

## 多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発

所 属 国立感染症研究所 細菌第一部  
研究者 山崎 利雄

分担研究者

極東製薬工業（株） 三輪 昭成

### 要旨

RFP・INH・SM(または EB)の薬剤混合液により、結核菌の主要 5 薬剤に単剤耐性を持つ参照菌株の最低阻止濃度は劇的に低下した。このことは、多剤併用療法に則した結核菌薬剤感受性試験法の確立が可能であることを示唆していた。また、ATP 測定による迅速薬剤感受性試験法の微量化ができた。

### 1. 研究目的

わが国の結核の治療は、耐性菌出現の防止と早期に排菌を陰性化させるために、抗結核剤を 2 から 3 剤組み合わせる多剤併用療法が行われている。近年は、ヒドラジッド (INH)、リファンピシン (RFP) とストレプトマイシン (SM) またはエタンブトール (EB) にピラジナミド (PZA) を加えて、6 ヶ月で治療する短期化学療法が主流になっている。結核患者の治療において正確な菌の薬剤感受性を知ることは重要であり、早期に菌の薬剤感受性がわかれば、患者の予後を最良にすることができる。また、自動化により、検査技師の結核感染の危険性を最小にする事ができる。さらに、治療期間の短縮により結果的に医療費の抑制にもつながる。そこでわれわれは、生きている微生物の数が、微生物の持っている adenosine triphosphate (ATP) 量を測定することにより知ることができることに着目し、結核菌の単剤について薬剤感受性を検査する迅速な方法 (ATP 法と略す) を開発した。薬剤感受性試験の迅速化を図るために、ATP 法を応用し、実際の結核治療に行われている多剤併用療法に則した、新しい薬剤感受性試験法を開発することを最終目的としたが、昨年度は、結核菌の参照菌株に対する主要 5 結核薬剤の 2 薬剤の併用効果を、液体培地を用いた微量希釈法にて調べた。また、開発した ATP 法 (マクロ法) をマイクロプレート法 (マイクロ法) へと展開を考え検討として、結核菌標準菌株による基礎的な検討より、マイクロ法への展開が十分可能である事を確認した。今年度は、結核菌の参照菌株に対する主要 3 薬剤の併用効果を微量希釈法にて調べ、本薬剤感受性試験に用いる適切な薬剤濃度の決定をする。そして、臨床分離株を用いて、Agar Proportion 法 (寒天法) との比較より、マイクロ法の有用性を確認することを目的とした。

### 2. 研究方法

#### (1) 使用菌液の調製

研究室保存の結核菌参照菌株 American Type Culture Collection (ATCC) 27294、ATCC35820 [streptomycin (SM) 耐性]、ATCC35822 [isoniazid (INH) 耐性]、ATCC35827 [kanamycin (KM) 耐性]、ATCC35837 [ethambutol (EB) 耐性]、ATCC35838 [rifampicin (RFP) 耐性] と、DDH マイコバクテリアにて同定された臨床分離結核菌 50 株を用いた。-80℃保存菌株を 1% 小川培地に接種、37℃で 2~4 週間培養後、1/4 白金耳の菌塊を Middlebrook 7H9 broth 5ml に懸濁し、通常大気中、37℃で 3~7 日間培養し、菌浮遊液を得た。

この菌液を充分攪拌、10 分間静置後、その上清を新しい Middlebrook 7H9 broth にて McFarland No. 0.5 濁度 (O. D. 0.1, 530nm) に調製した。

#### (2) 微量液体希釈法での最低阻止濃度 (minimum inhibitory concentration ; MIC) の測定

結核菌の薬剤感受性試験用ブロスミック MTB-1 キット (極東製薬工業) を用いて参照菌株の MIC を測定した。接種菌量は、O. D. 0.1 の濁度菌液をさらに Middlebrook 7H9 broth にて 100 倍希釈した後、その 0.2ml を薬剤乾燥固着 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、5%CO<sub>2</sub>、36±1℃にて培養し、7 日～10 日後、肉眼的に観察し、菌の発育が全く認められない最小濃度を MIC とした。

