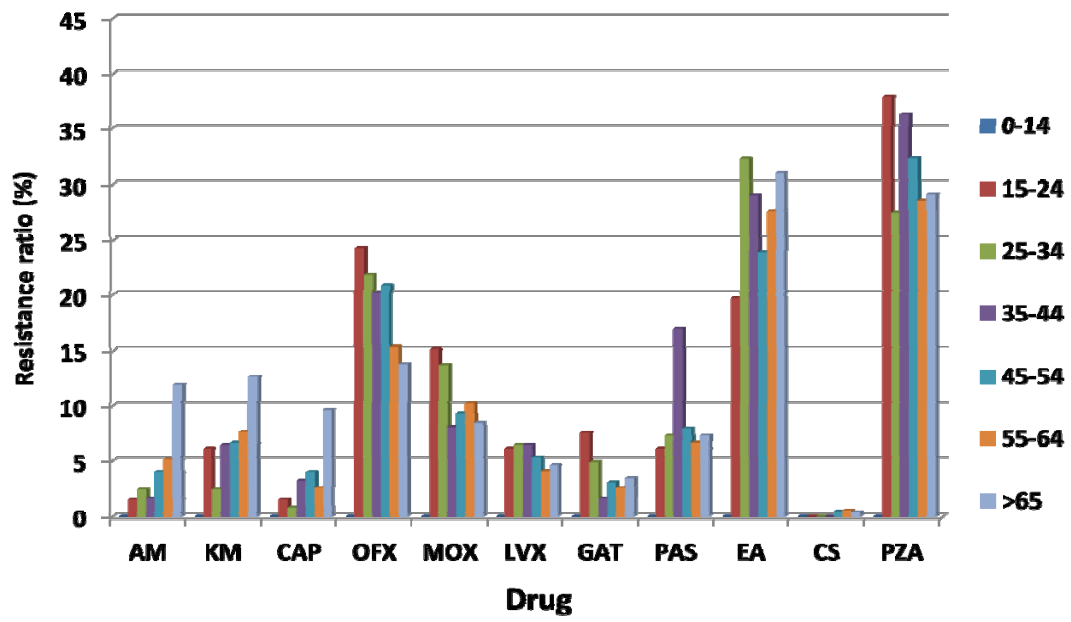
(2)



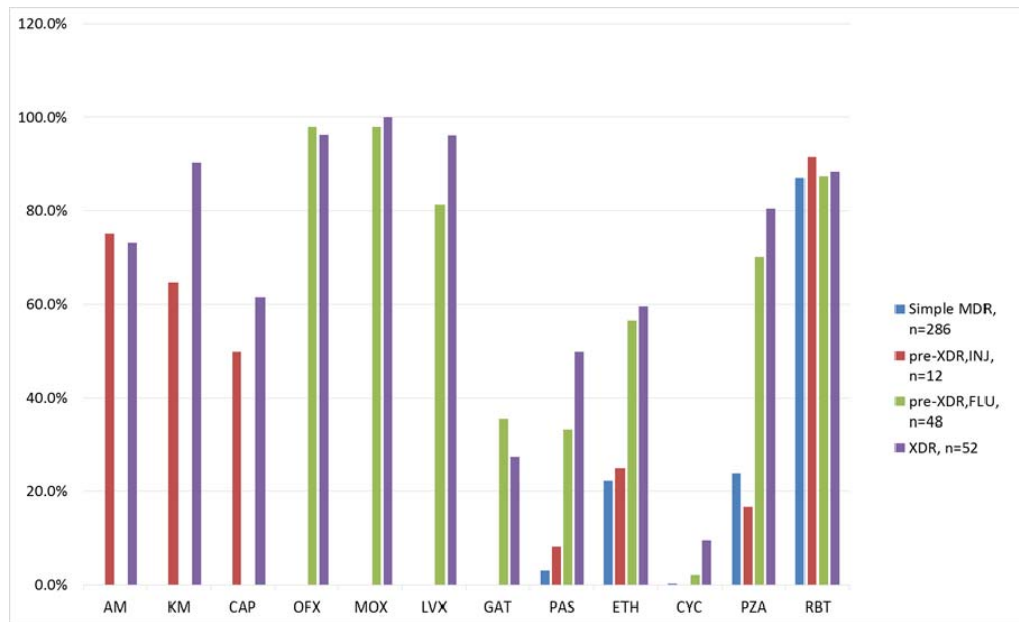
(3)



圖六 2007-2015 年多重抗藥性結核菌抗藥性分析(1)所有個案(2)新個案(3)再治療個案



圖七 抗藥性與個案年齡相關性分析(1)新個案(2)再治療個案

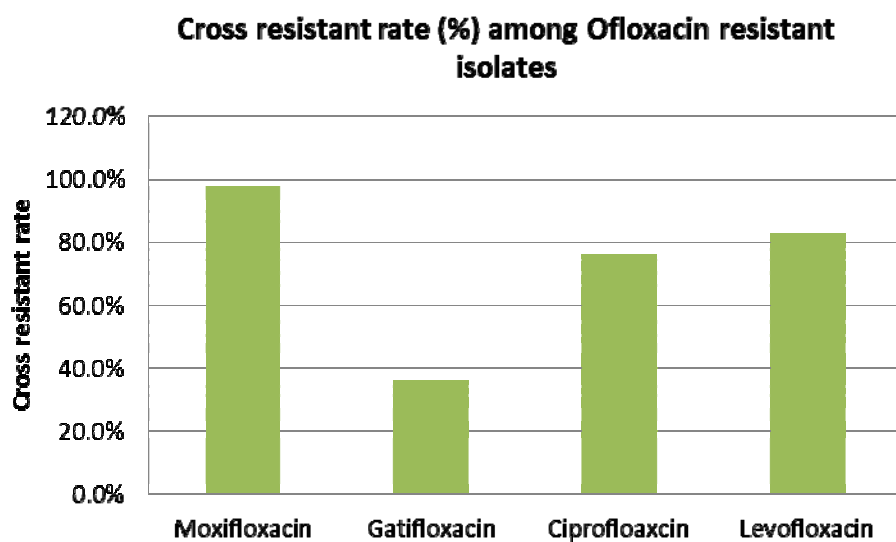


圖八 多重抗藥(2013-2014)及超級抗藥(2007-2014)結核菌株之抗藥性分析



ECOFF: The epidemiological cut-off value.

圖九 非 MDR、Simple MDR、pre-XDR、及 XDR 的藥物 MIC 分佈範圍



圖十 47 株 Fluoroquinolone 抗藥株的交叉抗藥比例

表一 肺外結核通報項目分析

肺外結核	新個案數(%)	再治療個案數(%)	總人數(%)
皮膚及眼結核	1 (1.7)	0 (0.0)	1 (1.7)
其他器官結合	18 (31.0)	4 (23.5)	22 (29.3)
泌尿及生殖系統結核	1 (1.7)	1 (5.9)	2 (2.7)
消化道結核	4 (6.9)	1 (5.9)	5 (6.7)
胸肋膜結核	16 (27.6)	1 (5.9)	17 (22.7)
骨及關節結核	4 (6.9)	6 (35.3)	10 (13.3)
淋巴結核	11 (19.6)	3 (17.6)	14 (18.7)
結核性腦膜炎	2 (3.4)	1 (5.9)	3 (4.0)
咽喉結核	1 (1.7)	0 (0.0)	1 (1.3)
總計	58	17	75

表二 胸部 X 光檢驗結果

胸部 X 光診斷	新個案數(%)	在治療個案數(%)	總人數(%)
正常	22 (2.2)	4 (1.0)	26 (1.8)
異常但無空洞	662 (66.0)	278 (66.2)	940 (66.1)
異常但有空洞	310 (30.9)	133 (31.7)	443 (31.1)
異常無關結核病	9 (0.9)	5 (1.2)	14 (1.0)
總計	1,003	420	1,423

