

# MIRU-VNTR 和 Spoligotyping 用于重庆地区 210 株儿童结核分枝杆菌临床分离株的基因分型

刘芮汐 李奇志 幸琳琳 彭哲 朱朝敏

**【摘要】** 目的 评价间隔区寡核苷酸分型 (Spoligotyping) 和基于结核分枝杆菌散在分布数目可变串联重复序列分析 (MIRU-VNTR) 方法在重庆地区儿童结核病分子流行病学中的应用。方法 收集重庆地区 210 株儿童结核分枝杆菌 (MTB) 临床分离株, 应用上述两种分型方法进行比较分析。结果 采用 Spoligotyping 分型方法, 210 株菌可分为 2 个基因群 44 种基因型, 其中最大的 1 个基因群即北京家族 (北京基因型) 含有 130 株菌 (61.90%)。采用 MIRU-VNTR 分析发现 24 个位点的多态性差异较大, 不同 MIRU 位点组合 (12、15 和 24 位点) 的分辨率指数依次升高, 后两个组合的差异是由位点 ETR-B 引起。各位点和各位点组合在北京家族菌株中的分辨率指数均高于非北京家族菌株。结论 重庆地区儿童 MTB 具有明显的基因多态性, 其主要流行型为北京家族。在结核病原学监测中, 可先采用 Spoligotyping, 再对成簇菌株进行 15 位点与 ETR-B 组合二次分型的联合分型策略, 可提高分子流行病学调查效果。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 北京基因型; 数目可变串联重复序列; 间隔区寡核苷酸分型; 儿童

**Genotyping of 210 *Mycobacterium tuberculosis* strains with Spoligotyping and MIRU-VNTR among pediatric tuberculosis patients in Chongqing** LIU Rui-xi, LI Qi-zhi, XING Lin-lin, PENG Zhe, ZHU Chao-min. Division of Infectious Disease and Gastroenterology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Developmental Disease in Childhood Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, CSTC2009CA5002; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China

Corresponding author: ZHU Chao-min, Email: zhuchaomin@yahoo.com.cn

The work was supported by a grant from the Foundation of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (No. 2008-2-177).

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the application of spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping) and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat (MIRU-VNTR) analysis in the molecular-epidemiological study of tuberculosis and to discuss the characteristics of pediatric *Mycobacterium (M.) tuberculosis* strains in Chongqing. **Methods** *M. tuberculosis* strains isolated and typed by Spoligotyping and MIRU-VNTR respectively, from the children patients in Chongqing and to compare the results from both methods, epidemiologically. **Results** By means of Spoligotyping, 210 clinical isolates were divided into 2 gene groups, displaying 44 genotypes. Among them, the biggest group was *M. tuberculosis* Beijing family, including 130 strains (61.90%), using the Spoligotyping. From the results of MIRU-VNTR, 24 loci showed different polymorphism and the HGI of different loci set (12 old loci, 15 basic loci and 24-loci set) increased accordingly. The subtle difference in HGI was originated from one locus ETR-B, which was included in the 24-locus system. The diversity of each loci and MIRU-VNTR set for non-Beijing genotype strains was higher than that of the Beijing genotype strains. **Conclusion** In this study, it was preliminarily confirmed the existence of high polymorphism of *M. tuberculosis* while the Beijing Family was the main genotype and main prevalent strain in children of Chongqing area. Spoligotyping prior to 15-locus with ETR-B combination seemed more suitable for the massive epidemiological investigation of pediatric tuberculosis patients.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Beijing genotype; Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat; Spoligotyping; Children

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.06.014

基金项目: 重庆市卫生局科研基金 (2008-2-177)

作者单位: 400014 重庆医科大学附属儿童医院感染消化科 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室 儿科学重庆重点实验室 重庆市 (儿童重大疾病诊治与预防) 国际科技合作基地