#### (3) 主要 5 薬剤の併用効果の検討

ブロスミック MTB-1 の各 1～11 列のウェルに RFP 1.0～0.004 (最終濃度 0.5～0.002) μg/ml、INH 1.0～0.003125 (最終濃度 0.5～0.0015625) μg/ml、EB 8.0～0.25 (最終濃度 4.0～0.125) μg/ml、SM 8.0～0.50 (最終濃度 4.0～0.25) μg/ml をそれぞれ 0.1ml ずつ分注し、12 列目と RFP、INH、EB、SM の固着してあるウェルには、Middlebrook 7H9 broth を 0.1ml ずつ分注し、各参照菌株の菌懸濁液 (O. D. 0.1) の 1/100 希釈液の 0.1ml ずつを 1～12 列に接種した。37℃で培養し、7 日と 10 日目にコロニーの有無を肉眼的に判定した。

#### (4) RFP と INH 存在下における主要 5 薬剤の併用効果の検討

ブロスミック MTB-1 の各 1～11 列のウェルに RFP 0.016 あるいは 0.008 (最終濃度 0.008 あるいは 0.004) μg/ml に INH 0.25～0.03125 (最終濃度 0.125～0.016) μg/ml を加えた薬剤混合液 0.1ml ずつ分注し、12 列目には、Middlebrook 7H9 broth を 0.1ml ずつ分注した。各菌液 (O. D. 0.1) の 1/100 希釈液の 0.1ml ずつを 1～12 列に接種した。37℃で培養し、7 日と 10 日目にコロニーの有無を肉眼的に判定した。

#### (5) RFP、INH と SM あるいは EB 存在下における主要 5 薬剤の併用効果の検討

ブロスミック MTB-1 の各 1～11 列のウェルに RFP 0.016 と 0.008 (最終濃度 0.008 と 0.004) μg/ml、INH 0.25～0.03125 (最終濃度 0.125～0.016) μg/ml と SM 4.0～1.0 (最終濃度 2.0～0.50) μg/ml あるいは EB 2.0～0.50 (最終濃度 1.0～0.25) μg/ml を加えた薬剤混合液を 0.1ml ずつ分注し、12 列目には、Middlebrook 7H9 broth を 0.1ml ずつ分注し、各菌液 (O. D. 0.1) の 1/100 希釈液の 0.1ml ずつを 1～12 列に接種した。37℃で培養し、7 日と 10 日目にコロニーの有無を肉眼的に判定した。

#### (6) ATP 法 (マイクロ法) による薬剤感受性試験

一次選択 4 薬剤の原末を INH 0.1 μg/ml、RFP 2.0 μg/ml、EB 2.5 μg/ml、SM 2.0 μg/ml の濃度に希釈調整し、プレートの所定位置に 0.1ml を分注後、18 時間常温乾燥させて作製した薬剤固着プレートに、濁度計にて O. D.=0.1 に正確に調整した菌液 0.05ml を Middlebrook 7H9 broth 2.0ml に加え攪拌した後、薬剤固着プレートの所定ウェルに 0.1ml ずつ接種し、36±1℃好気培養にて 5 日間培養をおこなった。培養後のプレートウェルに filamentous cell treatment (FCT) を 0.05ml ずつ添加し、室温で 30 分放置後、ATP 抽出試薬を 0.05ml 加え、プレート専用ドライブロックバスで、65℃、10 分間抽出を行った。次に常温に戻した後、発光マイクロプレートリーダー「ルミプロット」バイオハザード型 (PSS 社) にて発光試薬を 0.1ml 自動分注後、発光量を測定した。判定は RLU ratio (薬剤含有培養液の RLU 測定値÷薬剤含有培養液の RLU 測定値) で行ない、RLU ratio ≤0.5 を感性 (S)、RLU ratio >0.5 を耐性 (R) とした。

#### (7) 寒天法による薬剤感受性試験

NCCLS M24-T に記載された Middlebrook 7H10 寒天培地を用いる比率法を正確に遵守して、INH 0.2 μg/ml、RFP 1.0 μg/ml、EB 5.0 μg/ml、SM 2.0 μg/ml とコントロール含む 4 分画培地を各々作製した。O. D.=0.2 の調整菌液を更に、滅菌精製水にて 100 倍希釈および 10,000 倍希釈した菌液を調整した。発育陽性対照および薬剤含有培地には 100 倍希釈菌液を、1%対照培地には 10,000 希釈菌液を培地に 0.1ml ずつ接種し、36±1℃、5%炭酸ガス培養にて約 3 週間培養を行った。判定は、薬剤含有培地での菌コロニー数÷1%対照培地での菌コロ