表三 藥物儲備溶液(stock solution)製備表

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

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

表四 REMA 藥物敏性試驗方法使用之 96 孔盤配製表

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

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

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

表五 7H11 瓊脂平板法藥敏盤藥物配製濃度(µg/mL)表

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

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

表六 協同作用藥敏盤配製: 96 孔盤配製表

D/W ^{1A}	D/W ^{2A}	D/W ^{3A}	D/W ^{4A}	D/W ^{5A}	D/W ^{6A}	D/W ^{7A}	D/W ^{8A}	D/W ^{9A}	D/W ^{10A}	D/W ^{11A}	D/W ^{12A}
D/W ^{1B}	EMB 32 CFM 4	EMB 32 CFM 2	EMB 32 CFM 1	EMB 32 CFM 0.5	EMB 32 CFM 0.25	EMB 32 CFM 0.12	EMB 32 CFM 0.06	EMB 32 CFM 0.03	GC(+) ^{10B}	GC(-) ^{11B}	QC+100ul 7H9 CFM ^{12B}
D/W ^{1C}	EMB 16 CFM 4	EMB 16 CFM 2	EMB 16 CFM 1	EMB 16 CFM 0.5	EMB 16 CFM 0.25	EMB 16 CFM 0.12	EMB 16 CFM 0.06	EMB 16 CFM 0.03	GC(+) ^{10C}	GC(-) ^{11C}	QC+100ul 7H9 CFM ^{12C}
D/W ^{1D}	EMB 8 CFM 4	EMB 8 CFM 2	EMB 8 CFM 1	EMB 8 CFM 0.5	EMB 8 CFM 0.25	EMB 8 CFM 0.12	EMB 8 CFM 0.06	EMB 8 CFM 0.03	GC(+) ^{10D}	GC(-) ^{11D}	QC+100ul 7H9 CFM ^{12D}
D/W ^{1E}	EMB 4 CFM 4	EMB 4 CFM 2	EMB 4 CFM 1	EMB 4 CFM 0.5	EMB 4 CFM 0.25	EMB 4 CFM 0.12	EMB 4 CFM 0.06	EMB 4 CFM 0.03	GC(+) ^{10E}	GC(-) ^{11E}	QC+100ul 7H9 CFM ^{12E}
D/W ^{1F}	EMB 32 ^{2F}	EMB 16 ^{3F}	EMB 8 ^{4F}	EMB 4 ^{5F}	EMB 2 ^{6F}	EMB 1 ^{7F}	EMB 0.5 ^{8F}	EMB 0.25 ^{9F}	GC(+) ^{10F}	GC(-) ^{11F}	QC+100ul 7H9 CFM ^{12F}
D/W ^{1G}	CFM 4 ^{2G}	CFM 2 ^{3G}	CFM 1 ^{4G}	CFM 0.5 ^{5G}	CFM 0.25 ^{6G}	CFM 0.13 ^{7G}	CFM 0.06 ^{8G}	CFM 0.03 ^{9G}	GC(+) ^{10G}	GC(-) ^{11G}	QC+100ul 7H9 CFM ^{12G}
D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W

藥物單位: µg/mL

D/W: Sterilized deionized H₂O

CFM : Clofazamin

EMB: Ethambutol

表七 H37Rv 結核菌之最小抑菌濃度測試結果

$\mu\text{g/mL}$ Drug	REMA	標準瓊脂試驗
MEPM-CLAV	1/2.5-16/2.5 (n=55)	8/2.5- > 16/2.5 (n=6)
OPBZ	\leq 20-90 (n=57)	40-80 (n=6)
Mefloquine	4-16 (n=57)	4-8 (n=7)
AMC-CLAV	4/2-64/32 (n=56)	32/2-64/32 (n=6)
CFM	0.06-2 (n=56)	\leq 0.12-1 (n=7)
TDZ	2-16 (n=58)	8-16 (n=7)
NTZ	4-32 (n=57)	8 - 16 (n= 3)
MOX	0.03-0.5 (n=57)	0.25 (n=6)
TMP-SMX	0.1/2-0.8/16 (n=57)	0.2/2-0.8/16 (n=7)
INH	\leq 0.03-0.25 (n=56)	0.06-0.12 (n=7)
LZD	0.12-1 (n=57)	0.5-1 (n=6)

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

表八(1) 多重抗藥結核菌株 REMA MIC50 及 MIC90

		MIC50	MIC90	MIC distribution
Oxyphenbutazone				
	MDR(不含 XDR)	≤ 20	50	≤ 20-90
	XDR	40	80	≤ 20-80
	non-MDR	50	80	≤ 20 - > 90
	H37Rv	60	80	≤ 20 - 90
Meropenem-clavulanate				
	MDR(不含 XDR)	4/2.5	8/2.5	≤ 0.12/2.5- > 16/2.5
	XDR	4/2.5	8/2.5	≤ 0.12/2.5- > 8/2.5
	non-MDR	4/2.5	8/2.5	0.5/2.5-8/2.5
	H37Rv	4/2.5	8/2.5	1/2.5 - 16/2.5
Mefloquine				
	MDR(不含 XDR)	8	8	≤ 0.5-16
	XDR	8	8	1-32
	non-MDR	8	16	2-16
	H37Rv	8	8	4-16
Amoxicillin-Clavulanate				
	MDR(不含 XDR)	16/8	64/32	2/1- > 64/32
	XDR	32/16	64/32	2/1-64/32
	non-MDR	16/8	64/32	4/2- > 64/32
	H37Rv	32/16	32/16	4/2-64/32
Clofazimine				
	MDR(不含 XDR)	0.5	1	0.06- > 4
	XDR	0.5	2	≤ 0.03-4
	non-MDR	0.5	2	0.06-2
	H37Rv	0.25	0.5	0.06-2

表八(2) 多重抗藥結核菌株 REMA MIC50 及 MIC90

		MIC50	MIC90	MIC distribution
Thioridazine				
	MDR(不含 XDR)	8	8	≤ 1-16
	XDR	8	8	2-128
	non-MDR	8	8	4-16
	H37Rv	8	8	2-16
Nitazox				
	MDR(不含 XDR)	16	32	≤ 1-64
	XDR	16	64	4-128
	non-MDR	16	32	4-64
	H37Rv	16	32	4-32
Trimethoprim-sulfamethoxazole				
	MDR(不含 XDR)	0.4/8	0.8/16	≤ 0.05/1-7/128
	XDR	0.4/8	0.8/16	≤ 0.05/1-1.7/32
	non-MDR	0.4/8	0.8/16	≤ 0.05/1-3.5/64
	H37Rv	0.4/8	0.8/16	0.1/2-0.8/16
Linezolid				
	MDR(不含 XDR)	0.25	0.5	≤ 0.06-1
	XDR	0.25	0.5	≤ 0.06-0.5
	non-MDR	0.25	0.5	≤ 0.06-0.5
	H37Rv	0.5	0.5	0.12-1
Moxifloxacin				
	MDR(不含 XDR)	0.06	1	≤ 0.015- > 2
	XDR	2	> 2	0.5- > 2
	non-MDR	0.12	2	≤ 0.015- > 2
	H37Rv	0.12	0.12	0.03-0.5
Isoniazid				
	MDR(不含 XDR)	2	> 4	≤ 0.03- > 4
	XDR	2	> 4	0.25- > 4
	non-MDR	≤ 0.03	2	≤ 0.03- > 4
	H37Rv	0.06	0.06	≤ 0.03-0.25

表九 The epidemiological cut-off value(ECOFF) of simple MDR and pre-XDR

Drugs	ECOFF($\mu\text{g/mL}$)
Meropenem/clavulanate	$\geq 16/2.5$
Oxyphenbutazone	90
Mefloquine	16
Amoxicillin-Clavulanate	$\geq 16/32$
Clofazamine	4
Thioridazine	16
Nitazox	64
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	7/128
Linezolid	1
Moxifloxacin	0.5
Isoniazid	0.25

表十 Ethambutol 與 clofazimine 合併 FICI 值

Strain no.	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				FICI MIC
	Single EMB MIC	Single CFM MIC	Combined EMB MIC	Combined CFM MIC	
140200059	8	0.125	0.25	0.125	1.03
140200070	4	0.25	2	0.125	1.00
140200083	8	0.25	4	0.06	0.75
140200086	2	0.25	1	0.125	1.00
140200087	8	0.5	4	0.13	0.75
140200089	4	0.125	2	0.063	1.00
140200092	2	0.25	1	0.125	1.00
140200093	16	0.25	4	0.125	0.75
140200094	4	0.25	2	0.125	1.00
140200096	4	0.5	1	0.25	0.75
140200098	8	0.06	0.25	0.063	1.04
140200099	16	0.25	8	0.125	1.00
140200101	4	0.25	1	0.125	0.75
140200102	4	0.125	0.25	0.06	0.56
140200104	8	0.06	4	0.03	1.00
140200106	16	0.25	8.00	0.13	1.00
140200107	8	0.25	2	0.125	0.75
140200112	4	0.5	1	0.25	0.75
140200113	4	0.25	2	0.06	0.75
140200119	2	0.125	0.5	0.0625	0.75
140200120	4	0.5	1	0.25	0.75
140200122	8	1	4	0.5	1.00
140300091	1	0.5	0.5	0.125	0.75
150200002	8	0.5	4	0.13	0.75
150200003	4	0.5	1	0.25	0.75
150200007	8	0.5	4	0.25	1.00
150200009	4	0.25	2	0.125	1.00
150200010	16	0.5	4	0.25	0.75
150200011	8	1	4	0.5	1.00
150200013	8	0.25	4	0.125	1.00
150200015	8	0.5	1	0.25	0.63
H37Rv	2	0.25	1	0.06	0.75
H37Rv	2	0.125	0.25	0.06	0.63
H37Rv	1	0.25	0.5	0.0625	0.75
H37Rv	1	0.25	0.5	0.125	1.00
H37Rv	1	0.125	0.5	0.063	1.00
V strand	16	0.125	8	0.06	1.00
V strand	16	0.125	4	0.06	0.75
V strand	8	0.125	8	0.0625	1.50
V strand	16	0.25	8	0.125	1.00