通信作者: 朱朝敏, Email: zhuchaomin@yahoo.com.cn

结核病是危害人类健康的重大传染病,我国属于全球 22 个结核病高负担国家之一。近年研究表明,我国 0~14 岁儿童结核感染率在 0.72% 左右,与往年比较无明显下降,尤其是西部地区,活动性结核患病率明显高于中东部地区<sup>[1]</sup>。目前结核分枝杆菌(MTB)的分子流行病学研究已广泛应用于结核病暴发和流行,寻找追踪传染源,鉴别内源性复发和近期外源性感染及耐药菌株传播和实验室污染等方面的研究<sup>[2]</sup>。本研究采用数目可变串联重复序列分析(MIRU-VNTR)和间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)方法分别对重庆市儿童医院临床标本分离培养的 210 株 MTB 进行基因分型,以了解该地区儿童 MTB 的基因型,并评价两种方法在基因分型研究中的价值。

## 材料与与方法

### 一、菌株来源

210 株 MTB 来源于 2002—2009 年重庆市儿童医院因结核病住院患儿的临床标本,按全国结核病细菌学检验标准化规程培养,−80 ℃ 的菌株库中保存。标准菌株 H37Rv 由国家结核病参比实验室提供,作为本次试验的对照菌株。

### 二、分型方法

按天根公司提供的细菌基因组 DNA 提取试剂盒的步骤,提取结核菌 DNA。

#### 1. Spoligotyping:

(1)PCR 扩增:用一对引物扩增整个 DR 区,上下游引物均为 18 个核苷酸<sup>[3]</sup>。引物序列为 DRa: 5′-GGT TTG GGT CTG ACG AC-3′,5′端进行生物素标记;DRb: 5′-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3′。PCR 反应条件:96 ℃ 3 min;96 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 30 s,35 个循环;延伸 10 min。

(2)Biodyne C 膜的制备:Biodyne C 膜具有 43 个 van Embden 等<sup>[4]</sup>推荐的共价结合寡核苷酸,每一个寡核苷酸对应 DR 位点间唯一的间隔区序列。其中 6 个间隔区序列源自 *M. bovis* BCG 的 DR 区域序列,其余的全部源自 *M. tuberculosis* H37Rv 的 DR 区域序列<sup>[5]</sup>。先用新鲜配置的 16% EDAC 孵育膜 10 min<sup>[6]</sup>,立即将膜置于水中清洗;在 miniblotted 凹槽中平行加入 150 μl 用 500 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>(pH 8.4)稀释的 0.125 μl 寡核苷酸溶液,室温孵育 1 min。将膜从 miniblotted 中取出,并用 100 mmol/L NaOH 孵育 10 min。膜用 2×SSPE/0.1% SDS 于 50 ℃ 孵育 10 min,再用 20 mmol/L EDTA 室温孵育 15 min,然

后密封于塑料袋中置 4 ℃ 保存备用。

(3)PCR 产物的杂交与检测:用 2×SSPE/0.1% SDS 于 50 ℃ 洗膜 5 min,将膜置 miniblotted 中,方向与制备杂交膜垂直。20 μl PCR 产物加到 150 μl 2×SSPE/0.1%SDS 中,100 ℃ 加热变性 10 min。150 μl 稀释的 PCR 产物加到凹槽中,55 ℃ 杂交 60 min。取出膜,用 2×SSPE/0.5%SDS 于 55 ℃ 洗膜 2 次,每次 10 min。然后用辣根过氧化物酶标记的链球菌亲和素 2.5 μl 加到 10 ml 2×SSPE/0.5% SDS 中,于 42 ℃ 孵育膜 30 min。洗膜并将杂交的 DNA 用 CDP-star 检测,X 线片曝光 5 min。

(4)Spoligotyping 基因型的定义<sup>[6,7]</sup>:北京家族菌株具有特征性的 Spoligotyping 指纹图谱,即 43 个间隔区中 1~34 间隔区的杂交均为阴性,否则为非北京家族菌株。北京家族菌株中 35~43 间隔区均为阳性者为典型北京家族(typical Beijing family),而 35~43 间隔区中出现 ≥1 个阴性杂交者为非典型北京家族(atypical Beijing family)。此外,所有 *M. bovis* 和 *M. bovis* BCG 菌株定义为缺乏 39~43 间隔区而含有 33~38 间隔区。用 BioNumerics 软件对杂交模式进行分析。