ニ一数で行ない、菌コロニー数が 1%以下の耐性率を示した薬剤を感性 (S)、菌コロニー数が 1%以上の耐性率を示した薬剤を耐性 (R) と判定した。

### 3. 研究成果

#### (1) RFP, INH, SM, EB と主要 4 薬剤の併用効果

ブロスミック MTB-1 の各薬剤が固着してある 96 穴マイクロプレート各 1~11 列のウェルに RFP 0.5~0.002  $\mu\text{g/ml}$ 、INH 0.5~0.016  $\mu\text{g/ml}$ 、SM 4.0~0.125  $\mu\text{g/ml}$ 、EB 4.0~0.125  $\mu\text{g/ml}$  の濃度にそれぞれ加えて、各参照菌株の発育が、どの程度抑制されるか調べた結果を Table 1 に示す。各薬剤に耐性を持つ参照菌株の発育は、RFP 0.008  $\mu\text{g/ml}$ 、INH 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 、SM 2.0  $\mu\text{g/ml}$ 、EB 1.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度以上では完全に抑制された。RFP 0.004  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では、ATCC35837、ATCC35822 では抑制傾向が見られ、INH 0.0625  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では、ATCC35837、ATCC35822、ATCC35838 では抑制傾向が見られた。しかし、RFP 0.002  $\mu\text{g/ml}$ 、INH 0.03  $\mu\text{g/ml}$ 、SM 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、EB 0.5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では全く抑制されなかった。

#### (2) RFP と INH の併用効果の検討

RFP と INH の両薬剤が存在した場合、主要 5 薬剤それぞれに耐性を持つ参照菌株の MIC の低下を調べた結果を Table 2 に示す。RFP 0.008  $\mu\text{g/ml}$  に INH の濃度を 0.125~0.016  $\mu\text{g/ml}$  に含有させた場合、INH の濃度に依存して MIC 値は高くなった。RFP 0.004  $\mu\text{g/ml}$  に INH の濃度を 0.125~0.016  $\mu\text{g/ml}$  に含有させた場合、INH 0.125  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で参照菌株全てに併用効果が見られた。

#### (3) RFP、INH と SM あるいは EB の併用効果の検討

RFP と INH と SM の 3 薬剤が存在した場合、主要 5 薬剤それぞれに耐性を持つ参照菌株の MIC の低下を調べた結果を Table 3 に示す。全ての参照菌株において併用効果が認められたが、全ての株が感性菌であると判定できるのは、RFP 0.008  $\mu\text{g/ml}$  の濃度の時は、INH 0.063、SM 1.0  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度を持つ系であった。RFP 0.004  $\mu\text{g/ml}$  の濃度の時は、INH 0.125、SM 1.0  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度を持つ系であった。

RFP と INH と EB の 3 薬剤が存在した場合、主要 5 薬剤それぞれに耐性を持つ参照菌株の MIC の低下を調べた結果を Table 4 に示す。全ての参照菌株において併用効果が認められたが、全ての株が感性菌であると判定できるのは、RFP 0.008  $\mu\text{g/ml}$  の濃度の時は、INH 0.063、EB 0.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度を持つ系であった。RFP 0.004  $\mu\text{g/ml}$  の濃度の時は、INH 0.125、EB 0.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度を持つ系であった。

#### (4) ATP 法と寒天法との薬剤感受性試験結果の比較検討

ATCC 標準 5 菌株を 5 回ずつ反復試験した時の再現性試験成績を Table 5 に示した。感性株および単一耐性株ともに、感性、耐性を再現性を持って正確に判定できることを確認した。測定期間は全て、培養 5 日間であった。INH における相関性成績を Table 6 に示した。マイクロ法で感性であった 30 株は、寒天法でも感性であった。マイクロ法耐性であった 20 株中 19 株は寒天法でも耐性、残り 1 株は寒天法では感性であった。RFP の相関性成績を Table 7 に示した。マイクロ法で感性であった 32 株中 31 株は寒天法でも感性であった。残り 1 株は寒天法では耐性であった。マイクロ法で耐性であった 18 株は、全株とも寒天法でも耐性であった。EB の相関性成績を Table 8 に示した。マイクロ法で感性であった 37 株中 36 株は寒天法でも感性であった。残り 1 株は、寒天法で耐性であった。マイクロ法で耐性であった 13 株中 12 株は寒天法でも耐性であった。残り 1 株は、寒天法で感性であった。SM の相関性成績を Table 9 に示した。マイクロ法で感性であった 39 株は、全株とも寒天法でも感性であった。マイクロ法で耐性であった 11 株中 9 株は寒天法でも耐性であった。残り 2 株は、寒天法で感性であった。寒天法を gold standard とした場合の判定一致率をまとめたものを Table 10 に示した。判定一致率は、INH、RFP が 98%、EB、SM で 96%と極めて高い判定一致率を示した。不一致株は、INH 1 株、RFP 1 株、EB 2 株、SM 2 株であった。不一致株の内訳として、寒天法で耐性、マイクロ法で感性と判定