附錄 標準操作流程

1. 結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏盤製備 (REMA 法)

2. 結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏盤製備 (瓊脂平板法)

3. 結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏盤製備 (REMA 法) _

Ethambutol(EMB)/Clofazimine(CFM) combination



衛生福利部疾病管制署

愛滋及結核病組

結核菌群最低抑(殺)菌濃度 藥敏盤製備 (REMA 法)

(第版)

制 定		審 查		核 准	
日期： 年 月 日		日期： 年 月 日		日期： 年 月 日	

【年度文件審查簽章 Annual Documenting Review】

審查年度	日期	品管人員	實驗室負責人 (PI)

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 2 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

文 件 修 訂 紀 錄			
版次	修 訂 內 容	修訂頁碼	修訂日期

修訂次數	日期	版本	修訂	審查	核准
第一次修訂					
第二次修訂					
第三次修訂					
第四次修訂					

註：本品質文件僅供本中心人員執行作業使用，未經主管書面同意，禁止翻印。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 3 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

1 目的

製備不同藥物種類及不同濃度藥物之含藥液態培養基藥敏盤，以利執行結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏測試，得以觀察結核菌群對不同藥物之感受性。

2 適用檢體種類

由病人檢體初次分離或繼代培養的菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

無。

5 試劑耗材

5.1 7H9 粉末 (Difco)

5.2 甘油

5.3 培養基營養劑：OADC enrichment (Becton, Dickinson and Company)

5.4 KH_2PO_4

5.5 藥物種類：14 種。Oxyphenutazone (OPBZ)、Meropenem (MEPM)、Mefloquine、Amoxicillin (AMC)、Potassium Clavulanate (CLAV)、Clofazamine (CFM)、Thioridazine (TDZ)、Nitazoxanide (NTZ)、Moxifloxacin (MOX)、Trimethoprim (TMP)、Sulfamethoxazole (SMX)、Isoniazid (INH)、Linezolid (LZD)

5.6 0.22 μL 過濾膜

5.7 二甲基亞砜：Dimethyl sulfoxide (DMSO)

5.8 無菌水 (Sterilized deionized H_2O)

5.9 0.1N HCl：先倒入 270 mL 二次水，再加 30 mL 1M HCl (MERK) (酸加到水)

5.10 4% NaOH：先倒入 300 mL 二次水，再加 100 mL 4M NaOH (80 g NaOH (MERK) 加二次水至 200 mL)

5.11 分析級乙醇：MERK。純度>99.5%。

5.12 75%酒精

5.13 9 公分培養皿

5.14 96-well plate with lid

5.15 50 mL 無菌離心管

5.16 5 mL 無菌離心管

5.17 5 mL 無菌吸管

5.18 10 mL 無菌吸管

5.19 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.20 100 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.21 200 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.22 300 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.23 1000 μL 具過濾塞之微量吸管尖

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 4 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

5.24 無菌之 250 mL 血清瓶

6 儀器設備

- 6.1 微量電子天秤
- 6.2 全自動高壓蒸氣滅菌器
- 6.3 生物安全操作櫃
- 6.4 振盪器
- 6.5 1-10 μL 微量吸管分注器
- 6.6 10-100 μL 微量吸管分注器
- 6.7 10-200 μL 微量吸管分注器
- 6.8 10-1000 μL 微量吸管分注器
- 6.9 電動吸管
- 6.10 電動八爪分注器
- 6.11 12 爪分注器
- 6.12 酸鹼測定儀

7 環境與設施安全

- 7.1 實驗前打開紫外線燈以維護生物安全操作櫃之無菌環境。
- 7.2 實驗人員需穿戴口罩、實驗衣及手套。
- 7.3 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑 75% 酒精，擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全操作櫃之潔淨。

8 液態培養基製備

8.1 一般 7H9 培養基

- (1) 取 0.94 g 7H9 粉末
- (2) 加蒸餾水 180 mL
- (3) 加甘油 0.4 mL
- (4) 混合均勻後進行高溫高壓蒸氣滅菌 (121 $^{\circ}\text{C}$, 15 分鐘)
- (5) 滅菌冷卻至室溫
- (6) 加 20 mL OADC 混合均勻
- (7) 如有需要時呈比例增加

8.2 酸性 7H9 培養基

- (1) 取 0.94 g 7H9 粉末
- (2) 加 KH_2PO_4 1.2 g
- (3) 加蒸餾水 180 mL
- (4) 加甘油 0.4 mL
- (5) 混合均勻後進行高溫高壓蒸氣滅菌 (121 $^{\circ}\text{C}$, 15 分鐘)
- (6) 滅菌冷卻至室溫
- (7) 加 20 mL OADC 混合均勻 (此時 pH 值應為 5.9-6.0)
- (8) 如有需要時呈比例增加

9 藥物貯存液 (stock solution) 製備

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 5 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

- 9.1 藥物貯存液使用溶劑與濃度製備請參照附件一。藥物貯存液須經 0.22 μL 膜過濾後冷凍於 -80°C 備用。
- 9.2 藥物貯存液的使用解凍 1 次為原則。

10 藥敏盤製備

- 10.1 96 孔盤之各種藥物配製濃度表如附件二。
- 10.2 96 孔盤周邊每格加入 200 μL 的無菌水，可以避免靠邊的藥物因培養過程液體揮發造成藥物濃度變化。
- 10.3 將 OPBZ 列之 GC (+)及 GC(-)分別加入 100 及 200 μL 酸性 7H9 培養液。除標示 OPBZ 列及 MEPM/CLAV 列藥敏格外，其餘含藥藥敏格內、GC(+)
及 GC (-) (含 MEPM/CLAV 列之 GC(+)
及 GC (-))加入一般 7H9 培養液。藥敏格及 GC(+)
每格 100 μL 。GC (-)每格 200 μL 。
- 10.4 TMP/SMX、AMC/CLAV、Mefloquine、CFM、TDZ、NTZ、MOX、INH、LZD、OPBZ 藥物溶液 (working solution)配製配方表如附件三。製備時注意藥物貯存液與 7H9 須均勻混合。此配方表可製備所指藥物約 15 株檢體量。如有需要時，藥物貯存液 (stock)與 7H9 或 DMSO 可呈比例增加。
將 TMP/SMX、AMC/CLAV、Mefloquine、CFM、TDZ、NTZ、MOX、INH 及 LZD working solution 依 96 孔盤之配製表 (附件二)加入所屬藥物之最高濃度格內，每格加入 100 μL 。
OPBZ working solution (90~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)則依 96 孔盤之配製表 (附件二)，依濃度標示加入所屬格內。留存剩餘 OPBZ working solution (90~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)於另一片新的 96 孔盤進行無菌測試。
- 10.5 含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CLAV 培養基製備
加入 CLAV (1 mg/mL) 100 μL 至 19.9 mL 7H9 培養基，均勻混合後可得 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CLAV 培養基。此配方可製備約 15 株檢體量。如有需要時，藥物貯存液 (stock)與 7H9 可呈比例增加。
將 96 孔盤標示 MEPM/CLAV 列之每格藥敏格加入 100 μL 含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CLAV 培養基備用 (不含 MEPM/CLAV 列之 GC(+)
及 GC (-))。
- 10.6 MEPM/CLAV working solution 製備
將 128 μL MEPM 藥物貯存液加入 1872 μL 含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CLAV 培養基均勻混合。
- 10.7 將 100 μL MEPM/CLAV working solution 依 96 孔盤之配製表 (附件二)加入所屬 MEPM/CLAV 列之最高濃度格內。
- 10.8 利用 12 爪分注器以吸排 100 μL /次、5 次/行的方式，將 working solution 與培養基均勻混合，第 5 次所吸取之 100 μL 藥物混合液排入下一階濃度培養液，自藥物高濃度至低濃度進行連續稀釋，則可得上一行對半稀釋之藥物混合液。重複上述步驟完成各個藥物濃度之連續稀釋即可得藥敏盤藥物配製。
將最後一行所剩餘 100 μL 藥物混合液留存於另一片新的 96 孔盤進行無菌測試。
- 10.9 培養基以製備日期作為批號標示於 96 孔盤上，供藥敏試驗紀錄追溯使用。

11 品質管制：製備完畢之藥敏盤須於當日加入菌液進行培養測試。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 6 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

12 品管執行：品管菌株應在每批號培養基進行試驗時與測試菌株以相同方法一起進行試驗。

品管菌株 陽性品管 H37Rv (ATCC 27294) 無菌試驗 未接種菌液的培養基置入溫箱培養 48 小時	品管結果 對 ISONIAZID 敏感 品管結果 無生長菌落
--	---

13 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

14 廢棄物處理

廢液或其他廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，以 121 °C，30 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

15 參考資料

- 15.1 Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. 1998. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. J Clin Microbiol. 36:362-6.
- 15.2 Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. 2003. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. Antimicrob Agents Chemother. 47(11): 3616-9.