#### 2. MIRU-VNTR:

(1)MIRU 位点选择:第 1 组为国际传统应用的 12 位点<sup>[8]</sup>,第 2、3 组分别为 Supply 等<sup>[9]</sup>推荐的 15、24 个 VNTR 位点,引物参照文献<sup>[9]</sup>设计,由上海生物工程技术有限公司合成。

(2)PCR:扩增反应在 10 μl 反应体系中进行,其中含上下游引物 10 μmol/L 各 0.2 μl,2×Taq PCR MasterMix 5 μl,DNA 0.5 μl,三蒸水补充至反应体积。PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 10 min,变性 94 ℃ 10 min,退火 62 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 1 min,30 个循环,之后延伸 72 ℃ 10 min。

(3)结果检测:取 5 μl 扩增产物,在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,电泳电压 5~10 V/cm,将凝胶放入浓度为 0.5 μg/ml 的 EB 染色液中,染色 30 min,脱色 5 min。之后,在紫外凝胶成像分析系统下观察结果,用 100 bp DNA Marker 确定分子量,以国际参考菌株 H37Rv 作为对照。

(4)数据分析:计算各位点重复序列的拷贝数。将每株菌不同 VNTR 位点凝胶图像及其菌株背景资料输入计算机,采用 BioNumerics(Version 5.0)软件建立数据库,将所检测菌株呈现的 PCR 扩增指纹与 H37Rv 比较,以 H37Rv 每个位点重复序列作参照,计算出不同结核菌各个 VNTR 位点的分子量和重复

次数。计算各位点及不同 MIRU 位点组合的分辨率指数(HGI)<sup>[10]</sup>。采用 BioNumerics (Version 5.0) 软件计算不同 VNTR 位点的 HGI, 并对不同 VNTR 位点组合进行聚类分析, 观察各分型方法的类型数和独特类型数(经聚类分析后未成簇的菌株)。计算菌株成簇率(实验结果完全相同的菌株定义为一簇)<sup>[11]</sup>。各方法结果的关联性分析采用 Pearson 列联系数( $r$ )表示。

### 结 果

1. Spoligotyping 分型: 利用 Spoligotyping 对 210 株 MTB 进行基因分型, 表明重庆地区儿童菌株呈现明显基因多态性(图 1), 可分为 2 个基因群(北京家族和非北京家族), 44 种基因型, 30 株为独特类型。另 180 株分为 14 簇, 其中最大一群北京家族包含 130 株(61.90%), 典型北京家族占 97.69%, 非典型北京家族占 2.31%。非北京家族菌株表现为高度的基因多态性, 可分为 42 个基因型, 30 株为独特的基因型。其中检测发现有 3 株菌株为 *M. bovis* BCG 的 Spoligotyping 分型结果, 2 株为 *M. bovis* 的 Spoligotyping 分型结果。阴性对照无杂交点产生。Spoligotyping 分型对 210 株结核菌的 HGI 为 0.6271, 成簇率为 79.05%。

