

结核分枝杆菌分子生物学分型技术研究进展

陈建

【关键词】 结核分枝杆菌；生物学分型

Progress on the study of biological typing on *Mycobacterium tuberculosis* CHEN Jian. Department of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Biological typing

结核病是全球严重威胁人类健康的重大传染病之一，耐药结核，特别是耐多药结核患者逐年增多，致使全球结核病的流行形势非常严峻。分子生物学技术在结核分枝杆菌主要流行菌株的确定、耐药性监测、结核病感染、暴发以及传染源追踪等方面是十分有效的检测手段。结核分枝杆菌分型鉴定技术主要分为非核酸法和核酸法。传统的分型方法即核酸法主要指从细菌的表型特征上认识细菌，其主要技术或方法有噬菌体分型、血清分型、药物敏感试验分型、细胞蛋白电泳、生物化学多样性分析、多位点酶电泳等。但由于结核分枝杆菌菌株具有高度同源性，这些技术或方法在结核分枝杆菌分型鉴定中存在诸多缺陷，很难被广泛应用。随着分子生物学技术的发展，一些以分子生物学方法为基础的技术或方法逐步应用到结核分枝杆菌的分型研究中，在结核分枝杆菌的分型鉴定中被广泛应用，为结核分子流行病学研究展现了广阔的前景^[1,2]。

1. DNA 指纹图谱 (DNA fingerprinting) 分析: 1984 年英国莱斯特大学的遗传学家 Jefferys 等首次将分离的人源小卫星 DNA 用作基因探针，同人体核 DNA 的酶切片段杂交，获得了由多个位点上等位基因组成的长度不等的杂交带图纹，这种图纹极少有两个人完全相同，故称为“DNA 指纹”，如同人的指纹一样是每个人所特有的。DNA 指纹图谱开创了 DNA 多态性检测的多种方法，如限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析、串联重复序列分析、随机扩增多态性 DNA 分析等。这些分析方法均以 DNA 的多态性为基础，产生具有高度个体特异性的 DNA 指纹图谱。近几年来，DNA 指纹图谱分型方法也广泛用于结核分枝杆菌的分型鉴定。该方法首先将经过纯化的结核分枝杆菌染色体 DNA 用限制性内切酶消化后，通过琼脂糖凝胶电泳分离，然后将限制性酶切片段转移到纤维素膜上，与带标记的已知 DNA 探针杂交，最后检测与探针同源的限制性酶切片段的数目和大小的变化。由于每个菌株所呈现的指纹图谱型是特异的，所以可以进行菌株的分型鉴定。目前结核分枝杆菌 DNA 指纹图谱分析方法普遍采用插入序列 (insertion sequence, IS) 或其他重复序列作为分型的标志，包括 IS6110、IS1081、同向重复 (DR) 和多

态性富含 GC 重复序列 (polymorphic GC repeat sequence, PGRS) 等，其中应用最广泛的是 IS6110^[3]。

(1) IS6110 指纹图谱分型方法: 插入片段 IS6110 是结核分子流行病学研究使用最广泛的标志物，因为 IS6110 具有较高的分辨能力；IS6110 序列含有 1355 bp 的核苷酸和 28 bp 的反向末端重复序列，属于 IS3 家族的一个成员^[4]。它只存在于结核分枝杆菌复合群中，而且在结核分枝杆菌不同亲本的菌株中 IS6110 的拷贝数和染色体位置是高度变异的，但在菌株传播期间并能保持稳定，即使在细菌产生抗药性的过程中 IS6110 也不会发生变化。所以该方法广泛用于结核病流行病学研究，如结核病暴发和流行调查、人群中的耐药菌株的传播及播散、鉴别新近获得的感染和内源性复燃以及检查可疑的实验室交叉污染等^[5]。例如在美国旧金山和纽约的研究中，用 IS6110 对结核分枝杆菌进行分子生物学分型，结果显示造成结核病发病率上升的主要原因是新近获得性感染，而不是潜伏感染的复发^[6]。自从 van Embden 等^[7]在 1993 年推荐标准结核分枝杆菌 RFLP 分析方法后，该方法已在国际上得到广泛的认同与应用，使全球范围内结核分枝杆菌菌株水平鉴定和结果的比较成为可能。虽然该方法具有很强的鉴别菌株能力，但是这种方法对于 IS6110 拷贝数少或无 IS6110 的菌株难以进行结核分枝杆菌菌株水平的鉴定，而且在实验中需进行 Southern 杂交，操作较为繁琐，大片段杂交带识别相对较困难，出结果周期较长。

