

飞行时间质谱在耐药结核病检测中的应用价值

刘超^{1,2*}, 刁婷婷^{1,2*}, 张红吉^{1,2}, 刘红伟¹, 杨永锐¹, 李晓非¹

(1.昆明市第三人民医院/云南省传染性疾病预防医学中心,云南昆明 650000;2.大理大学公共卫生学院,云南大理 671003)

摘要:目的 旨在建立一种基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)平台鉴定结核分枝杆菌及检测结核耐药突变位点的方法,并对其用于临床耐药结核病检测的应用价值进行评估。方法 采用MALDI-TOF-MS检测3株国家参考品菌株,测定其对于结核鉴定位点和耐药位点的最低检出限。以非随机抽样法,收集昆明市第三人民医院结核科2023年1月至9月疑似结核病患者呼吸道样本,包括痰液样本120例,肺泡灌洗液样本100例,每例样本含量3~5 mL。供试样本均提取核酸,先用结核荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)试剂盒筛选出Ct值 \leq 32的结核阳性样本,然后用MALDI-TOF-MS检测与利福平(rifampicin, RIF)、异烟肼(isoniazide, INH)、乙胺丁醇(ethambutol, EMB)、莫西沙星(moxifloxacin, MXF)、链霉素(streptomycin, SM)和吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA)相关的耐药基因位点。同时采用表型药敏法和三代测序(Nanopore平台)对结核阳性样本进行检测并与MALDI-TOF-MS结果进行对比分析,验证其检测耐药结核的准确性。结果 对于结核鉴定位点IS6110和ext_RD9, MALDI-TOF-MS的最低检出限为60~100 CFU/mL;对于结核耐药位点, MALDI-TOF-MS的最低检出限为100~1 000 CFU/mL。经qPCR法鉴定Ct值 \leq 32的结核阳性标本共132例。对比表型药敏结果, MALDI-TOF-MS检测耐药的敏感度、特异度和kappa值分别是:RIF为93.75%、100%和0.96;INH为98.33%、90.28%和0.88;EMB为83.33%、97.50%和0.78;MXF为95.45%、100%和0.97。与三代测序结果相比, MALDI-TOF-MS检测耐药的敏感度、特异度和kappa值分别是:RIF为90.91%、100%和0.94;INH为92.96%、100%和0.92;EMB为92.86%、100%和0.96;MXF为95.45%、100%和0.97;SM为95.74%、100%和0.97;PZA为66.67%、100%和0.80。结论 MALDI-TOF-MS针对抗结核药物的耐药检测结果与表型药敏和三代测序检测结果对比高度一致,可作为快速检测结核耐药的一种有效方法。

关键词:飞行时间质谱;结核分枝杆菌;耐药;表型药敏;三代测序

中图分类号:R446.9

文献标志码:A

Application value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in the detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*

LIU Chao^{1,2*}, DIAO Tingting^{1,2*}, ZHANG Hongji^{1,2}, LIU Hongwei¹, YANG Yongrui¹, LI Xiaofei¹

(1. Kunming Third People's Hospital/Yunnan Infectious Disease Clinical Medical Center, Kunming 650000, Yunnan, China;

2. School of Public Health, Dali University, Dali 671003, Yunnan, China)

Abstract: Objective To explore the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) platform for identifying *Mycobacterium tuberculosis* and detecting drug-resistant mutations and evaluate its application value. **Methods** MALDI-TOF-MS was used to detect three national reference strains, and the minimum detection limits for tuberculosis-specific identifying genes and drug-resistant mutations were determined. Respiratory tract clinical specimens of suspected tuberculosis patients were collected from January to September 2023 in

收稿日期:2024-03-28

基金项目:昆明市科学技术局科技计划项目(2023-1-NS-008)