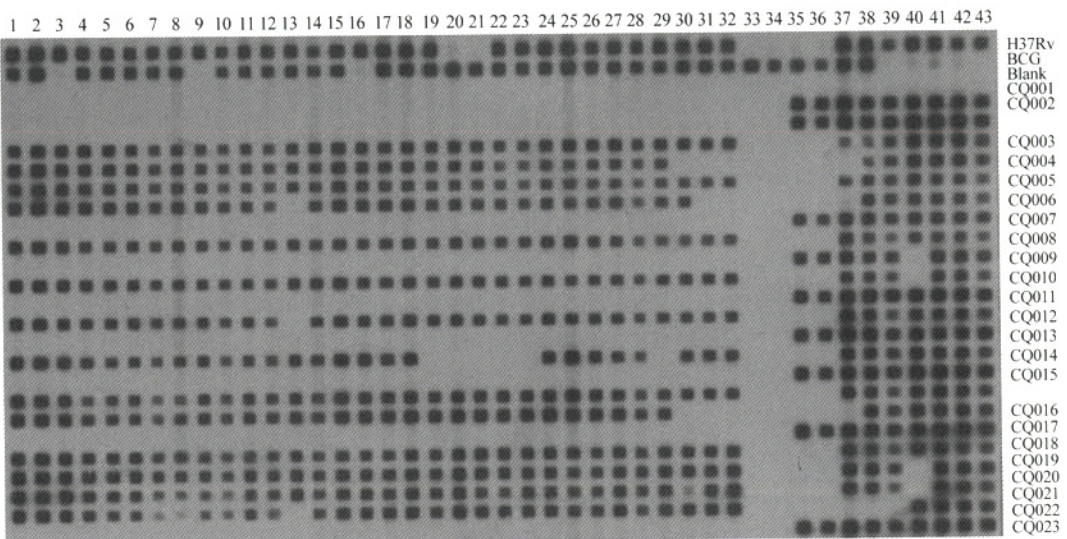
#### 2. MIRU-VNTR 分型:

(1) 检测结果的重复性: 每次实验设立的对照菌株 H37Rv 在同一 MIRU 位点的扩增片段大小相同。从检测标本随机挑选 20 株菌, 每株不同 MIRU 位点重复检测 3 次, 每次扩增片段大小完全一致。表明 MIRU 位点具有良好的重复性。

(2) 位点多态性及其分辨率: 不同位点在不同菌株间存在明显的多态性(图 2、3)。计算 24 个 MIRU 位点的等位基因多态性, 发现 QUB11b 位点多态性最高(HGI=0.7921), Mtub21、Mtab04、Mtab39、QUB26 位点的多态性较高(HGI>0.6), 大多数位点呈中等程度的多态性(0.3<HGI<0.6), 而 MIRU02、MIRU20、MIRU24、Mtab34 的多态性较差(HGI<0.1), 尤其是 MIRU02 位点的多态性最差(HGI=0)。全部菌株、北京家族菌株、非北京家族菌株 HGI 达到 0.5 以上的 MIRU 位点分别为 11、15 和 6 个(表 1)。

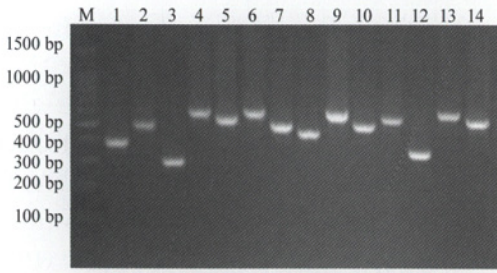
(3) 位点组合的分辨率分析: 传统 12 位点组合及 Supply 等<sup>[9]</sup>推荐的 15 和 24 位点组合(分别为第 1、2、3 组)。第 1~3 组的总体 HGI 依次升高, 分别为 0.9865、0.9981 和 0.9989; 成簇率明显降低, 分别为 35.24%、16.67% 和 12.38%; 在北京家族菌株中, 上述组合的 HGI 依次为 0.9803、0.9959 和 0.9967; 非北京家族菌株中分别为 0.9921、0.9987 和 0.9991。其中 VNTR15 和 24 位点的分辨能力接近, 而该差异是由位点 ETR-B 所致, 因此 VNTR15 位点与 ETR-B 共同分型即可达到 VNTR24 位点的分型能力(表 2)。

3. 两种分型方法结合分析: 用 Spoligotyping 分别和 12、15、24 位点 MIRU 两种基因分型方法对 210 株 MTB 分析, 得到的基因型分别为 152、183 和 189 种, 其中独特基因型分别为 130、162 和 172 种, HGI 分别为 0.9902、0.9985 和 0.9989; 成簇数目分别为 80、48 和 38 株, 成簇率分别为 27.62%、12.86% 和 10.00%。其中 130 株北京家族菌株分别用 12、15 和 24 位点 MIRU 分型方法可分为 77、102 和 111 种基因



