

國內外新知

快速偵測肺結核菌對rifampin的抗藥性

編輯部

Rifampin是治療結核病最常用之第一線藥物，並且能有效殺死結核桿菌的藥物。但廣泛使用的結果導致抗藥性菌株的增加，不僅導致治療失敗，並且增加篩選出多重抗藥性結核菌的機會。傳統結核菌之藥物感受性試驗最快需時兩週，通常醫師在得知結果之前已予治療，更助長了抗藥性菌株的產生。多重抗藥性結核菌的高致死率、高傳染力，突顯出發展快速鑑定結核桿菌抗藥性方法的重要性，特別是針對第一線藥物rifampin及INH。

近年來由於分子生物技術的發展，利用聚合酶連鎖反應（PCR）增幅病原菌遺傳物質DNA，不僅用於直接偵測病原菌存在與否，亦可用於研究抗藥性發生的機轉，進而偵測臨床菌株產生抗藥性的情形，提供臨床醫師用藥前的參考。

Rifampin是作用在RNA聚合酶的 β subunit、 β subunit與rifampin結合後構形改變，在RNA合成的起始階段阻撓核苷酸加上，因而抑制RNA的合成。對rifampin產生抗藥性的菌株可能是由於RNA聚合酶構形改變使得rifampin無法結合上去。這些具rifampin抗藥性的結核菌菌株的RNA polymerase β subunit的結構基因（rpoB）大都具有突變，並且集中於其中157個base pairs。這段DNA已選殖出並且定序用以設計了一對引子，利用這對

引子先作PCR增幅這DNA片段，再篩選是否產生突變。這些方法包括使用放射性同位素的PCR-SSCP（polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism）、dideoxy fingerprinting（ddF）及不需放射性同位素的PCR-heteroduplex formation assay（PCR-HDF）、line probe assay等等。在此介紹PCR-SSCP用以篩選具rifampin抗藥性肺結核桿菌是否產生突變的方法。

PCR-SSCP是一種偵測突變的方法，1993年Telengi等人首先應用於研究肺結核桿菌的抗藥性，將以上所述PCR增幅後之157 base pairs長的DNA片段加熱變性（變為單股DNA），急速冷卻以維持單股DNA的二級結構，再用聚合乙醯凝膠（polyacrylamide gel）跑電泳、野生形、突變型由於核苷酸不盡相同造成構形不同，跑電泳時快慢不一，在凝膠上的位置就不同，藉此可區分出野生型或突變型。實驗結果發現，56株不具rifampin抗藥性菌株皆無突變發生，反之，66株具rifampin抗藥性菌株中有64株有突變發生。其中兩個胺基酸（His₅₂₆及Ser₂₃₃）的突變就佔全部的61%。這些結果都有DNA定序加以證實。利用PCR-SSCP篩選具rifampin抗藥性肺結核桿菌是否產生突變，是一個快速且敏感度高的方法，是減少多重抗藥性結

核菌產生的一線希望。

〔譯者評〕雖然國內公共衛生已奠定良好基礎，但結核病仍是困擾國人健康的一大問題。尤其國人用藥習慣不良，更有利於抗藥性菌株的產生。發展快速鑑定結核桿菌抗藥性的方法是刻不容緩的。將PCR-SSCP方法應用於研究肺結核桿菌的抗藥性，是值得評估的嘗試。PCR-SSCP的優點是敏感度高、快速（平均48至72小時可完成），一次可篩選許多菌株。但缺點是需要利用放射性同位素，無論儲存或操作，對臨床實驗室都是一個很大的問題。另外，基因的突變並不一定造成胺基酸的改變，即使改變也並不一定影響抗藥性，所以可能有偽陽性的結果。雖然，目前所有的報告看起來，在這一段DNA產生突變與抗藥性有明顯的關係，不過，我們仍然需要評估我

們自己的菌株，以確定偽陽性不致太多，而對臨床有所助益。（黃采菽摘評）

參考文獻

1. Saiki RR, Walsh PS, Levenson CH, et al: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 6230-4.
2. Saikar G, Yoon HS, Sommer SS: Dideoxy fingerprinting (ddF): a rapid and efficient screen for the presence of mutations. Genomics 1992; 13: 441-3.
3. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al: Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993; 341: 647-50.
4. Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 2380-6.
5. Kim BJ, Kim SY, Park BM, et al: Mutations in rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single stranded conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. J clin Microbiol 1997; 35: 492-4.