

结核分枝杆菌对吡嗪酰胺耐药的检测方法研究与进展

胡严杰 黄海荣

【摘要】 吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA)是重要的一线抗结核药物之一,对细胞内的结核分枝杆菌具有独特的杀菌作用,因此成为结核病短程化疗的基石。同时,鉴于目前治疗耐多药结核病新药的缺乏,WHO 建议全程使用 PZA 治疗耐多药结核病。结核分枝杆菌对 PZA 耐药的相关基因 *pncA* 及其启动子区的突变位置分散且类型繁多,使一般的分子学诊断方法不易进行操作与检测。作者对现有的 PZA 耐药性检测方法的原理及新检测方法的研究进行综述与展望。

【关键词】 吡嗪酰胺; 分枝杆菌, 结核; 微生物敏感性试验; 表型; 基因型; 实验室技术和方法; 综述

Progress of pyrazinamide-resistance *Mycobacterium tuberculosis* detection HU Yan-jie, HUANG Hai-rong, National Tuberculosis Clinical Laboratory, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China

Corresponding author: HUANG hai-rong, Email: huanghairong@tb123.org

【Abstract】 Pyrazinamide (PZA) is one of the most potent anti-tuberculosis (TB) drugs which has unique bactericidal activity within cells, therefore, it is the core of short-course chemotherapy for TB. Recently, WHO suggested using PZA through out the treatment course of multiple drug-resistant TB because of lack of new drugs. As location of the mutation in the promoter is scattered and the types are various, *pncA* gene, which is related with PZA-resistant, is difficult to be detected using the general molecular test. In this article, the advancement of PZA-resistance TB detection will be reviewed.

【Key words】 Pyrazinamide; *Mycobacterium tuberculosis*; Microbial sensitivity tests; Phenotype; Genotyp; Laboratory techniques and procedures; Review

2015 年全球新增结核病患者约 960 万例,其中 3.3% 的初治患者和 20% 的复治患者为耐多药结核病患者^[1]。吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA)可杀死处于半休眠期的结核分枝杆菌,从而将治疗周期从 9~12 个月缩短至 6 个月,因而成为结核病短程化疗的基石^[2-3]。近年来有研究表明,使用 PZA 治疗的原发耐多药结核患者的预后优于未使用的患者^[4],因此,世界卫生组织(WHO)建议使用 PZA 应贯穿耐多药结核患者的整个疗程。然而,由于对 PZA 的药物敏感性试验(简称“药敏试验”)需要特殊的酸性环境,使得其不易操作且结果可重复性差,因此对 PZA 的药物敏感性检测并未常规纳入日常的药敏试验^[5]。由于临床对 PZA 药敏试验的需求,可靠的方法一直处于寻求、探索过程中,笔者将分别对 PZA 耐药的表型检测方法和分子检测方法的检测原理、特点进行综述。

表型药敏试验方法

PZA 是一种烟酰胺类似物,被转运到巨噬细胞内后在吡嗪酰胺酶(pyrazinamidase, PZase)的作用下生成吡嗪酸(pyrazinoic acid, POA)进而发挥抗结核作用^[1]。POA 在中性条件下以 POA^- 的形式存在,一部分 POA^- 通过外排作用转运到细胞外,在酸性环境下, POA^- 被还原成不带电荷的 POA 分子。由于 POA 的动态平衡,不带电荷的分子再次被转运到结核分枝杆菌胞内,进入时带入一个质子,经过大量累积后结核分枝杆菌的细胞质酸化,从而导致细菌死亡^[-6-8]。表型药敏试验方法是将结核分枝杆菌与药物共同孵育一段时间后,通过直接或间接观察细菌的存活状态,判断细菌是否耐受 PZA。

一、根据菌量检测的方法

1. BACTEC MGIT 960 液体培养基法:是 WHO 推荐的一种液体培养检测 MTB 对 PZA 是否敏感的方法,是目前应用最为广泛的 PZA 耐药性检测方法^[9]。其原理是应用 BACTEC MGIT 960 分枝杆菌培养系统比较一定周期内含药培养管和对照管是否因耗氧量不同而激发产生不同强度的荧光,从而推测含药培养管中的菌量占对照培养管菌量的比例,并由此判断细菌是否耐受 PZA。此方法中 PZA 的终

浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$, 液体培养基的 pH 值设定为 6.0^[10], 21 d 后可得到检测结果, 是目前认可度较高的 PZA 药敏试验方法。欧洲的一项研究以 BACTEC 460 为参照标准, 应用 MGIT 960 系统进行的 PZA 药敏试验结果与其一致率达到 98.3%^[10]。

2. VersaTREK-ESP System II 的 PZA 药敏试验法: 其原理是将 VersaTREK 全自动微生物探测系统 (VTI) 及 ESP® 培养系统 II (ESP) 配合使用, 通过连续监测 (24 min/次, 若无阳性信号出现, 最多检测 12 d) 培养瓶顶空中氧气的消耗率检测分枝杆菌的生长, 并通过阳性信号报告生长响应。在生长对照瓶检测报阳后 3 d 内含药生长瓶也报阳则为耐药, 反之则为敏感。此方法同样需要酸性环境, PZA 终浓度为 300 $\mu\text{g/ml}$, 但仅需 14 d 即可得到结果。该方法检测结果文献报道显示, 以 BACTEC 460 为金标准, 该方法的敏感度为 88.0%, 特异度为 92.3%^[11]。Espasa 等^[11]的一项以 BACTEC MGIT 960 为对照的研究中, 显示其敏感度和特异度分别为 97.0% 和 100.0%。

以上两种方法均需要昂贵的设备和试剂, 影响了其在临床上的全面推广, 而且越来越多的报道认为此类药敏试验的可重复性不够理想, 原因可能有以下几种因素: (1) 酸性环境不利于结核分枝杆菌的生长^[12]; (2) 接种量依靠比浊法稀释细菌确定, 肉眼观察误差较大, 易出现假阳性^[13]; (3) PZA 对不同生长状态的结核分枝杆菌的杀伤力不相同^[14]。

二、PZase 活性检测法

1. 韦恩法 (Wayne 法): 在 PZase 催化下 PZA 转化为具有还原性的 POA, 而转运到细菌膜外的 POA 分子可与硫酸亚铁氨发生反应生成红色的硫酸亚铁。将结核分枝杆菌接种到含有 PZA 的固体培养基上, 4 d 后向培养基上滴加硫酸亚铁铵, 通过观察培养基颜色变化可以推测是否有 POA 生成, 从而判断 PZase 是否具有活性。PZase 有活性表明细菌对 PZA 敏感, 否则判定为耐药。Cui 等^[10]的一项研究表明, 以 MGIT 960 系统进行的 PZA 药敏试验作为对照, Wayne 法的敏感度为 88.2%, 特异度为 98.5%。该方法操作简单, 特异度较高且检测周期短, 但其敏感度较低, 操作需要菌量较大, 可重复性较差, 因此没有得到广泛认可^[15-16]。

2. 底物类似物显色法: 烟酰胺是 PZA 类似物, 其也能在 PZase 的作用下转化成活性状态, 且该转化无需酸性环境, 因此有学者尝试用烟酰胺替代 PZA 作为底物检测结核分枝杆菌的 PZase 活性^[17]。本方法的基本原理与 Wayne 法相似, 但结果判定采用结核分枝杆菌液体药敏试验常用的比色法。常见的比色法包括: 刃天青微量滴定分析法 (resazurin-microtiter assay, REMA)、硝酸盐还原法 (nitrate reductase assay, NRA) 和噻唑蓝比色法 (MTT 法)。Cui 等^[10]的一项研究结果显示, 以 MGIT 960 法为标准, MTT 法的敏感度为 97.0%, 特异度为 99.6%。而泰国的一项研究结果显示, 以 MGIT 960 法作为对照, MTT 的敏感度仅为 88.0%, 特异度为 78.0%^[18]。比色法操作简便, 不需要特殊仪器, 结果易于判定, 成本低, 且能在 10~14 d 得到药敏试验结果。该方法

