

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

Protein Mass Spectrum Patterns of Bedaquiline-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

H37Ra through spontaneous mutation Using MALDI-TOF MS

Korawit Juprasertpom*

Therdsak Prammananan**

Chollanant Khattiyawech***

Seksun Samosonsuk***

Worada Samosornsuk***

*Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand

**BIOTEC, National Science and Technology Development Agency (NSTDA)

***Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University

Received: April 1, 2024 | Revised: May 27, 2024 | Accepted: August 15, 2024

Abstract

WHO endorses Bedaquiline (BDQ) as Group A antituberculosis drugs for clinical practice. Rapid identification of drug-resistant MTB strains is crucial for optimizing treatment efficacy, preventing further transmission, and effectively controlling the spread of contagious tuberculosis. Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a technique applied to use for detection of antimicrobial resistance, including tuberculosis drug resistance. Therefore, there is a high probability that MALDI-TOF MS could generate specific mass spectrum patterns related to BDQ resistance. The aim of this study was to examine the pattern of protein mass spectra (PMS) between BDQ-spontaneous mutants derived from spontaneous mutation in *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 compared to H37Ra wild type using MALDI-TOF MS. A stepwise induced mutation was performed in M7H10 agar plate containing BDQ concentrations ranging from 0.125 to 1.00 µg/mL. The BDQ-resistant colonies exhibiting on M7H10 containing BDQ concentration between 0.50 and 1.00 µg/mL were used to study their protein mass spectrum patterns compared to H37Ra wild type via MALDI-TOF MS. The results revealed the presence of 6 spontaneous BDQ^R strains (H1-H6). MALDI-TOF MS analysis revealed that BDQ^R strains exhibited 6 significantly different PMS pattern compared to *M. tuberculosis* H37Ra WT. All BDQ^R strains displayed a significant decrease in the major mass spectra peak within the range of m/z 5688–5693. H1 exhibited an interesting minor MS peak increase in ranges 2733 and 4864–4865 m/z . In H3 and H5, there was a significant increase in the mass spectrum peak observed in the range of 4932–4933 m/z and 5332–5334 m/z , respectively. MSP dendrogram clearly distinguishes between each BDQ^R strain and the wild type. In conclusion, this study successfully distinguishes protein mass spectra between wild type and BDQ^R strains. MALDI-TOF MS has demonstrated reliability and holds potential as an alternative technique for detecting drug resistance in MTB.

Correspondence: Worada Samosornsuk

E-mail: sworada@hotmail.com

รูปแบบ protein mass spectrum ของเชื้อวัณโรคเอชสามสิบเจ็ดอาร์เอดื้อยา Bedaquiline ผ่านกระบวนการ spontaneous mutation ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

กรวิษฐ์ จูประเสริฐพร*

เทอดศักดิ์ พราหมณ์นนท์**

ชลนันทน์ ชัตติยเวช***

เสกสรรค์ สโมสรสุข***

วรดา สโมสรสุข***

*บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

**ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

***ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

วันรับ: 1 เมษายน 2567 | วันแก้ไข: 27 พฤษภาคม 2567 | วันตอบรับ: 15 สิงหาคม 2567

บทคัดย่อ

WHO อนุมัติให้ Bedaquiline (BDQ) เป็นยารักษาวัณโรคกลุ่ม A ที่พิจารณานำมาใช้สำหรับการรักษาทางคลินิก การตรวจและวินิจฉัยลักษณะการดื้อยาชนิดใหม่อย่างรวดเร็วนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพ ป้องกันและควบคุมโรคไม่ให้เชื้อวัณโรคแพร่กระจาย matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็นเทคนิคที่นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลักษณะการดื้อยาในเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ รวมไปถึงเชื้อวัณโรค ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่นำเทคนิคนี้มาตรวจหาลักษณะการดื้อยา BDQ ในตัวอย่างเชื้อวัณโรค ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบ protein mass spectrum (PMS) ของเชื้อกลายพันธุ์ดื้อยา BDQ ด้วยการสร้างเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ H37Ra ATCC 25177 ให้เกิด spontaneous resistance ต่อยา BDQ โดยถ่ายโอนเชื้อที่ละชั้นตอนลงใน M7H10 ที่มีความเข้มข้นของยา BDQ ตั้งแต่ 0.125 ถึง 1.00 $\mu\text{g/mL}$ เป็นลำดับ เชื้อที่ขึ้นใน M7H10 ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.50 ถึง 1.00 $\mu\text{g/mL}$ ถือเป็นเชื้อดื้อยา BDQ จะนำมาศึกษารูปแบบ PMS เปรียบเทียบ H37Ra wild type ด้วย MALDI-TOF MS จากผลการศึกษาสามารถสร้างเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ดื้อยา BDQ (BDQ-resistance strains; BDQ^R strains) ได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ (H1-H6) การวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS แสดงให้เห็นถึงรูปแบบ PMS ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 6 รูปแบบเมื่อเปรียบเทียบกับ *M. tuberculosis* H37Ra WT ใน BDQ^R ทุกสายพันธุ์มีการลดลงของ PMS หลักช่วง m/z 5688–5693 สายพันธุ์ H1 พบ PMS รองที่เพิ่มขึ้นอย่างโดดเด่นในตำแหน่ง m/z 2733 และ 4864–4865 ในสายพันธุ์ H3 และ H5 พบ PMS เพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง m/z 4932 – 4933 และ 5332–5334 ตามลำดับ Main spectral profile (MSP) dendrogram สามารถจำแนกสายพันธุ์ของ BDQ^R และ wild type ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยนี้สามารถนำรูปแบบ PMS จำแนกระหว่างสายพันธุ์ที่ไว และดื้อต่อยา BDQ ออกจากกันได้ MALDI-TOF MS จึงแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือ และสามารถใช้เป็นเทคนิคทางเลือกในการตรวจหาลักษณะการดื้อยาในงานวัณโรค