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 7 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

附件一

藥物貯存液(stock solution)製備表

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

[#]: purity > 99.5%.

^{*}: distilled water.

[&]: Dimethyl sulfoxide.

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 8 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

附件二

96 孔盤之各種藥物配製濃度(μg/mL)表

接種日期： _____ 加 Resazurin 日期： _____ 判讀日期： _____ Lot : _____

SDW 1A	SDW 2A	SDW 3A	SDW 4A	SDW 5A	SDW 6A	SDW 7A	SDW 8A	SDW 9A	SDW 10A	SDW 11A	SDW 12A
SDW 1B	OPBZ 90 2B	80 3B	70 4B	60 5B	50 6B	40 7B	30 8B	20 9B	GC(+) 10B	GC(-) 11B	SDW 12B
SDW 1C	MEPM-CLAV 16/2.5 2C	8/2.5 3C	4/2.5 4C	2/2.5 5C	1/2.5 6C	0.5/2.5 7C	0.25/2.5 8C	0.12/2.5 9C	GC(+) 10C	GC(-) 11C	SDW 12C
SDW 1D	Mefloquine 64 2D	32 3D	16 4D	8 5D	4 6D	2 7D	1 8D	0.5 9D	GC(+) 10D	GC(-) 11D	SDW 12D
SDW 1E	AMC-CLAV 64/32 2E	32/16 3E	16/8 4E	8/4 5E	4/2 6E	2/1 7E	1/0.5 8E	0.5/0.25 9E	GC(+) 10E	GC(-) 11E	SDW 12E
SDW 1F	CFM 4 2F	2 3F	1 4F	0.5 5F	0.25 6F	0.12 7F	0.06 8F	0.03 9F	GC(+) 10F	GC(-) 11F	SDW 12F
SDW 1G	TDZ 128 2G	64 3G	32 4G	16 5G	8 6G	4 7G	2 8G	1 9G	GC(+) 10G	GC(-) 11G	SDW 12G
SDW 1H	SDW 2H	SDW 3H	SDW 4H	SDW 5H	SDW 6H	SDW 7H	SDW 8H	SDW 9H	SDW 10H	SDW 11H	SDW 12H

接種日期： _____ 加 Resazurin 日期： _____ 判讀日期： _____ Lot : _____

SDW 1A	SDW 2A	SDW 3A	SDW 4A	SDW 5A	SDW 6A	SDW 7A	SDW 8A	SDW 9A	SDW 10A	SDW 11A	SDW 12A
SDW 1B	NTZ 128 2B	64 3B	32 4B	16 5B	8 6B	4 7B	2 8B	1 9B	GC(+) 10B	GC(-) 11B	SDW 12B
SDW 1C	MOX 2 2C	1 3C	0.5 4C	0.25 5C	0.12 6C	0.06 7C	0.03 8C	0.015 9C	GC(+) 10C	GC(-) 11C	SDW 12C
SDW 1D	TMP-SMX 7/128 2D	3.5/64 3D	1.7/32 4D	0.8/16 5D	0.4/8 6D	0.2/4 7D	0.1/2 8D	0.05/1 9D	GC(+) 10D	GC(-) 11D	SDW 12D
SDW 1E	INH 4 2E	2 3E	1 4E	0.5 5E	0.25 6E	0.12 7E	0.06 8E	0.03 9E	GC(+) 10E	GC(-) 11E	SDW 12E
SDW 1F	LZD 8 2F	4 3F	2 4F	1 5F	0.5 6F	0.25 7F	0.12 8F	0.06 9F	GC(+) 10F	GC(-) 11F	SDW 12F
SDW 1G											SDW 12G
SDW 1H	SDW 2H	SDW 3H	SDW 4H	SDW 5H	SDW 6H	SDW 7H	SDW 8H	SDW 9H	SDW 10H	SDW 11H	SDW 12H

1. OPBZ: Oxyphenbutazone, MEPM: Meropenem, CLAV - Potassium Clavulanate, AMC: Amoxicillin, CFM : Clofazamin, TDZ: Thioridazine, NTZ: Nitazoxanide, MOX: Moxifloxacin, TMP: Trimethoprim, SMX: Sulfamethoxazole, INH: Isoniazid, LZD: Linezolid.
2. 藥物濃度單位：ug/mL。
3. SDW：無菌水 (Sterilized deionized H2O)。
4. OPBZ 列之 GC (+): 100 μL 酸性 7H9。
5. OPBZ 列之 GC (-): 200 μL 酸性 7H9。
6. 其餘藥物列之 GC (+): 100 μL 一般 7H9。
7. 其餘藥物列之 GC (-): 200 μL 一般 7H9。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 9 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

附件三

藥物溶液 (working solution) 配製配方表

Stock solution	(mg/mL)	Dilution in 7H9	Working solution ($\mu\text{g/mL}$)	Final solution ($\mu\text{g/mL}$)
Trimethoprim (TMP)	1	56 μL TMP	28/ 512	7/ 128
Sulfamethoxazole (SMX)	10	102.4 μL SMX 1842 mL 7H9	TMP/SMX	TMP/SMX
Amoxicillin (AMC)	10	51.2 μL AMC	256/ 128	64/ 32
Potassium Clavulanate (CLAV)	10	26 μL CLAV 1923 μL 7H9	AMC/CLAV	AMC/CLAV
Mefloquine	1	512 μL 1488 μL 7H9	512	64
Clofazamine (CFM)	1	32 μL 1968 mL 7H9	16	4
Thioridazine (TDZ)	10	102.4 μL 1898 mL 7H9	512	128
Nitazoxanide (NTZ)	10	102.4 μL 1840 μL 7H9 58 μL DMSO	512	128
Moxifloxacin (MOX)	1	16 μL 1984 μL 7H9	4	2
Isoniazid (INH)	1	32 μL 1968 μL 7H9	16	4
Linezolid (LZD)	1	64 μL 1936 μL 7H9	32	8
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	30.6 μL 1669.4 μL 7H9	180	90
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	27.2 μL 1672.8 μL 7H9	160	80
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	23.8 μL 1672.2 μL 7H9	140	70
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	20.4 μL 1679.6 μL 7H9	120	60
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	17.0 μL 1683 μL 7H9	100	50
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	13.6 μL 1686.4 μL 7H9	80	40
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	10.2 μL 1689.8 μL 7H9	60	30
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	6.8 μL 1693.2 μL 7H9	40	20

Final solution ($\mu\text{g/mL}$)：為執行藥敏試驗 REMA 法接種菌液後，藥敏盤格內藥物最後濃度。



衛生福利部疾病管制署

愛滋及結核病組


結核菌群最低抑(殺)菌濃度 藥敏盤製備 (瓊脂平板法) (第版)

制 定		審 查		核 准	
日期： 年 月 日		日期： 年 月 日		日期： 年 月 日	

【年度文件審查簽章 Annual Documenting Review】

審查年度	日期	品管人員	實驗室負責人 (PI)

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心


	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 2 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

文 件 修 訂 紀 錄			
版次	修 訂 內 容	修訂頁碼	修訂日期

修訂次數	日期	版本	修訂	審查	核准
第一次修訂					
第二次修訂					
第三次修訂					
第四次修訂					

註：本品質文件僅供本中心人員執行作業使用，未經主管書面同意，禁止翻印。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 3 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