(2) RFLP 分析: 是 DNA 指纹图谱分析中常用的方法，该技术是利用限制性内切酶能识别 DNA 分子的特异序列，并在特定序列位点切开 DNA 分子，即产生限制性片段的特性。对于不同种群的生物个体而言，它们的 DNA 序列存在差别。当用同一种限制性内切酶切割不同物种 DNA 序列时，产生数目和长度不同的限制性酶切片段；然后将这些片段电泳、转膜、变性，与标记过的探针进行杂交、洗膜，便可分析其 DNA 片段多态性^[8,9]。该方法是最早使用于基因分型方法之一。在结核病研究中，结核分枝杆菌基因组 DNA 片段有一定的特征，而重复序列是导致结核分枝杆菌染色体 DNA 多态性的主要原因。结核病分子流行病学研究中广泛应用两类重复 DNA 片段：一类是 IS，它可在基因组内移动，片段长度大约 1300 bp；另一类是重复 DNA，该片段大小变化较大，一般在 3~36 bp。据推测 IS 相关的 DNA 多态性是由于 IS 可随机移动到基因组的任意位置所致^[10]。对 DR 区域的研究发现，小片段的重复序列促进基因重排，IS6110 存在于大多数结核分枝杆菌菌株的 DR 区域内，可能还涉及 DR 同源重组以及 IS6110 插入序列造成重排^[11]。DR 位点包括多

个高度保守的 DR 序列和一些散在分布的非重复间隔序列。不同菌株的 DR 序列数量不同,而且存在或缺失某些间隔序列。这些特征有助于解释其他小重复序列相关的 DNA 多态性。这些小重复序列包括 PGRS、主要多态性的串联重复序列(major polymorphic tandem repeat, MPTR) 以及 GTG 重复序列^[12]。所以通过限制性内切酶切结核分枝杆菌 DNA 片段,然后电泳分离,结果形成结核分枝杆菌 DNA 指纹图谱。该方法的优点是数据多态性信息量大,重现性好,具有高分辨能力,图谱相对比较稳定的特点。但是操作技术复杂,周期长,费用相对较高;分离菌株染色体 DNA 经 RFLP 分析后,在琼脂糖凝胶上产生数百个条带难以区分,而且有的条带未显出或相互重叠,鉴别菌株类型难度较大^[13]。

2. 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型:PFGE 是在恒压电场琼脂糖电泳的基础上发展起来的分离技术。该方法采用切割基因组 DNA 稀有位点的限制性内切酶,产生少量较大的 DNA 片段,在电泳过程中交替改变电场,使其能够分离大分子的 DNA 片段。结核分枝杆菌染色体的 DNA G+C 含量高,采用 Dra I、Xba I 和 Spe I 等内切酶识别含腺嘌呤和胸腺嘧啶的序列位点进行,大片段的酶切 DNA 片段通过低浓度的琼脂糖凝胶在脉冲场电泳中便得到分离^[14]。Zhang 等^[15]用 PFGE 将 26 株结核分枝杆菌临床分离株分为不同类型,其结果与 IS6110 分型方法得出的结果基本一致。该方法与 IS6110-RFLP 操作一样,需要大量的结核分枝杆菌的 DNA,但用 PFGE 分型技术,只产生少量大的染色体限制性片段,带型较少,分离结果易解释,分辨率高,重复性好,即使结核分枝杆菌经过 10 次传代培养后仍可获得同样的 PFGE 带型,而且还不需要特异性探针,避免了放射性污染。据报道,其辨别能力与 IS6110 标准方法无明显差异,该技术主要用于 IS6110 拷贝数较少的结核分枝杆菌的分型,并已在结核暴发调查的传染源追踪和传播途径的确定等方面起到了重要的作用^[16]。但是,这种方法的缺陷之一是在于检测小的遗传变化较困难,少数菌株 DNA 不明原因降解,造成分型困难,其次是标本处理时间长,并且需要专门的电泳设备和特殊的仪器。因此,该方法在结核分枝杆菌菌株鉴定方面的广泛应用受到一定限制。

3. 以 PCR 技术为基础的分型方法:PCR 分型方法针对结核分枝杆菌基因组 DNA 上的特征片段,如 IS6110、DR、16S rDNA 等设计特异的引物后进行多种形式的 PCR 扩增,通过电泳分离,而呈现结核分枝杆菌 DNA 指纹图谱。以 PCR 为基础的分型方法只需少量的模板,从临床分离标本中获取的样本含量就能满足要求,而且不需要进行细菌纯化和培养,简单而快速,但特异性不如 RFLP 方法。该分型方法是对 RFLP 和 PFGE 方法的有效补充。

