

• 临床基础 •

靶向下一代测序分析耐药结核病使用抗结核药物后的耐药基因突变特征

朱庆东, 赵春艳[#], 宋 畅, 黄爱春, 许超艳, 兰艳群, 陈灿灵, 谢周华^{*}

南宁市第四人民医院 结核科, 广西 南宁 530023

摘 要: **目的** 考察靶向下一代测序分析耐药结核病使用抗结核药物后的耐药基因突变特征。**方法** 收集 2022 年 2 月—2023 年 8 月南宁市第四人民医院结核科收治的 87 例结核病患者的菌株。以表型药物敏感性试验结果为参照标准, 采用靶向下一代测序检出利福平、异烟肼、链霉素和乙胺丁醇的耐药突变基因分布、诊断效能, 与 Xpert MTB/RIF 比较对利福平耐药的诊断效能。**结果** 利福平耐药基因突变类型以 *Ser531Leu* (*rpoB*) 为主, 异烟肼耐药基因突变类型以 *Ser315Thr* (*katG*) 为主, 链霉素耐药基因突变类型以 *Lys43Arg* (*rpsL*) 为主, 乙胺丁醇耐药基因突变类型以 *Met306Val* (*embB*) 为主。以表型药物敏感性试验结果为参照标准, 靶向下一代测序对利福平、异烟肼、链霉素和乙胺丁醇的准确率均大于 80%, Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的各指标均低于靶向下一代测序。**结论** 靶向下一代测序诊断利福平、异烟肼、链霉素和乙胺丁醇耐药性表现出较高的敏感度、特异度和准确率。

关键词: 利福平; 异烟肼; 链霉素; 乙胺丁醇; 靶向下一代测序; 耐药基因

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)03-0624-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.03.012

Mutation characteristics of drug-resistant genes in drug-resistant tuberculosis patients treated with antituberculosis drugs by targeting next generation sequencing analysis

ZHU Qingdong, ZHAO Chunyan, SONG Chang, HUANG Aichun, XU Chaoyan, LAN Yanqun, CHEN Canling, XIE Zhouhua

Department of Tuberculosis, Nanning Fourth People's Hospital, Nanning 530023, China

Abstract: Objective To explore the mutation characteristics of drug-resistant genes in drug-resistant tuberculosis patients treated with antituberculosis drugs by targeting next generation sequencing analysis. **Methods** The strains from 87 tuberculosis patients admitted to the Tuberculosis Department of Nanning Fourth People's Hospital from February 2022 to August 2023 were collected. Based on the results of phenotype drug sensitivity tests, targeting next generation sequencing analysis was used to detect the distribution and diagnostic efficacy of resistance mutation genes for rifampicin, isoniazid, streptomycin, and ethambutol. The diagnostic efficacy for rifampicin resistance was compared with Xpert MTB/RIF. **Results** The mutation types of rifampicin resistance genes were mainly *Ser531Leu* (*rpoB*), isoniazid resistance genes were mainly *Ser315Thr* (*katG*), streptomycin resistance genes were mainly *Lys43Arg* (*rpsL*), and ethambutol resistance genes were mainly *Met306Val* (*embB*). Based on the results of phenotype drug sensitivity tests, the accuracy of targeting next generation sequencing analysis results for rifampicin, isoniazid, streptomycin, and ethambutol were greater than 80%. The Xpert MTB/RIF detection of rifampicin resistance indicators was lower than that of targeting next generation sequencing analysis. **Conclusion** Targeting next generation sequencing analysis has shown high sensitivity, specificity, and accuracy in diagnosing resistance to rifampicin, isoniazid, streptomycin, and ethambutol.

Key words: rifampicin; isoniazid; streptomycin; ethambutol; targeting next generation sequencing analysis; drug-resistant gene

收稿日期: 2024-11-14

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (2023GXNSFAA026022); 广西生健康委员会自筹经费科研课题 (Z-A20231211)