通信作者:李晓非。E-mail:1971069866@qq.com

杨永锐。E-mail:595144613@qq.com

* 共同第一作者

the Tuberculosis Department of Kunming Third People's Hospital by non-random sampling method, including 120 sputum samples and 100 bronchoalveolar lavage fluid samples, with the content of 3-5 mL in each sample. Nucleic acid was extracted from all the samples, and the tuberculosis positive samples with Ct value ≤ 32 were identified by qPCR kit for tuberculosis identification. The drug-resistant mutations of rifampicin (RIF), isoniazid (INH), ethambutol (EMB), moxifloxacin (MXF), streptomycin (SM) and pyrazinamide (PZA) were detected by MALDI-TOF-MS. The phenotypic drug susceptibility test (pDST) and third-generation sequencing (nanopore platform) were used to detect the TB-positive samples, and the results were compared with those of MALDI-TOF-MS to verify its accuracy. **Results** The lowest detection limit of MALDI-TOF-MS was 60-100 CFU/mL for MTB identification genes IS6110 and ext_RD9, and 100-1 000 CFU/mL for drug-resistance mutations. A total of 132 tuberculosis positive samples with Ct value ≤ 32 were screened by qPCR. Compared with pDST results, the sensitivity, specificity and kappa value of MALDI-TOF-MS for detection of drug-resistant mutations were 93.75%, 100% and 0.96 for RIF, 98.33%, 90.28% and 0.88 for INH, 83.33%, 97.50% and 0.78 for EMB and 95.45%, 100% and 0.97 for MXF, respectively. Compared with nanopore sequencing, the sensitivity, specificity and kappa values of MALDI-TOF-MS for detection of drug-resistant mutations were 90.91%, 100% and 0.94 for RIF, 92.96%, 100% and 0.92 for INH, 92.86%, 100% and 0.96 for EMB, 95.45%, 100% and 0.97 for MXF, 95.74%, 100% and 0.97 for SM, 66.67%, 100% and 0.80 for PZA, respectively.

Conclusion MALDI-TOF-MS can be used as an effective method for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistant mutations because its results were highly consistent with those of pDST and nanopore sequencing.

Key words: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance; Phenotypic drug susceptibility test; Nanopore sequencing

据世界卫生组织(WHO)估计,全球肺结核患者预计在2023年前达到1060万,其中130万人死亡^[1]。结核病已成为世界第二大致命传染病^[2]。耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)依然是全球范围内的公共卫生挑战之一。MDR-TB患者的快速准确诊断对于早期临床用药的指导和治愈率的提高至关重要。

表型药敏试验(drug susceptibility testing, DST)被认为是最可靠的检测结核分枝杆菌(*mycobacterial tuberculosis*, MTB)耐药的方法,但该方法操作复杂,耗时较长(10天至4周),患者很可能在此期间被给予不合理的药物治疗^[3]。分子药敏检测(molecular drug susceptibility testing, mDST)可快速诊断耐药结核。耐药肺结核分子诊断检测随着耐药机制的深入研究而日益受到重视^[4-5]。目前,临床上常用的商品化分子生物学检测方法包括实时荧光定量聚合酶链反应,全自动化学发光法检测 γ -干扰素,基于MTB rpoB基因的GeneXpert/RIF和测序等,可作为病原学诊断的补充^[6-9]。

国际上已有运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)平台对结核鉴定和耐药基因位点检测的研究报道,该平台具有高通量、检测周期短、低成本的特点^[10-12]。本研究基于MALDI-TOF-MS平台开发了一种结核分枝杆菌鉴定和6种抗结核药物耐药性的检测方法,并将其检测性能与表型DST和三代测序检测结

果进行对比和统计分析,评估其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 样本来源

以非随机抽样法,采集2023年1月至9月昆明市第三人民医院肺结核疑似患者的呼吸道样本(痰液样本120例,肺泡灌洗液样本100例),提取DNA,供后续实验使用。国家参考品菌株:MTB(94008、93009、94019)由中国食品药品检定研究院购进。该研究已经昆明市第三人民医院伦理委员会审定通过(批号:2022111030)。

1.1.2 主要仪器与试剂

飞行时间核酸质谱检测系统(浙江迪谱诊断技术有限公司),Veriti 96 PCR仪(美国ThermoFisher公司),板式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),ABI 7500 荧光定量PCR仪(美国ThermoFisher公司),GridION 测序仪(英国Oxford Nanopore公司)。磁珠法病原体DNA/RNA提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),飞行时间核酸质谱试剂(浙江迪谱诊断技术有限公司),分枝杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法,成都博奥晶芯生物科技有限公司),Sensititre® 结核药敏板(美国ThermoFisher公司),三代测序Barcode试剂盒、建库试剂盒、测序芯片、芯片清洗试剂盒均购自英国Oxford Nanopore Technologies公司,AMPure XP