ติดต่อผู้พิมพ์: วรดา สโมสรสุข

อีเมล: sworada@hotmail.com

Keywords

Tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis

Bedaquiline

MALDI-TOF MS

คำสำคัญ

วัณโรค

เชื้อวัณโรค

เบดาควิลิน

มัลดีทอฟ เอ็มเอส

บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis, TB) เป็นโรคติดเชื้อเกิดจากเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) และเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ก่อให้เกิดการเสียชีวิตมากที่สุดเป็นลำดับที่ 2 รองจาก COVID-19⁽¹⁾ จากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก ประเทศไทยมีอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ 103,000 ราย ในจำนวนดังกล่าวมีผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อเอชไอวี (TB/HIV) 8,900 ราย และมีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา RR/MDR-TB ประมาณ 2,400 ราย^(2, 3) อัตราความสำเร็จในการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (RR/MDR-TB) อยู่ที่ร้อยละ 63⁽¹⁾ ขณะที่การศึกษา meta-analysis พบอัตราความสำเร็จในการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (XDR-TB) มีเพียงร้อยละ 44.2⁽⁴⁾ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ยาในการรักษาที่มีหลักฐานเชิงประจักษ์ทางด้านประสิทธิภาพ และความปลอดภัยในการรักษา ในปี ค.ศ. 2020 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศถึงแนวทางการรักษาผู้ป่วยวัณโรคโดยพิจารณาใช้ยารักษาวัณโรคขนานใหม่ (new line drug anti-tuberculosis) ที่ให้ประสิทธิผลและประสิทธิภาพที่ดี^(5, 6) โดย Bedaquiline (BDQ) เป็นยารักษาวัณโรคขนานใหม่ในกลุ่ม A มีกลไกออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ ATP ซึ่งสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค^(7, 8) มีการนำมาปรับใช้รักษาทางคลินิกประกอบกับยากกลุ่มต่าง ๆ โดยมีสองสูตรการรักษา คือ สูตรยารักษากระยะสั้น (shorter oral regimens) และระยะยาว (longer oral regimens) ในปี ค.ศ. 2022 องค์การอนามัยโลกมีการปรับสูตรรักษาเพิ่มเติมโดยนำ BDQ ปรับใช้ร่วมกับ Pretomanid (Pa), Linezolid (L), และ Moxifloxacin (M) กลายเป็นสูตรรักษาสำหรับ 6 เดือน คือ BPaL หรือสูตรรักษากระยะยาว 9 ถึง 18 เดือนคือ BPaLM^(9, 10) สำหรับรักษาผู้ป่วย RR/MDR-TB และ Pre-XDR TB หลังจากได้พิจารณานำมาใช้ในทางคลินิกได้ไม่นานนัก มีรายงานการดื้อยาเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย BDQ พบในประเทศอินเดียและจีน^(11, 12) และในปีล่าสุดมีรายงานการดื้อยาต่อสูตรการรักษา BPaL ในแอฟริกาใต้⁽¹³⁾ ไม่พบรายงานการดื้อยาต่อสูตรการรักษา BPaLM แต่อย่างใด อัตราการดื้อยาต่อ BDQ ในเชื้อ MDR-TB ที่เพาะแยกจากทางคลินิกสูงถึงร้อยละ 4.4^(14, 15) ในปัจจุบันกลไกการดื้อยาที่ตรวจพบ และมีความเกี่ยวข้องต่อ BDQ ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ เช่น *atpE*, *Rv0678 (mmpR)* และ *pepQ atpE* มีหน้าที่ควบคุม ATP synthase subunit c⁽¹⁶⁾ เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา BDQ⁽¹⁷⁾ การกลายพันธุ์ของ *atpE* ส่งผลให้ค่า BDQ MIC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ^(18, 19), *Rv0678 (mmpR)* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับ MmpL5-MmpS5 เป็น repressor efflux pump ในการขับสารออกจากเซลล์ การกลายพันธุ์ของ *mmpR* ส่งผลให้ rotator ring ATPase ทำงานผิดปกติ⁽²⁰⁾ และ *pepQ* เป็น cytoplasmic aminopeptidase ยังไม่พบกลไกของยา BDQ ต่อยีนนี้อย่างแน่ชัด แต่การกลายพันธุ์ของยีน *pepQ* ส่งผลให้เกิด low-level bedaquiline และ clofazimine resistance⁽²¹⁾ การตรวจเชื้อดื้อยาต่อ BDQ ได้อย่างรวดเร็วจึงมีความสำคัญต่อการรักษา การติดตามโรค และการพยากรณ์การดำเนินโรค

ในปัจจุบันการตรวจหาเชื้อดื้อยา BDQ ต้องอาศัยวิธีทางพีโนไทป์สำหรับทดสอบความไวของเชื้อดื้อยา ซึ่งต้องใช้เครื่องมือ บุคลากรที่มีความชำนาญ และใช้เวลานานกว่าจะทราบผล นอกจากนี้ critical drug concentration (CC) ที่ใช้ยังแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ทดสอบ สำหรับการตรวจทางจีโนไทป์ยังคงมีข้อจำกัด เนื่องจากองค์ความรู้เกี่ยวกับการดื้อยายังมีน้อย จึงเกิดการศึกษา พัฒนา คิดค้น และประยุกต์วิธีที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และประสิทธิภาพในการตรวจหาการดื้อยาในเชื้อวัณโรค พร้อมทั้งลดระยะเวลาในการตรวจ สามารถให้ผลที่ถูกต้อง และแม่นยำ Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry หรือ MALDI–TOF MS เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ทำการตรึงโปรตีน หรือเปปไทด์ กับผลึกของเมทริกซ์ และยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างโปรตีนให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน เกิดการเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า โดยสารที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ เรียกว่า time-of-flight (TOF) ได้เป็น m/z peak จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับ PMS ใน database เพื่อระบุชนิดของตัวอย่าง ในปัจจุบัน MALDI–TOF MS มีการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพ และประยุกต์มาใช้ในการตรวจหาการดื้อต่อสารต้านจุลชีพต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น การตรวจ colistin resistance ใน *Escherichia coli*⁽²²⁾ การตรวจหาความไวต่อ fluconazole ที่สัมพันธ์ต่อ *CDR1* และ *CDR2*⁽²³⁾ มีการนำเทคนิคนี้สำหรับการตรวจหาการดื้อยารักษาวัณโรคชนิดหนึ่งที่หนึ่งต่อเชื้อกลุ่ม MTB และ NTM⁽²⁴⁾ มีการประยุกต์ PCR มาใช้ร่วมกับ MALDI–TOF MS เพื่อทำนายการดื้อยาใน MTB⁽²⁵⁾ ดังนั้นการนำเทคนิค MALDI–TOF MS มาประยุกต์ใช้ในการตรวจลักษณะการดื้อต่อยา BDQ ของเชื้อ *M. tuberculosis* พบความเป็นไปได้สูงที่จะตรวจลักษณะที่แตกต่างของโปรตีนที่สร้างขึ้นระหว่างเชื้อที่ไวและเชื้อดื้อยา ในการศึกษานี้จะทำการศึกษาเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 เชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงที่ 2 สามารถนำมาปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับที่ 2^(26, 27) คุณสมบัติของเชื้อมีความแตกต่างกับ H37Rv เพียงเล็กน้อย มีตำแหน่ง insertion และ deletion ที่แตกต่างกันเนื่องจากขนาดจีโนมของ H37Ra มีขนาดใหญ่กว่า H37Rv⁽²⁸⁾ มีการนำเชื้อทั้งสองชนิดไปใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์เพื่อตรวจหายีนดื้อยาด้วยเทคนิค CRISPR⁽²⁹⁾ ทำ molecular docking ของยาด้านวัณโรคโดยใช้ H37Ra เป็นเชื้อทดสอบ⁽³⁰⁾ ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อ H37Ra⁽³¹⁾ H37Ra จึงเป็นตัวแทนสำหรับทดลองในการวิจัยครั้งนี้ได้เป็นอย่างดี หลังจากประเทศไทยได้พิจารณานำยาทั้งสองชนิดมามีส่วนร่วมในสูตรการรักษาวัณโรคดื้อยา มีการปรับใช้จนถึงปัจจุบัน ยังไม่พบรายงาน หรืออุบัติการณ์การดื้อยาต่อ BDQ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเชื้อกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา BDQ ด้วย spontaneous mutation ทำให้ได้ BDQ–spontaneous mutants ที่เป็นไปตามข้อกำหนดของ WHO ที่เชื้อดื้อยาต่อ BDQ จะมีค่า CC มากกว่า 0.25 $\mu\text{g/mL}$ จากนั้นนำเชื้อดื้อยาที่ได้มาเปรียบเทียบกับรูปแบบการเปลี่ยนแปลง PMS ต่อเชื้อ H37Ra wild type ด้วย MALDI–TOF MS เพื่อพิจารณาความสามารถในการใช้เทคนิค MALDI–TOF MS จำแนกเชื้อที่ไวและเชื้อดื้อยาออกจากกัน

วัสดุและวิธีการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบเชิงทดลอง (experimental study) โดยทำการวิเคราะห์ลักษณะการดื้อยา bedaquiline ในเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 (wild type) เปรียบเทียบกับ *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา BDQ (Bedaquiline-resistant strains; BDQ^R strains) ที่ได้จากกระบวนการ spontaneous mutation และศึกษาลักษณะของ PMS ด้วย MALDI-TOF MS

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยทั้งหมด ผ่านกระบวนการพิจารณาด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (TU-IBC Project ID 041/2565) ไม่มีการใช้ตัวอย่างจากทางคลินิกในการศึกษา ขั้นตอนประกอบไปด้วยการเตรียมสารละลาย BDQ การสร้างเชื้อสายพันธุ์ดื้อยา BDQ ด้วย spontaneous mutation และการสกัดโปรตีนเพื่อนำไปวิเคราะห์ศึกษาลักษณะ protein mass spectrum (PMS) ของ BDQ^R strains เปรียบเทียบกับ *M. tuberculosis* H37Ra wild type

การเตรียมยา bedaquiline

ทำการเตรียมสารต้านจุลชีพ bedaquiline ตาม Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis⁽³²⁾ สารต้านจุลชีพ bedaquiline สั่งซื้อจาก MedChemExpress (BDQ catalog number HY-14881) ละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ทำการเตรียม stock solution ของสารต้านจุลชีพ BDQ ที่ 4,000 µg/mL (4 mg/mL) ทำการถ่ายเทสารลงใน vial หลอดละ 100 µL เก็บ stock ที่ freezer -80°C สำหรับ working solution ทำการเจือจางด้วย M7H9-10% OADC 900 µL ต่อ stock solution 100 µL (1:10) จะได้ final working solution ความเข้มข้นเท่ากับ 400 µg/mL พร้อมสำหรับใช้งานเพื่อการทดสอบต่าง ๆ

การสร้างเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra ที่ดื้อต่อ bedaquiline ด้วย Spontaneous mutation และการคัดเลือก mutant strains

กระบวนการทำ spontaneous mutation อ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดยดัดแปลงจาก N .Ismail และคณะ⁽³³⁾ อธิบายโดยย่อ นำโคโลนีของเชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงบนอาหารไข่ LJ medium โดยอยู่ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต 4 สัปดาห์ ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีลูกแก้ว ผสมจนโคโลนีกระจายตัวออกจากกัน และเติม M7H9-0.2% glycerol ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าสารด้วย vortex mixer 30 วินาที จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อเซลล์กระจายตัวดีแล้วให้ตั้งหลอดทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ตกตะกอน จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวหลอดใหม่ ที่มี M7H9-10% OADC ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และทำการปรับค่าความขุ่นเชื้อให้อยู่ที่ McFarland No.3 (มีเชื้อประมาณ 10⁶ CFU/mL) โดยใช้ McFarland densitometer control ปรับเซลล์แขวนลอยให้เจือจางเชื้อลงใน Eppendorf tube ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10⁻⁶ – 10⁻⁹ สำหรับเพลทควบคุม (Drug free control; DFC) ปิเปตเซลล์ที่เจือจางในแต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรลงใน DFC ส่วนเชื้อที่มีความขุ่นที่ McFarland No.3 ให้ปิเปตเซลล์ลงใน M7H10 โดยผสมกับสารต้านจุลชีพ BDQ ที่ 0.125 µg/mL จากนั้นทำการถ่ายโอนเชื้อที่ละขั้นตอนจากความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูง โดยเริ่มที่ 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 µg/mL ตามลำดับ บ่มเชื้อที่ 37°C ระยะเวลา 4 สัปดาห์ อ่านผลการทดสอบเมื่อ drug free control plate สามารถสังเกตโคโลนีได้ด้วยตาเปล่า

ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ให้ผลดีต่อยา BDQ (BDQ^R strains) โดยเก็บเฉพาะเชื้อที่เจริญเติบโตได้ในเพลทที่ผสมสารต้านจุลชีพ BDQ ที่มากกว่า 0.25 µg/mL ตามเกณฑ์ของ WHO⁽³²⁾ นำ BDQ^R เพาะเลี้ยงใน M7H10 ที่มีสารต้านจุลชีพผสม และบ่มเชื้อที่ 37°C 4 สัปดาห์ก่อนนำไปศึกษาต่อในส่วน MALDI-TOF MS และเก็บ ลงใน Middlebrook 7H9–10% OADC 15% glycerol ที่ผสมสารต้านจุลชีพของ BDQ ที่ความเข้มข้นนั้นๆ เก็บ stock เชื้อ ที่ -80°C

การสกัดโปรตีน และวิเคราะห์ลักษณะ protein mass spectrum ระหว่าง wild type และ mutant strains ด้วย MALDI-TOF MS

สกัดโปรตีนด้วยวิธีการ sonication (SM) โดยทำการตัดแปลงชิ้นตอนบางส่วนจากงานวิจัยของ Komolsiri, S และคณะ⁽³⁴⁾ อธิบายโดยย่อ เชื้อเชื้อจาก M7H10 ใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อด้วยโคแบคทีเรีย บดเชื้อให้ละเอียด 30 วินาที และผสม suspension ให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสออก และทำการปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 300 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสออก ทำซ้ำ 2 รอบเพื่อป้องกันการเจือปนของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นขั้นตอนต่าง ๆ เป็นไปตามวิธีการศึกษาที่ของ Komolsiri, S และคณะ⁽³⁴⁾ เมื่อได้สารละลายส่วนใสจากการสกัดโปรตีนเรียบร้อยแล้ว หยดสารละลายส่วนใส และ bacterial test standard (BTS) ซึ่งเป็นเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ใช้สำหรับเป็น calibrator เพื่อควบคุมผลการทดลอง (internal quality control) ชนิดละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้ง และ ปิเปตสารกระตุ้นให้พลังงาน (matrix) ชนิด α -Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid (HCCA) matrix 1 ไมโครลิตร ลงบน MALDI target plate รอจนแห้ง จึงนำไปเข้าเครื่อง MALDI-TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) เพื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะ PMS ผ่านโปรแกรม FlexControl™ (Bruker, Germany) เก็บสเปกตรัมในแต่ละตัวอย่างด้วย positive linear mode, mass/charge (m/z) ratio ในช่วง 2,000–20,000 ดาลตัน ค่าศักย์ไฟฟ้ากระตุ้นอยู่ที่ 20 kV ความเข้มเลเซอร์ที่ 40% ยิงด้วยเลเซอร์ 2,000 shots ต่อ 1 หลุม โดยทำการเก็บข้อมูลของสายพันธุ์ wild type และ mutant อย่างน้อยตัวอย่างชนิดละ 20 หลุม