作者简介: 朱庆东, 男, 副主任医师, 研究方向为耐药结核病的诊断与治疗。E-mail: zhuqingdong2003@163.com

[#]共同第一作者: 赵春艳, 女, 本科, 研究方向为耐药结核病的诊断与治疗。E-mail: zhaochunyan2303@163.com

^{*}通信作者: 谢周华, 男, 主任医师, 研究方向为耐药结核病的诊断与治疗。E-mail: 1491348066@qq.com

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的一种慢性传染病^[1]。尽管结核病在过去的几十年中因有效的抗结核药物而得到了显著控制,但耐药结核病尤其是多重耐药结核病的出现使得这一疾病再度成为威胁全球健康的难题。据估计耐药结核病造成的全球所有抗微生物药物耐药性死亡人数的 13%^[2]。及时准确的诊断是实现有效治疗和减少传播的前提。目前的诊断策略仍然主要依赖于基于培养的表型药物敏感性试验来决定。由于微生物生长缓慢,药物敏感性试验可能需要数周甚至数月才能完成。在这期间,患者可能会得到无效的药物治疗方案,导致治疗失败或促进耐药性的产生^[3]。目前对关键药物耐药性检测的快速分子检测已经彻底改变了耐药结核病的诊断。Xpert MTB/RIF 检测显著缩短了耐药结核病患者的治疗开始时间,但其不能用于检测目前使用的所有抗结核药物的全部耐药性^[4]。目前全基因组测序提供完整的基因组信息,但主要从培养的结核分枝杆菌分离株中进行,会延迟药物敏感性试验的治疗决策。相比之下,靶向下一代测序不需要特定微生物株的培养,能直接对样品中的 DNA 进行测序,避免了人工培养和筛选的过程,从而获得不同物种 DNA 的混合物,然后进行高通量测序和分析以获取所有基因信息,可为更多位点提供快速序列信息^[5-7]。本研究采用药物敏感性试验、靶向下一代测序对 87 例结核分枝杆菌患者中获得的结核分枝杆菌菌株进行耐药性检测,以药物敏感性试验结果为参考标准,评价靶向下一代测序在耐药结核病诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集 2022 年 2 月—2023 年 8 月南宁市第四人民医院结核科收治的 87 例确诊或临床诊断为结核病患者的痰液或肺泡灌洗液样本进行分枝杆菌固体培养,并排除重复菌株。本研究为回顾性研究,不包含任何可识别患者特征,并通过南宁市第四人民医院医学伦理审批(批件号:[2022]67)。

参照中国疾病预防控制中心发布的《肺结核诊断》(WS 288-2017)^[8],如果研究参与者满足以下任何 1 个标准,则被归类为患有结核病:Xpert MTB/RIF 检测、痰培养或涂片显微镜检查呈结核分枝杆菌阳性的病原学阳性的确诊患者。当没有分子或微生物学证据,但符合结核病的临床诊断标准:(1)与结核病患者接触的流行病学风险;(2)有可疑结

核病症状的临床表现,即咳嗽痰 2 周,或痰带血或咯血,包括全身症状,如盗汗、疲劳、间歇性或持续性午后低热、食欲不振、体质量减轻等症状;(3)胸部影像学检查的症状;(4)结核病病理检查的病理变化,表现为上皮样肉芽肿性炎症,以及光学显微镜下不同大小和数量的坏死和非坏死性肉芽肿;(5)免疫学检查、中度阳性或强阳性结核菌素皮肤试验,或 γ -干扰素释放试验阳性,或结核分枝杆菌抗体阳性试验;(6)在临床上诊断为肺结核,并进行 3 个月的预防性抗结核治疗,若肺部病变面积减小或消失,则可确诊为肺结核。

1.2 表型药敏试验

遵照临床和实验室标准研究所(CLSI)和世界卫生组织(WHO)的指导方针,所有抗生素均通过比例法在罗氏培养基(珠海 Baso 生物技术有限公司提供)上进行检测。首先,在菌悬液制备和稀释步骤中,从液体培养基中获取受试菌株,经 $4\,000\times g$ 离心 15 min 后,收集沉淀,并使用无菌 0.5% 聚山梨酯 80 Middlebrook 7H9 稀释,然后与标准麦氏比浊管(McFarland No.1)进行比浊,最终制备成 1 mg/mL 的菌悬液。检测药物的种类和质量浓度分别为:异烟肼 0.2 mg/L,利福平 40.0 mg/L,乙胺丁醇 2.0 mg/L,链霉素 4.0 mg/L。采用比例法进行药物敏感性试验接种,具体操作有两种方法:一是使用标准接种环取满一环(即 0.01 mL) $10\sim 2$ 、 $10\sim 4$ mg/mL 的菌悬液,通过划线法均匀接种到对照培养基和药敏培养基表面;二是使用移液枪吸取 0.1 mL $10\sim 3$ 、 $10\sim 5$ mg/mL 的菌悬液,滴加到对照培养基和药敏培养基表面,并旋转以确保菌液均匀分布。两种接种方法均确保最终接种菌量为 $10\sim 4$ 、 $10\sim 6$ mg。将接种后的培养基置于 $35\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下培养,4 周后观察结果。通过计算耐药率(耐药率=生长的菌落数/对照培养基上生长的菌落数)来判断药物敏感性,若耐药率超过 1%,则判定为耐药,否则视为敏感。

