

DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244901

· 论 著 ·

## 肉汤微量稀释法对耐多药结核分枝杆菌敏感性检测的评价

钟业腾, 王洁莹, 陈灼霖, 许玉妮, 邱文华, 裴 华

(海南医学院第二附属医院检验科, 海南 海口 570216)

**[摘要]** **目的** 评价肉汤微量稀释(BMD)法在耐多药结核分枝杆菌(MDR-MTB)敏感性检测中的应用效果。**方法** 采用罗氏比例法和 BMD 法对海南省 108 株 MDR-MTB 及 11 株非 MDR-MTB 菌株进行药敏试验,并对两种药敏方法检测结果不一致菌株进行全基因组测序(WGS)。**结果** 罗氏比例法和 BMD 法药敏结果平均判读时间分别为 28.0、8.5 d。罗氏比例法检测异烟肼、利福平、乙胺丁醇、卡那霉素和卷曲霉素的耐药率高于 BMD 法(均  $P < 0.001$ );BMD 法检测丙硫异烟胺和对氨基水杨酸的耐药率高于罗氏比例法(均  $P < 0.001$ )。以罗氏比例法药敏结果为金标准,BMD 法检测耐药性的灵敏度和特异度分别为 50.00%~100%、95.69%~100%,除 EMB (87.39%)、INH(94.96%)外,BMD 法检测其他药物的耐药性符合率均  $\geq 95\%$ 。罗氏比例法药敏结果与 WGS 总符合率为 76.19%(32/42),BMD 法药敏结果与 WGS 总符合率为 23.81%(10/42),差异具有统计学意义( $\chi^2 = 23.048$ ,  $P < 0.001$ )。两种药敏方法检测结果不一致的 MTB 共 34 株,罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感的 26 株 MTB 中,22 株(84.62%)相关耐药基因发生突变;罗氏比例法敏感 + BMD 法耐药的 11 株 MTB 中,5 株(45.45%)相关耐药基因发生突变。**结论** BMD 法是一种准确、快速的 MDR-MTB 敏感性检测方法,但仍需要进一步改进和优化,耐药性与相关耐药基因的突变密切相关。

**[关键词]** 耐多药结核分枝杆菌; 罗氏比例法; 肉汤微量稀释法; 最低抑菌浓度; 药物敏感试验

**[中图分类号]** R446.5

## Susceptibility detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by broth microdilution method

ZHONG Ye-teng, WANG Jie-ying, CHEN Zhuo-lin, XU Yu-ni, QIU Wen-hua, PEI Hua  
(Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570216, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the application effect of broth microdilution (BMD) method in susceptibility testing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-MTB). **Methods** The Roche's proportion method and BMD method were adopted in drug susceptibility testing on 108 MDR-MTB strains and 11 non-MDR-MTB strains in Hainan Province. Whole genome sequencing (WGS) was performed on strains with inconsistent results by the above two methods. **Results** The average time to acquire drug susceptibility testing results by Roche's proportional method and BMD method were 28.0 and 8.5 days, respectively. Roche's proportional method showed higher resistance rates to isoniazid (INH), rifampicin (RFP), ethambutol (EMB), kanamycin (KM), and capreomycin (CPM) than BMD method (all  $P < 0.001$ ). BMD method showed higher resistance rates to protionamide (PTO) and para-aminosalicylic acid (PAS) than Roche's proportional method (both  $P < 0.001$ ). Taking Roche's proportional method as the gold standard, the sensitivity and specificity of BMD method for testing drug resistance were 50.00% - 100% and 95.69% - 100%, respectively. Except EMB (87.39%) and INH (94.96%), the consistency rates of