利用烟酰胺替代 PZA, 解决了检测 pH 值和结核分枝杆菌生长所需 pH 值矛盾的问题; 但该方法缺乏标准化, 因此尚无推广^[10,17]。

耐药基因突变检测技术

PZase 是由 MTB 的 *pncA* 基因编码的蛋白, 研究表明 *pncA* 基因及其启动子区序列的突变是造成 PZase 活性降低或缺失的主要原因^[19], 也是对 PZA 产生耐药的主要原因。

pncA 基因全长 561 bp, 基因及其启动子序列的突变形式包括点突变、插入和缺失, 可能发生突变的碱基几乎覆盖了整个基因, 因此不便于应用常用的基于探针杂交的分子检测技术, 诸如分子信标法、TaqMan 探针法等。同时, 有报道认为 *pncA* 基因突变不一定造成 PZA 耐药, 如 Ramirez-Busby 等^[20]的 Meta 分析发现 83% 的 *pncA* 基因突变会造成对 PZA 耐药, 而 17% 的 *pncA* 基因突变不会造成耐药。这一因素大大削弱了通过检测 *pncA* 基因及其启动子区的序列差异来诊断结核分枝杆菌对 PZA 耐药的價值。不过, 鉴于作为对照方法的结核分枝杆菌 PZA 耐药表型药敏试验方法存在不可靠的问题, 分子检测技术的真实价值仍有待更多的评估, 而鉴于其耗时短的优势, 因此这一领域仍然激发了很多研究兴趣。

1. DNA 序列测定技术: DNA 测序技术是一种分析特定 DNA 序列碱基排列的技术, 可以对 DNA 的突变进行定位和鉴定研究。2011 年的一篇综述分析显示, 以 MGIT 960 法作为对照, DNA 测序技术诊断结核分枝杆菌对 PZA 耐药的敏感度和特异度分别为 90.0% 和 94.0%; 以 BACTEC 460 法为标准时, DNA 测序技术的敏感度和特异度分别为 87.0% 和 95.0%; 以 MGIT 960 法作为对照时, DNA 测序技术的敏感度和特异度分别为 85.0% 和 88.0%^[21]。DNA 测序技术是突变检测的“金标准”, 随着该技术自动化程度的提高及成本的降低, DNA 测序技术将成为未来基因检测的常规手段。

2. Surveyor 酶酶切法: Surveyor 酶是植物中提取的核酸内切酶, 它与普通内切酶不同之处在于其可特异性切割 DNA 错配部位, 这种切割对核苷酸序列无特殊要求, 不需要知晓 *pncA* 突变的具体位置和类型^[22]。该方法先将野生型 *pncA* 基因的 PCR 产物和待测样品的 *pncA* 基因的 PCR 产物混合, 在变性和复性过程中, 形成同源或异源双链, 在 Surveyor 酶作用后电泳, 如果待测样品没有突变、插入和缺失位点, 则 Surveyor 酶不能发挥作用, 电泳图谱上仅有单个条带; 如果待测样品含有突变、插入和缺失位点, 则形成一条异源双链和一条同源双链, 此时 Surveyor 酶发挥作用, 将异源双链切断, 此时电泳图谱上有 3 条或者更多条带^[22]。有一项研究采用该方法分析了 10 株临床分离株对 PZA 的耐药性, 仅有 1 株与 PZase 活性检测结果不一致^[23]。采用 Surveyor 酶酶切法操作简单, 无需特殊仪器, 具有推广价值。该技术已经应用在其他疾病的基因突变检测, 但在结核病检测方面应用较少。

3. 高分辨率熔解曲线 (high resolution melt, HRM): HRM 是新近发展起来的建立在实时荧光定量 PCR 基础上的突变检测技术。HRM 将野生型样品和待测样品加到同一样本管中进行 PCR 后杂交形成同源或异源双链, 利用饱和和荧光染料能与双链 DNA 进行特异性结合, 利用同源双链和异源双链的熔解温度不同、荧光染料脱落的温度也不相同来区分野生型和突变型。该方法通过设计交叉引物覆盖 *pncA* 及其启动子序列, 通过多管检测即可分析出 *pncA* 及其启动子序列的基因型, 不需要知道突变的碱基位点和突变类型。有研究者用 HRM 技术分析了 127 株临床分离株, 并与 BACTEC MGIT 960 药敏试验结果对比, 其敏感度为 85.5%, 特异度为 98.5%^[24]。HRM 法是闭管检测, 从而避免了污染造成的假阳性。目前, HRM 技术已经在结核病耐药分子诊断领域得到应用, 未来此项技术也有希望用于结核分枝杆菌对 PZA 耐药的分子检测。

