

## 结核分枝杆菌药物敏感性试验研究进展

张媛媛 万康林

结核病危害人类健康已有数千年的历史,人类文明的进步与发展遏制了结核病的蔓延与传播,尤其在使用了有效的抗结核药物以后。但是自 20 世纪 80 年代后期,许多国家与地区结核病发病率、死亡率出现了回升趋势,造成这一现象的主要原因之一便是多耐药结核菌(MDR-TB)的产生<sup>[1]</sup>。在我国山东省的一项流行病学调查发现结核菌耐药水平比较高,这一结果提示我国耐药结核菌的水平普遍偏高<sup>[2]</sup>;处理耐药菌株感染的关键是直接从临床标本中快速鉴定出这些菌株。因此,国内外在耐药结核分枝杆菌检测方法上开展了积极、富有成效的研究,并朝着快速、简便、准确、低成本的方法发展。

### 一、药物敏感性试验

1. 硝酸根还原试验(NRA):该方法基于结核分枝杆菌具有将硝酸根还原为亚硝酸根的能力。这种还原作用可以使某些特殊试剂发生颜色变化,从而检测这种作用。通过与 BACTEC460 方法相对照, NRA 对异烟肼(INH)、链霉素(SM)、乙胺丁醇(EMB)的敏感性与特异性分别是 97% 和 96%、95% 和 83%、75% 和 98%;并且大部分试验结果在 7 天之内获得。NRA 快速、简便、无需贵重仪器,而且可以正确识别耐药株和敏感株<sup>[3]</sup>。但是,某些分枝杆菌(如堪萨斯分枝杆菌)和大多数快速生长分枝杆菌也有这样的特性,这限制了 NRA 作为一种诊断方法在临床上的应用。另外,亚硝酸盐可以进一步被还原为一氧化氮从而无法使试剂颜色发生改变,但是可以用锌粉来解决这一问题,不过增加了该试验的成本。

2. MGIT-960 自动检测系统:分枝杆菌生长指示管(MGIT)依赖一种氧敏感荧光化合物检测分枝杆菌的生长。在细胞培养管的底部包埋荧光显示剂,可以直接感受培养管中氧气的浓度,细菌生长消耗氧,氧气浓度下降,荧光反应即产生,产生的荧光可以被检测到。MGIT-960 自动检测系统是近年来发展的一项新技术,具有较高的可重复性。该系统能够持续反映出由于分枝杆菌生长而产生的荧光。MGIT-960 自动检测系统于 BACTEC-460 检测系统相比,试验结果相符,在获得结果的时间上没有明显的差别,操作方法也比较相似,但由于没有放射性污染,所以可以替代 BACTEC-460 系统成为结核分枝杆菌药敏试验的替代方法<sup>[4]</sup>。

3. 噬菌体扩增生物试验(PhaB 试验):噬菌体扩增生物

试验是使用  $D_{29}$  噬菌体进行的试验。Wilson 等使用  $D_{29}$  检测存活的结核分枝杆菌,一定数量的结核分枝杆菌经抗生素处理后, $D_{29}$  可以在那些存活下来的杆菌中存活复制。但由于  $D_{29}$  感染的耻垢分枝杆菌后一个溶菌循环 90 min 可以完成,而在结核分枝杆菌中这一过程大约需要 13 h。因此使用一种杀毒剂来杀灭细胞外额外的噬菌体,然后将胞内存活的  $D_{29}$  继续感染快速生长耻垢分枝杆菌,并发生溶菌作用,而在固体培养基上产生空斑,计数空斑数就可以定量的检测耐药结核分枝杆菌。该法与比例法相比,所得结果相符,尤其将空斑减少 90% 作为一个判断指标,对 CPL-X、EMB、吡嗪酰胺(PZA)这三种抗结核药物,两项试验所得结果符合率更高,PhaB 试验可以在 2~3 天内获得结果,而且由于它的成本比较低,可以作为一种快速的结核分枝杆菌药敏试验在发展中国家推广<sup>[5]</sup>。在另外一项研究中,PhaB 试验与比例法所得结果的符合率达到 100%<sup>[6]</sup>。