1.3 Xpert MTB/RIF

样品处理均采用 Xpert MTB/RIF 检测盒(Cepheid, USA)进行。收集 $1\sim 4$ mL 待检样本,置一次性防漏容器中,并标记样本序号于检测盒侧壁。加入 2 倍体积的 Sample Reagent (SR),剧烈摇动 $10\sim 20$ 次,于 $20\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,其间再次摇动 $10\sim 20$ 次。沉淀样品重悬于 67 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),使用无菌移液管移取至少 0.5 mL

加入检测盒,添加 1.5 mL SR 试剂,剧烈振摇后静置 15 min。使用 Cepheid 提供的专用定量无菌移液管将液化样本吸入检测盒,确保 30 min 内上机检测。GeneXpert Dx 检测仪(Cepheid, USA)需预装 GeneXpert Dx 软件和 Xpert MTB/RIF 检测法文件,通过扫描条形码输入样本和试剂匣信息,启动测试流程。仪器维护包括每月用 70%乙醇清洁表面、样本检测仓和柱塞杆,每年或必要时更换风扇处空气过滤片。系统会根据探针的循环阈值(CT)自动判断检测标本中是否存在结核分枝杆菌、结核分枝杆菌载量,以及是否存在利福平耐药。在 6 条探针中,若除质控探针外至少有 2 条探针发出荧光,则提示可能存在结核分枝杆菌感染。如果 5 条探针未全部发出荧光,则可能存在利福平耐药情况。

1.4 核酸提取和靶向下一代测序分析

本研究中靶向下一代测序交由杭州圣庭医疗科技有限公司进行测序分析。样品液化并使用终浓度为 2%的 NALC-NaOH 进行裂解。用蛋白酶 K、溶菌酶、质粒等,并加入待检样本进行处理。先加待测样本于试剂中,孵化后取无水乙醇振荡后离心,放回 EP 管板。添加磁珠涡旋振荡,并静置后弃上清,再取 1×WB 液,并添加乙醇后弃上清。处理完 EP 管,活化磁珠后静置孵化。利用 Qubit 4.0 DNA 浓度测量仪器进行核酸质量检测,并确认合格。配制 PCR 反应体系,加入 DNA 并进行审核,然后将反应管放入美国 ABI/Bio-Rad PCR 仪中运行。结束后进行纯化处理,最后吸取 DNA 文库。对多重 PCR 的产品进行 barcode 标记和 PCR 后保存产物。对 PCR 产物进行纯化和质检。利用 Illumina MiseqDX 高通量测序系统进行测序,过滤和比对数据质量,得出病原微生物种类和耐药基因的分析结果(当至少有 1 个片段能够成功映射到已知的种或属水平时,判定为阳性)。已知耐药相关突变基因来源于目前已发表的文献^[9-12],异烟肼耐药相关基因分别为 *inhA*、*katG*、*ahpC*、*fabG1*、*kasA*,利福平耐药相关基因分别为 *rpoB*、*rpoC*,乙胺丁醇耐药相关基因分别为 *embA*、*embB*、*embC*,链霉素耐药相关基因分别为 *rpsL*、*gid*、*rrs*。

1.5 统计学处理

正态分布的连续变量表示为均值(标准差),分类变量表示为 $n(\%)$ 。组间差异采用 McNemar χ^2 检验。在评估靶向下一代测序对耐药结核病的诊断效

能方面,以药物敏感性试验作为参考标准,计算敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、准确率、约登指数。结果以 95%置信区间表示,靶向下一代测序与其他检测方法的敏感性等指标用 McNemar χ^2 检验。使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。所有检验均采用双尾检验,当 $P < 0.05$ 时,则判定差异具有统计学意义。