Beads 购自 Beckman Coulter。

1.2 方法

1.2.1 表型微孔板法药敏实验

表型 DST 采用微量肉汤稀释法进行,该方法提供最小抑制浓度 (MIC, Sensititre[®] UKMYC6 plate),可测试 13 种抗结核药物的耐药性,包括利福平 (rifampicin, RIF)、异烟肼 (isoniazide, INH)、乙胺丁醇 (ethambutol, EMB) 和莫西沙星 (moxifloxacin, MXF)。根据 WHO 耐药突变目录推荐的临界浓度,INH、RIF、EMB 和 MXF 的耐药临界点分别为 0.1、0.5、4 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。EMB MIC 为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时定义为不确定结果。

1.2.2 荧光定量 PCR 反应体系和程序

使用磁珠法病原体 DNA/RNA 提取试剂盒提取结核分枝杆菌 DNA,在 18 μL 扩增液中加入 2 μL DNA (北京博奥分枝杆菌核酸检测试剂盒),终体积为 20 μL 。PCR 反应在 ABI 7500 PCR 仪 (Applied Biosystems Inc., 美国) 上运行。反应程序为:37 $^{\circ}\text{C}$, 300 s; 94 $^{\circ}\text{C}$, 180 s; (94 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s) \times 40 次

循环;50 $^{\circ}\text{C}$, 10 s。60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 采集荧光信号。结核鉴定靶标为 IS6110。

1.2.3 MALDI-TOF-MS 检测操作流程

采用 MALDI-TOF-MS 平台检测结核分枝杆菌耐药基因突变位点,6 种抗结核药物及其对应检测的耐药突变位点列于表 1。多重 PCR:在 3 μL 反应液中加入 2 μL 待测核酸,瞬时离心后上机。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 45 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。SAP 反应:加 2 μL SAP 溶液到每个孔里,按以下程序运行。37 $^{\circ}\text{C}$ 40 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。单碱基延伸:加 2 μL iPLEX 延伸反应液到每个孔里,运行以下程序。95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,(52 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,80 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,5 个循环),40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。取出延伸反应结束后的产物,先向 384 孔板中加入 20 μL 水,然后将每管中的延伸产物转入 384 孔板中,瞬时离心后放入飞行时间质谱仪,按照默认设置参数,进行飞行质谱。使用 Typer 4.0 软件进行数据分析。

表 1 MALDI-TOF-MS 检测的抗结核药物耐药基因位点

Table 1 Detection of resistance mutations of anti-tuberculosis drugs by MALDI-TOF-MS

药物	基因	位置	碱基突变类型
RIF	<i>rpoB</i>	511	CTG>CCG
		516	GAC>GGC, GAC>GTC, GAC>TAC, GAC>TTC
		526	CAC>GAC, CAC>TAC, CAC>AAC, CAC>CGC, CAC>CTC, CAC>GGC, CAC>TGC
		531	TCG>TTG, TCG>TGG
		533	CTG>CCG
INH	<i>katG</i>	315	AGC>ACC, AGC>AAC, AGC>AGA, AGC>ACA
	<i>inhA</i>	promoter	C(-15)T
MXF	<i>gyrA</i>	94	GAC>AAC, GAC>TAC, GAC>CAC, GAC>GGC, GAC>GCC
	<i>gyrB</i>	500	GAC>AAC
EMB	<i>embB</i>	306	ATG>GTG, ATG>CTG, ATG>ATA, ATG>ATC, ATG>ATT
		406	GGC>GCC, GGC>GAC, GGC>AGC
SM	<i>rpsL</i>	43	AAG>AGG, AAG>ATG
		88	AAG>AGG, AAG>ATG
		513	A>C
PZA	<i>pncA</i>	905	A>G
		promoter	A (-11) G
		76	A>C

1.2.4 检出限测定

国家参考品菌株 (94008、93009、94019) 室温冻融后,先使用生理盐水将菌液稀释至 3×10^8 CFU/mL。然后将 3×10^8 CFU/mL 稀释后菌液再梯度稀释为 $10 \sim 10^5$ CFU/mL。提取菌液核酸后采用 MALDI-TOF-MS 检测,可检测到的最低浓度即为 MALDI-TOF-MS 的最低检出限。