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

วิเคราะห์ PMS ที่ได้จากตัวอย่าง H37Ra wild type และ BDQ^R strains โดยใช้โปรแกรม MBT Compass Explorer (Bruker, Germany) ที่มีฐานข้อมูลของเชื้อหลากหลายชนิดรวมไปถึงเชื้อวัณโรค นำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ BDQ^R strains ทำการเลือกตัวแทนของแต่ละตัวอย่างมา 1 หลุม โดยที่ตัวแทนตัวอย่างต้องสามารถแยกจีนส์ และสปีชีส์ออกจากกันได้ และมีค่า log score ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 2.000 จากนั้นนำผลที่ได้สรุปออกมาในรูปแบบเมนสเปกตรัมโปรไฟล์ (Main spectra profiles; MSPs) เคนโดแกรม ซึ่งจะสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อออกจากกัน พร้อมทั้งวิเคราะห์ลักษณะ PMS ในตัวอย่างที่เป็นตัวแทนสำหรับการวิเคราะห์ สังเกต mass to charge ratio (m/z) และ intensities เปรียบเทียบกับ H37Ra wild type ด้วยโปรแกรม FlexAnalysis™ (Bruker, Germany)

ผลการศึกษา

ผลการทำ BDQ spontaneous mutation ของ MTB H37Ra

หลังจากที่ได้ทำการเหนี่ยวนำเชื้อให้ดื้อยาต่อ BDQ ในความเข้มข้นที่สูงขึ้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสามารถเก็บเชื้อ BDQ^R strains ได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ โดยเก็บได้ชนิดละ 2 สายพันธุ์ จากเพลท M7H10 ที่ผสม BDQ ที่ความเข้มข้น 0.50, 0.75, และ 1.00 µg/mL โดยสามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 1 ตารางที่ 1 BDQ^R strains ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ได้จากกระบวนการทำ spontaneous mutation

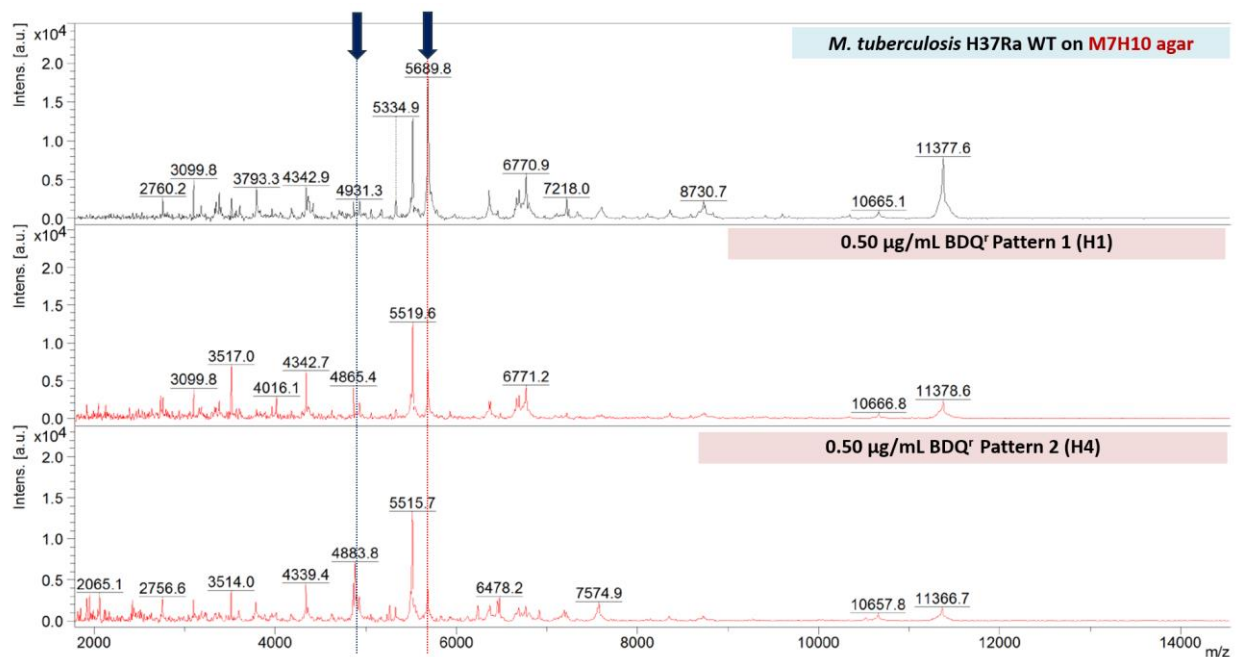
หมายเลขตัวอย่าง	สายพันธุ์	ความเข้มข้นของ BDQ ในอาหาร M7H10
1	H1	0.50 µg/mL BDQ mutant (BDQ ^R pattern 1)
2	H2	0.75 µg/mL BDQ mutant (BDQ ^R pattern 3)
3	H3	1.00 µg/mL BDQ mutant (BDQ ^R pattern 5)
4	H4	0.50 µg/mL BDQ Mutant (BDQ ^R pattern 2)
5	H5	0.75 µg/mL BDQ mutant (BDQ ^R pattern 4)
6	H6	1.00 µg/mL BDQ mutant (BDQ ^R pattern 6)

ผลการวิเคราะห์รูปแบบ protein mass spectrum ที่สัมพันธ์ต่อการดื้อยา BDQ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่าง H37Ra wild type