敏感度 = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阴性例数)

特异度 = 真阴性例数 / (真阴性例数 + 假阳性例数)

阳性预测值 = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阳性例数)

阴性预测值 = 真阴性例数 / (真阴性例数 + 假阴性例数)

准确率 = (真阳性例数 + 真阴性例数) / 总例数

约登指数 = (敏感度 + 特异度) - 1

2 结果

2.1 表型药敏试验

87 株菌株中有 67 株对利福平耐药(耐药率为 77.01%),45 株对异烟肼耐药(耐药率为 51.72%),20 株对链霉素耐药(耐药率为 22.99%),16 株对乙胺丁醇耐药(耐药率为 18.39%)。

2.2 靶向下一代测序检出抗结核药物的耐药基因分布

靶向下一代测序检出 64 株利福平耐药菌株,其中包含 1 种突变基因和 21 种突变位点;46 株异烟肼耐药菌株,其中包含 4 种突变基因和 10 种突变位点;22 株链霉素耐药菌株,其中包含 2 种突变基因和 3 种突变位点;22 株乙胺丁醇耐药菌株,其中包含 1 种突变基因和 7 种突变位点。其中利福平耐药基因突变类型以 *Ser531Leu* (*rpoB*) 为主(构成比为 56.25%),异烟肼耐药基因突变类型以 *Ser315Thr* (*katG*) 为主(构成比为 58.70%),链霉素耐药基因突变类型以 *Lys43Arg* (*rpsL*) 为主(构成比为 86.36%),乙胺丁醇耐药基因突变类型以 *Met306Val* (*embB*) 为主(构成比为 36.36%)。突变位点构成比见表 1。

2.3 靶向下一代测序检测抗结核药物的诊断效能

以表型药物敏感性试验结果为参照标准,靶向下一代测序检测利福平、异烟肼、链霉素和乙胺丁醇的敏感度分别为 88.06%、88.89%、85.00%、75.00%,特异度分别为 75.00%、85.71%、92.54%、85.92%。准确率均大于 80%。值得注意的是对乙胺丁醇的阳性预测值(54.55%)和对利福平的阴性预测值(65.22%)较低,见表 2。

表 1 耐药菌株对抗结核药物耐药性的耐药基因分布
Table 1 Resistant genes distribution of drug-resistant strains against tuberculosis drugs

药物	耐药数量/株	耐药基因	突变位点	n/种	构成比/%
利福平	64	<i>rpoB</i>	<i>Ser531Leu</i>	36	56.25
			<i>Ser531Trp</i>	3	4.69
			<i>Leu511Pro</i>	3	4.69
			<i>His526Asp</i>	3	4.69
			<i>Asp516Gly</i>	2	3.13
			<i>Leu533Pro</i>	2	3.13
			<i>Asn519del</i>	1	1.56
			<i>Asp516Tyr</i>	1	1.56
			<i>Gln513Leu</i>	1	1.56
			<i>His526Arg</i>	1	1.56
			<i>His526Tyr</i>	1	1.56
			<i>Leu457Pro</i>	1	1.56
			<i>Phe505Leu</i>	1	1.56
			<i>Ser512Gly</i>	1	1.56
			<i>Ser531Leu+Phe503Ser</i>	1	1.56
			<i>Leu511Pro+Asp516Gly</i>	1	1.56
			<i>Phe503Ser+Ser531Leu</i>	1	1.56
			<i>Asn519del+Asn519fs</i>	1	1.56
			<i>Ile480Val+Ser531Leu</i>	1	1.56
			<i>Leu511Pro+Gly507fs</i>	1	1.56
			<i>His526Asn+Phe424Val</i>	1	1.56
异烟肼	46	<i>katG</i>	<i>Ser315Thr</i>	27	58.70
			<i>Ser315Asn</i>	2	4.35
			<i>Ser315Arg+Ser315Thr</i>	2	4.35
			<i>Ser315Thr、Asp381Gly</i>	1	2.17
			<i>Ser315Gly、Ser315Arg</i>	1	2.17
		<i>inhA</i>	<i>-15C>T</i>	5	10.87
			<i>-8T>C</i>	2	4.35
		<i>ahpC</i>	<i>-72C>T</i>	1	2.17
			<i>-54C>T</i>	1	2.17
			<i>-52C>T</i>	1	2.17
		<i>katG、inhA</i>	<i>Ser315Thr</i>	2	4.35
			<i>Trp397</i>	1	2.17
链霉素	22	<i>rpsL</i>	<i>Lys43Arg</i>	19	86.36
			<i>Lys88Arg</i>	1	4.55
		<i>rrs</i>	<i>514A>C</i>	2	9.09
乙胺丁醇	22	<i>embB</i>	<i>Asp354Ala</i>	1	4.55
			<i>Gly406Ala</i>	3	13.64
			<i>Gly406Asp</i>	3	13.64
			<i>Met306Ile</i>	4	18.18
			<i>Met306Leu</i>	1	4.55
			<i>Met306Val</i>	8	36.36
			<i>Tyr319Cys+Met306Val</i>	1	4.55