**[收稿日期]** 2023-08-28

**[基金项目]** 海南省重点研发项目(ZDYF2022SHFZ100);海南省自然科学基金项目(822RC844、820MS144);海南省卫生健康行业科研项目(22A200272、22A200271)

**[作者简介]** 钟业腾(1984-),男(汉族),海南省文昌市人,副主任技师,主要从事临床微生物学研究。

**[通信作者]** 裴华 E-mail: phzmb61@aliyun.com

the BMD method in testing drug resistance of other drugs were all  $\geq 95.00\%$ . The overall consistency rate between Roche's proportional method and WGS was 76.19% (32/42), while the consistency rate between BMD method and WGS was 23.81% (10/42), difference was statistically significant ( $\chi^2 = 23.048, P < 0.001$ ). 34 MTB strains showed inconsistent results by two drug susceptibility testing methods. Among the 26 MTB strains that were resistant in Roche's proportion method but sensitive in BMD method, 22 strains (84.62%) had mutations in relevant resistance genes. Among the 11 MTB strains that were sensitive in Roche's proportion method but resistant in BMD method, 5 strains (45.45%) had mutations in relevant resistance genes. **Conclusion** BMD method is an accurate and rapid MDR-MTB susceptibility testing method, but further improvement and optimization are still needed. Drug resistance is closely related to mutations in relevant resistance genes.

**[Key words]** multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; Roche's proportional method; broth microdilution method; minimum inhibitory concentration; antimicrobial susceptibility testing

耐药结核病的出现和广泛传播是 2035 年实现无结核病世界的主要障碍<sup>[1]</sup>。耐药结核病治疗周期长、费用高、治愈率低<sup>[2-3]</sup>,造成患者传播时间延长。虽然耐药基因检测技术已广泛应用于耐药结核病快速筛查,但检测药物种类有限以及耐药性分子机制尚不完全清楚<sup>[4]</sup>,故表型药敏方法仍发挥着重要作用。目前罗氏比例法药敏试验被世界卫生组织(WHO)推荐为检测耐药结核的金标准<sup>[5]</sup>,但该方法操作繁琐、检测周期较长且药物种类有限<sup>[6]</sup>,仅能根据临床实验室标准化协会提供临界浓度判断“敏感”和“耐药”,无法监测药物治疗期间耐药浓度变化。肉汤微量稀释(broth microdilution, BMD)法药敏试验是一种比较有前景的解决方案,其操作简便,检测时间较短,仪器设备简单,可同时定量检测多种抗结核药物最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值<sup>[7-8]</sup>,从而提供定量的耐药性水平,指导临床个体化用药。然而目前我国仍缺乏 BMD 法标准化的方法,其商品化 BMD 法药敏板包含药物种类、操作方法及判读标准等均有明显差异,影响其推广使用,并且 BMD 法药敏试验在海南省耐多药结核分枝杆菌(multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, MDR-MTB)的研究相对缺乏。因此,本研究以罗氏比例法药敏试验为标准,评估商品化 BMD 法药敏板在海南省耐药结核分枝杆菌耐药性检测中临床应用效果。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2019 年 12 月—2021 年 3 月海南医学院第二附属医院(即海南省结核病医院)就诊疑似肺结核患者的痰、支气管肺泡灌洗液等呼吸道标本进行分离培养,经罗氏比例法药敏试验筛查,共筛选纳入 108 株 MDR-MTB 和 11 株非 MDR-MTB。

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)敏感标准株 H37Rv(ATCC 27294)由中国疾病预防控制中心(CDC)国家结核病参比实验室提供。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 BSC-1600 II B2 型生物安全柜均由苏州安泰空气技术有限公司生产,电热恒温培养箱由上海博迅公司生产,Neofuge 15R 高速冷冻离心机由上海力申科学仪器有限公司生产,多通道移液器由德国 eppendorf 公司生产。

