

分枝杆菌对硝基苯甲酸实验及其鉴别 分枝杆菌的分子机制研究进展

李月¹ 夏辉² 李马超¹ 王瑞白¹

【摘要】 分枝杆菌病是全球范围内威胁人类健康的重要传染病。其中,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)和非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)所导致的疾病在临床症状、病理表现及影像学特征等方面难以区分,但两者的耐药谱天然存在显著差异,致使两种疾病在临床处置方面显著不同,因此需要快速、准确地鉴别这两类分枝杆菌。PNB(4-nitrobenzoic acid)实验是基于分枝杆菌对对硝基苯甲酸不同的敏感性而建立的鉴别方法,由于操作简单、成本低廉、设备依赖性低,在临床上一直被广泛应用于 MTB 和 NTM 的鉴别,但其区分两类分枝杆菌的分子机制尚不十分明确。作者从 PNB 实验方法、已有研究的分枝杆菌 PNB 代谢酶,以及尚存在的问题等几个方面进行综述,以期阐明分枝杆菌 PNB 耐药机制、其区分 MTB 与 NTM 的原理,以及 PNB 的新应用价值提供思路。

【关键词】 硝基苯甲酸盐; 分枝杆菌, 结核; 非结核分枝杆菌

【中图分类号】 R378.91

4-nitrobenzoic acid experiment of mycobacteria and research progress on its molecular mechanism of *Mycobacterium* differentiation Li Yue¹, Xia Hui², Li Machao¹, Wang Ruibai¹. ¹Tuberculosis Department, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ²National Tuberculosis Reference Laboratory, National Center for Tuberculosis Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: Wang Ruibai, Email: wangruibai@icdc.cn

【Abstract】 Mycobacterial disease is an important infectious disease threatening human health worldwide. The diseases caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and non-tuberculous mycobacteria (NTM) are very similar in clinical symptoms, pathological manifestations and imaging features. However, there are inherent differences in the drug resistance spectrum between these two types of strains, resulting in significant differences in clinical treatment and management, therefore, rapid and accurate differentiation method is needed. PNB (4-nitrobenzoic acid) experiment is a selective culture method based on the different susceptibility of mycobacteria to PNB. It is widely used in clinical practice due to its simplicity, low price, and low technical requirements, but the mechanism involved in this experiment is unclear. This article reviewed the PNB experimental methods, reported researches on the PNB metabolic enzymes of mycobacteria and existing problems to provide ideas for elucidating the mechanism of mycobacteria PNB resistance, the principle of distinguishing MTB from NTM, and the new application value of PNB.

【Key words】 Nitrobenzenes; *Mycobacterium tuberculosis*; Non-tuberculous mycobacterium

结核病是一种主要由结核分枝杆菌(*Mycobacte-*

rium tuberculosis, MTB)感染引起的传染性疾, 目前在全球范围内仍是一个重大的健康威胁。2021年约有1060万例新发患者和160万例死亡患者。新增患者例数和死亡例数相比2020年的1000万和150万均有所增加^[1-2]。分枝杆菌的传统分类中,除结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌外,其余的分枝杆菌统称为非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)。近几十年来,由于对NTM认知度的提高、合并HIV感染发病率的上升,以及实验室检测技术和诊断方法的显著改进,NTM感



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.19982/j.issn.1000-6621.20230191

作者单位: ¹ 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核室,北京 102206; ² 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心/国家结核病参比实验室,北京 102206

通信作者: 王瑞白, Email: wangruibai@icdc.cn

染在世界范围内的发病率不断上升,也已经成为一个重要的公共卫生问题^[3]。由于 NTM 感染在临床表现、细菌学、病理学等方面与结核病相似,但 NTM 和 MTB 对抗结核药物的敏感性差异显著,因此,临床治疗方案和管理不尽相同。尽早、准确地进行 MTB 和 NTM 的鉴别诊断可有效治疗疾病,降低疾病负担。