1 目的

製備不同藥物種類及不同濃度藥物之含藥瓊脂藥敏盤，以利執行結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏測試，得以觀察結核菌群對不同藥物之感受性。

2 適用檢體種類

由病人檢體初次分離或繼代培養的菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

無。

5 試劑耗材

5.1 7H11 粉末 (Difco)

5.2 甘油

5.3 培養基營養劑：OADC enrichment (Becton, Dickinson and Company)

5.4 KH_2PO_4

5.5 藥物種類：14 種。Oxyphenutazone(OPBZ)、Meropenem、Mefloquine、Amoxicillin (AMC)、Potassium Clavulanate(CLAV)、Clofazamine(CFM)、Thioridazine(TDZ)、Nitazoxanide(NTZ)、Moxifloxacin(MOX)、Trimethoprim(TMP)、Sulfamethoxazole(SMX)、Isoniazid(INH)、Linezolid(LZD)

5.6 0.22 μL 過濾膜

5.7 二甲基亞砜：Dimethyl sulfoxide (DMSO)

5.8 無菌水 (Sterilized deionized H_2O)

5.9 0.1N HCl：先倒入 270 mL 二次水，再加 30 mL 1M HCl (MERK) (酸加到水)

5.10 4% NaOH：先倒入 300 mL 二次水，再加 100 mL 4M NaOH (80 g NaOH (MERK) 加二次水至 200 mL)

5.11 分析級乙醇：MERK。純度>99.5%。

5.12 75%酒精

5.13 9 公分四分格培養皿

5.14 藥敏盤透明標籤 (附件一)

5.15 無菌塑膠吸管

5.16 50 mL 無菌離心管

5.17 15 mL 無菌離心管

5.18 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.19 100 μL 具過濾塞之微量吸管尖


5.20 200 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.21 1000 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.22 無菌之 250 mL 血清瓶

5.23 無菌之 500 mL 血清瓶

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 4 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

5.24 無菌之 1000 mL 血清瓶

6 儀器設備

- 6.1 微量電子天秤
- 6.2 全自動高壓蒸氣滅菌器
- 6.3 生物安全操作櫃
- 6.4 振盪器
- 6.5 水浴槽
- 6.6 1-10 μL 微量吸管分注器
- 6.7 10-100 μL 微量吸管分注器
- 6.8 10-200 μL 微量吸管分注器
- 6.9 10-1000 μL 微量吸管分注器
- 6.10 電動吸管
- 6.11 酸鹼測定儀

7 環境與設施安全

- 7.1 實驗前打開紫外線燈以維護生物安全操作櫃之無菌環境。
- 7.2 實驗人員需穿戴口罩、實驗衣及手套。
- 7.3 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑 75%酒精，擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全操作櫃之潔淨。

8 培養基製備


8.1 一般 7H11 培養基

- (1) 取 21 g 7H11 粉末
- (2) 加蒸餾水 900 mL
- (3) 加甘油 5 mL
- (4) 混合均勻加熱煮沸至瓊脂呈透明狀
- (5) 進行高溫高壓蒸氣滅菌 (121 $^{\circ}\text{C}$ ，15 分鐘)
- (6) 滅菌後置於水浴槽保溫於 55-60 $^{\circ}\text{C}$
- (7) 加 100 mL OADC 混合均勻 (過高溫加入 OADC 將變質/白而無效)
- (8) 置於水浴槽保溫於 55-60 $^{\circ}\text{C}$ 備用
- (9) 如有需要時呈比例增加

8.2 酸性 7H11 培養基

- (1) 取 18.9 g 7H11 粉末
- (2) 加 KH_2PO_4 3.1 g
- (3) 加蒸餾水 945 mL
- (4) 加甘油 5.25 mL
- (5) 混合均勻加熱煮沸至瓊脂呈透明狀 (此時 pH 值應為 6.1-6.2)
- (6) 進行高溫高壓蒸氣滅菌 121 $^{\circ}\text{C}$ ，15 分鐘
- (7) 滅菌後置於水浴槽保溫於 55-60 $^{\circ}\text{C}$
- (8) 加 105 mL OADC 混合均勻 (過高溫加入 OADC 將變質/白而無效)

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 5 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

(9) 置於水浴槽保溫於 55-60°C 備用

(10) 如有需要時呈比例增加

9 藥物貯存液 (stock solution) 製備

9.1 藥物貯存液使用溶劑與濃度製備請參照附件二。藥物貯存液須經 0.22 μL 膜過濾後冷凍於 -80°C 備用。

9.2 藥物貯存液的使用解凍 1 次為原則。

10 藥敏盤製備

10.1 各種藥物配製濃度及使用培養基種類如附件三。

10.2 TMP/SMX、AMC/CLAV、Mefloquine、CFM、TDZ、NTZ、MOX、INH、LZD、OPBZ 藥敏盤配製配方表可參照附件四，此配方表可製備附件四所指藥物與其最終濃度約 15 片藥敏盤。如有需要時，藥物貯存液 (stock) 與 7H11 可呈比例增加。

上述藥物 (除 OPBZ 外) 不同濃度之藥敏盤製備，可先將 stock 以適當的溶劑進行連續稀釋而得不同濃度再參照附件四配方表進行製備。除 NTZ 須使用 DMSO 為溶劑外，其餘藥物則以無菌水進行稀釋即可。製備時注意藥物與溶劑須均勻混合。

例如，NTZ 藥物貯存液 (1 mg/mL) 利用 DMSO 以 1:1 稀釋後，再以附件四配方表進行配製，可得 Final concentration (μg/mL) 為 64 之藥物培養基。NTZ 其他濃度之藥敏盤可依上述方式類推製備而得。

10.3 MEPM/CLAV 藥敏盤製備

加入 CLAV (1 mg/mL) 250 μL 及 MEPM (1 mg/mL) 250 μL 至 98.2 mL 7H11 培養基，均勻混合後可得 MEPM/CLAV Final concentration (μg/mL) 16/2.5 之培養基。此配方可製備約 15 片藥敏盤。如有需要時，藥物貯存液 (stock) 與 7H11 可呈比例增加。

如配製 MEPM/CLAV Final concentration (μg/mL) 8/2.5 之培養基，則僅須將 MEPM stock (1 mg/mL) 與無菌水以 1:1 比例進行稀釋，再以上述配方進行製備即可。


10.4 10.2、10.3 製備之培養基依標示分注於培養皿內。每格須含有 5 mL 培養基並注意分注時不產生氣泡，以免影響培養後菌落之觀察與計數。每一四分格藥敏盤須具有一格 Control (C)。

10.5 製備完畢之藥敏盤待凝固後，倒置冷藏儲存於 2-8°C 環境備用。藥敏盤效期為 1 個月。

10.6 培養基以製備日期作為批號標示於包裝袋外，供藥敏試驗紀錄追溯使用。

11 品質管制：培養基應在效期內使用。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 6 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

12 品管執行：品管菌株應在每批號培養基進行試驗時與測試菌株以相同方法一起進行試驗。

品管菌株

陽性品管

H37Rv (ATCC 27294)

品管結果

對 ISONIAZID 敏感

無菌試驗

未接種菌液的培養基置入溫箱培養 48 小時

品管結果

無生長菌落

13 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。


14 廢棄物處理

廢液或其他廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，以 121 °C，30 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