1.2.5 三代测序

分别针对表 1 中耐药基因区域设计引物,进行多重 PCR 扩增,所得产物长度约 500 bp 左右。文库

构建和上机测序的具体操作流程按照文献 [13] 中 1.3.3 部分进行。测序完成后,使用 MinKNOW 2.0 版生成碱基识别数据,并使用 NanoFilt 去除短片段和/或低质量的 reads。当至少一条 read 被映射到种或属水平时,结核分枝杆菌被认为是阳性^[14]。通过靶向纳米孔测序检测的耐药基因使用具有默认比对设置的耐药数据库 (card.mcmaster.ca)、ResFinder 或 TBProfiler 数据库进行预测 (在靶基因的长度的 $\geq 60\%$ 上具有 $\geq 80\%$ 的同一性)^[15]。将变异识别的阈值设定为等位基因频率 $> 10\%$, 深度 > 10 , 等位基因深度 > 5 ^[16]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件。以表型 DST 为参考标准,分析 MALDI-TOF-MS 对 RIF、INH、EMB 和 MFX 耐药检测的灵敏度和特异度。以三代测序为参考标准,分析 MALDI-TOF-MS 对 RIF、INH、EMB、MFX、SM (streptomycin) 和 PZA (pyrazinamide) 进行耐药检测的性能。采用 *Kappa* 检验进行一致性分析,检验水准 $\alpha = 0.05$, *Kappa* 值 >0.75 为一致性较高, *Kappa* 值在 $0.4 \sim 0.75$ 之间为一致性中等, *Kappa* 值 <0.4 为一致性较差^[17]。敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、符合率、受试者工作特征曲线下面积 (area under curve, AUC) 用相应公式计算。

2 结果

2.1 MALDI-TOF-MS 核酸质谱对于 MTB 的最低检出限

MALDI-TOF-MS 检测 MTB 鉴定位点 IS6110

表 2 MALDI-TOF-MS 与表型药敏结果对比

Table 2 Comparison between MALDI-TOF-MS and drug susceptibility

药物	DST 耐药		DST 敏感		敏感度/ %	特异度/ %	PPV/ %	NPV/ %	符合率/ %	AUC	<i>Kappa</i> 值
	MS 耐药	MS 敏感	MS 耐药	MS 敏感							
RIF	30	2	0	100	93.75	100	100	98.04	98.48	0.97	0.96
INH	66	5	0	61	92.96	100	100	92.42	96.21	0.97	0.92
EMB	10	2	3	117	83.33	97.5	76.92	98.32	96.21	0.90	0.78
MXF	21	1	0	110	95.45	100	100	99.1	99.24	0.98	0.97

注: DST: 表型药敏; MS: 核酸质谱。

表 3 MALDI-TOF-MS 与三代测序结果对比

Tab 3 Comparison between MALDI-TOF-MS and Nanopore sequencing

药物	DST 耐药		DST 敏感		敏感度/ %	特异度/ %	PPV/ %	NPV/ %	符合率/ %	AUC	<i>Kappa</i> 值
	MS 耐药	MS 敏感	MS 耐药	MS 敏感							
RIF	30	3	0	99	90.91	100	100	97.06	97.73	0.96	0.94
INH	66	5	0	61	92.96	100	100	92.42	96.21	0.97	0.92
EMB	13	1	0	118	92.86	100	100	99.16	99.24	0.96	0.96
MXF	21	1	0	110	95.45	100	100	99.1	99.24	0.98	0.97
SM	45	2	0	85	95.74	100	100	97.7	98.48	0.98	0.97
PZA	2	1	0	129	66.67	100	100	99.23	99.24	0.83	0.80

注: DST: 表型药敏; MS: 核酸质谱。

2.3 MALDI-TOF-MS 方法对异质性耐药的检出能力

本研究发现 5 例样本存在异质性耐药现象, 以其中 3 例结果为展示, 如图 1 所示, 在第 1 例样本中, embB306_1 位点的野生型 A 高度为 15.38, 耐药突变 G 高度为 6.30, G/A 比值为 41% (图 1A)。通过 Sanger 测序证实了这一结果, 结果显示 C 峰高, T

和 ext_RD9 的最低检测限在 3 株参考品菌株中为 60~100 CFU/mL, 耐药位点的最低检出限为 100~1 000 CFU/mL。对于痰液、肺泡灌洗液等临床样本, qPCR 法检测 Ct 值 ≤ 32 时, MALDI-TOF-MS 检测所有结核鉴定位点和耐药位点全部检出; $32 < Ct$ 值 ≤ 40 时, MTB 鉴定位点 IS6110 和 ext_RD9 可检出, 耐药位点部分可检出, 部分未能检出; Ct 值 >40 时, 鉴定位点和耐药位点均未检出。