された過大評価率の頻度は 0.0%から 2.0%と低く良好な結果を示した。また、その逆の判定である過小評価率の頻度も、0.0~4.0%と低く良好な成績であった。

#### 4. 考 察

わが国では、現在のところ結核患者から分離される 95%は抗結核薬に感性な結核菌である。しかし、多剤耐性菌による結核感染症例は、結核病学会等で治療に苦慮していると報告されている。特に RFP は、有効な抗結核剤であるが、検査の結果、耐性菌と判定されると、別の薬剤に代えて治療が続けられる。そのため、患者は、適切な治療を受けられず、予後が悪かったり、再発の恐れがあったりする。結核の治療は、多剤併用療法なので、一剤に耐性菌であっても、他の薬剤に感性菌であれば、菌は死滅させられ、治療は成功する。そのため、RFP を越える有効な治療薬がない現在、より適切な治療のために、実際の治療に則した新しい薬剤感受性試験法の確立が望まれている。ところが、わが国の結核菌薬剤感受性試験法は、1%小川卵培地を基礎培地とする一濃度による比率法を標準法とすることが、新結核菌検査指針に記載されている。しかし、この方法は最終判定結果がでるまでに 3~4 週間を必要とする。また、操作法が煩雑で判定には、技術者の熟練を要し、判定時期を遅らせると耐性と判定されやすいなどの問題もある。米国疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention ; CDC) は、1994 年に臨床検査部門に対し、臨床材料から菌の分離、同定、薬剤感受性試験までの結核菌検査を、すべて 30 日以内に終了し医師に報告するようという勧告を出した。この勧告を達成するために、われわれは、生きている微生物の細胞内の ATP 量を測定する方法を結核菌の薬剤感受性試験に応用し、試験期間を 5 日間に短縮し、さらに数値化による客観的な判定が可能な結核菌の薬剤感受性試験法 (ATP 法) を開発した。しかし、この方法は単剤による試験管法である。結核の治療は、抗結核薬 2~3 剤での併用療法が標準的な治療法であることから、単剤での試験結果がそのまま臨床効果に反映しないので、多剤併用療法に則した迅速で正確な結核菌の薬剤感受性試験の開発を目標とし、今年度は、結核菌の主要 5 薬剤にそれぞれ単剤耐性を持つ参照菌株を用いて、RFP、INH、SM(または EB) の組み合わせた混合薬剤系について検討した結果、単剤に高度耐性菌であっても最低阻止濃度 (MIC) は劇的に低下した。このことは、単剤に対する感受性を検査している現行法で、その抗結核薬に耐性と判定された場合であっても、実際には抗結核薬 2~3 剤での併用療法により、排菌が止まり患者の治療が成功している現実と合っている。結核の治療は、薬による副作用の出現を見ながら行われ、患者の体格、栄養状態、肝機能や腎機能の能力などにより、服薬後の時間により各薬剤の血中濃度は一定ではない。そのため、本法を用いた薬剤感受性試験の薬剤濃度の最終決定は、患者の治療成績を参考にしながら行う必要がある。

諸外国においては、本研究の比較参照法に用いた agar proportion を基本とする液体培地を用いた迅速感受性試験法が開発され、既にわが国の医療施設においても使用することが可能となりつつある。極めて近い将来、多くの施設で小川一濃度法から液体感受性法の移行へと進むことが見込まれる。われわれは、ATP 法を開発したが、試験管法であるため、操作が煩雑なことから、臨床現場への普及は困難であった。そこで、試験管法からマイクロプレート法への移行を考え、市販品の生物発光用マイクロルミノリーダーを用いて基礎的な検討を進めた結果、従来の試験管法との相関性を確保することができた。そこで、ATP ミクロ法の有用性を評価するために、実際の臨床検査現場から分離同定された結核菌臨床株を用いて、米国の gold standard 法である Agar proportion 法と比較した結果、INH, RFP, EB, SM の一次選択薬すべてにおいて 96~98%と極めて高い一致率を得ることができた。また、判定に要する期間は培養 5 日間と Agar proportion 法の培養 3 週間と比較すると大幅な短縮化を認めた。ATP ミクロ法の開発によって、わが国においても結核菌の薬剤感受性検査を迅速かつ正確に解析できる可能性が示唆された。