表 2 靶向下一代测序对抗结核药物耐药性的诊断效能

Table 2 Diagnostic efficacy of targeting next-generation sequencing analysis on drug resistance of antituberculosis drugs

药物	突变类型	药物敏感性试验/株		敏感 度/%	特异 度/%	阳性预 测值/%	阴性预 测值/%	约登指 数/%	准确 率/%
		耐药	敏感						
利福平	突变	59	5	88.06	75.00	92.19	65.22	63.06	85.06
	未突变	8	15						
异烟肼	突变	40	6	88.89	85.71	86.96	87.80	74.60	87.36
	未突变	5	36						
链霉素	突变	17	5	85.00	92.54	77.27	95.38	77.54	90.80
	未突变	3	62						
乙胺丁醇	突变	12	10	75.00	85.92	54.55	93.85	60.92	83.91
	未突变	4	61						

2.4 靶向下一代测序与 Xpert MTB/RIF 对利福平耐药的诊断效能比较

以表型药物敏感性试验结果为参照标准, Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的敏感度 (75.00%)、特异度 (78.26%)、阳性预测值 (90.57%)、阴性预测

值 (52.94%)、约登指数 (43.51%) 和准确率 (75.86%) 均低于靶向下一代测序。进一步将靶向下一代测序与 Xpert MTB/RIF 进行头对头比较, 与 Xpert MTB/RIF 相比, 靶向下一代测序敏感度为 90.57%, 特异度为 52.94%, 准确率为 75.86%。表 3。

表 3 靶向下一代测序与 Xpert MTB/RIF 的头对头比较

Table 3 Head to head comparison between targeting next generation sequencing analysis and Xpert MTB/RIF

方法	突变类型/株	Xpert MTB/RIF		敏感 度/%	特异 度/%	阳性预 测值/%	阴性预 测值/%	约登指 数/%	准确 率/%
		耐药/株	敏感/株						
靶向下一代测序	突变	48	16	90.57	52.94	75.00	78.26	43.51	75.86
	未突变	5	18						

3 讨论

基因组学技术的发展, 尤其是宏基因组测序和靶向下一代测序, 为耐药结核病的快速诊断和治疗规划带来了新的希望。宏基因组测序虽然具有对样本中所有遗传物质进行全面分析的能力, 能够提供关于病原体种类及其耐药性的信息, 不依赖于细菌培养, 但由于成本和数据处理复杂性, 对实际临床应用提出了挑战。与宏基因组测序相比, 靶向下一代测序技术在特异性和经济性之间取得了良好的平衡。通过预设计的探针或引物, 靶向下一代测序可以在 1 次测序中同时分析多个已知的耐药位点, 大大缩短了从样本到结果的时间^[13]。这对于多重耐药和广泛耐药结核病的诊断尤为重要, 因为快速获取准确的耐药图谱可以支持临床医生制定更有效的治疗方案。

本研究对 67 例耐药结核病进行靶向下一代测序, 并获得耐药基因突变谱。在 64 株耐利福平菌株中, *rpoB* 基因表现出显著的突变分布, 尤其是 *Ser531Leu* 突变, 占比达到了 56.25%。这一突变早