(1) PCR 分型:利用 PCR 技术扩增待研究菌株的目的基因,然后将扩增产物经电泳分离后再与特异的探针杂交,最后通过检测杂交结果完成对结核分枝杆菌的分型。该方法是应用 IS6110 和多态性串联重复(MPTR)引物半巢式扩增,

再与 IS6110 特异的寡核苷酸探针杂交后,能够产生一种扩增产物谱型将结核分枝杆菌菌株分组。该方法稳定性好,简单快速,但分辨力较差^[17]。Plikaytis 等^[18]在结核分枝杆菌的研究中,应用该方法扩增分析 rRNA 基因后进行鉴别,并区分人型和牛型结核分枝杆菌取得了较好的分型效果。这是由于人型结核分枝杆菌含有较多的 IS6110,其扩增产物可与 IS55 探针杂交,人型结核分枝杆菌呈杂交阳性;而牛型结核分枝杆菌只含低拷贝的 IS6110,其杂交后呈阴性反应,结果将两种结核杆菌鉴别并区别开来。

(2) Spoligotyping(间隔寡核苷酸)分型:Spoligotyping 分型是一种以 PCR 为基础,基于结核分枝杆菌复合群中染色体区域 DR 序列的分型方法。该序列是一含有 36 bp 核苷酸短的重复序列,集中于染色体一个特殊区域,DR 之间常被一些不同的间隔序列分开,这些间隔序列的长度和碱基序列不同。DR 序列特异存在于结核分枝杆菌复合群中,最多可达 50 个拷贝,DR 之间的非重复间隔序列目前已发现 43 种。DR 及相邻的间隔序列合称为直接可变重复单位。根据不同间隔序列设计出各自特异的寡核苷酸探针,与结核分枝杆菌染色体的 DRS 作为靶序列扩增 DNA 进行反向杂交,根据杂交显色后,检测到不同指纹图谱,然后进行结核分枝杆菌的分型。Spoligotyping 方法基于重复序列的 PCR 扩增,利用结核分枝杆菌的 DNA 指纹分析结核分枝杆菌复合群的结构特征并进行聚类分析。根据成簇和成簇率较高的菌株,同时结合流行病学研究中发现某些特定的结核分枝杆菌的传播能力强于其他菌株,便可判断为当地的主要流行菌株型。van Soolingen 等^[19]采用 Spoligotyping 分型方法对中国和蒙古国的结核分枝杆菌标准 DNA 指纹构建的研究中发现,“北京家族”菌株是两国主要流行菌株。国内外其他学者也采用 Spoligotyping 方法进行了结核分枝杆菌流行菌株的分型鉴定,同样也揭示了“北京家族”是具有一定特征性的 DNA 指纹图谱而且是一种流行非常广泛,传播力极强的结核分枝杆菌家族^[20]。Spoligotyping 分型方法的优点在于分辨力强,操作简单、快速,结果稳定和重复性好。它在“北京家族”的分型鉴定上有着独特的优势。

(3) 随机引物 PCR 分型:随机引物 PCR 分型是用一条人工合成的寡核苷酸引物对整个 DNA 链进行探测,扩增出特异的 DNA 片段。如果 DNA 链之间存在差异,所产生的 DNA 片段数量及长度就会不同,经电泳将这些产物分开后,可得到多态性很好的 DNA 指纹图谱,进而分型鉴定。Welsh, McClelland^[21]和 Williams 等^[22]于 1990 年建立了该分型方法并获得了 DNA 的多态性指纹图谱。它与其他指纹分型方法相比,该方法特异性高,无放射性污染,简便而快速、需要模板量少(10~25 ng)以及费用较低等特点,目前已显示出很好的应用前景。据报道,该技术在研究结核分枝杆菌遗传多态性方面已取得了较好的效果^[23];并作为一个重要的分型鉴定技术在结核病爆发性流行的调查和疫情监测中发挥着作用^[24]。但是这种方法仍存在着明显的缺陷,其结

果的稳定性和可重复性较差,且对模板的要求较高,而且在不同实验条件下有一定差异,在不同实验室所得到的结果缺乏可比性。由于存在这些缺陷,不少学者进行了反复摸索,已使这种方法得到了进一步的改进,取得了较好的实验效果^[25]。

