



## 结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药性检测方法的研究进展

丘厦霞<sup>#</sup>, 张晓宇<sup>#</sup>, 李慧玲, 许鸿文, 李恒<sup>\*</sup>

潍坊医学院医学检验学院, 山东 潍坊 261053

丘厦霞, 张晓宇, 李慧玲, 许鸿文, 李恒. 结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药性检测方法的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(5): 1587–1599.

Qiu Xiaxia, Zhang Xiaoyu, Li Huiling, Xu Hongwen, Li Heng. Testing of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1587–1599.

**摘要:** 吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA)是重要的一线抗结核药物, 与异烟肼、利福平和乙胺丁醇构成治疗方案的核心。因其疗效较好, 被广泛应用于结核病的治疗过程。然而, 近年来随着耐多药结核病的出现, PZA 耐药导致部分患者治疗失败, 因此常规开展 PZA 药物敏感性试验对于减少耐药性的发生显得极为重要。由于 PZA 在酸性条件下才能发挥作用, 而结核分枝杆菌在酸性环境下生长不良, 故 PZA 耐药性检测一直是临床中的难题。本文结合国内外最新研究进展, 就结核分枝杆菌 PZA 耐药性检测方法的研究进行阐述, 期望能为更有效地诊治结核病提供新思路。

**关键词:** 结核分枝杆菌; 吡嗪酰胺; 耐药性; *pncA* 基因; 药物敏感性试验

**基金项目:** 国家自然科学基金(81902170); 国家级大学生创新创业训练项目(202110438019); 潍坊医学院公派国内访学项目

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81902170), by the National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (202110438019) and by the Weifang Medical University Sponsored Visiting Scholar Research Program

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: leehome1985@163.com

Received: 27 September 2021; Revised: 20 January 2022; Published online: 5 March 2022

# Testing of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide

QIU Xiaxia<sup>#</sup>, ZHANG Xiaoyu<sup>#</sup>, LI Huiling, XU Hongwen, LI Heng<sup>\*</sup>

School of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China

**Abstract:** Pyrazinamide (PZA) is an indispensable first-line drug for the treatment of tuberculosis. It plays a key role in shortening the course of the treatment from 9–12 months to 6 months. The antibiotics rifampicin (R), isoniazid (H), ethambutol (E), and PZA (Z) form the core control regimen for the drug-sensitive *Mycobacterium tuberculosis*. However, PZA resistance has led to treatment failure in many patients with the emergence of MDR-TB in recent years. Therefore, it is particularly important for reducing PZA resistance to carry out the susceptibility test. Nevertheless, the test is challenging and often unreliable, as the drug is active only at pH 5.5 which affects the *in vitro* growth of *M. tuberculosis*, and thus causes both false-susceptible and false-resistant results. In this review, we summarized the research on susceptibility testing of PZA, hoping to provide a reference for the effective diagnosis and treatment of tuberculosis.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; pyrazinamide; drug resistance; *pncA* gene; drug susceptibility testing

结核病仍是全球十大死因之一，据 2020 年发布的《全球结核病报告》显示，在全球范围内，2019 年估计有 1 000 万人罹患结核病，艾滋病毒阴性者中估计有 120 万人死于结核病<sup>[1]</sup>。吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA)在酸性环境中抗菌活性高，对静止期结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)有杀灭作用，亦可杀灭吞噬细胞内的结核分枝杆菌<sup>[2]</sup>。PZA 与其他抗结核药物联合使用可将疗程缩短至 6–9 个月，而且很大程度降低了长期复发率，因此被 WHO 推荐作为对药物敏感的结核病或耐多药结核病的重要治疗药物之一。由于 PZA 在 pH 值为 5.5 左右的酸性条件下才可转化为有杀菌活性的吡嗪酸(pyrazine acid, POA)而发挥作用，但酸性条件会影响结核分枝杆菌生长，故使用传统药敏检测方法无法准确地反映菌株对 PZA 的耐药情况<sup>[3]</sup>。因此，寻求结果可靠、操作简易、价格实惠的 PZA 药敏检测方法，是目前亟待解决的问

题。本文通过总结近几年 PZA 耐药结核检测方面的研究，分别从以培养为基础的表型检测法、吡嗪酰胺酶(pyrazinamidase, PZase)活性检测法、耐药性相关基因检测法三方面介绍了目前常见的 PZA 耐药性检测方法，并对其原理、应用范围及在实际应用中的优缺点做出分析。

## 1 表型检测法

表型检测法是以结核分枝杆菌培养为基础的一大类药敏检测方法，其中琼脂比例法是美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的耐多药结核病(multidrug-resistance tuberculosis, MDR-TB)药物敏感性试验(drug susceptibility testing, DST)金标准<sup>[4]</sup>。其原理是将结核分枝杆菌接种在不含药物和含有临界值浓度药物的培养基上，观察菌株生长情况。若在含有药物培养基上生长的结核分枝杆菌菌落数量占到无药

物培养基上生长菌落的 1%以上,则认为结核分枝杆菌对该药物制剂具有耐药性。该方法是异烟肼、利福平等一线抗结核药物常用的检测方法。但是如前文所述, PZA 在酸性条件下才具有杀菌活性, 但酸性条件会影响结核分枝杆菌生长, 故使用琼脂比例法无法准确地反映菌株对 PZA 的耐药情况。

限制比例法应用的另一个重要因素是过长的检测时间, 长达数月的检测周期极易造成耐药结核的传播。因此, 随着以 BACTEC 系统为代表的结核分枝杆菌快速培养方法的发明, 越来越多的医院采用此类系统进行结核分枝杆菌的药敏检测。

### 1.1 BACTEC 液体培养基法

BACTEC 460 (B460)是由美国 BD 公司研究开发的对结核分枝杆菌快速培养、鉴定分析的全自动系统, 是 CLSI 推荐的 PZA 药敏检测金标准<sup>[5]</sup>。由于其放射性元素的使用限制了该系统的应用, 目前该公司已经停产了此类产品转而推广 BACTEC MGIT960 (M960)系统。M960 没有使用放射性元素, 而是检测结核分枝杆菌生长时消耗管内氧气的量。培养管中含有对氧气浓度极为敏感的荧光指示剂, 通过对比一定时间内含药管与无药对照管荧光强度的不同, 即可判断药物的敏感性<sup>[6]</sup>。