4. 微阵列技术: 微阵列片技术采用原位合成或微量点样等方法, 将已知序列的 DNA 片段固定在支持物表面, 然后采用含有特异性标记的样品分子进行杂交, 通过检测特异性信号强度来获取样品的序列信息。有研究者设计了 79 种特异性探针序列检测结核分枝杆菌对 PZA 耐药的 *pncA* 基因, 其结果与测序一致^[25]。这说明该方法具有很高的敏感度和特异度, 可快速识别设定的突变位点, 但微阵列技术需要大量探针, 且杂交过程操作复杂, 因此易于发生污染。未来自动化技术的发展可能有助于解决这些问题, 但是此技术需要昂贵的仪器设备, 极大地限制了该技术的临床应用。

问题和展望

虽然临床目前对 PZA 进行药敏试验的检测技术很多, 但现有技术都存在不同程度的缺陷。对 PZA 进行表型药敏试验的难点在于液体培养技术需要 pH=5.5~6.0 的条件, 而结核分枝杆菌的生长需要中性环境, 从而可能导致假阳性结果的出现; 比色法和产物显色法均不能区分 PZase 的活性高低, 容易导致假阴性结果出现; 基因突变检测技术需要首先建立结核分枝杆菌对 PZA 耐药与基因突变间良好的一致性关系。目前, PZA 的杀菌机制还未完全阐明, 相信随着对其杀菌机制和耐药机制研究的不断深入, 同时随着分子生物学技术的不断发展, 未来一定能够建立可靠而实用的 PZA 药敏试验的检测方法。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report of 2015. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [2] Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. Tubercle, 1985, 66(3): 219-225.
- [3] Grosset J. Mechanisms of action of antituberculosis drugs in standard and short-course chemotherapy regimens. Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol Pneumoftiziol, 1985, 34(2): 108-115.
- [4] Falzon D, Jaramillo E, Schünemann HJ, et al. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis; 2011 update. Eur Respir J, 2011, 38(3): 516-528.
- [5] Hoffner S, Angeby K, Sturegård E, et al. Proficiency of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide: the Swedish experience. Int J Tuberc Lung Dis, 2013, 17(11): 1486-1490.
- [6] Konno K, Feldmann FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis, 1967, 95(3): 461-469.
- [7] Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(1): 6-21.
- [8] Corrêa MF, Fernandes JP. Pyrazinamide and Pyrazinoic Acid Derivatives Directed to Mycobacterial Enzymes Against Tuberculosis. Curr Protein Pept Sci, 2016, 17(3): 213-219.
- [9] World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. 4th ed. WHO/HTM/TB/2009. 422. Geneva: World Health Organization, 2009.
- [10] Cui Z, Wang J, Lu J, et al. Evaluation of methods for testing the susceptibility of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide. J Clin Microbiol, 2013, 51(5): 1374-1380.
- [11] Espasa M, Salvadó M, Vicente E, et al. Evaluation of the VerSaTREK system compared to the Bactec MGIT 960 system for first-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 488-491.
- [12] Pfyffer GE, Palicova F, Rüsch-Gerdes S. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. J Clin Microbiol, 2002, 40(5): 1670-1674.
- [13] Piersimoni C, Mustazzolu A, Giannoni F, et al. Prevention of false resistance results obtained in testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the Bactec MGIT 960 system using a reduced inoculum. J Clin Microbiol, 2013, 51(1): 291-294.
- [14] Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J Med Microbiol, 2002, 51(1): 42-49.
- [15] Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis, 1974, 109(1): 147-151.
- [16] Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, et al. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(9): 2291-2295.
- [17] Martin A, Takiff H, Vandamme P, et al. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(2): 327-331.
- [18] Foongladda S, Klayut W, Pholwat S, et al. Comparison and development of pyrazinamide susceptibility testing methods for tuberculosis in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 83(3): 270-273.
- [19] Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med, 1996, 2(6): 662-667.
- [20] Ramirez-Busby SM, Valafar F. Systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9): 5267-5277.
- [21] Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(10): 4499-4505.
- [22] 石瑞如, 杜长梅. 特异性核酸内切酶检测结核分枝杆菌的乙胺丁醇耐药基因突变. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10): 702-704.
- [23] Shi R, Otomo K, Yamada H, et al. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene

mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes Infect*, 2006, 8(1): 128-135.