(4) PCR 单链构象多态性(PCR-SSCP)分析:PCR-SSCP 是在 1989 年由 Orita 等^[26]首先报道的一种 PCR 扩增产物的单链 DNA 凝胶电泳技术,现在已在基因突变和 DNA 多态性的检测和筛查方面得到了最广泛的应用。该方法是将 PCR 产物经变性后,部分或全部裂解为两条互补的单链 DNA,长短不同及空间构型各异的 DNA 片段经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,由于其迁移率的差别,在凝胶上呈现出不同的带型,将其与野生型标准株对照,可以非常敏感的将野生型和突变型菌株在分子构象上的差异分离开来。该方法灵敏度高,稳定性好,简单快速。Tokue 等^[27]采用 PCR-SSCP 方法对不同类型的分枝杆菌鉴别取得了好的效果;但是该方法目前主要应用于结核杆菌耐药基因的检测,例如 Pretorius 等^[28]利用该技术检测了 120 株耐 RFP 的临床分离株,结果显示 95% 的耐 RFP 菌株发生了 *rpoB* 基因突变。但是该方法也存在某些缺点,一是它只能作为突变检测方法,要最后确定突变的位置和类型还需要进一步测序;在操作中电泳条件要求较严格,而且 SSCP 是依据点突变引起单链 DNA 分子立体构象的改变实现电泳分离,当某些位点突变对单链 DNA 分子立体构象的改变较小时,常常会出现电泳无法分辨造成漏检。所以该方法广泛应用于结核分枝杆菌分型还有待进一步研究。

(5) 混合接头 PCR:混合接头 PCR 是 IS6110-RFLP 之后不久发展的一种 RFLP 快速分型技术,也是以 IS6110 片段多态性为基础。该方法是用限制性酶 Hha I 消化 DNA。Hha I 是专门识别 4 bp 的限制性酶,比 Pvu II 产生更多的短片段,更适合做 PCR。形成的所有片段均有 3' 端,可与具有互补的 5' 端的接头结合。而且这个双链接头包含一个引物位点,针对该接头的引物可与该位点结合。接头具有 U 碱基对而非 T 碱基对,因此称为“混合接头”。通过用尿嘧啶-N-糖苷酶(UNG)去掉 U 碱基对,接头引物在 PCR 的第一个循环中将不能结合。另一个引物是针对 IS6110 3' 端的 IS6110 特异的引物,但由于接头引物不能结合,所以选择单链片段进行扩增^[29],然后同样以琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物。如果使用荧光标记物,可用计算机高度精确地计算出 bp 数^[30]。该方法非常可靠,重复性很好,与传统的 IS6110-RFLP 相比检测速度快,但比其他以 PCR 基础的方法要慢。混合接头 PCR 已成功地用于鉴别结核分枝杆菌分离株,并用于研究结核分枝杆菌中 IS6110 插入位点的流行率^[31],而且该技术成功地区分了多次结核暴发中的耐多药结核分离株^[30];目前尚未应用于大范围的结核流行病学研究。

4. 可变数目串联重复序列(VNTR)分型法:是一种在高等真核生物的基因分型中极有价值的研究方法。该分型方

法建立在数目可变的 VNTR 之上,被检测的菌株根据散在于基因组中不同独立位点的 VNTR 重复单元拷贝数的多少来进行数码编码,然后根据每个菌株的数字编码的不同,利用相关软件通过计算机来对这些菌株进行自动分型^[32]。结核分枝杆菌全基因组中存在一种散在分布的分枝杆菌间隔重复单元(mycobacterial interspersed repetitive units, MIRU)的 VNTR,基因组分析揭示在结核分枝杆菌 H37Rv 基因组存在的 41 个 MIRU 中有 12 个相当于人类微卫星样 VNTR 区域^[33]。Mazars 等^[34]对 72 株不同结核分枝杆菌分离株的 12 个位点进行分型研究发现,这些菌株的 12 个位点可鉴定出 2~8 个 MIRU VNTR 等位基因,相当于 1600 万种不同组合,其分辨率接近 IS6110 RFLP,而且 MIRU VNTR 分型结果与 IS6110 RFLP 高度相关。

VNTR 方法操作简单,并能提供数字式的分型信息,具有很高的可重复性,在实验室内和实验室间具有非常好的可比性,可以同时大量样本进行分析。这种分型方法为结核病分子流行病学研究和建立全球数字化数据库开辟了新的途径^[35]。