Scarparo 等<sup>[7]</sup>利用 M960 和 B460 系统对 100 株临床分离样本进行 PZA 药敏检测。对于 PZA 敏感株, M960 系统检测时间为 4.4–16.9 d (中位数为 7.5 d)。B460 为 4.0–12.0 d (中位数为 7.0 d); 对于 PZA 耐药株, M960 的检测周转时间为 4.2–19.3 d (中位数为 9.8 d), B460 则为 4.0–20.0 d (中位数为 8.1 d)。两个系统检测结果的总体一致性为 92%。两种机型在报阳后都需要继续培养一段时间才能接种进行药敏实验, 如果加上这段时间, M960 系统检测速度总体上

比 B460 系统略快<sup>[7]</sup>。传统结核分枝杆菌耐药性检测通常是在临床标本分离培养后进行, 需要较长的时间。Siddiqi 等<sup>[8]</sup>利用 M960 系统在处理标本的同时进行 PZA 药物敏感性试验, 能够节省约 8 d 的耐药性检测时间。

M960 具有较好的灵敏度和特异性。据 Maslov 等<sup>[9]</sup>报道, 以 *pncA* 测序作为参考, M960 方法的敏感性为 81%, 特异性为 97%, 准确性为 91%。随着研究的不断深入, 多篇文献报道该方法出现了假耐药结果。2010 年, Chedore 等<sup>[10]</sup>的研究显示, 在使用 M960 系统对 743 株结核分枝杆菌进行 PZA 敏感性测试时, 有 57 株 (7.7%)表现出耐药; 随后用 B460 参考法对这 57 株进行反复测试, 结果为 33 个菌株 (4.4%)表现为耐药, 其余 24 株 (占菌株总数的 3.2%)表现为敏感; 再次用 M960 对以上 24 株进行重复检测, 结果有 14 株显示敏感结果, 另外 10 株仍为耐药。2018 年, Bouzouita 等<sup>[11]</sup>发现, 将 MGIT 960 系统检测结果与 *pncA*、*rpsA* 和 *panD* 测序相比较, 16/41 菌株被错误鉴定为对 PZA 耐药, 假耐药率高达 39.0%。该方法产生假耐药性原因可能是接种量过大致使液体培养基环境的 pH 值增高, 使吡嗪酰胺酶失活从而导致 PZA 失去杀菌力。有研究人员提出可以通过降低结核分枝杆菌菌株接种量而显著地提高检测的准确性。Mok 等<sup>[12]</sup>和 Mustazzolu 等<sup>[13]</sup>利用改良后的 MGIT960 方法检测了 106 株样本, 仅有 0.9% 的菌株出现了假耐药情况, 没有任何菌株被检测为假敏感株, 此结论也得到了广泛的验证。

BACTEC MGIT960 系统具有药敏试验与标本处理并行、分离培养耗时短、分离培养率高等特点, 是目前为止最准确的 PZA 药敏检测方法<sup>[14]</sup>。但是由于 BACTEC 系统价格高昂, 同时需要较高熟练度的操作人员和进口试剂, 该系统的推广应用受到了较大限制。

## 1.2 BACT/Alert 3D 培养法

BACT/Alert 3D 系统是全自动非放射性的快速细菌培养系统,其原理是利用细菌在生长过程中释放 CO<sub>2</sub>,使得培养基中 pH 值改变,通过监测培养瓶底部的 CO<sub>2</sub> 变色指示剂的颜色变化,从而显示培养瓶内是否有细菌生长。若瓶内有结核分枝杆菌生长,产生的 CO<sub>2</sub> 可将瓶底感受器的颜色从深绿色变为黄色<sup>[15]</sup>。Singh 等<sup>[16]</sup>曾用 L-J 比例法(Löwenstein-Jensen proportion method)作为参考,将其与 BACT/Alert 3D 系统进行比较,通过分析 107 株临床分离样本,得出该方法平均检测时间约在 10.92 d (中位数为 10.32 d),灵敏度为 100%,特异性为 98.61%,准确性为 99.06%,一致性为 92.52%。该系统同样存在价格昂贵、针对的药物类别较少等问题,限制了其在临床上推广使用。

## 1.3 比色法

比色法是药敏检测时常用的技术。此类方法是利用结核分枝杆菌生长代谢还原指示剂或硝酸盐,产生颜色反应,通过观察颜色的变化从而判断药敏状况。无药管中颜色变化标志着结核分枝杆菌生长代谢旺盛,与药物测试管颜色进行比较从而判断药敏结果。由于此法检测的依旧是结核分枝杆菌代谢活性,因此依然存在酸性环境下结核分枝杆菌代谢活性低的困境。因此,比色法检测 PZA 药敏的报道较少。

### 1.3.1 CTC 比色法

笔者前期曾经报道过一种基于 CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, 5-氰基-2,3-二甲苯基四氮唑)的结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药性快速比色检测方法<sup>[17]</sup>。首先在 pH 6.0 的条件下,利用 PZA 处理细菌 3 d。然后去除 PZA 之后换成 pH 6.7 的条件恢复未杀死的结核分枝杆菌的活性,并通过 CTC 染料变色的方式进行展示。若细菌耐药,则活性较强,显色

较深;若为敏感菌,则细菌被杀死或被抑制,不会产生颜色变化。两种 pH 条件的组合使得该方案顺利解决了 pH 影响检测这一问题。以 M960 法作为金标准分析了 50 株临床分离样本,CTC 法整体的灵敏度和特异性分别为 97.1% 和 81.3%。利用 CTC 比色法,90% (40 株)的菌株可以在 5 d 内给出检测结果,全部检出只需要 6 d,检测时间明显少于其他的利用培养法进行检测的方案。此方法的缺陷在于只能对分离株进行药敏检测,算上分离纯化的过程,检测时间依然较久。