2.2 MALDI-TOF-MS 检测效能分析

以表型 DST 作为参考标准, MALDI-TOF-MS 可准确预测 MTB 对利福平 (RIF)、异烟肼 (INH)、乙胺丁醇 (EMB) 和莫西沙星 (MXF) 4 种抗结核药物的耐药性, *Kappa* 值 ≥ 0.78 指征高度一致, 见表 2。

应用 MALDI-TOF-MS 检测利福平 (RIF)、异烟肼 (INH)、乙胺丁醇 (EMB)、莫西沙星 (MXF)、链霉素 (SM) 和吡嗪酰胺 (PZA) 6 种抗结核药物的耐药突变位点与三代测序检测的耐药突变位点对比高度一致 (*Kappa* 值 ≥ 0.80), 见表 3。

峰矮 (图 1B)。在第 2 例样本中, rpoB526_1 位点的野生型 C 高度为 7.51, 耐药突变 T 高度为 2.17, T/C 比值为 28.9% (图 1C), 通过 Sanger 测序得到证实 (图 1D)。在第 3 例样本中, gyrA94_2 位点的野生型 A 高度为 11.03, 耐药突变 C 高度为 4.93, C/A 比值为 44.6% (图 1E), 也通过 Sanger 测序得到证实 (图 1F)。