1.2.2 试剂 MTB 药敏试剂盒(MIC 法)、罗氏比例法药敏培养基、对硝基苯甲酸(P-nitrobenzoic acid, PNB)/噻吩-2-羧酸肼(2-thiophenecarboxylic acid hydrazide, TCH)鉴定培养基均由珠海贝索公司提供,基因组 DNA 提取试剂盒由广东体必康生物科技有限公司提供。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌悬液配制 使用一次性接种环刮取培养 2~3 周的新鲜 MTB 菌株,移到含玻璃珠和无菌盐水的磨菌管中进行研磨,用无菌生理盐水稀释,与 1 麦氏单位比浊管比浊,配成 1 mg/mL 的预处理菌悬液。

1.3.2 罗氏比例法药敏试验 吸取预处理菌悬液按照《结核病实验室检验规程》<sup>[9]</sup>操作配制成浓度为  $10^{-2}$  mg/mL 和  $10^{-4}$  mg/mL 的菌悬液,分别接种于对照培养基(中性罗氏培养基)和药敏培养基上,倒置于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  培养箱中培养 24 h 后,再拧紧,直立培养 4 周后观察结果。罗氏比例法药敏培养基药物浓度分别为异烟肼(isoniazid, INH)0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、利福平(rifampicin, RFP)40  $\mu\text{g/mL}$ 、乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)2.0  $\mu\text{g/mL}$ 、莫西沙星(moxifloxacin, MFX)2.0  $\mu\text{g/mL}$ 、卡那霉素(kanamycin, KM)30.0  $\mu\text{g/mL}$ 、卷曲霉素(capreomycin, CPM)40.0  $\mu\text{g/mL}$ 、丙硫异烟胺(protoionamide, PTO)

40.0 μg/mL 和对氨基水杨酸(para-aminosalicylic acid, PAS)1.0 μg/mL。

1.3.3 BMD 法药敏试验 使用结核分枝杆菌药敏试剂盒(MIC 法)中培养液将预处理菌 1 mg/mL 悬液稀释 100 倍,分别以 100 μL/孔加入 BMD 法药敏板中,加样后加盖并用封口膜密封,正面向上置于(36±1)℃培养,以对照孔 MTB 生长良好时观察对应孔各药物并判读浓度,最佳判读时间为 7~14 d,最长不超过 21 d。耐药判断标准(临界浓度)<sup>[7]</sup>为 INH 0.2 μg/mL,RFP 1.0 μg/mL,EMB 5.0 μg/mL,MFX 0.5 μg/mL,KM 5.0 μg/mL,CPM 2.0 μg/mL,PTO 2.5 μg/mL,PAS 2.0 μg/mL。

1.3.4 全基因组测序 罗氏比例法药敏试验和 BMD 法药敏试验检测结果不一致的菌株进一步进行全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)。采用十六烷基三甲基溴化铵-溶菌酶(cetyltrimethylammonium bromide-lysozyme, CTAB)法<sup>[10]</sup>提取 DNA 组,DNA 组通过广东体康生物科技有限公司进行高通量测序和生物信息分析来获得目标基因组。使用 TB Profiler (v2. 8. 12, [https://github.com/jodyphelan/TB Profiler](https://github.com/jodyphelan/TB_Profiler))<sup>[11-12]</sup>对测序 MTB 菌株耐药性进行分析。

1.3.5 质量控制 每批次罗氏比例法和 BMD 法药敏试验均以 MTB 标准株 H37Rv 为敏感参考菌株进行室内质控;MTB 分离培养、药敏试验及结核病分子诊断参加中国 CDC 国家结核病参比实验室或结核病防治临床中心的室间质评活动。

1.4 数据处理 应用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行分析。采用卡方检验或 Fisher 确切概率法分析罗氏比例法和 BMD 法药敏结果的差异。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两种方法药敏检测结果 罗氏比例法和 BMD 法药敏结果平均判读时间分别为 28.0、8.5 d,BMD 法药敏结果中仅有 2 株 MDR-MTB 菌株判读时间超过 14 d(分别为 15.0、18.0 d)。MTB 药敏试验结果显示,罗氏比例法检测 INH、RFP、EMB、KM 和 CPM 的耐药率高于 BMD 法(均  $P < 0.001$ );BMD 法检测 PTO 和 PAS 的耐药率高于罗氏比例法(均  $P < 0.001$ )。见表 1。共有 9 株 MTB 使用罗氏比例法对 EMB 耐药 MIC 值为 EMB 临界浓度(5.0 μg/mL)。见图 1。