已被证实为利福平耐药的主要机制, 与文献中的高频突变一致^[14]。此外, 其他突变如 *Ser531Trp*、*Leu511Pro* 和 *His526Asp* 通过改变 RNA 聚合酶的构象, 降低药物的结合能力, 是利福平耐药发生的核心机制^[15]。对异烟肼耐药的 46 例患者中, *katG* 基因的 *Ser315Thr* 突变是主要机制。这一突变诱导的几种生理变化, 包括对活性氧和 DNA 损伤的易感性增加、转录程序的重塑和叶酸生物合成的代谢抑制^[16]。其他突变包括 *inhA* 启动子区域的 *-15C>T*, 占 10.87%, 烯酰酰基载体蛋白还原酶是参与脂肪酸合成的关键酶, 主要是霉菌酸生物合成, 是 NADH 依赖性酰基载体蛋白还原酶家族的一部分^[17]。该区域突变通过增加目标酶表达量来降低药物的有效性。此外, *ahpC* 基因的突变尽管频率低, 但指出可能存在通过过氧化物酶酶活性的另一耐药途径^[18]。在链霉素耐药的 22 株菌株中, *rpsL* 基因的 *Lys43Arg* 突变极具主导性, 该突变通过改变核糖体蛋白阻碍链霉素与核糖体的结合, 从而抑制其功能效率^[19]。对于乙胺丁醇耐药菌株的分析显示, *embB* 基因的

Met306Val 突变最显著,这一突变影响了阿拉伯糖基转移酶,不利于乙胺丁醇的作用^[20]。此外,*Gly406Ala* 和 *Gly406Asp* 各占 13.64%,揭示了药物的多重耐药机制可能主要集中在细胞壁合成路径。

本研究评估了靶向下一代测序在检测结核病利福平、异烟肼、链霉素和乙胺丁醇耐药性方面的诊断效能。结果显示,靶向下一代测序在利福平、异烟肼、和链霉素的耐药检测中展现出较高的敏感度和特异度,值得注意的是,乙胺丁醇的阳性预测值仅为 54.55%,而利福平的阴性预测值为 65.22%,这些较低的预测值可能导致误诊。敏感度和特异度的差异表明,靶向下一代测序检测可能正确识别出所有真实耐药的菌株,但也可能有一些耐药菌株被漏检,或一些原本药物敏感的菌株被错误地判断为耐药。因此,不应单纯依赖靶向下一代测序的结果,而是建议将其与传统药物敏感性试验结果结合,同时考虑患者的临床信息和流行病学史,做出最佳的治疗选择。Xpert MTB/RIF 检测可以进行全自动样品制备、扩增和通过实时 PCR 同时检测结核分枝杆菌和利福平的耐药性^[21]。与 Xpert MTB/RIF 相比,靶向下一代测序对利福平耐药性敏感度(88.06%)显著高于 Xpert MTB/RIF 的 75.00%,显示出靶向下一代测序在检测耐药菌株时具有更高的可靠性和准确度。值得注意的是,靶向下一代测序的价值还在于对利福平以外的药物、分析耐药基因突变特征以及优异的敏感度和特异度,尤其适用于需要快速、高精度检测的临床环境。先前的研究表明全基因组测序检测链霉素耐药的敏感度为 93.10%,特异度为 94.44%;异烟肼的敏感度为 98.11,特异度为 83.33%;利福平的敏感度为 95.92%,特异度为 100.00%;乙胺丁醇的敏感度为 81.25%,特异度为 83.675%^[22]。尽管在本研究中靶向下一代测序检测利福平、异烟肼、链霉素和乙胺丁醇的耐药性略逊于全基因组测序的诊断效能。然而不可忽视的是在成本、效率方面,靶向下一代测序较之于全基因组测序具有显著优势。靶向下一代测序通过聚焦于特定基因或区域,降低了测序和数据分析的复杂性和成本,这些优势在耐药结核的快速诊断中极具吸引力。

综上所述,靶向下一代测序通过对已知耐药位点的同时检测,缩短了从样本到结果的时间,可对多重耐药和广泛耐药结核病快速诊断。尽管 Xpert MTB/RIF 的低成本优势仍具有吸引力,但靶向下一

代测序的高敏感度和特异度在对利福平以外药物耐药性的检测和耐药基因突变特征的分析中,提供了更强大的支持。靶向下一代测序对耐药基因突变谱的分析进一步揭示了利福平、异烟肼、链霉素等药物的耐药机制,如 *rpoB* 基因的 *Ser531Leu* 突变在利福平耐药中的核心作用,以及 *katG* 基因的 *Ser315Thr* 突变在异烟肼耐药中的主导地位。