- [24] 洪创跃, 王峰, 刘小立. 高分辨率熔解曲线技术快速筛查结核分枝杆菌 *pncA* 基因突变. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(3): 198-201.
- [25] Denkin S, Volokhov D, Chizhikov V, et al. Microarray-based

pncA genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*, 2005, 54 (Pt 12): 1127-1131.

(收稿日期: 2016-07-05)

(本文编辑: 王然 李敬文)

· 简讯 ·

脊柱感染性疾病诊治新进展学习班在和田市成功举办

2016 年 8 月 5—7 日, 由新疆维吾尔自治区胸科医院, 新疆维吾尔自治区结核病防治研究所主办的 2016 年度国家级继续医学教育项目“脊柱感染性疾病诊治新进展学习班”在新疆维吾尔自治区和田市召开。出席本次会议的领导和嘉宾有新疆维吾尔自治区胸科医院党委书记玉山·斯德克, 《中国防痨杂志》和《结核病与肺部健康杂志》常务副主编、编辑部主任薛爱华编审, 中国康复医学会脊柱结核病学组主任委员、《中国脊柱脊髓杂志》副主编、宁夏医科大学总医院脊柱外科主任医师、博士研究生导师王自立教授, 中国防痨协会结核病临床专业分会骨关节结核学组组长、《中国防痨杂志》副主编、首都医科大学附属北京胸科医院骨科主任秦世炳教授, 《中国防痨杂志》编辑部李敬文副主任, 中国防痨协会结核病临床专业分会骨关节结核学组委员、中华医学会结核病分会骨关节结核学组委员、新疆维吾尔自治区胸科医院骨科主任地里下提·阿不力孜等。共有来自新疆医科大学第一附属医院脊柱外科、关节外科, 新疆医科大学第六附属医院脊柱外科, 新疆维吾尔自治区胸科医院结核科、急诊 ICU, 乌鲁木齐市友谊医院, 和田地区人民医院, 以及和田地区其他相关医院骨科及相关科室的专家和代表 70 余人参加本次会议。

大会开幕式由地里下提·阿不力孜主任主持。新疆维吾尔自治区胸科医院党委书记玉山·斯德克致开幕辞。他在致辞中首先向各位专家、嘉宾及代表的参会表示欢迎和感

谢, 并简要介绍了新疆维吾尔自治区胸科医院近年来开展的主要工作, 以及所取得的成果。王自立教授在致辞中对新疆维吾尔自治区胸科医院所组织的本次专题学术活动表示了肯定, 并预祝会议取得圆满成功。

学术讲座阶段, 王自立、秦世炳、地里下提·阿不力孜、阿斯卡尔江·买买提依明、买尔旦·买买提、马原等教授围绕着胸腰椎结核脊柱稳定性重建手术方法的选择、耐药骨关节结核的诊断与治疗进展、复杂脊柱结核手术治疗、关节结核的手术治疗进展、骨关节结核鉴别诊断等五大主题进行了精彩的报告。同时, 《中国防痨杂志》和《结核病与肺部健康杂志》常务副主编、编辑部主任薛爱华编审与参会代表分享了论文写作知识, 并传递了学术期刊的经营理念。学术报告中间穿插病例讨论环节, 新疆维吾尔自治区胸科医院提供了 2 份疑难病例与参会代表共同讨论。各位与会专家针对相关病例的诊断、药物治疗、手术时机、手术方式、术后随访等问题展开讨论。代表踊跃发言, 各抒己见, 互动氛围浓厚。

学术报告与病例讨论后, 大会主席地里下提·阿不力孜主任主持了闭幕式。秦世炳教授对本次会议进行了总结, 指出本次会议专家报告内容涉及面广, 实用性强, 临床病例讨论热烈, 达到了会议预期目的, 对参加本次会议的专家及代表表示感谢, 更加感谢会务组的辛勤筹备。至此, 会议胜利闭幕。