### 1.3.2 烟酰胺微孔板检测法(NIC-MABA 法)

烟酰胺(nicotinamide, NIC)是 PZA 的结构类似物,也具有抗结核活性。其中性 pH 的条件下可由 PZase 作用转化为烟酸<sup>[18]</sup>。研究发现,对 PZA 耐药的结核分枝杆菌也对 NIC 耐药,使用高剂量的 NIC 能够可靠地检测到 PZA 耐药状态。由于其无需酸性环境即可杀菌,从而避免了酸性环境对大多数 PZA 药敏试验的重复性与可靠性的影响<sup>[19-20]</sup>。有学者用 NIC-MABA 法测验了 125 株临床分离株,出报告时间平均约 9.0 d,以 M960 法为参考, NIC-MABA 法具有 100% 的敏感度,95.2% 的特异性和 97.6% 准确性<sup>[21]</sup>。2020 年 Akbal 等<sup>[20]</sup>选取了 30 株临床分离物和 2 株参考菌,采用多种比色法进行检测。结果显示, Resazurin 微量滴定法(Resazurin microtiter assay, REMA)与硝酸盐还原酶法(nitrate reductase assay, NRA)的灵敏度、特异性、一致性均为 93.3%;孔雀石绿脱色法(malachite green decolorization assay, MGDA)的灵敏度为 86.6%,特异性为 93.3%,一致性为 90%;结晶紫脱色法(crystal violet decolorization assay, CVDA)的灵敏度为 86.6%,特异性为 100%,一致性为 93.3%。此类方法最大的优点是在中性条件下检测,有效避免酸性环境对结

核分枝杆菌生长的影响,且成本低廉、耗时短、操作简单,与 M960 法检测结果有较高的一致性,尤其适合在资源匮乏的地区应用。但由于该方法检测的环境为 pH 中性条件,与 PZA 作用的真实环境有差异,检测结果的可靠性有待更多临床试验的验证。

### 1.3.3 TB-CX 显色试验

TB-CX 显色试验(MDR/XDRTB color test, TB-CX)将培养和 DST 方法结合到一个包含 4 个象限的琼脂平板中,其中 1 个象限不加药物用于检测生长,另外 3 个象限用于药物敏感性试验<sup>[22-23]</sup>。接种后放入自封袋内在 37 °C 下孵育,直到无药象限中出现至少 50 个菌落时,读取 PZA 象限中的 DST 结果,当出现在含药培养基上的菌落数大于出现在无药培养基上的菌落数的 1%时,菌株被认为对 PZA 具有耐药性<sup>[22]</sup>。

Mekonnen 等<sup>[22]</sup>的研究表明,TB-CX 检测时间为 5-23 d (中位数为 13.0 d),以 M960 为参考,将 38 株临床分离物进行检测,得出灵敏度为 85%,特异性为 100%,一致性为 91%。TB-CX 试验提供了一种成本较低的检测方法,尤其适用于资源有限的地区使用<sup>[24]</sup>。该技术与 CTC 法一样,对纯培养菌检测较准确,如检测的是痰液样本,则特异性稍差,不能区分结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌,其可靠性还有待进一步验证。

## 2 PZase 活性检测法

由于 PZA 需要通过 PZase 转化为 POA 才能发挥杀菌作用,因此直接检测 PZase 活性能更真实地反映结核分枝杆菌的 PZA 耐药性。与比色法相比,多数 PZase 活性检测法同样产生颜色变化,不同点在于此类方法检测的是 PZase 活性而非菌的代谢活性。

### 2.1 韦恩法(Wayne 法)

其原理是利用体外具有还原性的 POA 分

子与硫酸亚铁铵发生反应生成红色或褐色的硫酸亚铁,通过颜色变化判断 PZase 活性。将结核分枝杆菌接种到含有吡嗪酰胺的固体培养基上,37 °C 培养 4 d 后向固体培养基内加入新鲜配制的 1%硫酸亚铁铵,室温放置 30 min 后观察培养基。若培养基出现红色或褐色条带,指示样本有 POA 生成,即 PZase 具有活性,这代表结核分枝杆菌对 PZA 敏感,无颜色变化则判定为耐药<sup>[25-26]</sup>。泰国的一项研究表明,以 M960 系统作为参照,共分析了 150 株临床分离样本,Wayne 法的灵敏度约为 65.4%,特异性约为 100%<sup>[27]</sup>。该检测法操作简易,成本低廉,特异性高。经典 Wayne 法检测首先需要分离结核分枝杆菌,从标本采集到获得药敏结果的时间为 18-95 d。检测时间较长,且其操作时接种量较大,需要专人实时监测,故 Wayne 法检测 PZA 的耐药性不适于常规的临床试验<sup>[28]</sup>

### 2.2 显微镜药物敏感性试验结合韦恩试验(MODS-Wayne)检测法

显微镜观察药物敏感性(microscopic observation drug susceptibility assay, MODS)试验是一种快速、廉价、准确的检测结核分枝杆菌药物敏感性的方法,常用于异烟肼、利福平等药物敏感性的检测。将该法用以检测 PZA 的敏感性还鲜有报道。近期一项研究<sup>[29]</sup>发现,MODS 检测与 Wayne 法相结合,可以准确地从抗酸杆菌(AFB)涂阳性痰标本中直接判断结核分枝杆菌对 PZA 的耐药性。该研究显示 MODS-Wayne 法与 M960 系统相比,样本为 193 例就诊者的消毒痰液,显示灵敏度为 92.7%,特异性为 99.3%,一致性为 95.3%,kappa 值为 0.86。对于 PZA 敏感菌的检测时间范围为 14-29 d (中位数为 18.5 d)。PZA 耐药菌检测时间为 14-25 d (中位数为 21.0 d),检测时间快于经典 Wayne 法。