本研究也存在一些局限性。其中表型药敏试验结果显示卡那霉素、卷曲霉素和对氨基水杨酸等抗结核药物的耐药率较低,这可能在敏感度和特异度等指标上引入较大的偏倚,因此未将这些药物纳入最终的对比研究。未来可以扩大样本量,纳入对比更多类型的抗结核药物,揭示更多关于抗结核药物耐药性的规律,并确保研究结果的广泛适用性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dong Z, Wang Q Q, Yu S C, *et al.* Age-period-cohort analysis of pulmonary tuberculosis reported incidence, China, 2006-2020 [J]. *Infect Dis Poverty*, 2022, 11(1): 85.
- [2] Farhat M, Cox H, Ghanem M, *et al.* Drug-resistant tuberculosis: A persistent global health concern [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2024, 22(10): 617-635.
- [3] Murphy S G, Smith C, Lapierre P, *et al.* Direct detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using targeted next generation sequencing [J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1206056.
- [4] Kayomo M K, Mbula V N, Aloni M, *et al.* Targeted next-generation sequencing of sputum for diagnosis of drug-resistant TB: Results of a national survey in Democratic Republic of the Congo [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10786.
- [5] Kambli P, Ajbani K, Kazi M, *et al.* Targeted next generation sequencing directly from sputum for comprehensive genetic information on drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis* (Edinb), 2021, 127: 102051.
- [6] Hilt E E, Ferrieri P. Next generation and other sequencing technologies in diagnostic microbiology and infectious diseases [J]. *Genes* (Basel), 2022, 13(9): 1566.
- [7] Mitchell S L, Simner P J. Next-generation sequencing in clinical microbiology: Are we there yet? [J]. *Clin Lab Med*, 2019, 39(3): 405-418.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS 288—2017 肺结核诊断 [J]. *结核与肺部疾病杂志*, 2024, 5(4): 376-378.
- [9] Walker T M, Kohl T A, Omar S V, *et al.* Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: A retrospective cohort

- study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(10): 1193-1202.
- [10] Cox H, Goig G A, Salaam-Dreyer Z, *et al.* Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicin-resistant tuberculosis in high-burden settings: A retrospective cohort study [J]. *J Clin Microbiol*, 2022, 60(3): e0236221.
- [11] Phelan J E, O'Sullivan D M, 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] 梅金周, 王云霞, 张梅娟, 等. 全基因组测序技术在耐药肺结核诊断中的应用性评价 [J]. 新发传染病电子杂志, 2024, 9(3): 16-20.
- [13] Deb S, Basu J, Choudhary M. An overview of next generation sequencing strategies and genomics tools used for tuberculosis research [J]. *J Appl Microbiol*, 2024, 135(7): 1xael74.
- [14] Brandis G, Hughes D. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying rpoB Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(11): 2493-2497.
- [15] Li M C, Lu J, Lu Y, *et al.* rpoB Mutations and effects on rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 4119-4128.
- [16] Ofori-Anyinam N, Hamblin M, Coldren M L, *et al.* KatG catalase deficiency confers bedaquiline hyper-susceptibility to isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *bioRxiv*, 2023.10.17.562707.
- [17] Prasad M S, Bhole R P, Khedekar P B, *et al.* *Mycobacterium* enoyl acyl carrier protein reductase (InhA): A key target for antitubercular drug discovery [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105242.
- [18] Sherman D R, Mduli K, Hickey M J, *et al.* AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *BioFactors* (Oxford), 1999, 10(2-3): 211-217.
- [19] Cohen K A, Bishai W R, Pym A S. Molecular basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbiol Spectr*, 2014, 2(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0036-2013.
- [20] Nan X T, Li M C, Xiao T Y, *et al.* Different contributions of embB and ubiA mutations to variable level of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates [J]. *Infect Drug Resist*, 2024, 17: 3125-3132.
- [21] Boehme C C, Nabeta P, Hillemann D, *et al.* Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [22] 吴联朋, 夏丹丹, 徐克. 全基因组测序技术在耐药结核病诊断中的应用价值 [J]. 温州医科大学学报, 2024, 54(1): 42-4652.

【责任编辑 解学星】