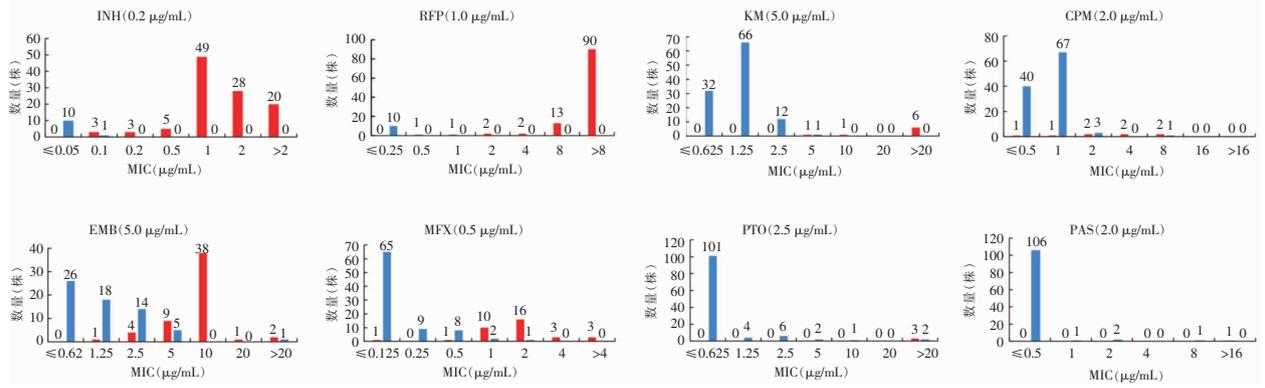
表 1 罗氏比例法和 BMD 法检测 MTB 的耐药结果[株(%)]

Table 1 Drug resistance results of MTB tested by Roche's proportional method and BMD method (No. of strains [%])

药物类型	MDR-MTB 菌株(n=108)		非 MDR-MTB 菌株(n=11)		合计(n=119)	
	罗氏比例法	BMD 法	罗氏比例法	BMD 法	罗氏比例法	BMD 法
INH	108(100)	102(94.44)	0(0)	0(0)	108(90.76)	102(85.71)
RFP	108(100)	106(98.15)	1(9.09)	1(9.09)	109(91.60)	107(89.92)
EMB	54(50.00)	41(37.96)	1(9.09)	1(9.09)	55(46.22)	42(35.29)
MFX	34(31.48)	34(31.48)	0(0)	1(9.09)	34(28.57)	35(29.41)
KM	8(7.41)	7(6.48)	0(0)	0(0)	8(6.72)	7(5.88)
CPM	8(7.41)	5(4.63)	0(0)	0(0)	8(6.72)	5(4.20)
PTO	3(2.78)	8(7.41)	0(0)	0(0)	3(2.52)	8(6.72)
PAS	7(6.48)	10(9.26)	0(0)	0(0)	7(5.88)	10(8.40)

2.2 两种方法药敏结果比较 以罗氏比例法药敏结果为金标准,BMD 法检测耐药性的灵敏度和特异度分别为 50.00%~100%、95.69%~100%,其中灵敏度最低的药物为 CPM(50.00%),其次为 EMB

(74.55%),特异度最低的药物为 PTO(95.69%)。除 EMB(87.39%)、INH(94.96%)外,BMD 法检测其他药物的耐药性符合率均  $\geq 95\%$ 。见表 2。