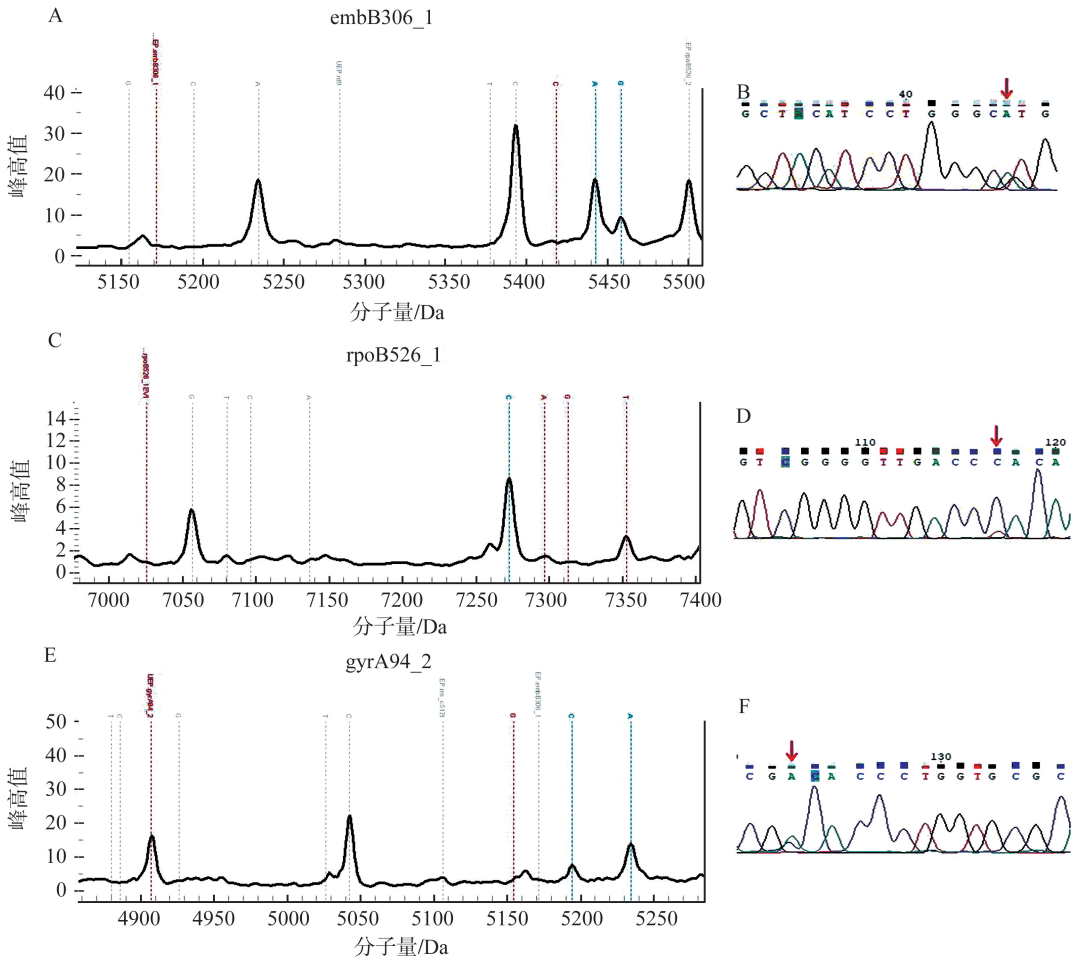


图1 异质性耐药核酸质谱检测峰型图和 Sanger 测序峰型图

A: embB306_1 A>G 异质性耐药样本核酸质谱检测峰形图; B: embB306_1 A>G 异质性耐药样本 Sanger 测序峰型图, 红色箭头指征的是 embB306_1 位点碱基; C: rpoB526_1 C>T 异质性耐药样本核酸质谱检测峰形图; D: rpoB526_1 C>T 异质性耐药样本 Sanger 测序峰型图, 红色箭头指征的是 rpoB526_1 位点碱基; E: gyrA94_2 A>C 异质性耐药样本核酸质谱检测峰形图; F: gyrA94_2 A>C 异质性耐药样本 Sanger 测序峰型图, 红色箭头指征的是 gyrA94_2 位点碱基。

Figure 1 Heterogeneous drug-resistant nucleic acid mass spectrometry peak chart and Sanger sequencing peak chart

A: MS peak chart of rpoB embB306_1 A>G heteroresistance; B: Sanger sequencing peak chart of embB306_1 A>G heteroresistance, the red arrow indicates embB306_1; C: MS peak chart of rpoB526_1 C>T heteroresistance; D: Sanger sequencing peak chart of rpoB526_1 C>T heteroresistance, the red arrow indicates rpoB526_1; E: MS peak chart of gyrA94_2 A>C heteroresistance; F: Sanger sequencing peak chart of gyrA94_2 A>C heteroresistance, the red arrow indicates gyrA94_2.

3 讨论

2023年,中国发表了MALDI-TOF-MS在结核和非结核分枝杆菌感染疾病中的应用专家共识^[18],进一步肯定了该技术的诊断能力。在扩增效率方面,传统的PCR大多只扩增40个循环,而MALDI-TOF-MS法采用多重PCR扩增45个循环后单碱基延伸40个循环进一步提高了模板DNA的扩增效率^[19]。既往研究表明,IS6110不仅存在于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB),也存在于其他细菌中^[20],且存在IS6110缺失的MTB^[21]。这就导致当仅以IS6110为检测靶标时,可能会获得假

阳性或假阴性结果。ext-rd9是MTB复合群差异区域9外部区域,该区域存在于所有MTB复合群,是MTB复合群特异性靶标之一^[22]。本研究采用IS6110和ext_RD9作为MTB的鉴定靶标,结果显示,MALDI-TOF-MS法检测MTB鉴定位点IS6110和ext_RD9的最低检测限为60~100 CFU/mL,耐药位点的最低检出限为100~1 000 CFU/mL,与李爱芳等^[23]的研究结果接近。针对痰液等临床标本,不同留痰方法对痰涂片镜检或分子生物学方法检测结核杆菌阳性率的影响较大,医护人员应注意痰标本留取过程的质量管理^[24]。本研究中发现,对于痰液、肺泡灌洗液等临床样本,qPCR法检测Ct值≤32时,MALDI-TOF-MS检测所有结核鉴定位点和耐药

位点全部检出; $32 < Ct \text{ 值} \leq 40$ 时, MTB 鉴定位点 IS6110 和 ext_RD9 可检出, 但耐药位点部分可检出, 部分未能检出; $Ct \text{ 值} > 40$ 时, 鉴定位点和耐药位点均未检出。