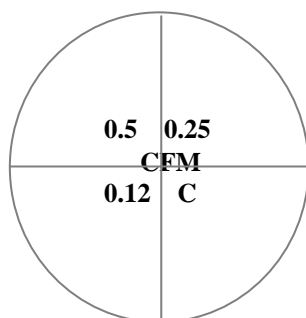
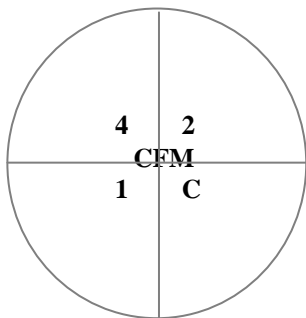
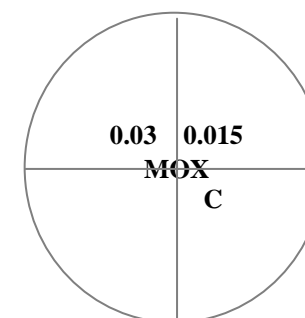
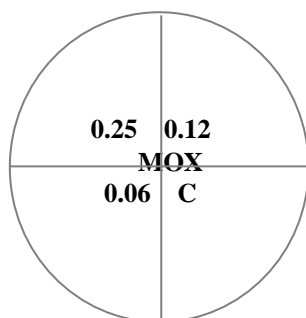
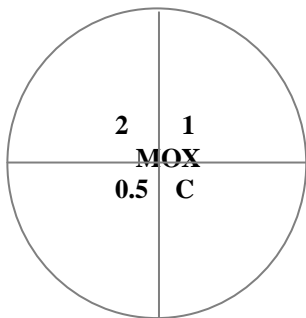
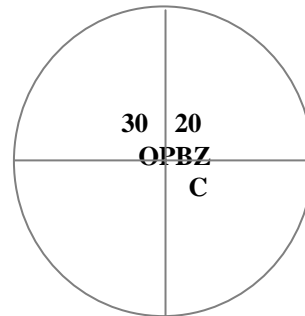
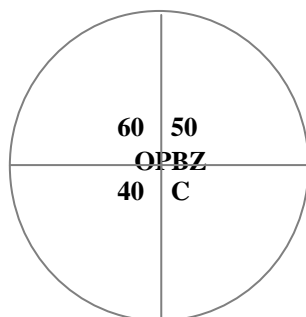
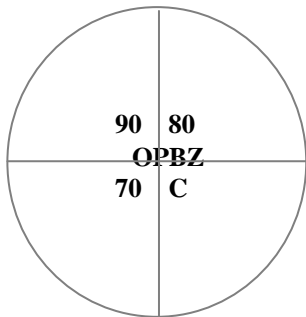
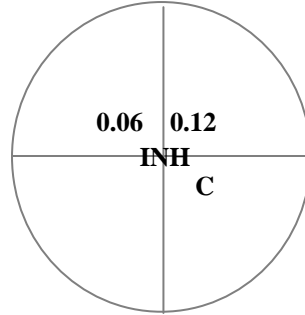
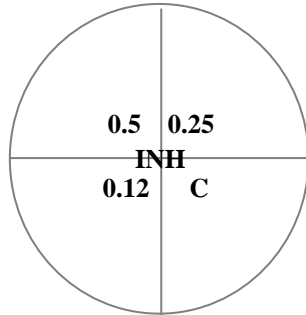
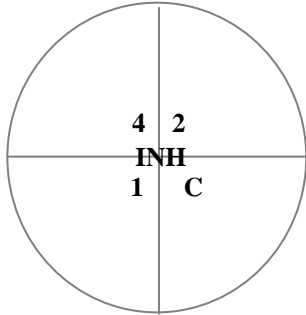
15 參考資料

- 15.1 Centers for Disease Control, Atlanta, Gerorgia 30333, Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory, 1981.
- 15.2 The National Committee for Clinical Laboratory Standards, Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; tentative standard-second edition, 2000.
- 15.3 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D, Isenberg, Vo12, section 7.7.1, 2004.


衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 7 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

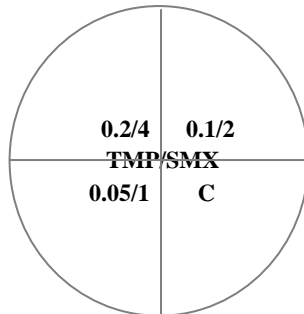
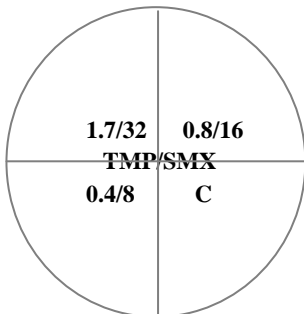
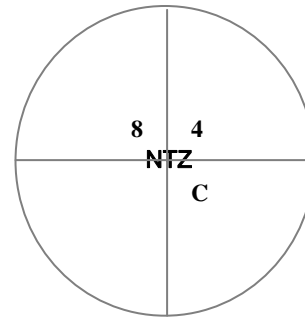
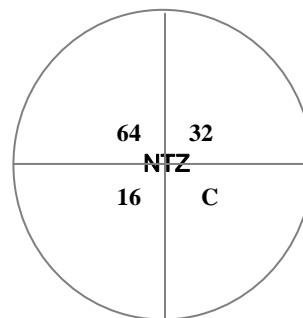
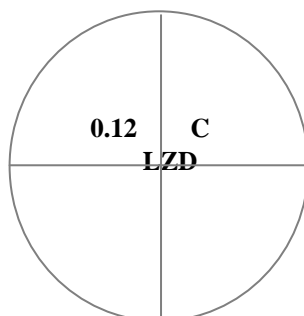
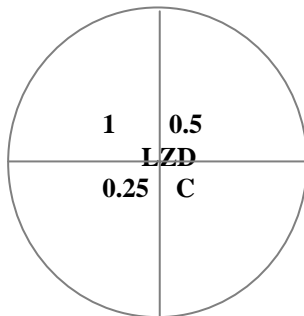
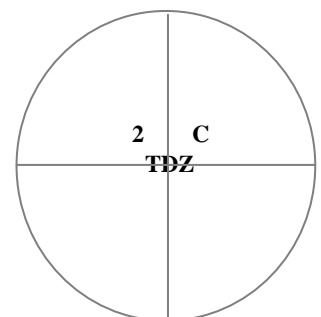
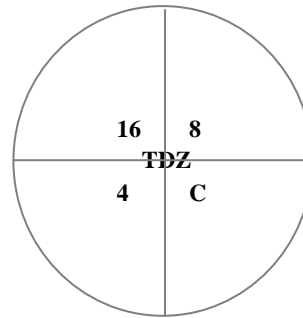
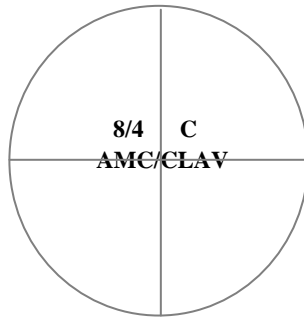
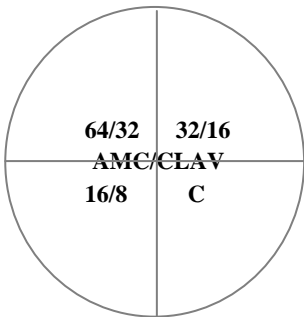
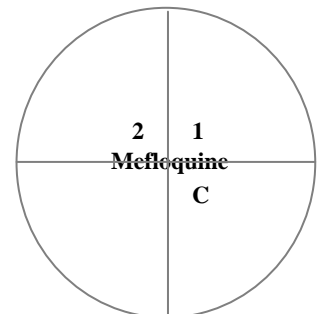
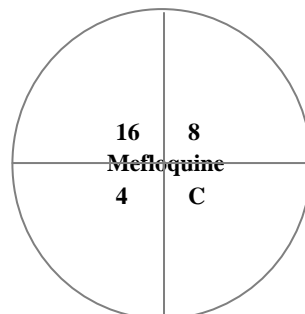
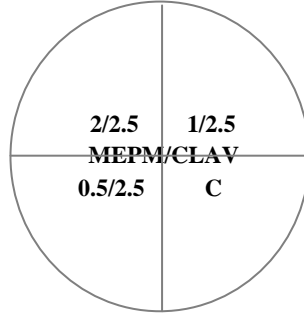
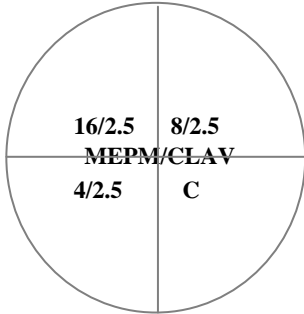
附件一 藥敏盤透明標籤 (以四分格培養皿顯示)




衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 8 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

附件一 藥敏盤透明標籤 (以四分格培養皿顯示)



衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 9 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

附件二

藥物貯存液(stock solution)製備表


藥物名稱	溶劑種類	藥物原液濃度 (mg/mL)
Trimethoprim (TMP)	0.1N HCl	1
Sulfamethoxazole (SMX)	4% NaOH	10
Mefloquine	Ethanol [#]	1
Amoxicillin (AMC)	0.1N HCl	10
Potassium Clavulanate (CLAV)	D/W [*]	10
Clofazamine (CFM)	DMSO ^{&}	1
Thioridazine (TDZ)	DMSO	10
Nitazoxanide (NTZ)	DMSO	10
Meropenem (MEPM)	DMSO	1
Potassium Clavulanate (CLAV)	D/W	1
Moxifloxacin (MOX)	DMSO	1
Oxyphenbutazone (OPBZ)	DMSO	10
Isoniazid (INH)	D/W	1
Linezolid (LZD)	D/W	1

[#]: purity > 99.5%.

^{*}: distilled water.

[&]: Dimethyl sulfoxide.