1964 年, Tsukamura 和 Tsukamora 研发了对硝基苯甲酸(4-nitrobenzoic acid, PNB)和噻吩-2-羧酸联氨(thiophene-2-carboxylic acid hydrazine, TCH)选择性培养基用于分枝杆菌的鉴别^[4-5],依据培养结果可将分枝杆菌分为牛型 MTB、人型 MTB 和 NTM 三类^[6]。在两种培养基上的生长情况分别为:牛型 MTB PNB(阴性)/TCH(阴性)、人型 MTB PNB(阴性)/TCH(阳性)和 NTM PNB(阳性)/TCH(阳性)。作为一种操作简单、成本低廉和技术可靠的检测方法,PNB/TCH 实验被临床广泛应用于分枝杆菌的鉴别,尤其是在广大发展中国家或缺乏分子生物学菌种鉴定能力的实验室中。在我国,PNB/TCH 实验被纳入《全国结核病细菌学检验规程》(1984 版)^[7]、《结核病诊断细菌学检验规程》(1995 版)^[8]及《结核病实验室检验规程》(2015 版)^[9],规定用于结核病的病原学检测。实际应用中,牛型 MTB 仅对吡嗪酰胺天然耐药,对其他药物的敏感性与人型 MTB 相同,且总体牛型 MTB 占比非常少见^[10],故多数情况下仅使用 PNB 实验鉴定 MTB 和 NTM。

一、PNB 实验方法的研究进展

传统 PNB 实验使用 2~3 周的新鲜分枝杆菌培养物进行试验。0.01 ml 10^{-1} mg/ml 浓度的菌液均匀接种至中性改良罗氏斜面培养基和含 PNB (500 μ g/ml)的改良罗氏斜面培养基各 1 支,即 10^{-3} mg/管,37 °C 培养。每周观察 1 次结果,同时记录两种培养基上菌落的生长情况直至孵育 4 周。实验时设置堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)为阳性对照菌株,MTB 标准菌株 H37Rv 为阴性对照菌株^[9]。PNB 生长阳性判断为 NTM,阴性判断为 MTB。PNB 实验的主要局限性在于这是一个基于培养的实验方法,加上从样本中进行菌株分离的培养时间,至少需要 6~8 周,非常耗时。为了缩短 PNB 实验的检测时间、提高检测的敏感度,研究人员相继对 PNB 实验方法进行了改进。

(一)液体法

液体法包括 PNB-Mycobacteria Growth Indi-

cator Tube(MGIT)法和微量肉汤培养法两种方法。PNB-MGIT 法是在 BACTEC MGIT 960 培养管中添加 500 μ g/ml 的 PNB 进行鉴别培养。该方法利用 BACTEC MGIT 960 培养管底部植入的氧依赖性荧光淬灭感受器,提高敏感度的同时,将报告时间缩短至 7~10 d^[11],但高度依赖于专用大型仪器 BACTEC MGIT 960/320 全自动分枝杆菌培养及药敏检测系统。

微量肉汤培养法是在 96 孔板中添加 100 μ l 含 PNB 的 Middlebrook 7H9(10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase(OADC))液体培养基,PNB 的鉴别浓度降为 200 μ g/ml;然后每个检测孔再加入 100 μ l 10^{-3} mg/ml 的待测菌液,同时设无 PNB 的生长对照孔,培养 7~10 d 判读结果^[12]。该方法无需昂贵的专用设备,成本较低,适于基层实验室进行大样本量检测。

(二)固体法

PNB-7H10 法是在配制 Middlebrook 7H10 (10% OADC)固体琼脂培养基时添加终浓度为 500 μ g/ml 的 PNB。将 1 麦氏浊度的菌液 1:100 稀释后取 10 μ l 接种 PNB-7H10 平板,根据生长情况判读结果。报告时间在 3~28 d,93% 的 MTB 菌株培养后 14 d 可以报告结果。PNB-7H10 法与 PNB-MGIT 的检测结果完全一致,但每个样本的检测成本可以从 PNB-MGIT 的 3.5 美元下降至 PNB-7H10 的 0.7 美元。7H10 固体培养基不使用罗氏培养基中的无抗生素蛋基,不含蛋白水解污染物,培养基呈半透明,更容易观察菌落生长及污染的情况。同时,7H10 培养基已被美国临床实验室标准协会(the US Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐用于药物敏感性试验,在全球大多数实验室中得到广泛使用^[13]。