5. DNA 序列分析:是利用 PCR 扩增结核分枝杆菌 DNA 序列,以荧光素为标记物,然后用测序仪进行测序,根据检测的结果便可将待测菌株进行分型鉴定。该方法主要用于细菌基因突变的检测,而且能够确定其突变的部位与性质,是检测基因突变的决定性方法。Brown 等^[36]采用 DNA 序列分析对土耳其等国结核病暴发收集菌株分析,不仅可了解暴发菌株的基因型突变,还识别了耐药类型。在 1998 年 Escalante 等^[37]采用该技术对结核分枝杆菌分析鉴定出耐药基因和耐药类型。Bartfai 等^[38]利用该方法检测了 29 株用比例法测定为耐 RFP 的临床分离株,结果显示 27 株结核分枝杆菌发生了 *rpoB* 基因突变,其中 26 株突变发生在 507~588 位编码 27 个氨基酸密码子的 81 bp 的区域,1 株突变发生在 N 端,其余 3 株未发生突变。目前 DNA 序列分析在结核病研究方面主要用于耐药结核分枝杆菌分型研究^[39],该技术出结果较快,检测结果准确。但对每一菌株来说,要测定所有已知的 DNA 突变部位,需要多次反应,费用昂贵,工作量很大,在实际应用中受到一定的限制,目前仅限于少量研究性实验室中开展工作^[40]。

6. 基因芯片技术分型:基因芯片技术在 20 世纪 90 年代初由美国 Affymetrix 公司的 Fodor 博士提出并开始相关的研究^[41]。该技术是将大量不同的生物信息分子如寡核苷酸、DNA 或 cDNA 探针等与互补的靶核苷酸序列杂交,通过随后的荧光信号强度的检测进行定性分析与定量分析。基因芯片在一微小的基片表面集成了大量的分子识别探针,能够在同一时间内平行分析大量的基因,进行大信息量的筛选与检测分析^[42]。该方法一旦用于结核分枝杆菌分型鉴定,就可以大大减少实验时间,快速检测大量生物样品,而且需要的 DNA 量少,自动化程度也相当的高。通过在芯片上分析结核分枝杆菌 DNA 的杂交情况,可同时检测不同基因位点的

基因变异^[43]。基因芯片技术可以快速准确鉴定结核分枝杆菌种群。1999 年 Behr 等^[44]通过基因芯片技术对结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌和卡介苗的基因组进行杂交试验比较,证实卡介苗缺失与结核分枝杆菌 H37Rv 致病相关区域,包含 91 个开放读码框(ORF)的 H37Rv 的 11 个区域在致病牛型结核分枝杆菌中缺乏,而代表 38 个 ORF 的另外 5 个区域牛结核分枝杆菌中存在,在一些 BCG 株中缺乏。DNA 芯片是一种有前景的工具,芯片技术原则上可使分子分型在一次试验的不同进化水平上同时进行,是目前分子生物学最前沿的方法,受到了国内外学者的普遍关注。但是该技术目前主要用于耐药基因型的鉴定^[45]。尤其在抗结核药利福平耐药检测方面应用广泛,而且具有很好的敏感性和特异性^[46,47]。相信在不远的将来,基因芯片技术将会作为一种简便、快捷的新技术应用于结核分枝杆菌分型鉴定,为有效预防和控制结核病发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Viader-Salvado JM, Luna-Aguirre CM, Reyes-Ruiz JM, et al. Frequency of mutations in rpoB and codons 315 and 463 of katG in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Northeast Mexico. *Microb Drug Resist*, 2003, 9(1): 33-38.
- [2] Agdamag DM, Kageyama S, Solante R, et al. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to drugs and detection of rpoB mutation in multidrug-resistant tuberculosis in the Philippines. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7(11): 1104-1108.
- [3] Radhakrishnan I, Manju YK, Kumar RA, et al. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:1683.
- [4] Spurgiesz RS, Quitugua TN, Smith KL, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by using nine novel variable-number tandem repeats across the Beijing family and low-copy-number IS6110 isolates. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(9): 4224-4230.
- [5] Yeo IK, Tannenbaum T, Scott AN, et al. Contact investigation and genotyping to identify tuberculosis transmission to children. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25(11): 1037-1043.
- [6] Agerton TB, Valway SE, Blinkhorn RJ, et al. Spread strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* across the United States. *Clin Infect Dis*, 1999, 29(1): 85-92.
- [7] van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(2): 406-409.
- [8] Warren RM, Sampson SL, Richardson M, et al. Mapping of IS6110 flanking regions in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* demonstrates genome plasticity. *Mol Microbiol*, 2000, 37(6): 1405-1416.
- [9] Gillespie SH, Dickens A, McHugh TD. False molecular clusters due to nonrandom association of IS6110 with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(6): 2081-2086.
- [10] Fomukong N, Beggs M, El Hajj H, et al. Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains, low and high copy number of IS6110. *Tuberc Lung Dis*, 1997, 78(2): 109-116.
- [11] Groenen PML, Bunchoten AE, Soolingen D, et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: application for strain differentiation by a novel method. *Mol Microbiol*, 1993, 105: 1057-1065.
- [12] Cowan LS, Mosher L, Diem L, et al. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(5): 1592-1602.
- [13] Goulding JN, Stanley J, Saunders N, et al. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1121-1126.
- [14] Kam KM, Yip CW, Tse LW, et al. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 306-313.
- [15] Zhang Y, Mazurek GH, Cave MD, et al. DNA polymorphism in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analysed by pulsed field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(6): 1551-1556.
- [16] Singh SP, Salamon H, Lahti CJ, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1927-1931.
- [17] Mokrousov I, Otten T, Vyazovaya A, et al. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003, 22(6): 342-348.
- [18] Plikaytis BB, Eisenach KD, Crawford JT, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. *Mol Cell Probes*, 1991, 5(3): 215-219.
- [19] van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(12): 3234-3238.
- [20] Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(8): 843-849.
- [21] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [22] Williams JG, Kubeilk AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [23] Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis*, 2002,