注:红色条形柱表示比例法耐药菌株,蓝色条形柱表示比例法敏感菌株。

图 1 MTB 药敏试验 MIC 分布

Figure 1 MIC distribution of drug susceptibility testing of MTB

表 2 罗氏比例法和 BMD 法药敏结果一致性分析

Table 2 Consistency of drug susceptibility results between Roche’s proportional method and BMD method

药物类型	BMD 法	罗氏比例法		灵敏度 [% (95%CI)]	特异度 [% (95%CI)]	阳性预测值 [% (95%CI)]	阴性预测值 [% (95%CI)]	符合率 (%)
		R	S					
INH	R	102	0	94.44 (87.81~97.72)	100 (67.86~100)	100 (95.48~100)	64.71 (38.62~84.74)	94.96
	S	6	11					
RFP	R	107	0	98.17 (92.88~99.68)	100 (65.55~100)	100 (95.68~100)	83.33 (50.88~97.06)	98.32
	S	2	10					
EMB	R	41	1	74.55 (60.73~84.91)	98.44 (90.45~99.91)	97.62 (85.90~99.88)	81.82 (71.04~89.36)	87.39
	S	14	63					
MFX	R	32	3	94.12 (78.94~98.97)	96.47 (89.32~99.08)	91.43 (75.81~97.76)	97.62 (90.86~99.58)	95.80
	S	2	82					
KM	R	7	0	87.50 (46.68~99.34)	100 (95.83~100)	100 (56.09~100)	99.11 (94.40~99.95)	99.16
	S	1	111					
CPM	R	4	1	50.00 (17.45~82.55)	99.10 (94.36~99.95)	80.00 (29.88~98.95)	96.49 (90.73~98.87)	95.80
	S	4	110					
PTO	R	3	5	100 (31.00~100)	95.69 (89.74~98.40)	37.50 (10.24~74.11)	100 (95.83~100)	95.80
	S	0	111					
PAS	R	7	3	100 (56.09~100)	97.32 (91.79~99.31)	70.00 (35.37~91.91)	100 (95.76~100)	97.48
	S	0	109					

注:R 为耐药,S 为敏感;符合率 = (两种方法均耐药的株数 + 两种方法均敏感的株数) / 检测总株数 × 100%。

2.3 WGS 结果 罗氏比例法和 BMD 法药敏试验检测结果不一致的 MTB 共 34 株,有 26 株 MTB 药敏检测使用罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感,有 11 株 MTB 对药物使用罗氏比例法敏感 + BMD 法耐药,其中有 3 株 MTB 对 2 种不同药物同时分别出现使用罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感和使用罗氏比例法敏感 + BMD 法敏感。罗氏比例法药敏结果与 WGS 总符合率为 76.19% (32/42),BMD 法药敏结果与 WGS 总符合率为 23.81% (10/42),差异具

有统计学意义 ( $\chi^2 = 23.048, P < 0.001$ )。

84.62% (22/26) 使用罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感的 MTB 在相关耐药基因中发生突变,其中 1 株同时对 KM 和 CPM 罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感的 MTB 仅对 KM 在 *eis* 启动子区域发生突变,而对 CPM 相关耐药基因未发生突变;4 株 MTB 对 INH 在 *fabG1* 启动子区域发生突变,BMD 法药敏检测 MIC 值在 0.1 ~ 0.2 µg/mL;12 株 MTB 对 EMB 在 *embB* 基因上发生突变,BMD 法药敏检测

MIC 值均 ≤ 临界浓度 (5.0 μg/mL)。

45.45% (5/11) 使用罗氏比例法敏感 + BMD 法耐药的 MTB 在相关耐药基因中发生突变, 其中 2 株 MTB 对 MFX 在 *gyrA* 基因中发生突变, 1 株对

CPM 在 *tlyA* 基因中发生移码, 2 株对 PTO 低浓度耐药 (5 μg/mL) 分别在 *inhA* 和 *ethA* 发生突变。有 3 株 MTB 对于 PTO 表现为野生型; 有 3 株 MTB 均未发现对 PAS 有相关耐药基因突变。见表 3。