使用 PNB 的改良直接硝酸还原酶实验(Modified direct nitrate reductase assay using PNB, NRAp)^[14-15]则利用分枝杆菌将硝酸盐还原为亚硝酸盐的能力^[16]。在含 1000 μ g/ml KNO_3 的罗氏培养基上生长的分枝杆菌,可以将 Griess 试剂转变为粉色。NRA 和使用刃天青(resazurin)、Alarblue 等染料一样,都是利用颜色的变化使生长结果更易判读,以提高实验的敏感度,缩短判读时间。NRA 方法 2011 年被世界卫生组织推荐用于耐多药结核病患者的快速药敏检测。在 KNO_3 罗氏培养基添加 500 μ g/ml 的 PNB,并采用 NRA 法检测即 NRAp 实验。与其他 PNB 实验不同的是,该方法可

以直接检测涂片阳性的痰液样本。

(三)代谢产物检测法

代谢产物检测法是使用分光光度计或液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)直接对 PNB 的还原代谢物对氨基苯甲酸(*p*-aminobenzoic acid, PABA)进行浓度测定,无需培养。实验时是将待测菌株的新鲜培养物制成 20 mg/ml 的菌液,每毫升菌液加入 5 μl 5% PNB,37 °C 孵育过夜。0.2 μm 滤膜过滤后的菌液可直接进行 LC-MS 检测,PABA 的质荷比瞬态为 138→77.1,鉴定的 cut-off 值为 0.7^[17]。滤液也可经三氯乙酸、亚硝酸钠和氨基磺酸依次处理,N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐显色,在分光光度计上读取 540 nm 的吸光度值。以 PABA 浓度 0 μg/ml 定为 cut-of 值,>0 μg/ml 判定为 NTM,≤0 μg/ml 判定为 MTB。代谢产物法所需最低分枝杆菌菌量为 1 mg,在细菌培养阳性后最短可以在 8 h 进行 MTB 及 NTM 鉴定^[18]。两种检测方法中 LC-MS 更灵敏,检测过程仅需 5 min,但对仪器条件和实验技术要求更高。

与传统的 PNB 方法相比,改进后的方法显著缩短了结果报告的时间(表 1)。但在使用 PNB 实验进行分枝杆菌鉴定时还需要注意:(1)分枝杆菌对 PNB 的敏感性不是绝对的。约 2% 的 MTB 菌株可以在 PNB 培养基上生长,而 NTM 中也有部分菌

种,或部分菌种中的少量菌株不能耐受 500 μg/ml 的 PNB。PNB 实验的错判率约为 10%~20%^[11, 19-22];(2)PNB 实验不适用于混合感染,NTM 在 PNB 上的生长,会掩盖混合感染样本中 MTB 的检出。

二、分枝杆菌 PNB 代谢及其催化酶的研究进展

PNB 实验的生化原理较为清晰,即 PNB 在硝基还原酶(nitroreductase, NR)的作用下,硝基还原为氨基,转变为 PABA(图 1)。PNB 对于细菌是有毒性的,而 PABA 不仅无毒,而且是叶酸合成的中间产物,而叶酸对于细菌的存活是至关重要的。PNB 鉴别 MTB 和 NTM 两类菌株的机制可能是 MTB 中不存在参与此代谢的 NR 酶或酶活性低,PNB 无法被转化而抑制 MTB 的生长;而 NTM 中天然存在的 NR 能够转化 PNB,使其自身生长代谢不被抑制。因此,PNB 的鉴别机制研究主要在于参与反应的 NR 的鉴定及其在基因组上的定位。PNB 的同分异构体邻硝基苯甲酸(2-nitrobenzoic acid)与间硝基苯甲酸(3-nitrobenzoic acid)不能区分 MTB 与 NTM,提示涉及的 NR 酶具有构象特异性。

细菌的 NR 属于硝基黄素单核苷酸还原酶[nitro flavin mononucleotide (FMN) reductase]超家族,利用非共价结合的 FMN 作为辅助因子,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸[nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NAD(P)H]作为电子供体进行强制性的双电子转移,催化硝基化合物的还原。