薬剤感受性試験検査時間を極力短縮するために、Middlebrook 7H9 broth を基礎培地とする ATP 法を用い

る予定であるが、液体培地のため雑菌汚染が生じやすい。また、ATP 測定作業時や容器破損時には、エアロゾルが発生しやすいので、作業は安全キャビネット内で行う必要がある。そのため、バイオハザード対策のとられた測定装置の開発も今後の課題として残っている。

## 5. まとめ

結核菌の主要 5 薬剤にそれぞれ単剤耐性を持つ参照菌株は、RFP、INH、SM(または EB)の組み合わせにより単剤に高度耐性菌であっても最低阻止濃度 (MIC) は劇的に低下した。このことは、結核の治療に用いられている多剤併用療法に則した結核菌薬剤感受性試験法の確立が可能であることを示唆していた。

結核菌迅速薬剤感受性試験法のキット化の開発を目標とし、既に開発した ATP 試験管法からマイクロプレート法への移行を進めてきた。今回、臨床検査現場で分離、同定された結核菌 50 株を用いて、米国の標準法である Agar Proportion 法との比較研究を実施した。第一次選択 4 薬剤による感受性試験結果の一致率は、INH(98%)、RFP(98%)、EB(96%)、SM(96%)と極めて高い一致率を得ることができた。以上の結果から、ATP ミクロ法は迅速かつ正確な測定法であり、今後、臨床検査現場での実用化が期待される方法であると示唆された。

## 6. 研究発表

- 1) 山崎利雄、生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性測定、臨床検査 47 : 197~199、2003
- 2) 山崎利雄、佐藤直樹、山下研也、岡沢 豊、荒木 一、三輪昭成、生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法 (第 IV 報) 改良した ATP 法と参照法との比較、臨床病理 51 : 194~200、2003

## 7. 知的所有権の取得状況

該当なし

Table 1 MIC of reference strains to combination of antimicrobial agents

Antimicrobial agent	concentration ( $\mu$ g/ml)	MIC measured value of reference strain ( $\mu$ g/ml)				
		ATCC35820	ATCC35837	ATCC35827	ATCC35822	ATCC35838
		MIC=2048 SM	MIC=128 EB	MIC=128 KM	MIC=512 INH	MIC=4 RFP
RFP	0.5	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.25	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.125	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.06	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.03	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.016	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.008	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.004	>128	16	2	0.03	4
	0.002	>128	128	128	>32	4
INH	0.5	0.125	0.125	0.125	>32	0.03
	0.25	0.125	0.125	0.125	>32	0.03
	0.125	0.125	0.125	0.125	>32	0.03
	0.06	>128	16	16	>32	0.5
	0.03	>128	128	>128	>32	4
	0.016	>128	128	>128	>32	4
SM	4	>128	0.125	0.125	0.03	0.03
	2	>128	0.125	0.125	0.03	0.03
	1	>128	0.125	128	>32	0.03
	0.5	>128	32	>128	>32	4
	0.25	>128	32	>128	>32	4
	0.125	>128	128	>128	>32	4
EB	4	0.125	128	0.125	0.03	0.03
	2	0.125	128	0.125	0.03	0.03
	1	0.125	128	0.125	0.03	0.03
	0.5	>128	128	>128	>32	4
	0.25	>128	128	>128	>33	4
	0.125	>128	128	>128	>34	4