表 3 BMD 法和罗氏比例法药敏检测存在差异的 MTB 菌株 WGS 结果

Table 3 WGS results of strains with different drug susceptibility results tested by BMD method and Roche's proportional method

不一致菌株 药物类型	药物 类型	MIC (μg/mL)	突变 类型	株数 (株)	不一致菌株 药物类型	药物 类型	MIC (μg/mL)	突变 类型	株数 (株)
罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感					罗氏比例法敏感 + BMD 法耐药				
INH	INH	0.1	WT	1	KM + CPM	KM	5	<i>eis_G-12A</i>	1 <sup>c</sup>
		0.1~0.2	<i>fabG1_C-15T</i>	2		CPM	2	WT	1 <sup>c</sup>
		0.2	<i>fabG1_T-8C</i>	1	EMB + MFX	EMB	5	<i>embB_M306L</i>	1 <sup>e</sup>
		0.2	<i>katG_Y337C</i>	1	EMB + PTO	EMB	1.25	WT	1 <sup>f</sup>
FRP	FRP	1~2	<i>katG_S315T</i>	2	EMB + PTO	EMB	2.5	<i>embB_D328Y</i>	1 <sup>g</sup>
EMB	EMB	5	WT	1	MFX	MFX	2	WT	1
		5	<i>embB_D354A</i>	1			1	<i>gyrA_A90V</i>	1
		2.5	<i>embB_D354A;</i> <i>embB_Q497K</i>	1	CPM	CPM	8	<i>tlyA_Frameshift</i>	1
		2.5	<i>embB_G406D</i>	1	PTO	PTO	>20	WT	1
		2.5~5	<i>embB_M306I</i>	4			5	<i>inhA_S94A</i>	1
MFX	MFX	≤0.125	WT	1	PAS	PAS	8~>16	WT	2
CPM	CPM	≤0.5~2	<i>rrs_A1401G</i>	2	EMB + PTO + PAS	EMB	>20	WT	1 <sup>d</sup>
INH + EMB	INH	0.1	<i>fabG1_C-15T</i>	1 <sup>a</sup>		PTO	>20	WT	1 <sup>d</sup>
	EMB	5	<i>embB_M306L</i>	1 <sup>a</sup>		PAS	>16	WT	1 <sup>d</sup>
MFX + CPM	MFX	0.5	<i>gyrA_A90V</i>	1 <sup>b</sup>	EMB + MFX	MFX	1	<i>gyrA_A90V</i>	1 <sup>e</sup>
	CPM	1	<i>rrs_A1401G</i>	1 <sup>b</sup>	EMB + PTO	PTO	5	<i>ethA_Frameshift</i>	1 <sup>f</sup>
					EMB + PTO	PTO	10	WT	1 <sup>g</sup>

注: MIC 为采用 BMD 法药敏试验检测结果; WT 为野生型; a~g 表示字母相同的菌株为同 1 株菌, 其中 a~c 表示共 3 株 MTB 同时对 2 种药物使用罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感; d 表示 1 株 MTB 同时对 3 种药物罗氏比例法敏感 + BMD 法耐药; e~g 共 3 株 MTB 对药物同时出现罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感和罗氏比例法敏感 + BMD 法耐药。

### 3 讨论

我国耐药结核病流行严重, 经济、有效和快速检测结核病耐药性对于结核病防治至关重要。当前我国常用的基于罗氏培养基的比例法药敏试验操作繁琐、检测时间至少 4 周<sup>[13-14]</sup>。该方法使用一个或两个临界浓度来确定药物耐药性。然而, 一些研究报告, 在耐药 MTB 菌株中观察到的异质性 MIC 水平可能具有重要的治疗意义<sup>[15]</sup>。Heysell 等<sup>[16]</sup> 研究