表 1 传统及改良 PNB 实验主要参数比较

方法名称	基质类型	培养基	PNB 浓度	样本量	报告时间
传统法	固体	罗氏培养基	500 μg/ml	100 μl 10 ⁻¹ mg/ml	28 d
PNB-MGIT	液体	BACTEC MGIT 960	500 μg/ml	1 麦氏浊度, 1:5 稀释后接种 500 μl	7~10 d
微量肉汤法		Middlebrook 7H9 (10%OADC)	200 μg/ml	10 ⁻³ mg/ml, 100 μl 接种	7~10 d
PNB-7H10	固体	Middlebrook 7H10 (10%OADC)	500 μg/ml	1 麦氏浊度, 1:100 稀释后 10 μl 接种	3~28 d
NRAp		罗氏培养基(1000 μg/ml KNO ₃)	500 μg/ml	200 μl 痰液接种, 1 ml Griess 显色	7~10 d
分光光度计	代谢产物	水	0.001%	20 mg/ml	8 h
LC-MS		水	0.001%	20 mg/ml	8 h

注 PNB: 对硝基苯甲酸; NRAp: 对硝基苯甲酸的改良直接硝酸还原酶实验; KNO₃: 硝酸钾; LC-MS: 液相色谱-质谱联用仪

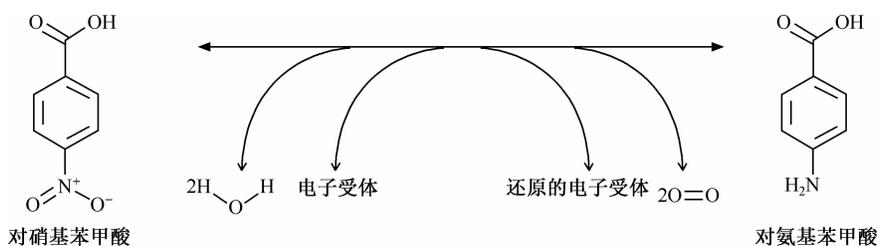


图 1 对硝基苯甲酸代谢的生化反应

该酶家族的成员包括 NAD(P)H:FMN 氧化还原酶、氧不敏感硝基还原酶、黄素还原酶 P、二氢蝶啶还原酶、NADH 氧化酶和 NADH 脱氢酶等。NR 编码基因在细菌基因组中是广泛存在的,在真核生物中也有发现。NR 普遍存在的原因可能是硝基芳香族化合物通常是有毒和致突变的。许多微生物中都建立了降解和解毒这些化合物的酶代谢途径。分枝杆菌不同种的基因组上携带有不同数量、种类的 NR 编码基因,如脓肿拟分枝杆菌 CF00207-00450 基因组(NZ_CP089589.1)中就包含 34 个预测的 NR 家族蛋白。但迄今为止,分枝杆菌中以 PNB 为底物,确证能够转化 PNB 的 NR 包括仅有脂酰胺脱氢酶(lipoamide dehydrogenase, Lpd)和硝基还原酶/二氢蝶啶还原酶(nitroreductase/dihydropteridine reductase, NfnB)两种。

(一)Lpd

由于硝基很容易接受电子,许多具有不同生理作用的酶也可以还原芳香硝基,尽管还原硝基不是这些酶的主要作用^[23-25]。Lpd 就是其中很典型的一种。Lpd 是多酶 α -酮戊二酸脱氢酶复合物的一种成分,包括 α -酮戊二酸和丙酮酸脱氢酶。多酶的作用是催化 α -酮戊二酸转化为琥珀酰辅酶 A,丙酮酸转化为乙酰辅酶 A,随后用于脂肪酸生物合成或转化为柠檬酸盐进入三羧酸循环中进行氧化。Lpd 还能够进行替代氧化剂的单电子或双电子非生理性还原,其中就包括连接三羧酸循环和脂肪酸生物合成的糖酵解反应。脂肪酸代谢途径对分枝杆菌是尤为重要的,合成的长支链脂质分枝菌酸整合入细胞壁,为菌体提供抗亲水性溶质和药物的非渗透性屏障,也使分枝杆菌的致病菌株如 MTB、麻风分枝杆菌和鸟分枝杆菌可以在巨噬细胞的吞噬溶酶体中存活^[26]。