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心


	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 10 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

附件三 藥敏盤藥物配製濃度表 (µg/mL)與所使用培養基種類

酸性 7H11	一般 7H11									
OPBZ	MEPM/CLAV	Mefloquine	AMC/CLAV	CFM	TDZ	NTZ	MOX	TMP/SMX	INH	LZD
90	16/2.5	16	64/32	4	16	64	2	1.7 / 32	4	1
80	8 / 2.5	8	32 / 16	2	8	32	1	0.8 / 16	2	0.5
70	4 / 2.5	4	16 / 8	1	4	16	0.5	0.4 / 8	1	0.25
60	2 / 2.5	2	8 / 4	0.5	2	8	0.25	0.2 / 4	0.5	0.12
50	1 / 2.5	1	-	0.25	-	4	0.12	0.1 / 2	0.25	-
40	0.5 / 2.5	-	-	0.12	-	-	0.06	0.05 / 1	0.12	-
30	-	-	-	-	-	-	0.03	-	0.06	-
20	-	-	-	-	-	-	0.015	-	0.03	-

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

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 11 頁/共 11 頁
	版次：	盤製備 (瓊脂平板法)	核准日期： 年 月 日

附件四

藥敏盤配製配方表

Stock solution	(mg/mL)	Dilution in 7H11	Final concentration ($\mu\text{g/mL}$)
Trimethoprim (TMP)	1	700 μL TMP	7 (TMP) / 128 (SMX)
Sulfamethoxazole (SMX)	10	1280 μL SMX 98 mL 7H11	
Amoxicillin (AMC)	10	640 μL AMC	64 (AMC) / 32 (CLAV)
Potassium Clavulanate (CLAV)	10	320 μL CLAV 99 mL 7H11	
Mefloquine	1	6400 μL 93.6 mL 7H11	64
Clofazamine (CFM)	1	960 μL 239.04 mL 7H11	4
Thioridazine (TDZ)	10	3072 μL 236.928 mL 7H11	128
Nitazoxanide (NTZ)	10	1280 μL 98.7 mL 7H11	128
Moxifloxacin (MOX)	1	200 μL 99.8 mL 7H11	2
Isoniazid (INH)	1	400 μL 99.6 mL 7H11	4
Linezolid (LZD)	1	800 μL 99.2 mL 7H11	8
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	900 μL 99.1 mL 7H11	90
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	800 μL 99.2 mL 7H11	80
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	700 μL 99.3 mL 7H11	70
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	600 μL 99.4 mL 7H11	60
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	500 μL 99.5 mL 7H11	50
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	400 μL 99.6 mL 7H11	40
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	300 μL 99.7 mL 7H11	30
Oxyphenbutazone (OPBZ)	10	200 μL 99.8 mL 7H11	20



衛生福利部疾病管制署

愛滋及結核病組

結核菌群最低抑(殺)菌濃度 協同作用藥敏盤製備 (REMA 法)

(第版)

制 定		審 查		核 准	
日期： 年 月 日		日期： 年 月 日		日期： 年 月 日	

【年度文件審查簽章 Annual Documenting Review】

審查年度	日期	品管人員	實驗室負責人 (PI)

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 2 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

文 件 修 訂 紀 錄			
版次	修 訂 內 容	修訂頁碼	修訂日期

修訂次數	日期	版本	修訂	審查	核准
第一次修訂					
第二次修訂					
第三次修訂					
第四次修訂					

註：本品質文件僅供本中心人員執行作業使用，未經主管書面同意，禁止翻印。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 3 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

1 目的

製備不同藥物種類及不同濃度藥物之含藥液態培養基藥敏盤，以利執行結核菌群最低抑(殺)菌濃度之協同作用藥敏測試，得以觀察結核菌群對不同藥物組合之感受性。

2 適用檢體種類

由病人檢體初次分離或繼代培養的菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

無。

5 試劑耗材

5.1 7H9 粉末 (Difco)

5.2 甘油

5.3 培養基營養劑：OADC enrichment (Becton, Dickinson and Company)

5.4 KH_2PO_4

5.5 藥物種類：14 種。Ethambutol(EMB)、Clofazimine (CFM)

5.6 0.22 μL 過濾膜

5.7 二甲基亞砜：Dimethyl sulfoxide (DMSO)

5.8 無菌水 (Sterilized deionized H_2O)

5.9 0.1N HCl：先倒入 270 mL 二次水，再加 30 mL 1M HCl (MERK) (酸加到水)

5.10 4% NaOH：先倒入 300 mL 二次水，再加 100 mL 4M NaOH (80 g NaOH (MERK) 加二次水至 200 mL)

5.11 分析級乙醇：MERK。純度>99.5%。

5.12 75%酒精

5.13 9 公分培養皿

5.14 96-well plate with lid

5.15 50 mL 無菌離心管

5.16 5 mL 無菌離心管

5.17 5 mL 無菌吸管

5.18 10 mL 無菌吸管

5.19 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.20 100 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.21 200 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.22 300 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.23 1000 μL 具過濾塞之微量吸管尖

5.24 無菌之 250 mL 血清瓶

6 儀器設備

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 4 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

- 6.1 微量電子天秤
 - 6.2 全自動高壓蒸氣滅菌器
 - 6.3 生物安全操作櫃
 - 6.4 振盪器
 - 6.5 1-10 μL 微量吸管分注器
 - 6.6 10-100 μL 微量吸管分注器
 - 6.7 10-200 μL 微量吸管分注器
 - 6.8 10-1000 μL 微量吸管分注器
 - 6.9 電動吸管
 - 6.10 電動八爪分注器
 - 6.11 12 爪分注器
 - 6.12 酸鹼測定儀
- 7 環境與設施安全
- 7.1 實驗前打開紫外線燈以維護生物安全操作櫃之無菌環境。
 - 7.2 實驗人員需穿戴口罩、實驗衣及手套。
 - 7.3 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑 75%酒精，擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全操作櫃之潔淨。
- 8 液態培養基製備
- 8.1 一般 7H9 培養基
 - (1) 取 0.94 g 7H9 粉末
 - (2) 加蒸餾水 180 mL
 - (3) 加甘油 0.4 mL
 - (4) 混合均勻後進行高溫高壓蒸氣滅菌 (121 $^{\circ}\text{C}$ ，15 分鐘)
 - (5) 滅菌冷卻至室溫
 - (6) 加 20 mL OADC 混合均勻
 - (7) 如有需要時呈比例增加
- 9 藥物貯存液 (stock solution) 製備
- 9.1 藥物貯存液使用溶劑與濃度製備請參照附件一。藥物貯存液須經 0.22 μL 膜過濾後冷凍於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 備用。
 - 9.2 藥物貯存液的使用解凍 1 次為原則。
- 10 藥敏盤製備
- 10.1 96 孔盤之各種藥物配製濃度表如附件二。
 - 10.2 96 孔盤周邊每格加入 200 μL 的無菌水，可以避免靠邊的藥物因培養過程液體揮發造成藥物濃度變化。
 - 10.3 在 GC(+)、GC (-)及 QC 藥敏格加入一般 7H9 培養液。GC(-)加入 200ul 的 7H9 培養液，GC(+)、QC 加入 100 μL 的 7H9 培養液。
 - 10.4 EMB、CFM 藥物溶液 (working solution)配製配方表如附件三。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 5 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

- 測試 EMB 或 CFM 單一作用的各種濃度藥敏格中，加入 7H9 及 EMB 各 50 μL 或 7H9 及 CFM 各 50 μL。
- 依 96 孔盤之配製表(附件二)，加入 EMB、CFM 各 50 μL 至所屬格中。
- 10.5 將最末的稀釋濃度所剩餘 100 μL 藥物混合液排入 QC 格進行無菌測試。
- 10.6 培養基以製備日期作為批號標示於 96 孔盤上，供藥敏試驗紀錄追溯使用。
- 11 自行配製之含藥物培養基之確效試驗
- 11.1 在先前實驗中已測試過Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)在2%濃度下不影響結核菌生長。
- 12 藥物敏感性試驗步驟
- 12.1 挑選固態或液態培養基培養出之新鮮初代(primary)結核菌做為測試菌，於BSL-3 實驗室中調製Macfarland 1.0 測試菌液；再將菌液以7H9 broth稀釋為1:20(取12滴加入6 mL 7H9兩管)，然後接種100μL 之1:20 稀釋菌液入96 孔盤，同時接種至Sheep blood agar (BD®)做無菌測試；接種菌液再繼續連續稀釋至10⁻⁴ 菌液(取100μL加入9.9 mL 0.85%食鹽水)，接種至Middlebrook 7H11 瓊脂平板培養基做接種菌液之菌落計數(colony count)，接種量需固定，以免影響測試結果。
- 12.2 接種完畢之96 孔盤用塑膠袋封好，置入35-37°C 溫箱培養。培養7-10 天後，加入0.02%的resazurin，於48-72 小時後觀察顏色變化。若為藍色判定為敏感，若為粉紅色(需與對照組一樣粉紅)則判定為抗藥，最低的藥物敏感濃度(藍色)即為最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)。
- 12.3 將Sheep blood agar(BD®)置入35-37°C 溫箱中，培養48 小時觀察有無污染菌生長。
- 12.4 菌落計數之Middlebrook 7H11 瓊脂平板培養基置入35-37°C 溫箱中培養約14-21天，待單一菌落生長至肉眼可觀察及單一菌落間生長未融合前，以解剖顯微鏡輔助觀察菌落型態及菌落計數。
- 13 評估 EMB、CFM 藥物協同作用則依 fractional inhibitory concentration index (FICI) 進行計算：