表明, 为了应对 MIC 参考临界浓度, 临床医生可能会增加药物的剂量, 如左氧氟沙星或 MFX, 甚至考虑减少具有毒性的药物剂量。因此, 了解耐药程度对临床治疗更有意义。BMD 法药敏试验不仅可以提供定量药敏结果, 还可以提供耐药程度 (MIC 值)。

本研究发现使用 BMD 法药敏试验检测平均周期仅为 8.5 d, 短于罗氏比例法检测周期 28.0 d, BMD 法药敏试验可更快地检出耐药菌株。本研究显示以罗氏比例法药敏试验为标准, 除了 EMB (87.39%)、INH (94.96%) 外, BMD 法检测其他药物耐药性的

符合率均高于 95%。BMD 法检测对大部分药物的灵敏度和特异度均 >90%，但对 CPM 的灵敏度仅为 50.00%，其主要原因是罗氏比例法对 CPM 耐药的菌株仅为 8 株，BMD 法对 CPM 药敏结果分别为 4 株耐药、4 株敏感，由于耐药菌株数量过少不具有代表性。本研究中有使用罗氏比例法发现 9 株对 EMB 耐药的 MTB 菌株 MIC 值在 EMB 临界浓度 (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 上，导致 BMD 法对 EMB 检测灵敏度、阴性预测值和符合率较低。研究<sup>[17]</sup>表明，EMB 的表型药敏方法不如 INH 或 RFP 等其他药物准确，实验室间或方法学一致性低。因此，需要更多基于大样本的研究来评估 BMD 法在检测这种药物的敏感性方面的性能。

本研究还对两种表型方法总体不一致菌株进行全基因组测序分析，发现罗氏比例法药敏结果与 WGS 总符合率高于 BMD 法 ( $P < 0.001$ )，显示出 WGS 结果更支持罗氏比例法药敏结果。在使用罗氏比例法耐药 + BMD 法敏感菌株中，有 84.62% 的 MTB 菌株在相关耐药基因中发生突变，与抗结核药物耐药性密切相关，其中 12 株 MTB 对 EMB 在 *embB* 基因上发生突变，MIC 值均  $\leq$  临界浓度 (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，说明 BMD 法药敏在对 EMB 的临界浓度 (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 应需要更多数据验证及调整。使用罗氏比例法敏感 + BMD 法耐药 MTB 菌株中，仅 45.45% 的 MTB 菌株发生了相关耐药基因的突变，说明 BMD 法药敏对 PAS、PTO 等二线药物可靠性有待进一步验证。

本研究具有一定的局限性。由于患者数据及研究时间有限，某些药物耐药率低，如 KM、CPM、PTO 及 PAS 耐药率 < 10%，这些药物的高特异性可能导致结果偏倚，不具有代表性。应增加研究菌株数量及耐药性，进一步研究、验证。

综上所述，BMD 法是一种准确、快速检测耐药 MTB 敏感性的方法，具有广泛的应用前景。与传统罗氏比例法相比，BMD 法能够更快地检出耐药菌株，并提供耐药菌株的 MIC，有助于指导个体化治疗。然而，BMD 法在某些药物的检测上还存在一定的限制，需要进一步优化和改进。所以还需要继续开展更多的研究，以进一步验证 BMD 法在耐药 MTB 敏感性检测中的应用价值，并探索其他新的检测方法，以提高结核病的治疗效果和控制策略。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参 考 文 献]