由于 MODS-Wayne 只检测培养物上清液中是否存在 POA, 因此不需要酸性培养环境来检测 PZA 的抗菌活性, 有效避免酸性环境抑制结核分枝杆菌的生长这一因素也克服了传统 DST 的局限性, 既不需要首先培养分离, 也无需大接种量(3–5 mg 足够), 从而可以避免假阴性结果<sup>[29–30]</sup>。此外, 它具有快速、成本低、操作简单和对实验人员培训要求低等特点。因此, MODS-Wayne 检测法有望成为资源受限地区引入的常规 PZA 敏感性测试项目。

### 2.3 吡嗪酰胺酶活性测定法

Zhou 等<sup>[31]</sup>利用小麦胚芽体外表达系统合成了吡嗪酰胺酶, 通过检测吡嗪酰胺酶活性来判断 PZA 的药敏。该研究对 51 株临床分离样本进行体外表达酶活性鉴定, 与 M960 系统相比, 灵敏度为 65%, 特异性为 96%; 与 *pncA* 测序法相比, 灵敏度为 88%, 特异性为 100%。由于该方法采用了体外无细胞表达系统, 避免了传统蛋白表达所需的繁琐过程, 24 h 内即可完成酶活性测定。遗憾的是此类方法所需的表达系统需依赖进口, 成本较贵, 且只能检测纯培养物, 应用受到较大限制。

### 2.4 拉曼光谱学检测法(lab-on-a-chip surface-enhanced Raman spectroscopy, LoC-SERS)

PZA 需要转化为 POA 才能发挥杀菌作用, PZA 耐药的结核分枝杆菌无法将 PZA 转化为 POA, 导致细胞内外 POA 浓度较低。Muehlig 等<sup>[32]</sup>利用表面增强拉曼散射技术, 通过对细胞外环境中 PZA 和 POA 浓度的精确测定, 建立了一种结核分枝杆菌 PZA 耐药性检测新方法。微流控芯片技术和拉曼光谱技术的联用使得该研究组能够实现对微量样本的高灵敏度检测<sup>[33–35]</sup>, 据报道, LoC-SERS 对 PZA 的检测限为 27  $\mu\text{mol/L}$ , 对 POA 的检测限为 21  $\mu\text{mol/L}$ 。

由于缺乏类似的研究, 该技术的应用还需更加深入的研究与评估工作。

## 3 耐药基因检测法

PZA 药敏表型检测法需要严格控制 pH 条件, 操作较为复杂。使得在大多数资源有限的条件下, 临床医生并不会对患者进行 PZA 的表型药物敏感性测试。近些年来, 随着分子生物学理论和技术的发展, 结核分枝杆菌的 PZA 耐药机制得到深入研究, 大量的基于结核分枝杆菌耐药基因检测的方法被开发出来。基因检测法无需培养, 可以绕过培养法的诸多困难, 在早期诊断和临床确证试验中有着更为精准的应用。

### 3.1 全基因组测序法(whole-genome sequencing, WGS)

该方法是利用新一代测序技术对结核分枝杆菌的整个基因组进行测序, 通过生物信息技术分析, 来判断待测样本与标准株之间基因组的结构差异、单核苷酸多态性等信息。WGS 具有较高的分辨率, 因此该方法比任何其他分型方法能提供更多的信息<sup>[36]</sup>。WGS 不仅可以对 PZA 的整个基因和启动子进行检测, 还可预测结核病的所有一、二线药物的耐药性<sup>[37]</sup>。据 Papaventsis 等<sup>[38]</sup>报道: 将 17 个研究中的 6 130 个分离样本进行 WGS 检测, PZA 耐药性的灵敏度为 43.2%–100%, 特异性为 66.7%–100%。Quail 等<sup>[39]</sup>发现 WGS 最快可在 11 d 内完成 PZA 耐药性检测。WGS 能快速、全面地同时检测所有可能的耐药基因, 可识别新的可能的相关耐药基因突变, 能够较好解决 PZA 的主要耐药基因 *pncA* 突变位点繁多分散的检测难题。虽然其费用较高, 但经过基因检测技术的不断发展, 成本将会逐渐降低<sup>[39]</sup>。

### 3.2 *pncA* PCR 直接测序法

该方法对结核分枝杆菌耐药基因 *pncA* 进行 PCR 扩增, 产物纯化后, 直接用于 DNA 序列分析。DNA 测序能够检测出突变的基因, 且能确定突变的部位与类型, 发现新的突变位点<sup>[40]</sup>。Tam 等<sup>[41]</sup>利用 *pncA* PCR 测序法, 在 4 个工作日内对 162 株结核杆菌复合体(MTBC)的吡嗪酰胺耐药性进行了分析。结果显示 *pncA* 测序和表型 PZA 药物敏感性试验(DST)结果之间的一致性为 100%。该方法可直接从呼吸道标本中检测 PZA 耐药性, 扩增片段长度为 828 个碱基对(NC\_000962.3 位点 2288495–2289322), 覆盖了 *pncA* 基因的 561 个碱基对, 以及其启动子区域<sup>[41–42]</sup>。Bouzouita 等<sup>[11]</sup>利用测序法检测了 82 株分离样本, 与 M960 系统相比, 灵敏度为 92.0%, 特异性为 100%。

需要注意的是, 基因的突变未必会导致耐药的产生, 因此对于一些未曾报道的突变位点, 其耐药性是未知的。为了解决这个问题, 笔者曾经报道过一种基于荧光定量 PCR 和体外表达系统的结核分枝杆菌及其吡嗪酰胺耐药性快速联合检测新方法(gene-to-protein function MTB/PZA susceptibility test, GPF MTB/PZA), 该方法将基因型检测与 PZase 活性检测结合到了一起<sup>[43]</sup>。利用荧光定量 PCR 技术扩增全长 *pncA* 基因。测定全长 *pncA* 基因序列并与结核耐药突变数据库进行比对。*pncA* 基因没有发生突变的菌株认定为 PZA 敏感株。对于已知的突变, 按照突变数据库判断药敏。对于新发的突变, 通过体外表达系统表达出吡嗪酰胺酶。最终通过酶活性的测定判断 PZA 的耐药情况。该方法可以直接从痰液样本中检测结核分枝杆菌并进行 PZA 药敏检测, 报告时间少于 48 h。