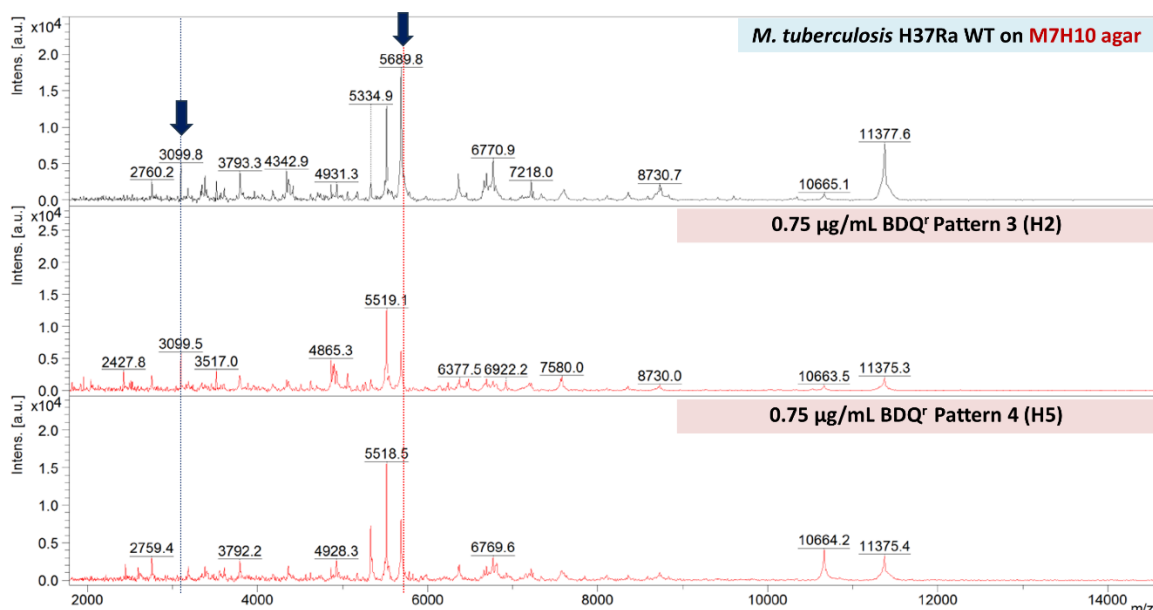
นำตัวอย่าง BDQ^R strains ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ได้มาผ่านกระบวนการสกัดโปรตีน โดยทำการสกัดตัวอย่าง H37Ra wild type เพื่อเปรียบเทียบลักษณะ PMS ด้วย MALDI-TOF MS พบลักษณะที่แตกต่างกันทั้งหมด 6 รูปแบบ (ภาพที่ 1-4) เชื้อจำนวน 2 สายพันธุ์ (H1 และ H4) ที่ขึ้นบน M7H10 ผสม BDQ ความเข้มข้น 0.50 µg/mL ทำการตรวจรูปแบบ PMS พบลักษณะความแตกต่างของ PMS ที่มีพีคเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่งช่วง m/z 4883-4885 และลดลงที่ตำแหน่งช่วง m/z 5687-5689 เมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra wild type (ภาพที่ 1) เชื้อจำนวน 2 สายพันธุ์ (H2 และ H5) ที่ขึ้นบน M7H10 ผสม BDQ ความเข้มข้น 0.75 µg/mL ทำการตรวจรูปแบบ PMS พบลักษณะความแตกต่างของ PMS ที่มีพีคลดลงที่ตำแหน่งช่วง m/z 3099 และ 5687-5689 เมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra wild type (ภาพที่ 2) และ เชื้อจำนวน 2 สายพันธุ์ (H3 และ H6) ที่ขึ้นบน M7H10 ผสม BDQ ความเข้มข้น 1.00 µg/mL ทำการตรวจรูปแบบ PMS พบลักษณะความแตกต่างของ PMS ที่มีพีคเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่งช่วง m/z 4931-4932 และลดลงที่ตำแหน่งช่วง m/z 5687-5689 เมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra wild type (ภาพที่ 3) เมื่อนำผล PMS ทั้งหมดที่ได้จัดเรียงลำดับ และจัดเรียงกลุ่ม พบว่าในทุกสายพันธุ์มีการตรวจพบ PMS พีคลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ตำแหน่งช่วง m/z 5688-5693 นอกจากนี้ยังพบ PMS รองที่มีความแตกต่างกับ wild type อย่างโดดเด่น โดยสายพันธุ์ H1 ตรวจพบ PMS ลดลงที่ช่วงตำแหน่ง m/z 2732-2733 และ 3099-3101 สายพันธุ์ H2 PMS พีคลดลงที่ช่วงตำแหน่ง m/z 4339-4342 เฉกเช่นเดียวกันกับสายพันธุ์ H3 ในขณะที่ H4 พบ PMS พีค ลดลงที่ช่วงตำแหน่ง m/z 3099-3101 คล้ายกับสายพันธุ์ H5 แต่กลับพบการลดลง PMS พีคที่ตำแหน่ง m/z 3514-3519 อย่างชัดเจน และมีการเพิ่มขึ้นของ PMS พีคที่ตำแหน่งช่วง m/z 5332-5334 และในสายพันธุ์ H6 พบการลดลง PMS พีคที่ตำแหน่ง m/z 4339-

4342 (ภาพที่ 4) การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วย MSP dendrogram แสดงเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถจำแนกออกจากกันได้เป็นอย่างดีชัดเจน โดยพบว่าสายพันธุ์เชื้อ H1 และ H5 มีความใกล้เคียงกันกับ MTB H37Ra wild type สายพันธุ์ H2 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ H6 ในขณะที่ H2 H3 H4 และ H6 มีความแตกต่างกับ MTB H37Ra wild type เป็นอย่างมาก สิ่งนี้จึงช่วยสนับสนุนได้ว่า MALDI-TOF MS สามารถทำการตรวจแยกลักษณะการดื้อยา BDQ ที่มีลักษณะต่างๆ ที่แตกต่างออกจากกันได้ (ภาพที่ 5)

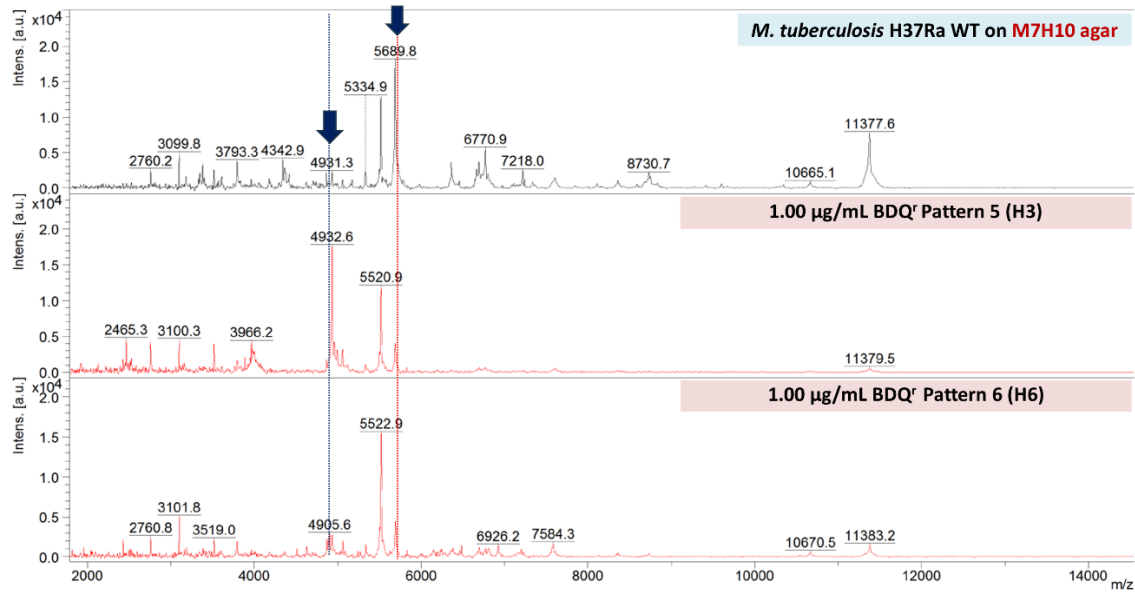
ภาพที่ 1 แสดงรูปแบบแมสสเปกตรัมแบบภาพรวมของ BDQ^r strains ที่ 0.50 µg/mL โดยตรวจพบลักษณะที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ (สายพันธุ์ H1 และ H4) ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra WT