本研究通过比较 MALDI-TOF-MS 法与表型药敏 DST 和 Nanopore 三代测序的敏感度和特异度等统计学指标, 分析其检测结核耐药的准确性。结果显示, MALDI-TOF-MS 检测结果与表型 DST 对比, 除乙胺丁醇 $Kappa$ 值为 0.78, 其他 3 种药物 RIF、INH 和 MXF $Kappa$ 值 ≥ 0.92 。对于 DST 耐药而 MS 敏感的, 分析可能原因是样本中出现的耐药突变超出本研究设计的核酸质谱引物体系检测范围。对于 3 例乙胺丁醇 DST 敏感而 MS 耐药的, 考虑原因是乙胺丁醇 MIC 为 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时定义为不确定结果, 3 例样本 DST 处于临界值。与三代测序结果对比, MALDI-TOF-MS 检测 RIF、INH、EMB、MXF、SM 和 PZA 6 种药物耐药突变位点的结果对比高度一致 ($Kappa$ 值 ≥ 0.80)。对于三代测序显示耐药而 MS 敏感的, 是三代测序检测到 MALDI-TOF-MS 引物体系中未涉及的突变位点, 其中 3 例 RIF 耐药检测到 rpoB I491F, 5 例 INH 耐药检测到 katG W149L (2 例)、katG W204L (3 例), 1 例 EMB 耐药检测到 embB Y319C, 1 例 MXF 耐药检测到 gyrA S91P, 2 例 SM 耐药检测到 rrs c517t, 1 例 PZA 耐药检测到 pncA L85P, 这些位点在 WHO 结核耐药位点目录中属于证据等级 1 级和 2 级。

异质性耐药是指耐药和敏感菌株同时存在于同一份样本中的现象。从基因型角度来看, 是指野生型和各种耐药型基因序列同时存在于同一份样本中的现象^[18]。异质性耐药在 MDR-TB 患者中较常见并可能会影响治疗方案的成功, MALDI-TOF-MS 可以进一步鉴别结核分枝杆菌药物敏感性的异质性^[25]。本研究中 3.8% (5/132) 的临床样本出现了异质性耐药, MALDI-TOF-MS 能检测出野生型碱基和突变型碱基的峰高值, 初步计算突变型碱基/野生型碱基峰高值比来估算样本中耐药菌的含量比例, 并进一步用 Sanger 测序对结果进行验证 (图 1)。

本研究仍有一些不足之处需要改进。①本研究纳入病例较少, 结果会存在一定的局限性。对于异质性耐药, 未能获得决定临床样本是否发生耐药的突变型碱基/野生型碱基峰高值比的 cut-off 值。在以后的研究中, 应该继续扩大样本量, 作进一步详细的研究; ②由于链霉素和吡嗪酰胺的表型药敏 DST 结果不稳定, 没有使用这两种药物进行 DST; ③与莫西沙星和吡嗪酰胺相关的耐药位点覆盖较少, 可

能导致耐药样本漏检, 未来将考虑进一步优化核酸质谱引物体系。随着临床资料可获得性的提高和耐药位点的优化, MALDI-TOF-MS 对 MTB 药敏检测的性能评估有望得到提高。

综上所述, MALDI-TOF-MS 飞行时间核酸质谱是一种能够获得大量耐药基因准确突变信息, 识别异质性耐药感染的技术。适合对结核病患者进行早期、快速诊断, 可以作为临床鉴定结核分枝杆菌药敏试验结果的有效补充。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 [ER/OL] [2023-11-7] (2024-3-25). <http://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/9789240083851-eng.pdf?sequence=1>
- [2] Yang J, Zhang L, Qiao W, et al. Mycobacterium tuberculosis: pathogenesis and therapeutic targets [J]. Med Comm, 2023, 4(5): e353. doi: 10.1002/mco2.353.
- [3] Georghiou SB, Schumacher SG, Rodwell TC, et al. Guidance for studies evaluating the accuracy of rapid tuberculosis drug-susceptibility tests [J]. J Infect Dis, 2019, 220(Suppl 3): S126-S135.
- [4] Domínguez J, Boeree MJ, Cambau E, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a 2023 TBnet/RESIST-TB consensus statement [J]. Lancet Infect Dis, 2023, 23(4): e122-e137.
- [5] MacLean E, Kohli M, Weber SF, et al. Advances in molecular diagnosis of tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(10): e01582-19. doi: 10.1128/JCM.01582-19.
- [6] Amer S, EL Hefnawy A, Baz A, et al. Evaluation of tuberculosis diagnostic tools, with extending MODS assay use to second line susceptibility testing [J]. Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2021, 70(3): 161-167.
- [7] 李晓非, 黄山, 欧阳兵, 等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术在肺结核临床路径中的应用 [J]. 山东大学学报(医学版), 2018, 56(6): 35-40.
LI Xiaofei, HUANG Shan, OUYANG Bing, et al. Application value of gene Xpert MTB/RIF for the rapid detection of pulmonary tuberculosis in the clinical pathway [J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2018, 56(6): 35-40.
- [8] 李晓非, 刘红伟, 资敏, 等. 全自动化学发光法检测 γ -干扰素试验诊断结核病的临床应用 [J]. 山东大学学报(医学版), 2019, 57(11): 34-41.
LI Xiaofei, LIU Hongwei, ZI Min, et al. Clinical application of the fully automatic chemiluminescence to detect