早期的研究发现, 72%–97%的 PZA 耐药菌含有 *pncA* 基因突变, 但是随着对 PZA 耐药机

制研究的深入, *rpsA*、*panD* 和 *ClpC1* 基因被证实也与 PZA 耐药相关<sup>[44–47]</sup>。仅检测 *pncA* 基因, 则可能会漏掉一些 PZA 耐药菌。

### 3.3 高分辨率熔解曲线技术(high-resolution melting, HRM)

HRM 是一种以实时荧光 PCR 为基础的突变检测技术。同源双链与异源双链的熔解温度不同, 导致嵌入 DNA 双链中的荧光染料脱落时对应的温度也不相同。HRM 技术就是通过实时监测荧光产生变化的温度的不同从而来区分野生型菌株与突变型菌株。有研究结果报道, 选取 49 株突变型菌株和 78 株野生型菌株作为研究对象, 以 M960 为对照, HRM 法检测 PZA 耐药性的灵敏度为 85.5%, 特异性为 98.4%, 一致性为 84.2%<sup>[48]</sup>。HRM 分析过程实现闭管操作, 有效避免了扩增产物交叉污染造成假耐药结果, 且操作简单(只需进行一次 PCR 过程), 可在 2–3 h 内完成检测, 大大缩短了检测时间<sup>[49]</sup>。

近期 Filipenko 等<sup>[50]</sup>报道了一种改良的 HRM 法(H-HRM), 其通过设计 7 对重叠引物, 分别覆盖了 *pncA* 基因的 561 bp 编码区和 40 bp 的启动子区, 将野生型 DNA (DNA-W)与突变型 DNA (DNA-M)作为模板同时扩增, 形成“人工”杂交片段, 以绘制出稳定性与重复性更佳的熔解曲线。该研究以 M960 为参考方法, 对 35 株临床分离物进行 H-HRM 检测, 显示敏感度为 97.14% (CI 85.08–99.93), 特异性为 95.65% (CI 78.05–99.89)<sup>[50]</sup>。该法的不足之处在于: 检测前需要使用定量 PCR 对待检样本的 DNA 进行浓度测定, 以便确定合适比例的野生型 DNA 的量。H-HRM 同样为闭管操作, 排除了扩增产物污染的可能<sup>[50–51]</sup>。目前, HRM 已应用于其他抗结核药物的耐药检测, 相较于全长基因测序平台, 具有 HRM 功能的实时荧光定量 PCR 平台价格更为低廉。值得注意的是, 此类方法也没

有考虑由 *rpsA*、*panD* 和 *ClpC1* 基因突变引起的 PZA 耐药。

### 3.4 微阵列技术(DNA microarray)

微阵列技术是在核酸杂交(Northern、Southern 等)基础上发展出的一项新技术。其将已知序列的片段或基因探针固定于支持物体表面, 然后与标记的样品分子进行杂交, 通过测验不同探针的杂交信号强度来分析样品的序列信息。Havlicek 等<sup>[52]</sup>通过微阵列技术分析了 271 株结核分枝杆菌分离物, 显示 DNA microarray 灵敏度为 83%, 特异性为 100%, 样本周转时间只需 2.5 h。该方法具有快速、准确、自动化程度高等优点, 但由于微阵列技术需要大量的探针, 检测成本较高。

### 3.5 NIPRO Geno scholar PZA-TB II 线性探针检测法

线性探针技术(line probe assays, LPA)通过引物扩增目的片段, 得到的产物与膜上固定的特异性探针杂交, 最后利用酶显色反应得出检测结果。NIPRO Geno scholar PZA-TB II 线性探针检测法是由日本大阪的 NIPRO 公司基于线性探针技术开发的 PZA 药敏检测方法, 简称 PZA-LPA2 试验。鉴于 *pncA* 的突变位点繁多且分散, 该方案没有针对特定的耐药突变位点设计探针。48 个探针中大多数探针代表野生型基因, 因此, 没有结合探针的样本被认为是 PZA 耐药株。为了增加检测的特异性, 该方案还引入了一些不会引起 PZA 耐药性的突变片段作为探针<sup>[53-54]</sup>。2020 年, WHO 对 PZA-LPA2 试验进行了系统性审查, 以表型 DST 法为参考, 来自 7 项研究中的 964 份样本评估出 PZA-LPA2 试验灵敏度为 81.2% (75.4%–98.6%), 特异性为 97.8% (96.5%–98.6%)<sup>[55]</sup>。除了检测 PZA 耐药性, 该方法也可用于检测痰样, 以及临床分离株的利福平、异烟肼耐药性。该方法是一种经

济有效、快速的间接检测 PZA 药敏试验替代方法, 推广前还需进行大量的验证评估工作。

## 4 总结与展望

多重耐药结核的蔓延已经严重威胁了结核病的防控。医院常用的结核分枝杆菌及其耐药性检测方法费时费力, 延误了病人的诊断和用药, 导致了多重耐药结核蔓延。尽管近些年科研人员开发出了很多结核病和药敏检测的新方法, PZA 耐药检测难的问题依然没有完全解决。本文将比较有代表性的检测方法归纳于表 1 中。

在诸多以培养为基础的 PZA 药敏检测方法中, BACTEC MGIT960 系统仍是迄今为止应用最广泛, 能够提供较为准确结果的药敏检测系统。虽然该系统应用有着成本的限制, 但是随着社会经济的发展, 其价格终究会在一个可接受的范围。对于经济欠发达地区, TB-CX 检测有着不错的准确率。拉曼光谱学检测等一些新方法, 由于目前缺乏足够的验证, 尚处于研究阶段。