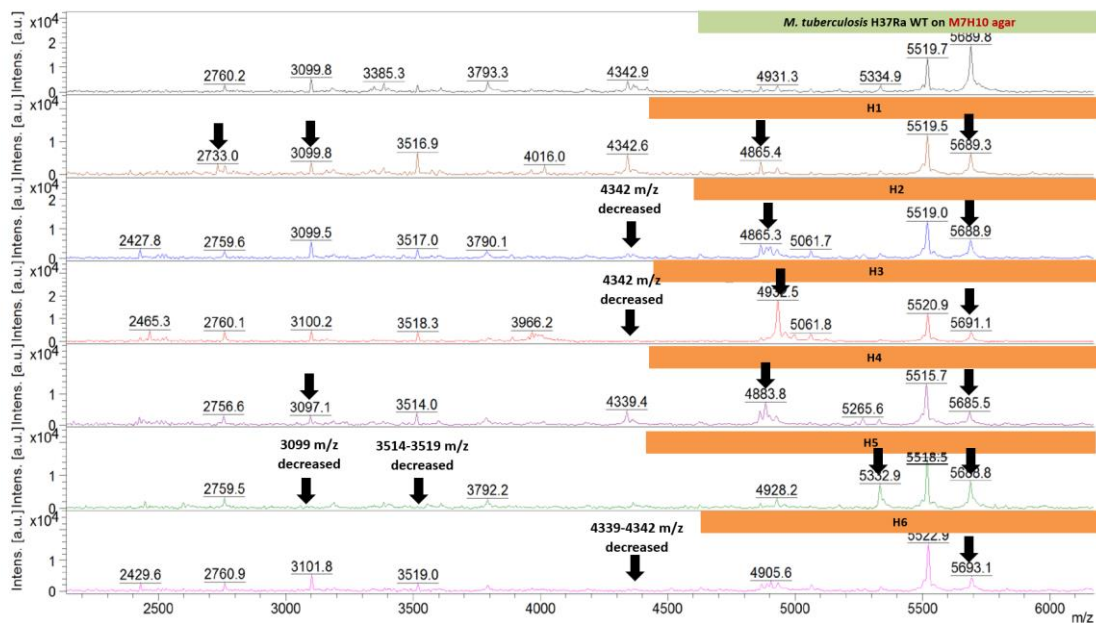
ภาพที่ 2 แสดงรูปแบบแมสสเปกตรัมแบบภาพรวมของ BDQ^r strains ที่ 0.75 µg/mL โดยตรวจพบลักษณะที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ (สายพันธุ์ H2 และ H5) ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra WT



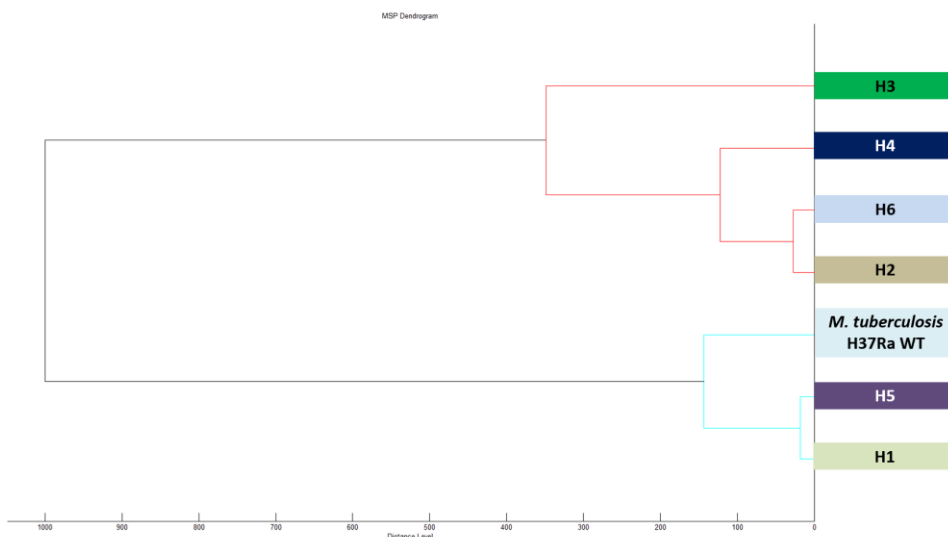
ภาพที่ 3 แสดงแมสสเปกตรัมแบบภาพรวมของ BDQ^r strains ที่ 1.00 µg/mL โดยตรวจพบลักษณะที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ (สายพันธุ์ H3 และ H6) ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra WT



ภาพที่ 4 แสดงแมสสเปกตรัมในขอบเขตช่วง m/z 2500 ถึง 6000 ของ BDQ^r strains (H1-6); ลูกศรสีดำชี้ไปที่แต่ละตำแหน่งแสดงถึงความแตกต่างของแมสสเปกตรัม ในตำแหน่งนั้นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra WT



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะ MALDI-TOF MS โดยอาศัย main spectrum profile (MSP) dendrogram ในการจำแนกความสัมพันธ์ของ BDQ^R strains ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยเรียงจากบนลงล่าง; เส้นสีแดงประกอบไปด้วยเชื้อสายพันธุ์ H3 H4 H6 และ H2; เส้นสีฟ้าประกอบไปด้วย MTB H37Ra WT (ตัวอย่างควบคุม) เชื้อสายพันธุ์ H5 และ H1 ตามลำดับ



วิจารณ์

Bedaquiline (BDQ) เป็นยารักษาวัณโรคขนานใหม่ในกลุ่ม A มีการประกาศใช้ในทางคลินิกเพื่อรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ MDR- และ XDR-TB เนื่องจากมีหลักฐานที่ให้ประสิทธิภาพและประสิทธิผลที่ดี⁽⁵⁾ BDQ มีกลไกยับยั้ง ATP synthase ที่ตำแหน่ง c-subunit ของเชื้อ MTB ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค^(7, 8, 35) หลังจากที่มีการประกาศใช้โดยองค์การอนามัยโลกได้ระยะหนึ่ง มีการพบอุบัติการณ์และรายงานการดื้อยาต่อ BDQ ในประเทศจีนและอินเดีย^(11, 12) ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการสร้างเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาต่อ BDQ โดยอาศัยกระบวนการ spontaneous mutation ในเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra โดยจากการศึกษาก่อนหน้าพบการทำ BDQ-spontaneous mutation ในเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv เท่านั้น^(33, 36) ไม่พบการศึกษาใดๆ ทำการทดสอบในตัวอย่าง MTB H37Ra

ในการสร้างเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ดื้อยาด้วยวิธีการ spontaneous mutation ได้เชื้อ BDQ-spontaneous mutants ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.125 µg/mL เนื่องจากเกณฑ์ของ WHO ที่กำหนดให้ค่า CC BDQ ต้องมากกว่า 0.25 µg/mL จึงจะถือว่าดื้อต่อ BDQ ดังนั้นจึงมีการบ่มยาที่ความเข้มข้นเดิมไปจนถึงความเข้มข้นในระดับสูง จนปรากฏผลลัพธ์ได้เชื้อสายพันธุ์ดื้อยาที่ความเข้มข้น 0.50, 0.75 และ 1.00 µg/mL ได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ เมื่อทำการวิเคราะห์ BDQ^R strains ด้วย MALDI-TOF MS พบว่าตำแหน่ง PMS หลักที่ *m/z* 5688–5693 มีการลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ PMS ของ H37Ra wild type ในขณะที่สายพันธุ์ H1 พบ PMS พิเศษที่มีความโดดเด่น มีการลดลงที่ช่วงตำแหน่ง *m/z* 2732 – 2733 และ 3099–3101 ตรงกันข้ามกับสายพันธุ์ H3 ที่พบ PMS เพิ่มขึ้นอย่างน่าสนใจที่ช่วงตำแหน่ง *m/z* 4931–4932 นอกจากนี้ สายพันธุ์ H5 ยังตรวจพบ PMS พิเศษเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง *m/z* 5332 เมื่อเปรียบเทียบกับ H37Ra wild type สอดคล้องกับผล MSP dendrogram ที่บ่งบอกว่าสายพันธุ์ H3 และ