Table 2 MIC of reference strains to combination of RFP and INH

Antimicrobial agent concentration ( $\mu$ g/ml)		MIC measured value of reference strain ( $\mu$ g/ml)				
		ATCC35820 MIC=2048 SM	ATCC35837 MIC=128 EB	ATCC35827 MIC=128 KM	ATCC35822 MIC=512 INH	ATCC35838 MIC=4 RFP
0.008	0.125	0.125	0.125	0.125	0.03	0.125
0.008	0.063	0.125	0.125	0.125	0.03	1
0.008	0.031	0.25	0.125	0.5	0.03	4
0.008	0.016	0.5	0.125	1	0.03	4
0.004	0.125	0.125	0.125	0.125	0.03	0.25
0.004	0.063	0.125	0.125	0.5	0.03	1
0.004	0.031	>128	8	2	0.03	4
0.004	0.016	>128	16	16	0.03	4

Table 3 MIC of reference strains to combination of RFP, INH and SM

Antimicrobial agent concentration ( $\mu$ g/ml)			MIC measured value of reference strain ( $\mu$ g/ml)				
			ATCC35820 MIC=2048 SM	ATCC35837 MIC=128 EB	ATCC35827 MIC=128 KM	ATCC35822 MIC=512 INH	ATCC35838 MIC=4 RFP
0.008	0.125	2.0	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.125	1.0	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.125	0.5	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.063	2.0	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.063	1.0	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.063	0.5	0.125	0.125	0.125	0.03	0.25
0.008	0.031	2.0	128	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.031	1.0	128	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.031	0.5	128	16	0.5	0.03	1
0.008	0.016	2.0	128	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.016	1.0	128	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.016	0.5	128	16	2	0.03	2

Table 4 MIC of reference strains to combination of RFP, INH and EB

Antimicrobial agent concentration ( $\mu$ g/ml)			MIC measured value of reference strain ( $\mu$ g/ml)				
			ATCC35820 MIC=2048 SM	ATCC35837 MIC=128 EB	ATCC35827 MIC=128 KM	ATCC35822 MIC=512 INH	ATCC35838 MIC=4 RFP
0.008	0.125	1.00	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.125	0.50	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.125	0.25	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
0.008	0.063	1.00	0.125	0.125	0.125	0.03	0.25
0.008	0.063	0.50	0.125	0.125	0.125	0.03	0.25
0.008	0.063	0.25	0.125	0.125	0.125	0.03	0.50
0.008	0.031	1.00	0.125	32	0.125	0.03	1.0
0.008	0.031	0.50	0.125	32	0.125	0.03	1.0
0.008	0.031	0.25	0.5	32	2	0.03	1.0
0.008	0.016	1.00	0.125	32	0.125	0.03	2
0.008	0.016	0.50	0.125	32	0.125	0.03	2
0.008	0.016	0.25	0.5	32	32	0.03	16

Table 5 Precision of ATP micro method when the four reference strain of *Mycobacterium tuberculosis* were repeatedly tested

Antimycobacterial agent	Strain of <i>M.tuberculosis</i> tested				
	ATCC27294	ATCC35822	ATCC35838	ATCC35837	ATCC35820
isoniazid	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
rifampicin	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
ethambutol	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5
streptomycin	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5

Table 6 Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid

ATP micro method result	No.of isolates with Agar Proportion method result	
	INH(0.1 $\mu$ g/ml)	
INH(0.1 $\mu$ g/ml)	Susceptible	Resistant
Susceptible	30	0
Resistant	1	19

Table 7 Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin

ATP micro method result	No.of isolates with Agar Proportion method result	
	RFP (1.0 $\mu$ g/ml)	
RFP (2.0 $\mu$ g/ml)	Susceptible	Resistant
Susceptible	31	1
Resistant	0	18

Table 8 Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol

ATP micro method result	No.of isolates with Agar Proportion method result	
	EB (5.0 $\mu$ g/ml)	
EB (2.5 $\mu$ g/ml)	Susceptible	Resistant
Susceptible	36	1
Resistant	1	12

Table 9 Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to streptomycin

ATP micro method result	No.of isolates with Agar Proportion method result	
	SM (2.0 $\mu$ g/ml)	
SM (2.0 $\mu$ g/ml)	Susceptible	Resistant
Susceptible	39	0
Resistant	2	9

Table 10 Comparison of antimycobacterial susceptibility test results with the Agar Proportion method

Antimycobacterial Agent/ATP micro method	Comparison with the interpretation by Agar Proportion method				
	Agreement(%) with			Very major discrepancy(%)	Major discrepancy(%)
	Susceptible	Resistant	Total(%)		
INH	60	38	98	0	2
RFP	62	36	98	2	0
EB	72	24	96	2	2
SM	78	18	96	0	4