$$FICI = \frac{MIC_{drug\ A\ combination}}{MIC_{drug\ A\ alone}} + \frac{MIC_{drug\ B\ combination}}{MIC_{drug\ B\ alone}}$$
 $FICI \leq 0.5:$ 協同作用; $0.5 < FICI \leq 2:$ 無顯著效益; $FICI > 2:$ 拮抗作用。
- 14 品質管制：製備完畢之藥敏盤須於當日加入菌液進行培養測試。
- 15 品管執行：品管菌株應在每批號培養基進行試驗時與測試菌株以相同方法一起進行試驗。

品管菌株

陽性品管

H37Rv (ATCC 27294)

無菌試驗

品管結果

對 ISONIAZID 敏感

品管結果

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 6 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

未接種菌液的培養基置入溫箱培養 48 小時 無生長菌落

16 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

17 廢棄物處理

廢液或其他廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，以 121 °C，30 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

18 參考資料

- 18.1 Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. 1998. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. J Clin Microbiol. 36:362-6.
- 18.2 Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. 2003. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. Antimicrob Agents Chemother. 47(11): 3616-9.

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 7 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

附件一

藥物貯存液(stock solution)製備表

藥物名稱	溶劑種類	藥物貯存液濃度 (mg/mL)
Ethambutol (EMB)	D/W	1
Clofazamine (CFM)	DMSO ^{&}	1

D/W: distilled water.

[&]: Dimethyl sulfoxide.

藥名	存放位置	品牌	Lot	效價	購買民國年
Ethambutol	配藥室防潮箱	SIGMA、 USP	022k1600、 H	100%	95、97
Clofazimine	配藥室防潮箱	USP	F1C392	100%	101

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏 盤製備 (REMA 法)	頁碼：第 8 頁/共 9 頁
	版次：		核准日期： 年 月 日

附件二

96 孔盤之各種藥物配製濃度(µg/mL)表

接種日期：_____ 加 Resazurin 日期：_____

判讀日期：_____ Lot：_____

D/W 1A	D/W 2A	D/W 3A	D/W 4A	D/W 5A	D/W 6A	D/W 7A	D/W 8A	D/W 9A	D/W 10A	D/W 11A	D/W 12A
D/W 1B	EMB 32 CFM 4	EMB 32 CFM 2	EMB 32 CFM 1	EMB 32 CFM 0.5	EMB 32 CFM 0.25	EMB 32 CFM 0.12	EMB 32 CFM 0.06	EMB 32 CFM 0.03	GC(+) 10B	GC(-) 11B	QC+100ul 7H9 CFM 12B
D/W 1C	EMB 16 CFM 4	EMB 16 CFM 2	EMB 16 CFM 1	EMB 16 CFM 0.5	EMB 16 CFM 0.25	EMB 16 CFM 0.12	EMB 16 CFM 0.06	EMB 16 CFM 0.03	GC(+) 10C	GC(-) 11C	QC+100ul 7H9 CFM 12C
D/W 1D	EMB 8 CFM 4	EMB 8 CFM 2	EMB 8 CFM 1	EMB 8 CFM 0.5	EMB 8 CFM 0.25	EMB 8 CFM 0.12	EMB 8 CFM 0.06	EMB 8 CFM 0.03	GC(+) 10D	GC(-) 11D	QC+100ul 7H9 CFM 12D
D/W 1E	EMB 4 CFM 4	EMB 4 CFM 2	EMB 4 CFM 1	EMB 4 CFM 0.5	EMB 4 CFM 0.25	EMB 4 CFM 0.12	EMB 4 CFM 0.06	EMB 4 CFM 0.03	GC(+) 10E	GC(-) 11E	QC+100ul 7H9 CFM 12E
D/W 1F	EMB 32 2F CFM 4	EMB 16 3F CFM 2	EMB 8 4F CFM 1	EMB 4 5F CFM 0.5	EMB 2 6F CFM 0.25	EMB 1 7F CFM 0.12	EMB 0.5 8F CFM 0.06	EMB 0.25 9F CFM 0.03	GC(+) 10F	GC(-) 11F	QC+100ul 7H9 CFM 12F
D/W 1G	CFM 4 2G	CFM 2 3G	CFM 1 4G	CFM 0.5 5G	CFM 0.25 6G	CFM 0.12 7G	CFM 0.06 8G	CFM 0.03 9G	GC(+) 10G	GC(-) 11G	QC+100ul 7H9 CFM 12G
D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W

接種日期：_____ 加 Resazurin 日期：_____

判讀日期：_____ Lot：_____

D/W 1A	D/W 2A	D/W 3A	D/W 4A	D/W 5A	D/W 6A	D/W 7A	D/W 8A	D/W 9A	D/W 10A	D/W 11A	D/W 12A
D/W 1B	EMB 2 CFM 4	EMB 2 CFM 2	EMB 2 CFM 1	EMB 2 CFM 0.5	EMB 2 CFM 0.25	EMB 2 CFM 0.12	EMB 2 CFM 0.06	EMB 2 CFM 0.03	GC(+) 10B	GC(-) 11B	QC+100ul 7H9 CFM 12B
D/W 1C	EMB 1 CFM 4	EMB 1 CFM 2	EMB 1 CFM 1	EMB 1 CFM 0.5	EMB 1 CFM 0.25	EMB 1 CFM 0.12	EMB 1 CFM 0.06	EMB 1 CFM 0.03	GC(+) 10C	GC(-) 11C	QC+100ul 7H9 CFM 12C
D/W 1D	EMB 0.5 CFM 4	EMB 0.5 CFM 2	EMB 0.5 CFM 1	EMB 0.5 CFM 0.5	EMB 0.5 CFM 0.25	EMB 0.5 CFM 0.12	EMB 0.5 CFM 0.06	EMB 0.5 CFM 0.03	GC(+) 10D	GC(-) 11D	QC+100ul 7H9 CFM 12D
D/W 1E	EMB 0.25 CFM 4	EMB 0.25 CFM 2	EMB 0.25 CFM 1	EMB 0.25 CFM 0.5	EMB 0.25 CFM 0.25	EMB 0.25 CFM 0.12	EMB 0.25 CFM 0.06	EMB 0.25 CFM 0.03	GC(+) 10E	GC(-) 11E	QC+100ul 7H9 CFM 12E
D/W 1F	QC+100ul 7H9 EMB 2F	QC+100ul 7H9 EMB 3F	QC+100ul 7H9 EMB 4F	QC+100ul 7H9 EMB 5F	QC+100ul 7H9 EMB 6F	QC+100ul 7H9 EMB 7F	QC+100ul 7H9 EMB 8F	QC+100ul 7H9 EMB 9F	GC(-) 10F	GC(-) 11F	QC+100ul 7H9 CFM 12F
D/W 1G	2G	3G	4G	5G	6G	7G	8G	9G	10G	11G	12G
D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W	D/W

藥物單位: µg/mL

D/W: Sterilized deionized H₂O

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

	編號：	結核菌群最低抑(殺)菌濃度藥敏	頁碼：第 9 頁/共 9 頁
	版次：	盤製備 (REMA 法)	核准日期： 年 月 日

附件三

藥物溶液 (working solution) 配製配方表

Stock solution	(mg/mL)	Dilution in 7H9 (μ L)	Working solution (μ g/mL)	Final solution (μ g/mL)
Ethambutol(EMB)	1	512 3488 7H9	128	32
Clofazimine (CFM)	1	64 3936 7H9	16	4

Final solution (μ g/mL)：為執行藥敏試驗 REMA 法接種菌液後，藥敏盤格內藥物最後濃度。