- 8(11):1347-1349.
- [24] Harn HJ, Shen KL, Ho LI, et al. Evidence of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei city, Taiwan. *J Clin Pathol*, 1997, 50(6):505-508.
- [25] Eldholm V, Matee M, Mfinanga SG, et al. A first insight into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Dares Salaam, Tanzania, assessed by spoligotyping. *BMC Microbiol*, 2006, 6(10):76-79.
- [26] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5(4):874-879.
- [27] Tokue Y, Sugano K, Noda T, et al. Identification of mycobacteria by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1995, 23(4):129-133.
- [28] Pretorius GS, Sirgel FA, Schaaf HS, et al. Rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* — rapid detection and implications in chemotherapy. *S Afr Med J*, 1996, 86(1):50.
- [29] Haas WH, Butler WR, Woodley CL, et al. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(5):1293-1298.
- [30] Butler WR, Haas WH, Crawford JT. Automated DNA fingerprinting analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(7):1801-1803.
- [31] Burger M, Raskin S, Brockelt SR, et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex culture isolates collected in Brazil and spotted onto filter paper. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(2):573-576.
- [32] Kovalev SY, Karnaev EY, Kravchenko MA, et al. Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005, 9(7):746-752.
- [33] Skuce RA, McCorry TP, McCarrill JF, et al. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, 2002, 148(2):519-528.
- [34] Mazars P, Lesjean E, Vincent S, et al. Variable human minisatellite like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*, 2000, 36:762-771.
- [35] Sola C, Ferdinand S, Mammina C, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(4):1559-1565.
- [36] Brown TJ, Tansel O, French GL. Simultaneous identification and typing of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by analysis of *pncA* and *rpoB*. *J Med Microbiol*, 2000, 49(7):651-656.
- [37] Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, et al. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis*, 1998, 79(2):111-118.
- [38] Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, et al. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(10):3736-3739.
- [39] Allix C, Walravens K, Saegerman C, et al. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(6):1951-1962.
- [40] Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol*, 2002, 10(1):45-52.
- [41] Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide assay for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(11):5022-5026.
- [42] Mostrem P, Gordon M, Sola C, et al. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*, 2002, 8(11):694-704.
- [43] Gingeras TR, Ghandour G, Wang F, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res*, 1998, 8(5):435-448.
- [44] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarrays. *Science*, 1999, 284(5419):1520-1523.
- [45] Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem*, 2001, 47(5):809-814.
- [46] 景奉香, 胡忠义, 孙悦, 等. 用 DNA 芯片快速检测结核分枝杆菌对利福平的耐药性. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(9):551-554.
- [47] Tillib SV, Strizhkov BN, Mirzabekov AD. Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Anal Biochem*, 2001, 292(1):155-160.

(收稿日期:2007-08-17)

(本文编辑:尹廉)