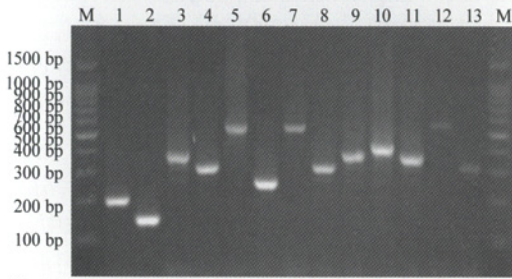
注: 1~43: Spoligotyping 探针; H37Rv 和 BCG: 阳性对照; 空白: 阴性对照; CQ001~CQ023: 本研究的临床分离株

图 1 重庆地区部分 MTB 的 Spoligotyping 基因分型



注: M: 100 bp DNA Marker; 1: H37Rv; 2~14: 临床分离株

图2 MIRU26位点的多态性检测结果



注: 同图2

图3 Mtb21位点的多态性检测结果

型(表2)。经关联性分析, Spoligotyping分型方法与12、15和24位点MIRU结果的Pearson列联系数 $r$ 值分别为0.8554、0.2244和0.1940。

### 讨论

1. Spoligotyping: 210株菌Spoligotyping分型结果显示, 可分为北京基因型和非北京基因型2个基因群, 分别为130株和80株(61.90%和38.10%), 44

种基因型中30株为独特类型, 另180株分为14簇。210株菌中, 85.71%的菌株成簇, 成簇性较高, 且大部分成簇于北京家族。北京家族菌株中, 97.69%(127/130)为典型北京家族; 2.31%(3/130)为非典型北京家族。非北京家族菌表现为明显的基因多态性, 可分为42种基因型, 30株为独特基因型。由此说明重庆地区儿童MTB具有明显的基因多态性, 其主要流行型为北京家族(61.90%), 但远低于其他地区成年人(西藏地区为90.28%<sup>[12]</sup>), 因此儿童结核病更能反映近期感染的情况。非北京家族占38.10%, Spoligotyping指纹图谱结果显示更复杂的基因多态性, 具有重要的流行病学意义。

由于所有的*M. bovis*和*M. bovis* BCG菌株都缺乏39~43间隔区而含有33~38间隔区的特征, 本研究也证实了利用Spoligotyping技术可从结核菌复合群中分辨出*M. bovis*和*M. bovis* BCG。210株菌中有3株呈现出*M. bovis* BCG Spoligotyping基因型, 2株*M. bovis* Spoligotyping基因型, 结果表明Spoligotyping分析方法对儿童MTB的基因分型较成年人具有更重要意义。

2. MIRU-VNTR: 本研究分析了24个MIRU位点的基因多态性, 不同位点之间的多态性差异很大, HGI变化范围为0~0.7921, 其中QUB11b的多态性最高。不同MIRU位点组合在210株儿童结核菌株中的分辨力各异。国际通用的12位点组合的分辨力最低(HGI=0.9865), 成簇率达35.24%。由此可见, 以12位点组合作为标准的传统分型方法在菌株分型中使用受到一定的限制。这与Christianson等<sup>[13]</sup>对加拿大650株菌12位点的研究结果一致。MIRU15位点和24位点组合则明显提高了分辨力(HGI分别为0.9982和0.9986), 则成簇率较12位点显著降低(分别为17.62%和12.38%), 后两种组合差异不大的原因是由于补充的9个位点除ETR-B具有中等水平的分辨指数(0.5290)外, 其余8个位点的分辨指数都很低。所以其差异仅由1个位点ETR-B所致, 补充位点中的其中8个位点并不能对北京基因型菌株进一步分型。因此