耐药基因检测法近些年发展较快, 此类方法多数着眼于检测 *pncA* 的突变情况, 通过 *pncA* 的基因型判断待测菌是否发生了耐药突变。常见的 *pncA* PCR 直接测序法和 PZA-LPA2 试验等技术都属于此类型。正如前文所述, *pncA* 基因突变引起的 PZA 耐药菌占比为 72%–97%, *rpsA*、*panD* 和 *ClpC1* 基因也与 PZA 耐药相关。仅检测 *pncA* 基因, 则可能会造成一些假阴性的结果。因此, 在耐药基因检测法中, 全基因测序法是目前最佳解决方案, 尽管其成本比较高。

除此之外, 目前所有的耐药基因检测法都面临着同样一个问题: 突变与耐药相关性的问题。并非所有突变都会导致耐药, 除了同义突变外, 非关键区域的某些突变也可能不会导致耐药性的产生。因此利用测序的方法判断 PZA



表 1 PZA 耐药性检测方法

Table 1 PZA drug resistance detection methods

Methods	Sensitivity/%	Specificity/%	Concordance/%	Detection time/d	Sample types	Number of samples	Cost	Reference methods	
Phenotypic test	BACTE 460	–	92.00	S 4.0–12.0 (median 7.0) R 4.0–20.0 (median 8.1)	Clinical isolates	100	High	MGIT 960	
	BACTEC 960	81.00	–	S 4.4–16.9 (median 7.5) R 4.2–19.3 (median 9.8)	Clinical isolates	100	High	<i>pncA</i> sequencing	
	BACT/Alert 3D	100.00	92.52	10.92 (median 10.32)	Clinical isolates	107	High	L-J proportion	
	TB-CX	85.00	100.00	91.00	5–23 (median 13.0)	Clinical isolates	38	4–5 \$	MGIT 960
	CTC	97.10	81.30	–	6	Clinical isolates	50	Low	MGIT 960
	NIC-MABA	100.00	95.20	–	9	Clinical isolates	125	–	MGIT 960
	REMA	93.30	93.30	93.30	9	Clinical isolates	30	1.59 \$	MGIT 960
	NRA	93.30	93.30	93.30	9	Clinical isolates	30	1.84 \$	MGIT 960
	MGDA	86.60	93.30	90.00	9	Clinical isolates	30	1.60 \$	MGIT 960
	CVDA	86.60	100.00	93.30	9	Clinical isolates	30	1.63 \$	MGIT 960
Pzase activity assay	Wayne	65.40	100.00	–	Clinical isolates	150	Low	MGIT 960	
	MODS-Wayne	92.70	99.30	95.30	Sputum	193	Low	MGIT 960	
	Pzase activity assay	65.00	96.00	–	Sputum	193	High	MGIT960	
		88.00	100.00	–	Clinical isolates	51	High	MGIT960	
					Clinical isolates	51	–	<i>pncA</i> sequencing	
	Resistance gene	43.20–100.00	66.70–100.00	–	11	Clinical isolates	6 130	High	–
	detection method	92.00	100.00	–	0.17	Clinical isolates	82	Low	MGIT960
		85.50	98.40	84.20	0.1	Clinical isolates	127	Low	MGIT960
		97.14	95.65	–	1–2	Clinical isolates	35	Low	MGIT960
		83.00	100.00	–	0.1	Clinical isolates	271	High	–
PZA-TB II	81.20	97.80	–	–	Clinical isolates	964	–	DST	

REMA: resazurin microtiter assay; NRA: nitrate reductase assay; MGDA: malachite green decolorization assay; CVDA: crystal violet decolorization assay; S: sensitive strain; R: resistant strain.

药敏情况需要一个将突变与耐药情况联系起来的数据库。结核耐药突变数据库<sup>[56]</sup> (tuberculosis drug resistance mutation database, TBDReaMDB) 曾经很好地弥补了这一空缺, 遗憾的是该数据库目前已经无法访问。此外, 数据库只能针对已经报道过的突变位点, 新产生的未知突变仍然需要表型检测的验证。因此, 现阶段耐药基因检测将比较适合作为结核病耐药快速筛查的一种手段, 而耐药确诊和新的耐药突变位点确认, 依然需要使用表型检测的方法。

目前, 单一的检测方法很难实现准确的 PZA 药敏检测, 越来越多的研究人员开始采用多方法联合检测以提高检测的准确性。比如笔者前期开发的 GPF MTB/PZA 法。该方法联合了基因检测和酶活检测两种方法, 实现了不错的检测效果。其弊端在于只能检测由 *pncA* 基因突变引发的耐药情况。未来可以将 *pncA*、*rpsA*、*panD* 和 *ClpC1* 等基因同时纳入基因检测步骤以提高检测的准确度。

尽管目前 PZA 药敏检测还面临着诸多问题, 相信随着 PZA 耐药机制研究的不断深入, 未来一定能够建立准确且实用的 PZA 药敏试验检测方法为临床耐 PZA 的结核病患者提供有效的预防与治疗。