Lpd 是一种多催化功能活性酶^[27],来自猪心、分枝杆菌和克氏锥虫的 Lpd 是仅有的三种具有 NR 活性的脂酰胺脱氢酶^[28],其中猪心来源的 Lpd 是最早确定具有 NR 活性的^[23]。Lpd 是分枝杆菌中最早确定具有 NR 活性的酶^[29]。1994 年,Rafii 等^[29]从属于 NTM 的范巴伦分枝菌酸杆形菌(*Mycobacterium vanbaalenii*)环境株 Pyr-1 的胞内蛋白中分离到一种 NR 活性酶,可以在体外将 PNB 转化为 PABA。检测结果显示,其是对氧不敏感的胞内酶,可由硝基化合物 1-硝基苊诱导表达,酶活性是菌量依赖性的,可以被还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)增强,被对氯苯甲酸、邻碘异苯甲酸、甲萘

醌、双香豆素和抗霉素 A 抑制。1997 年,Marcinkeviciene 和 Blanchard^[26]从耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)Mc²155 菌体蛋白中分纯了一个相对分子量 49 000 的蛋白,Edman 氨基末端测序显示为 Lpd。但在该项研究中,Lpd 的硝基还原酶活性是用硝基咪唑衍生物硝基咪唑酮(nitrofurazone)进行测定的。2001 年 Rafii 等^[28]完成了 Pyr-1 菌株中 NR 酶的纯化及氨基酸测序,结果显示,N 端 20 个氨基酸残基中 18 个与耻垢分枝杆菌 Lpd 蛋白相同(90% 同源性),确定也为 Lpd 蛋白。2005 年,Rajashankar 等^[30]报道了 MTB 的 Lpd 蛋白(*Rv0462* 基因编码)的晶体结构及功能,结果显示,MTB 的 Lpd 是二聚体,和其他生物的 Lpd 具有相似的结构形式,Arg-93、His-98、Lys-103 和 His-386 是其保守的活性位点,但酶活性分析中仅检测了脂酰胺脱氢酶、丙酮酸脱氢酶和二硫代硝基苯还原酶活性,没有进行硝基还原酶活性检测。

(二)Nrd/NfnB

大肠杆菌中的 NfnB 是原核生物中硝基还原酶的原型物。这种酶通过将硝基还原为氨基,激活抗肿瘤药物中含硝基前药,从而被用于抗癌化学疗法的研究^[31]。2010 年,Manina 等^[32]进行了耻垢分枝杆菌中 NfnB 的结构、生物特性及其在苯并噻嗪酮(benzothiazinone, BTZ)耐药中的作用研究。BTZ 是靶向分枝杆菌癸烯基磷酸- β -D-核糖 2'-差向异构酶(decaprenylphosphoryl- β -d-ribose 2'-epimerase, DprE1)亚单位的新型抗结核药物,其硝基基团是抗分枝杆菌活性所必需的。耻垢分枝杆菌中的 NfnB 催化其硝基完全还原为氨基,失活而产生分枝杆菌对该药物的耐药性。在 MTB 和耻垢分枝杆菌中过表达 NfnB,都可以导致对 BTZ043 的耐药,但需要在有氧条件下,说明 NfnB 是氧依赖型。而 MTB 中预测的 NR 酶的过表达,包括 *acg*、*Rv0306*、*moeY*、*fbiB*、*Rv3131*、*Rv3127*、*Rv3368c*、*Rv3547*、*Rv1558*、*Rv1261c*、*Rv3178* 和 *lpdC*,都不能影响 BTZ043 对分枝杆菌最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC)^[32]。

2013 年,丁朋举^[33]利用大肠杆菌对耐 PNB 的脓肿分枝杆菌 ATCC19977 中注释为 NR 的基因(*YP_001703395*)进行了体外表达及酶活性测定。蛋白纯化复性后测定酶活性证实产物确实能够还原 PNB 而发生显色反应,酶的活力单位是 0.21,比活性为 32.2 U/mg。*YP_001703395* 和 *WP_005111198* 的序列 100% 相同,而后的注释为“PnbA_NfnB-

like, nitroreductase similar to *Mycobacterium smegmatis* NfnB; cd02136”,正是耻垢分枝杆菌中的 NfnB 基因。MTB 基因组中不存在 NfnB 的直系同源物(<http://tuberculist.epfl.ch/>),因此,可能是两类分枝杆菌对 PNB、BTZ 等化合物敏感性不同的原因。