- interferon- γ test in diagnosis of tuberculosis [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2019, 57 (11): 34-41.
- [9] Allix-béguet C, Arandjelovic I, Bi L, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(15): 1403-1415.
- [10] Wu X, Tan G, Yang J, et al. Prediction of mycobacterium tuberculosis drug resistance by nucleotide MALDI-TOF-MS [J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 121: 47-54. doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.061.
- [11] Yang H, Li A, Dang L, et al. A rapid, accurate, and low-cost method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* and its drug-resistant genes in pulmonary tuberculosis: applications of massARRAY DNA mass spectrometry [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1093745. doi: 10.3389/fmicb.2023.1093745.
- [12] Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25 (20): 4775. doi: 10.3390/molecules25204775.
- [13] 余艳芳,赵开顺,屠春林,等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在结核分枝杆菌耐药检测中的应用价值研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2021, 29(10): 106-112.
YU Yanfang, ZHAO Kaishun, TU Chunlin, et al. Application value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in the detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease*, 2021, 29 (10): 106-112.
- [14] Miao Qing, Ma Yuyan, Wang Qingqing, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(Suppl 2): S231-S240.
- [15] Yonkus JA, Whittle E, Alva-Ruiz R, et al. "Answers in hours": a prospective clinical study using nanopore sequencing for bile duct cultures [J]. *Surgery*, 2022, 171 (3): 693-702.
- [16] Consortium C, Allix-Béguet C, Arandjelovic I, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379 (15): 1403-1415.
- [17] Tang W, Hu J, Zhang H, et al. Kappa coefficient: a popular measure of rater agreement [J]. *Shanghai Arch Psychiatry*, 2015, 27(1): 62-67.
- [18] Liang J, Wu X, An H. Expert consensus on the clinical application of nucleic acid MALDI-TOF MS technique in the diagnosis of tuberculosis and non-tuberculosis mycobacteriosis [J]. *Chin J Antituberc*, 2023, 45(6): 543-558.
- [19] Oviaño M, Gato E, Bou G. Rapid detection of KPC-producing enterobacterales susceptible to imipenem/relebactam by using the MALDI-TOF MS MBT STAR-Carba IVD assay [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 328. doi: 10.3389/fmicb.2020.00328.
- [20] Kent L, McHugh TD, Billington O, et al. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp? [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33 (9): 2290-2293.
- [21] 谢彤,孙蕊,巨韩芳,等. 结核分枝杆菌北京基因型菌株大片段的多态性研究 [J]. *中国防痨杂志*, 2018, 40 (3): 269-273.
XIE Tong, SUN Rui, JU Hanfang, et al. Large sequence polymorphisms of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains [J]. *Chinese Journal of Anti-tuberculosis*, 2018, 40(3): 269-273.
- [22] Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(7): 2562-2567.
- [23] 李爱芳,曹俊杰,杨翰,等. MassARRAY 核酸质谱在结核分枝杆菌检测中的应用价值 [J]. *国际呼吸杂志*, 2023, 43(10): 1149-1156.
LI Aifang, CAO Junjie, YANG Han, et al. Application value of MassARRAY nucleic acid mass spectrometry in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *International Journal of Respiration*, 2023, 43 (10): 1149-1156.
- [24] 江华,王琳,汤玲玲,等. 目标管理在提高初治肺结核患者痰标本留取质量上的价值 [J]. *中国防痨杂志*, 2019, 41(6): 676-680.
JIANG Hua, WANG Lin, TANG Lingling, et al. The value of target management in improving the quality of sputum samples retention of initially treated pulmonary tuberculosis patients [J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*, 2019, 41(6): 676-680.
- [25] Chen Y, Ji L, Liu Q, et al. Lesion heterogeneity and long-term heteroresistance in multidrug-resistant tuberculosis [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224(5): 889-893.

(编辑:刘霞)