表1 24个位点及其HGI

序号	基因组位置	位点	12位点	15位点	拷贝数	HGI		
						综合	北京家族	非北京家族
1	H37Rv-2163-b	QUB11b	*	*	1~9	0.7921	0.7299	0.8215
2	H37Rv-1955	Mtb21	*	*	1~8	0.7710	0.6797	0.7177
3	H37Rv-0424	Mtb04	*	*	1~7	0.6925	0.6640	0.7187
4	H37Rv-3690	Mtb39	*	*	2~6	0.6814	0.5412	0.7560
5	H37Rv-4052	QUB26	*	*	2~11	0.6795	0.5475	0.8184
6	H37Rv-2996	MIRU26	*	*	1~10	0.5962	0.3139	0.6509
7	H37Rv-0960	MIRU10	*	*	1~7	0.5784	0.3599	0.7111
8	H37Rv-0802	MIRU40	*	*	1~6	0.5640	0.3399	0.7358
9	H37Rv-0577	ETR-C	*	*	1~7	0.5438	0.4665	0.6487
10	H37Rv-2461	ETR-B	*	*	1~7	0.5290	0.3556	0.6389
11	H37Rv-0580	ETR-D(MIRU4)	*	*	1~5	0.5257	0.4036	0.6643
12	H37Rv-4156	QUB4156c	*	*	2~7	0.4980	0.4693	0.5117
13	H37Rv-1644	MIRU16	*	*	1~4	0.4910	0.4335	0.5826
14	H37Rv-2165	ETR-A	*	*	1~3, 5~7	0.4684	0.2382	0.5487
15	H37Rv-3192	MIRU31(ETR-E)	*	*	2~7	0.3921	0.3515	0.5165
16	H37Rv-4348	MIRU39	*	*	2~4	0.3600	0.2280	0.5200
17	H37Rv-3007	MIRU27(QUB-5)	*	*	2~4	0.2202	0.0304	0.4396
18	H37Rv-2401	Mtb30	*	*	1~5	0.2201	0.1045	0.2924
19	H37Rv-2531	MIRU23	*	*	1, 4~7	0.1365	0.0607	0.2506
20	H37Rv-2347	Mtb29	*	*	1~6	0.1287	0.0755	0.2130
21	H37Rv-2059	MIRU20	*	*	1~4	0.0831	0.0457	0.1421
22	H37Rv-3171	Mtb34	*	*	2~4	0.0828	0.0454	0.1421
23	H37Rv-2687	MIRU24	*	*	1~2	0.0189	0	0.0494
24	H37Rv-2687	MIRU2	*	*	2	0	0	0

注: \*表示不同位点组合中所用的位点

表 2 不同位点组合在 210 株 MTB 中的 HGI

菌株类型	分型方法	类型数	独特类型数	成簇菌株数	成簇率(%)	HGI
210 株菌	Spoligotyping	44	30	180	79.05	0.6271
	12 位点	136	104	106	35.24	0.9865
	Spoligotyping + 12 位点	152	130	80	27.62	0.9902
	15 位点	175	146	64	16.67	0.9981
	15 位点 + ETR-B	183	163	47	16.67	0.9981
	24 位点	183	163	47	12.38	0.9986
130 株北京家族	Spoligotyping + 24 位点	189	172	38	10.00	0.9989
	Spoligotyping	2	0	130	98.46	0.0454
	12 位点	77	60	70	40.77	0.9803
	15 位点	96	71	59	21.15	0.9959
	15 位点 + ETR-B	107	89	41	17.69	0.9967
	24 位点	107	89	41	17.69	0.9967
80 株非北京家族	Spoligotyping	42	30	50	47.50	0.9430
	12 位点	60	44	36	25.00	0.9921
	15 位点	76	72	8	5.00	0.9987
	15 位点 + ETR-B	77	74	6	3.75	0.9991
	24 位点	77	74	6	3.75	0.9991

段的菌株。综合以上分型方法，在大规模的儿童结核病分子流行病学研究中，可先采用 Spoligotyping，再对成簇菌株进行 15 位点 MIRU 加上 ETR-B 组合的二次分型的联合分型策略，将大大提高流行病学调查和病原学监测效果。

参 考 文 献

[1] You YH, DuanMu HJ. Prevalence and prevention among pediatric tuberculosis. Chin J Pediatr, 2006, 44 (4): 243-245. (in Chinese)  
游永红, 端木宏谨. 我国儿童结核病流行和防治重点. 中华儿科杂志, 2006, 44(4): 243-245.