三、现有研究的局限性

关于分枝杆菌 PNB 耐药机制的研究较少。虽然除 Lpd 和 NfnB 外,分枝杆菌中已经确定具有 NR 活性的蛋白及其编码基因还包括:Rv3547,一种硝基咪唑并噻嗪特异性硝基还原酶,对重要的双环硝基咪唑类抗结核新药 PA-824 (pretomanid) 前药的激活至关重要^[28, 32, 34-37]; Rv2466c, MTB 氧化应激反应中的一种放线硫醇依赖型硝基还原酶 (mycothiol-dependent nitroreductase, MSH), 其过表达会增加 MTB 野生型和耐药突变株对噻吩嘧啶衍生物类新型抗分枝杆菌药物 TP053 的敏感性,表明 TP053 是由 Rv2466c 激活的前药^[38]; Acg/Rv2032, 一种罕见的 FMN 结合蛋白,是 MTB 的必需毒力因子^[39], acg 的缺失无论是静止和激活的巨噬细胞还是急性和持续性小鼠感染模型中毒力和生长力都会减弱,不能作为 NR 酶还原活化前药,但有可能还原降解呋喃妥因和硝基呋喃类药物^[40]; Rv3131 和 acg 同样属于受控于 DosR 调控子的 48 个基因^[41],是一个含 FMN 结合结构域的硝基还原酶蛋白,可诱导 TLR2 介导促炎细胞因子分泌,有助于 MTB 的肉芽肿形成并影响先天免疫应答^[42],但在以上这些蛋白或基因的研究中没有进行 PNB 的代谢能力测定。而已有的 Lpd 和 NfnB 研究中,多是在大肠杆菌中进行克隆、表达、蛋白纯化后测定的 NR 酶活性。现有文献表明,以 PNB 为底物的体外活性测定是 NR 活性测定的常用方法,但体外检测并不能说明目标蛋白在分枝杆菌内的实际表达情况;同时,已有研究均缺乏 MTB 和 NTM 间的差异性对比及基因替代等确证性实验,因此,难以确定其在 PNB 区分两类分枝杆菌中的作用。

综上所述,分枝杆菌中确定的 PNB 转化 NR 酶,以及两类分枝杆菌对 PNB 敏感性差异产生的原因迄今并未阐明。因为内在共同代谢酶 NR 的关联,PNB 实验可能与分枝杆菌的滞留性、低氧环境应激和抗结核药物的耐药性等重要生物学功能存在相关性。例如,耻垢分枝杆菌中过表达 MTB-LpdC 蛋白可延长其在巨噬细胞内的存活能力^[43]。NfnB 的过度表达是一种新的苯并噻嗪酮类药物耐药机

制,可能在同样靶向 DprE1 的二硝基苯甲酰胺类化合物药物耐药性形成中起作用^[32]。而且分枝杆菌不同菌种间存在的硝基化合物的代谢差异,决定了 BTZ043、TP053 及 PA-824 等抗结核新药应用于不同分枝杆菌菌种的潜力^[32, 44],这与 PNB 区分两类分枝杆菌的原理是相同的。因此,对 PNB 的相关代谢机制存在重要的意义,需要进一步阐明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献 李月:查阅文献、汇总资料、撰写文章初稿;夏辉和李马超:对文章的知识性内容作批评性审阅;王瑞白:指导研究、对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization, 2022.
- [3] Stout JE, Koh WJ, Yew WW. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis*, 2016, 45: 123-134. doi:10.1016/j.ijid.2016.03.006.
- [4] Tsukamura M, Tsukamura S. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by p-nitrobenzoic ACID susceptibility. *Tubercle*, 1964, 45: 64-65. doi:10.1016/s0041-3879(64)80091-x.
- [5] Tsukamura M. The enzymatic reduction of p-nitrobenzoic acid by *Mycobacterium tuberculosis* avium. *Kekkaku*, 1954, 29(10): 388-418.
- [6] Varma-Basil M, Kumar S, Yadav J, et al. A simple method to differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* and Non-tuberculous mycobacteria directly on clinical specimens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2007, 38(1): 111-114.
- [7] 中华医学会结核病科学会, 中国防痨协会, 中华医学会检验学会. 全国结核病细菌学检验规程. 北京: 中华医学会结核病科学会, 中国防痨协会, 中华医学会检验学会, 1984.
- [8] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断细菌学检验规程. *中国防痨杂志*, 1996, 18(2): 127-134.
- [9] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [10] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国结核病流行病学抽样调查办公室. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告. *中国防痨杂志*, 2002, 24(2): 65-108.
- [11] Giampaglia CM, Martins MC, Chimara E, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with p-nitrobenzoic acid using MGIT 960. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11(7): 803-807.
- [12] 崔振玲, 王洁, 黄晓辰, 等. 微量液体培养法快速鉴别分枝杆菌. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(1): 17-20. doi:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2011.01.005.
- [13] Shakoos S, Ahsan T, Jabeen K, et al. Use of p-nitrobenzoic acid in 7H10 agar for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a field study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2010, 14(12): 1644-1646.
- [14] Imperiale BR, Morcillo NS, Palomino JC, et al. Predictive value of direct nitrate reductase assay and its clinical performance in the detection of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis. *J Med Microbiol*, 2014, 63(Pt 4): 522-527. doi:10.1099/jmm.0.070219-0.