## 参考文献

- [1] Chakaya J, Khan M, Ntoumi F, Aklillu E, Fatima R, Mwaba P, Kapata N, Mfinanga S, Hasnain SE, Katoto PDMC, Bulabula ANH, Sam-Agudu NA, Nachega JB, Tiberi S, McHugh TD, Abubakar I, Zumla A. Global tuberculosis report 2020-reflections on the global TB burden, treatment and prevention efforts. *International Journal of Infectious Diseases*, 2021, 113: S7–S12.
- [2] Njire M, Tan YJ, Mugweru J, Wang CW, Guo JT, Yew W, Tan SY, Zhang TY. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: review and update. *Advances in Medical Sciences*, 2016, 61(1): 63–71.
- [3] Zhang Y, Permar S, Sun ZH. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, 51(1): 42–49.
- [4] Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, Pfyffer GE, Ridderhof JC, Siddiqi SH, Wallace RJ, Warren NG, Witebsky FG. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence. 2011, Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [5] Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2003, 7(1): 6–21
- [6] Sinirtas M, Ozakin C, Gedikoglu S. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to front line antituberculosis drugs and comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2009, 43(3): 403–409.
- [7] Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(3): 1109–1114.
- [8] Siddiqi S, Ahmed A, Asif S, Behera D, Javaid M, Jani J, Jyoti A, Mahatre R, Mahto D, Richter E, Rodrigues C, Visalakshi P, Rüsç-Gerdes S. Direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for rapid detection of multidrug resistance using the Bactec MGIT 960 system: a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(2): 435–440.
- [9] Maslov DA, Zaichikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, Larionova EE, Andreevskaya SN, Zhang Y, Danilenko VN. Resistance to pyrazinamide in Russian *Mycobacterium tuberculosis* isolates: *pncA* sequencing versus Bactec MGIT 960. *Tuberculosis*, 2015, 95(5): 608–612.
- [10] Chedore P, Bertucci L, Wolfe J, Sharma M, Jamieson F. Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(1): 300–301.
- [11] Bouzouita I, Cabibbe AM, Trovato A, Draoui H, Ghariani A, Midouni B, Essalah L, Mehiri E, Cirillo DM, Slim-Saidi L. Is sequencing better than

- phenotypic tests for the detection of pyrazinamide resistance? *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2018, 22(6): 661–666.
- [12] Mok S, Roycroft E, Flanagan PR, Montgomery L, Borroni E, Rogers TR, Fitzgibbon MM. Overcoming the challenges of pyrazinamide susceptibility testing in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(8): e0261720.
- [13] Mustazzolu A, Piersimoni C, Iacobino A, Giannoni F, Chirullo B, Fattorini L. Revisiting problems and solutions to decrease *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide false resistance when using the Bactec MGIT 960 system. *Annali Dell' Istituto Superiore Di Sanita*, 2019, 55(1): 51–54.
- [14] Demers AM, Venter A, Friedrich SO, Rojas-Ponce G, Mapamba D, Jugheli L, Sasamalo M, Almeida D, Dorasamy A, Jentsch U, Gibson M, Everitt D, Eisenach KD, Diacon AH. Direct susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for pyrazinamide by use of the Bactec MGIT 960 system. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(5): 1276–1281.
- [15] 陈军, 王飞, 任易, 肖勇, 彭孝红. BacT/Alert 3D 系统与罗氏培养基分离分枝杆菌的比较. *中国防痨杂志*, 2007, 29(2): 151–153.  
Chen J, Wang F, Ren Y, Xiao Y, Peng XH. BacT/Alert 3D system versus Lowenstein-Jensen medium for isolation of *Mycobacteria* from clinical specimens. *The Journal of the Chinese Antituberculosis Association*, 2007, 29(2): 151–153. (in Chinese)
- [16] Singh P, Wesley C, Jadaun GPS, Malonia SK, Das R, Upadhyay P, Faujdar J, Sharma P, Gupta P, Mishra AK, Singh K, Chauhan DS, Sharma VD, Gupta UD, Venkatesan K, Katoch VM. Comparative evaluation of Löwenstein-Jensen proportion method, BacT/ALERT 3D system, and enzymatic pyrazinamidase assay for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(1): 76–80.
- [17] Li H, Zhou LP, Luo J, Yu JP, Yang H, Wei HP. Rapid colorimetric pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2016, 20(4): 462–467.
- [18] Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(2): 327–331.
- [19] Murray MF. Nicotinamide: an oral antimicrobial agent with activity against both *Mycobacterium tuberculosis* and human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, 36(4): 453–460.
- [20] Akbal AU, Durupinar B, Coban AY. Colorimetric methods for rapid determination of pyrazinamide resistance. *International Journal of Mycobacteriology*, 2020, 9(3): 274–280.
- [21] Hu Y, Wu X, Luo J, Fu Y, Zhao L, Ma Y, Li Y, Liang Q, Shang Y, Huang H. Detection of pyrazinamide resistance of *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide as a surrogate. *Clinical Microbiology and Infection*, 2017, 23(11): 835–838.
- [22] Mekonnen B, Mihret A, Getahun M, Hailu T, Sidiki S, V Kelley H, Scordo JM, Hunt WG, Pan XL, Balada-Llasat JM, Gebreyes W, Evans CA, Aseffa A, Torrelles JB, Wang SH, Abebe T. Evaluation of the tuberculosis culture color plate test for rapid detection of drug susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a resource-limited setting, Addis Ababa, Ethiopia. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0215679.
- [23] Toit K, Mitchell S, Balabanova Y, Evans CA, Kummik T, Nikolayevskyy V, Drobniewski F. The Colour Test for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, 16(8): 1113–1118.
- [24] Zhang AN, Jumbe E, Krysiak R, Sidiki S, Kelley HV, Chemey EK, Kamba C, Mwapasa V, García JI, Norris A, Pan XJ, Evans C, Wang SH, Kwiek JJ, Torrelles JB. Low-cost diagnostic test for susceptible and drug-resistant tuberculosis in rural Malawi. *African Journal of Laboratory Medicine*, 2018, 7(1): 690.
- [25] Sharma B, Pal N, Malhotra B, Vyas L, Rishi SM. Comparison of MGIT 960 & pyrazinamidase activity assay for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Indian Journal of Medical Research*, 2010, 132: 72–76.
- [26] Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of *Mycobacteria*. *The American Review of Respiratory Disease*, 1974, 109(1): 147–51.
- [27] Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M,