H6 มีความแตกต่างกับ H37Ra WT เป็นอย่างมาก ดังนั้น การตรวจพบ PMS ที่มีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ อาจมีความเกี่ยวข้องต่อการดื้อยา BDQ และยีนดื้อยา ดังตัวอย่างการศึกษาของ Furniss และคณะที่ตรวจหาการดื้อยาต่อ colistin ใน *E. coli* โดยตรวจพบ PMS หลักที่เกี่ยวข้องกับ lipid A ใน *E. coli* ที่ตำแหน่ง m/z 1796.2 หากมีการดื้อยาชนิด chromosomal mutation เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น L-Ara4N หรือ pETN ส่งผลให้ตรวจ PMS พิกัดเพิ่มเติมได้ที่ตำแหน่ง m/z 1,927.2 และ 1,919.2 ตามลำดับ⁽²²⁾ สอดคล้องกับการศึกษาความไวต่อ fluconazole ใน *Candida albicans* ซึ่งตรวจพบ PMS มีการเปลี่ยนแปลงในสายพันธุ์ที่ไวต่อยา (susceptible) ไวปานกลาง (intermediate) และดื้อ (resistant) ต่อยา fluconazole ที่ตำแหน่ง m/z 3376–3382 โดยมีความสอดคล้องต่อยีน *CDR1* และ *CDR2*⁽²³⁾ อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาใดตรวจสอบลักษณะ PMS ที่บ่งชี้การดื้อยาต่อ BDQ โดยตรงจากแนวโน้มนการศึกษาต่าง ๆ ประกอบกับการวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาสำรองเพื่อยืนยันเบื้องต้นว่า MALDI-TOF MS สามารถนำมาประยุกต์ใช้ดูลักษณะการดื้อยา BDQ ในเชื้อวัณโรคได้จริง สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อที่ดื้อต่อยา BDQ และไวต่อยา BDQ ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และมีประเด็นที่น่าสนใจที่ควรจะศึกษาต่อไปในส่วนของยีนดื้อยา BDQ มีความสัมพันธ์ หรือสอดคล้องต่อ PMS ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีการรายงานถึงยีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องต่อ BDQ เช่น *atpE*, *mmpR* (*Rv0678*), *Rv1979c*, *pepQ*, *mmpL5*, *atpB* และ *ppsC*⁽³⁷⁾ การเปลี่ยนแปลงของ PMS สายพันธุ์ต่างๆ จากงานวิจัยนี้อาจจะมีความเกี่ยวข้องต่อยีนดื้อยาข้างต้นที่อาจปรากฏลักษณะ PMS เฉพาะที่แตกต่างกัน

ข้อจำกัดในการวิจัยครั้งนี้ คือ ไม่มีการใช้เชื้อวัณโรคที่เพาะแยกจากทางคลินิก (TB clinical isolates) ร่วมด้วย เนื่องจากเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษายาววัณโรคชานใหม่ BDQ ที่เปรียบเทียบกับ wild type และ mutant strains ของเชื้อ MTB H37Ra ไม่พบการศึกษาทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ มีเพียงการศึกษาที่ใกล้เคียงที่ทำการวิจัย spontaneous mutation ต่อ BDQ ใน H37Rv⁽³³⁾ นอกจากนี้ MALDI-TOF MS เป็นการทดสอบรูปแบบเชิงคุณภาพ (qualitative method) ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณของโปรตีนที่ชี้เฉพาะได้อย่างชัดเจน ผลที่ได้เกิดจากรูปแบบ PMS ที่มีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อดื้อยาและไวต่อยา BDQ ไม่สามารถระบุตำแหน่งและชนิดของยีนที่กลายพันธุ์ของเชื้อดื้อยาที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งควรทำการศึกษานิดของโปรตีนและชนิดของยีนที่กลายพันธุ์ของเชื้อดื้อยา BDQ ในงานวิจัยต่อไป

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

เทคนิค MALDI-TOF MS สามารถวิเคราะห์ลักษณะแมสสเปกตรัมและจำแนกรูปแบบเชื้อที่ไวและดื้อต่อ BDQ ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra ออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังไม่ได้พิสูจน์ในระดับยีน หรือตัวอย่างเชื้อที่ดื้อต่อ BDQ จากผู้ป่วยจริง ดังนั้นควรนำรูปแบบผลการดื้อยาต่อ BDQ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ไปวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อ BDQ ในผู้ป่วย และศึกษาควบคู่ไปกับชนิดของยีนที่กลายพันธุ์ เพื่อให้มั่นใจว่า รูปแบบแมสสเปกตรัมในการศึกษานี้สามารถช่วยตรวจคัดกรองเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา BDQ เบื้องต้นได้ ซึ่งจะทำให้การรายงานผลต่อแพทย์หรือผู้ที่เกี่ยวข้องได้อย่างรวดเร็ว เพื่อลดความเสี่ยงในการดำเนินโรคที่รุนแรงจากการตรวจพบการดื้อยาที่ล่าช้า และเพื่อป้องกันการแพร่กระจายวัณโรคดื้อยาต่อ BDQ ที่อาจเกิดขึ้นได้ในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช., รหัสทุน P22-50487) สำหรับทุนผลิตบัณฑิตวิจัยคุณภาพสูง ระดับปริญญาโท ปี พ.ศ. 2562 และสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส., รหัสทุน HSRI 65-061) ปี พ.ศ. 2566 และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และงานจุลชีววิทยา โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติที่ อบรมวิธีการใช้งานเครื่องมือ สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2023.
2. Division of Tuberculosis Department of Disease Control MoPH. National Tuberculosis Control Programme Guideline, Thailand. 2023.
3. Division of Tuberculosis Department of Disease Control MoPH. Clinical Practice Guideline Tuberculosis Preventive Treatment. 2023.
4. Pedersen OS, Holmgard FB, Mikkelsen MKD, Lange C, Sotgiu G, Lillebaek T, et al. Global treatment outcomes of extensively drug-resistant tuberculosis in adults: A systematic review and meta-analysis. J Infect. 2023;87(3):177–89.
5. WHO. WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 4 : Treatment Drug-resistant tuberculosis treatment. 2020.
6. Huerga H, Khan U, Bastard M, Mitnick CD, Lachenal N, Khan PY, et al. Safety and Effectiveness Outcomes From a 14 – Country Cohort of Patients With Multi-Drug Resistant Tuberculosis Treated Concomitantly With Bedaquiline, Delamanid, and Other Second-Line Drugs. Clin Infect Dis. 2022;75(8):1307–14.
7. Lohrasbi V, Talebi M, Bialvaei AZ, Fattorini L, Drancourt M, Heidary M, et al. Trends in the discovery of new drugs for Mycobacterium tuberculosis therapy with a glance at resistance. Tuberculosis. 2018;109:17–27.
8. Kundu S, Biukovic G, Grüber G, Dick T. Bedaquiline targets the ϵ subunit of mycobacterial F-ATP synthase. Antimicrob Agents Chemother .2016;60(11):6977–9.
9. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: treatment – drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update. Geneva: World Health Organization. 2022.
10. Vanino E, Granozzi B, Akkerman OW, Munoz-Torrico M, Palmieri F, Seaworth B, et al. Update of drug-resistant tuberculosis treatment guidelines: A turning point. Int J Infect Dis. 2023;130 Suppl 1:S12–s5.
11. Hoffmann H, Kohl TA, Hofmann-Thiel S, Merker M, Beckert P, Jatón K, et al. Delamanid and Bedaquiline Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Ancestral Beijing Genotype Causing

Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in a Tibetan Refugee. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):337–40.

12. Tadolini M, Lingsang RD, Tiberi S, Enwerem M, D'Ambrosio L, Sadutshang TD, et al. First case of extensively drug-resistant tuberculosis treated with both delamanid and bedaquiline. *Eur Respir J*. 2016;48(3):935–8.

13. Millard J, Rimmer S, Nimmo C, O'Donnell M. Therapeutic Failure and Acquired Bedaquiline and Delamanid Resistance in Treatment of Drug-Resistant TB. *Emerg Infect Dis*. 2023;29(5):1081–4.

14. Hu Y, Fan J, Zhu D, Liu W, Li F, Li T, et al. Investigation of bedaquiline resistance and genetic mutations in multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Chongqing, China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2023;22(1):19.

15. Zheng H, He W, Jiao W, Xia H, Sun L, Wang S, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant tuberculosis against levofloxacin, moxifloxacin, bedaquiline, linezolid, clofazimine, and delamanid in southwest of China. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):330.

16. Radomski N, Roguet A, Lucas FS, Veyrier FJ, Cambau E, Accrombessi H, et al. *atpE* gene as a new useful specific molecular target to quantify *Mycobacterium* in environmental samples. *BMC Microbiol*. 2013;13:277.

17. Petrella S, Cambau E, Chauffour A, Andries K, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2853–6.

18. Sonnenkalb L, Carter JJ, Spitaleri A, Iqbal Z, Hunt M, Malone KM, et al. Bedaquiline and clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: an in-vitro and in-silico data analysis. *Lancet Microbe*. 2023;4(5):e358–e68.

19. Degiacomi G, Sammartino JC, Sinigiani V, Marra P, Urbani A, Pasca MR. In vitro Study of Bedaquiline Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Multi-Drug Resistant Clinical Isolates. *Front Microbiol*. 2020 ;11:559469.

20. Setyawan MF, Mertaniasih NM, Soedarsono S, Nuha Z, Maladan Y, Matsumoto S. *Mycobacterium tuberculosis* – *atpE* Gene Profile of Bedaquiline-Treated Pulmonary Tuberculosis Patients at the Referral Hospital Dr. Soetomo, Indonesia. *Int J Mycobacteriol*. 2023;12(2).

21. Almeida D, Ioerger T, Tyagi S, Li SY, Mdluli K, Andries K, et al. Mutations in *pepQ* Confer Low-Level Resistance to Bedaquiline and Clofazimine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(8):4590–9.

22. Furniss RCD, Dortet L, Bolland W, Drews O, Sparbier K, Bonnin RA, et al. Detection of Colistin Resistance in *Escherichia coli* by Use of the MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometry System. *J Clin Microbiol*. 2019;57(12).

23. Maenchantrarath C, Khumdee P, Samosornsuk S, Mungkornkaew N, Samosornsuk W. Investigation of fluconazole susceptibility to *Candida albicans* by MALDI-TOF MS and real-time PCR for CDR1, CDR2, MDR1 and ERG11. BMC Microbiol. 2022;22(1):153.
24. Ceyssens PJ, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Combined Species Identification and Drug Sensitivity Testing in Mycobacteria. J Clin Microbiol. 2017;55(2):624–34.
25. Wu X, Tan G, Yang J, Guo Y, Huang C, Sha W, et al. Prediction of Mycobacterium tuberculosis drug resistance by nucleotide MALDI-TOF-MS. Int J Infect Dis. 2022;121:47–54.
26. American Type Culture Collection. *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann: ATCC; 2021 [Available from: <https://www.era-env.com/ERAWcfService/getmsdscontent.svc/msds?key=IXI%2bZI8Ywfg%3d&value=5e08Pj7RW28%3d>].
27. Xu Y, Wang G, Xu M. Biohazard levels and biosafety protection for *Mycobacterium tuberculosis* strains with different virulence. Biosafety and Health. 2020;02(03):135–41.
28. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, et al. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. PLoS One. 2008;3(6):e2375.
29. Feng S, Liang L, Shen C, Lin D, Li J, Lyu L, et al. A CRISPR-guided mutagenic DNA polymerase strategy for the detection of antibiotic-resistant mutations in *M. tuberculosis*. Mol Ther Nucleic Acids. 2022;29:354–67.
30. Patil SM, Barji DS, Chavan T, Patel K, Collazo AJ, Prithipaul V, et al. Solubility Enhancement and Inhalation Delivery of Cyclodextrin-Based Inclusion Complex of Delamanid for Pulmonary Tuberculosis Treatment. AAPS Pharm Sci Tech. 2023;24(1):49.
31. Priyadarshini N, Veeramani A, Chinnathambi P, Palanichamy A, Al-Dosary MA, Ali MA, et al. Antimycobacterial effect of plant derived phthalate against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Physiol Mol Plant Pathol. 2022;117:101761.
32. WHO. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018. Report No.: 9789241514842.
33. Ismail N, Omar SV, Ismail NA, Peters RPH. In vitro approaches for generation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants resistant to bedaquiline, clofazimine or linezolid and identification of associated genetic variants. J Microbiol Methods. 2018;153:1–9.
34. Komolsiri S, Juprasertporn K, Khattiyawech C, Samosornsuk S, Samosornsuk W. Comparison of protein extraction methods for *Mycobacterium tuberculosis* detection by MALDI-TOF Mass Spectrometry. JDPC3. 2024;18(1):86–98.
35. Sarathy JP, Gruber G, Dick T. Re-Understanding the Mechanisms of Action of the Anti-Mycobacterial Drug Bedaquiline. Antibiotics (Basel). 2019;8(4).

36. Sonnenkalb L, Carter J, Spitaleri A, Iqbal Z, Hunt M, Malone K, et al. Deciphering Bedaquiline and Clofazimine Resistance in Tuberculosis: An Evolutionary Medicine Approach. *bioRxiv*. 2021:2021.03.19.436148.
37. Nieto Ramirez L, Vargas K, Diaz G. Whole Genome Sequencing for the Analysis of Drug Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review for Bedaquiline and Delamanid. *Antibiotics*. 2020;9:133.