- [15] Boum Y 2nd, Orikiriza P, Rojas-Ponce G, et al. Use of Colorimetric Culture Methods for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Sputum Samples in Resource-Limited Settings. *J Clin Microbiol*, 2013, 51 (7): 2273-2279. doi:10.1128/JCM.00749-13.
- [16] Angeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(2): 553-555. doi:10.1128/JCM.40.2.553-555.2002.
- [17] Wang G, Yu X, Liang Q, et al. Evaluation of a Simple in-House Test to Presumptively Differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Nontuberculous Mycobacteria by Detection of p-Nitrobenzoic Acid Metabolites. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80877. doi:10.1371/journal.pone.0080877.
- [18] 魏国梅, 王桂荣, 姜广路, 等. 分光光度计鉴别结核与非结核分枝杆菌的研究. *继续医学教育*, 2019, 33(4): 133-135. doi:10.3969/j.issn.1004-6763.2019.04.074.
- [19] 余旭良, 徐礼锋, 祝进, 等. 99 株非结核分枝杆菌菌种鉴定和药敏结果分析. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(20): 3580-3582.
- [20] 邓建平, 王斌, 白锐, 等. 2011—2018 年四川省自贡市分枝杆菌临床分离株鉴定分析. *疾病监测*, 2019, 34(4): 338-343. doi:10.3784/j.issn.1003-9961.2019.04.013.
- [21] 吴龙章, 潘美玉, 刘欣, 等. 结核分枝杆菌对对硝基苯甲酸耐药性的研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(2): 117-119. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2011.02.012.
- [22] Sharma B, Pal N, Malhotra B, et al. Evaluation of a Rapid Differentiation Test for *Mycobacterium Tuberculosis* from other Mycobacteria by Selective Inhibition with p-nitrobenzoic Acid using MGIT 960. *J Lab Physicians*, 2010, 2(2): 89-92. doi:10.4103/0974-2727.72157.
- [23] Tsai CS. Nitroreductase activity of heart lipoamide dehydrogenase. *Biochem J*, 1987, 242(2): 447-452. doi:10.1042/bj2420447.
- [24] Bauer SL, Howard PC. Kinetics and cofactor requirements for the nitroreductive metabolism of 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene by rabbit liver aldehyde oxidase. *Carcinogenesis*, 1991, 12(9): 1545-1549. doi:10.1093/carcin/12.9.1545.
- [25] Rafii F, Cerniglia CE. Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. *Environ Health Perspect*, 1995, 103 Suppl 5(Suppl 5): 17-19. doi:10.1289/ehp.95103s417.
- [26] Marcinkeviciene J, Blanchard JS. Catalytic Properties of Lipoamide Dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 340(2): 168-176. doi:10.1006/abbi.1997.9926.
- [27] Tsai CS. Kinetic studies of multifunctional reactions catalysed by lipoamide dehydrogenase. *Int J Biochem*, 1980, 11(5): 407-413. doi:10.1016/0020-711x(80)90311-0.
- [28] Rafii F, Hehman G, Lunsford P. Purification and characterization of an enzyme from *Mycobacterium* sp. Pyr-1, with nitroreductase activity and an N-terminal sequence similar to lipoamide dehydrogenase. *Arch Microbiol*, 2001, 176(5): 381-385. doi:10.1007/s002030100337.
- [29] Rafii F, Selby AL, Newton RK, et al. Reduction and mutagenic activation of nitroaromatic compounds by a *Mycobacterium* sp [published correction appears in *Appl Environ Microbiol* 1995 Apr; 61(4): 1677]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(12): 4263-4267. doi:10.1128/aem.60.12.4263-4267.1994.
- [30] Rajashankar KR, Bryk R, Kniewel R, et al. Crystal structure and functional analysis of lipoamide dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2005, 280(40): 33977-33983. doi:10.1074/jbc.M507466200.