- [1] Liu DX, Huang F, Zhang GL, et al. Whole-genome sequencing for surveillance of tuberculosis drug resistance and determination of resistance level in China[J]. Clin Microbiol Infect, 2022, 28(5): 731.e9 - 731.e15.
- [2] Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis[J]. Lancet, 2010, 375 (9728): 1830 - 1843.
- [3] He WC, Tan YH, Liu CF, et al. Drug-resistant characteristics, genetic diversity, and transmission dynamics of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Hunan, China, revealed by whole-genome sequencing[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(1): e0154321.
- [4] 夏辉, 郑扬, 宋媛媛. 世界卫生组织《优化肉汤微孔板法结核分枝杆菌复合群药物敏感性试验方法学》解读[J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(7): 641 - 645.  
Xia H, Zheng Y, Song YY. Interpretation of the optimized broth microdilution plate methodology for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex issued by World Health Organization[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2022, 44(7): 641 - 645.
- [5] 吴敏, 周洪经, 李志媛, 等. 最低抑菌浓度法在耐药结核分枝杆菌药敏试验中的应用[J]. 山东医药, 2021, 61(12): 42 - 46.  
Wu M, Zhou HJ, Li ZY, et al. Application of minimum inhibitory concentration method in drug sensitivity test of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Shandong Medical Journal, 2021, 61(12): 42 - 46.
- [6] Macedo R, Nunes A, Portugal I, et al. Dissecting whole-genome sequencing-based online tools for predicting resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: can we use them for clinical decision guidance?[J]. Tuberculosis (Edinb), 2018, 110: 44 - 51.
- [7] Clinical & Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia spp.*, and other aerobic actinomycetes: M24 3rd edition[S]. Malvern, PA, USA: CLSI, 2018.
- [8] Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance standards for susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia spp.*, and other aerobic actinomycetes: M62[S]. Malvern, PA, USA: CLSI, 2018.
- [9] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.

Zhao YL, Pang Y. Rules for laboratory examination of tuberculosis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.

- [10] Wang JY, Yu CC, Xu YN, et al. Analysis of drug-resistance characteristics and genetic diversity of multidrug-resistant tuberculosis based on whole-genome sequencing on the Hainan island, China[J]. *Infect Drug Resist*, 2023, 16: 5783 - 5798.
- [11] Phelan JE, O'Sullivan DM, Machado D, et al. Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs[J]. *Genome Med*, 2019, 11(1): 41.
- [12] Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences[J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 51.
- [13] 王为娜, 龙波, 高文凤, 等. 微量 MIC 法和罗氏比例法对结核分枝杆菌药敏检测比对分析[J]. *寄生虫病与感染性疾病*, 2019, 17(1): 52 - 54.
- Wang WN, Long B, Gao WF, et al. Comparing analysis of MIC microtiter and Lowenstein-Jensen DST of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Parasitoses and Infectious Diseases*, 2019, 17(1): 52 - 54.
- [14] 刘金娜. 微量液体培养基最低抑菌浓度法与罗氏比例法在结核分枝杆菌药敏试验中的价值比较[J]. *实用临床医药杂志*, 2020, 24(17): 28 - 30, 40.
- Liu JN. Value of minimum inhibitory concentration method of microliquid culture medium versus Roche's proportional method in drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2020, 24(17):

28 - 30, 40.

- [15] Xia H, Zheng Y, Zhao B, et al. Assessment of a 96-well plate assay of quantitative drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* complex in China[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169413.
- [16] Heysell SK, Moore JL, Peloquin CA, et al. Outcomes and use of therapeutic drug monitoring in multidrug-resistant tuberculosis patients treated in Virginia, 2009 - 2014[J]. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2015, 78(2): 78 - 84.
- [17] Angra PK, Taylor TH, Iademarco MF, et al. Performance of tuberculosis drug susceptibility testing in U. S. laboratories from 1994 to 2008[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(4): 1233 - 1239.

(本文编辑:刘思娣、左双燕)

**本文引用格式:**钟业腾,王洁莹,陈灼霖,等.肉汤微量稀释法对耐药药结核分枝杆菌敏感性检测的评价[J].*中国感染控制杂志*, 2024,23(7):840 - 846. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244901.

**Cite this article as:** ZHONG Ye-teng, WANG Jie-ying, CHEN Zhuo-lin, et al. Susceptibility detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by broth microdilution method [J]. *Chin J Infect Control*, 2024, 23(7): 840 - 846. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244901.