选择基础 VNTR15 位点加 ETR-B 组合可有效地对以北京菌株为流行株的地区进行基因分型，也大大地减少了工作量。由此可见，MIRU 的分型能力虽然取决于位点的数量，更取决于每个位点分型的能力。

3. 两种分型方法的比较：经两种方法的关联性分析，Spoligotyping 方法与 12、15 和 24 位点 MIRU 结果的  $r$  值分别为 0.8554、0.2244 和 0.1940。表明 Spoligotyping 和 MIRU 两种方法结果存在关联性，而 Spoligotyping 与 12 位点 MIRU 分析结果之间存在较强的一致性，与 15、24 位点 MIRU 分析结果的关联性极弱。这可能是由于 Spoligotyping 与 15 位点 MIRU 分析方法所用的分子标志物有较大差异。以分辨率比较，本研究 210 株儿童 MTB 分别按 Spoligotyping 及 12、15 和 24 个 MIRU 位点分析，HGI 分别为 0.6271、0.9865、0.9981 和 0.9986。由此可见，无论何种组合的 MIRU 分型方法其分辨力都明显优于 Spoligotyping 方法。尽管 Spoligotyping 在分辨力方面不及 MIRU，但儿童结核病具有自身的特点，如卡介苗病，因此 Spoligotyping 在儿童菌株分型中的应用价值是 MIRU 分型方法所不及。

此外，不同位点在不同菌株中的 HGI 也有不同，对北京家族和非北京家族 HGI > 0.5 的位点分别为 5 个和 16 个，差异较大，这也说明北京家族具有高度的同源性。由于我国大部分地区都以北京家族为优势菌株，Mtub04、Mtub39、QUB11b、Mtub21 和 QUB26 这 5 个位点对于菌株的基因分型更有价值。

我国是 MTB 北京基因型主要流行地区<sup>[14]</sup>。本研究结果表明，重庆地区儿童 MTB 分离株约有 61.9% 的流行菌株属于北京基因型，因此我国流行的儿童结核菌株具有较高的同源性，使用单一的基因分型方法无法准确地区分其类型和处于不同进化阶

[2] Zhang TM. The overview and progress in the study of molecular epidemiology of tuberculosis. Chin J Tuberc Respir Dis, 2000, 23 (10): 583-585. (in Chinese)  
张天民. 结核病分子流行病学的概况和进展. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(10): 583-585.

[3] Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. J Clin Microbiol, 1992, 31(6): 1615-1618.

[4] van Embden JDA, 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.

[5] Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect Immun, 1991, 59(8): 2695-2705.

[6] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol, 1997, 35(4): 907-914.

[7] Awkey PM, Smith EG, Evans JT, et al. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110 based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. J Clin Microbiol, 2003, 41(8): 3514-3520.

[8] Supply P, Mazars E, Ksjean S, et al. Variable human minisatellite like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol, 2000, 36(3): 762-771.

[9] Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2006, 44: 4498-4510.

[10] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol, 1988, 26: 2465-2466.

[11] All PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med, 1994, 330: 1703-1709.

[12] Shi L, Yang M, Pource C, et al. Genotyping study of 216 *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the patients in Tibet with MLVA and Spoligotyping. Chin J Microbiol Immunol, 2007, 27: 711-718. (in Chinese)  
石荔, 杨敏, Pource C, 等. MLVA 和 Spoligotyping 用于西藏地区 216 株结核分枝杆菌临床分离株的基因分型研究. 中华微生物和免疫学杂志, 2007, 27: 711-718.

[13] Christianson S, Wolfe J, Pamela O, et al. Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Canada. Tuberculosis, 2010, 90: 31-38.

[14] Otal I, Martin J, Vincent-Levy-Frebault V, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. J Clin Microbiol, 1991, 29: 1252-1254.