- [31] Parkinson GN, Skelly JV, Neidle S. Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B; a pro-drug-activating enzyme. *J Med Chem*, 2000, 43(20): 3624-3631. doi:10.1021/jm000159m.
- [32] Manina G, Bellinzoni M, Pasca MR, et al. Biological and structural characterization of the *Mycobacterium smegmatis* nitroreductase NfnB, and its role in benzothiazinone resistance. *Mol Microbiol*, 2010, 77(5): 1172-1185. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07277.x.
- [33] 丁朋举. 分枝杆菌系统进化及其硝基还原酶基因克隆表达. 郑州: 河南工业大学, 2013.
- [34] 张福真. 分枝杆菌脱氮黄素依赖性硝基还原酶活化 PA-824 的关键位点鉴定. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [35] Haver HL, Chua A, Ghode P, et al. Mutations in Genes for the F₄₂₀ Biosynthetic Pathway and a Nitroreductase Enzyme Are the Primary Resistance Determinants in Spontaneous *In Vitro*-Selected PA-824-Resistant Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(9): 5316-5323. doi:10.1128/AAC.00308-15.
- [36] Cellitti SE, Shaffer J, Jones DH, et al. Structure of Ddn, the Deazaflavin-Dependent Nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Bioreductive Activation of PA-824. *Structure*, 2013, 21(1): 191. doi:10.1016/j.str.2012.12.012.
- [37] Taylor RM, Baniulis D, Burritt JB, et al. Analysis of Human Phagocyte Flavocytochrome b₅₅₈ by Mass Spectrometry. *J Biol Chem*, 2006, 281(48): 37045-37056. doi:10.1074/jbc.M607354200.
- [38] Albesa-Jové D, Chiarelli LR, Makarov V, et al. Rv2466c Mediates the Activation of TP053 To Kill Replicating and Non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(7): 1567-1575. doi:10.1021/cb500149m.
- [39] Chauviac FX, Bommer M, Yan J, et al. Crystal Structure of Reduced MsAcp, a Putative Nitroreductase from *Mycobacterium smegmatis* and a Close Homologue of *Mycobacterium tuberculosis* Acp. *J Biol Chem*, 2012, 287(53): 44372-44383. doi:10.1074/jbc.M112.406264.
- [40] Hu Y, Coates AR. *Mycobacterium tuberculosis* acg Gene Is Required for Growth and Virulence In Vivo. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20958. doi:10.1371/journal.pone.0020958.
- [41] Shiraz M, Lata S, Kumar P, et al. Immunoinformatics analysis of antigenic epitopes and designing of a multi-epitope peptide vaccine from putative nitro-reductases of *Mycobacterium tuberculosis* DosR. *Infect Genet Evol*, 2021, 94: 105017. doi:10.1016/j.meegid.2021.105017.
- [42] Peddireddy V, Doddam SN, Qureshi IA, et al. A putative nitroreductase from the DosR regulon of *Mycobacterium tuberculosis* induces pro-inflammatory cytokine expression via TLR2 signaling pathway. *Sci Rep*, 2016, 6: 24535. doi:10.1038/srep24535.
- [43] Venugopal A, Bryk R, Shi S, et al. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* depends on lipoamide dehydrogenase, a member of three multienzyme complexes. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(1): 21-31. doi:10.1016/j.chom.2010.12.004.
- [44] Buchieri MV, Cimino M, Rebollo-Ramirez S, et al. Nitazoxanide Analogs Require Nitroreduction For Antimicrobial Activity in *Mycobacterium smegmatis*. *J Med Chem*, 2017, 60(17): 7425-7433. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00726.

(收稿日期: 2023-06-05; 网络出版日期: 2023-08-02)

(本文编辑: 范永德)