- Chairprasert A. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from siriraj hospital, Thailand. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 223.
- [28] Calderón RI, Velásquez GE, Becerra MC, Zhang Z, Contreras CC, Yataco RM, Galea JT, Lecca LW, Kritski AL, Murray MB, Mitnick CD. Prevalence of pyrazinamide resistance and Wayne assay performance analysis in a tuberculosis cohort in Lima, Peru. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2017, 21(8): 894–901.
- [29] Alcántara R, Fuentes P, Antiparra R, Santos M, Gilman RH, Kirwan DE, Zimic M, Sheen P. MODS-Wayne, a colorimetric adaptation of the microscopic-observation drug susceptibility (MODS) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance from sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019, 57(2): e01162–e01118.
- [30] Alcántara R, Fuentes P, Marin L, Kirwan DE, Gilman RH, Zimic M, Sheen P. Direct determination of pyrazinamide (PZA) susceptibility by sputum microscopic observation drug susceptibility (MODS) culture at neutral pH: the MODS-PZA assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(5): e01165–e01119.
- [31] Zhou M, Geng XL, Chen J, Wang XD, Wang DB, Deng JY, Zhang ZP, Wang WH, Zhang XN, Wei HP. Rapid colorimetric testing for pyrazinamide susceptibility of *M. tuberculosis* by a PCR-based *in-vitro* synthesized pyrazinamidase method. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27654.
- [32] Muehlig A, Jahn IJ, Heidler J, Jahn M, Weber K, Sheen P, Zimic M, Cialla-May D, Popp J. Molecular specific and sensitive detection of pyrazinamide and its metabolite pyrazinoic acid by means of surface enhanced Raman spectroscopy employing *in situ* prepared colloids. *Applied Sciences*, 2019, 9(12): 2511.
- [33] Jahn IJ, Žukovskaja O, Zheng XS, Weber K, Bocklitz TW, Cialla-May D, Popp J. Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: challenges, solutions and potential applications. *The Analyst*, 2017, 142(7): 1022–1047.
- [34] Bonifacio A, Cervo S, Sergo V. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy of biofluids: fundamental aspects and diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(27): 8265–8277.
- [35] Hidi IJ, Jahn M, Weber K, Bocklitz T, Pletz MW, Cialla-May D, Popp J. Lab-on-a-chip-surface enhanced Raman scattering combined with the standard addition method: toward the quantification of nitroxoline in spiked human urine samples. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(18): 9173–9180.
- [36] Katala BZ, Mbebele PM, Lema NA, Campino S, Mshana SE, Rweyemamu MM, Phelan JE, Keyyu JD, Majigo M, Mbugi EV, Dockrell HM, Clark TG, Matee MI, Mpagama S. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and clinical outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis in Tanzania. *BMC Genomics*, 2020, 21: 174.
- [37] Köser CU, Bryant JM, Becq J, Török ME, Ellington MJ, Marti-Renom MA, Carmichael AJ, Parkhill J, Smith GP, Peacock SJ. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(3): 290–292.
- [38] Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniewski F, Cirillo DM, Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, 2017, 23(2): 61–68.
- [39] Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 2012, 13: 341.
- [40] Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology*, 2018, 23(12): 1098–1113.
- [41] Tam KKG, Leung KSS, Siu GKH, Chang KC, Wong SSY, Ho PL, Leung EKC, Yam WC. Direct detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by use of *pncA* PCR sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019, 57(8): e00145–e00119.
- [42] Whitfield MG, Marras SAE, Warren RM, van Rie A, Rice J, Wangh LJ, Kreiswirth BN. Rapid Pyrazinamide Drug Susceptibility Testing using a Closed-Tube PCR Assay of the Entire *pncA* gene. *Scientific Reports*, 2020, 10: 4234.
- [43] Li H, Chen J, Zhou M, Geng XL, Yu JP, Wang WH, Zhang XN, Wei HP. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and pyrazinamide susceptibility related to

- pncA* mutations in sputum specimens through an integrated gene-to-protein function approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(1): 260–267.
- [44] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2009, 13(11): 1320–1330.
- [45] Shi WL, Chen JZ, Feng J, Cui P, Zhang S, Weng XH, Zhang WH, Zhang Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3(1): 1–8.
- [46] Zhang Y. Rapid molecular detection of pyrazinamide resistance: the way forward. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2015, 19(2): 128.
- [47] Modlin SJ, Marbach T, Werngren J, Mansjö M, Hoffner SE, Valafar F. A typical genetic basis of pyrazinamide resistance in monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(6): e01916–e01920.
- [48] 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.  
Hong CY, Wang F, Liu XL. Detection of *pncA* mutation associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by high-resolution melting curve analysis. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2013, 36(3): 198–201. (in Chinese)
- [49] Pholwat S, Stroup S, Gratz J, Trangan V, Foongladda S, Kumburu H, Juma SP, Kibiki G, Houpt E. Pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by high resolution melt analysis. *Tuberculosis*, 2014, 94(1): 20–25.
- [50] Filipenko ML, Dymova MA, Cherednichenko AG, Khrapov EA, Mishukova OV, Schwartz YS. Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis pncA* gene by modified high-resolution melting curve analysis of PCR products. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, 168(2): 264–269.
- [51] Nagai Y, Iwade Y, Katayama M, Yamaguchi T, Hayakawa E, Nakano M, Sakai T, Mitarai S, Nosaka T. High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2013, 19(6): 1116–1125.
- [52] Havlicek J, Dachsels B, Slickers P, Andres S, Beckert P, Feuerriegel S, Niemann S, Merker M, Labugger I. Rapid microarray-based assay for detection of pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2019, 94(2): 147–154.
- [53] Driesen M, Kondo Y, De Jong BC, Torrea G, Asnong S, Desmaretz C, Mostofa KSM, Tahseen S, Whitfield MG, Cirillo DM, Miotto P, Cabibbe AM, Rigouts L. Evaluation of a novel line probe assay to detect resistance to pyrazinamide, a key drug used for tuberculosis treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 2018, 24(1): 60–64.
- [54] Willby MJ, Wijkander M, Havumaki J, Johnson K, Werngren J, Hoffner S, Denking CM, Posey JE. Detection of *Mycobacterium tuberculosis pncA* mutations by the nipro genoscholar PZA-TB II assay compared to conventional sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 62(1): e01871–e01871.
- [55] Update on the use of nucleic acid amplification tests to detect TB and drug-resistant TB: rapid communication. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [56] Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Medicine*, 2009, 6(2): e2.

(本文责编 李磊)