4. 分枝菌酸试验(MAI):分枝菌酸是分枝杆菌菌体组成的重要成分,应用高效液相层析(HPLC)和 p-bromophenyleyle bromide derivatizing 试剂进行紫外线检测分枝菌酸,拟推算结核菌的数量,根据结核分枝杆菌在含药和不含药培养基上的生长情况,从而判断菌株的耐药性<sup>[7]</sup>。

Viader-Salvado 等<sup>[8]</sup>应用 MAI 方法检测了从临床上分离到的 200 株菌株对利福平(RFP)和 INH 的耐药情况。同时使用传统的直接比例法作为对照,发现在 400 次试验中,两种方法结果相同的共 398 次,占总数的 99.5%,MAI 对 RFP 和 INH 的敏感性分别为 97.6% 和 100%,对两种药物的特异性和阳性预期值都是 100%,而阴性预期值分别是 98.3% 和 100%,并且使用 MAI,可以在临床分离菌株后 5 天得到结果。

5. 比色试验:Yajko 等<sup>[9]</sup>采用一种氧化-还原指示剂 Alarm Blue 来判断结核分枝杆菌的药物敏感性,这种氧化-还原指示剂随着细菌的生长过程,颜色从蓝到粉红发生变化,用 50 株耐药或部分耐药的结核分枝杆菌分别进行了 INH、SM、RFP 的药敏试验,所得到的结果与传统比例法相符,200 次药敏试验中有 194 次结果相同(符合率为 97%),比色试验在接种后 7 天有 58% 的菌株获得了结果,14 天 50 株菌株即全部获得结果。这种方法的优点是,无放射性,不要求昂贵的仪器,可以产生定量的(MIC)药敏结果。它可以在治疗结核菌感染的早期检测 MIC 值。

6. 流式细胞仪:这种方法是基于分枝杆菌通过非特异的细胞脂化石乙酸荧光素释放出荧光素。在代谢活跃的

分枝杆菌细胞内堆积的荧光能够很容易的被流式细胞仪检测到。相反,被抗生素抑制或杀死的结核杆菌就检测不到这种荧光素的堆积。使用这种方法,对 35 株结核分枝杆菌进行 INH、EMB、RFP 的敏感性试验,所得结果与比例法结果的符合率分别是 95%、92% 和 83%。该方法可以在接种后 24 h 内获得结果,本法所需仪器比较昂贵<sup>[10]</sup>。

7. 荧光素酶系统在结核分枝杆菌药敏试验中的应用:利用细菌噬菌体将萤火虫的荧光素酶基因(FluX)转录到任何可以生长的菌株当中,于是在存在细胞 ATP 和外加的底物荧光素时,可产生可见光。减少 ATP 储量,消减荧光素酶蛋白的产量,干扰噬菌体感染或高效抗生素,在这个系统中将抑制荧光的产生<sup>[11-14]</sup>。这种方法应用在临床分离到的结核分枝杆菌菌株及标准株的药物敏感性试验中,取得了较高的敏感性和特异性<sup>[14]</sup>。Sarkis 等<sup>[15]</sup>构建了一种荧光素酶标记的分枝杆菌噬菌体 L5,将萤火虫荧光素酶基因插入噬菌体染色体的 tRNA 区,被 L5 转染的耻垢分枝杆菌表达荧光素酶基因并能发光。这种噬菌体可以用来区分耻垢分枝杆菌的敏感株与耐药株,也可以用来快速鉴定、区分抗结核药物。构建各种分枝杆菌的生物发光菌株已被证明可以用来体外评估抗结核杆菌药物,与 BACTEC 和比例法平行比较,结果是可靠的<sup>[13]</sup>。

以上几种方法虽然均有令人满意的特异度和灵敏度,而且较常规的药敏试验节省时间,但都是以结核分枝杆菌生长为基础的试验,因此均有耗时和可能继续感染试验人员的缺点。

## 二、结核分枝杆菌的耐药基因及检测方法

### 1. 结核分枝杆菌的耐药基因:

(1) rpoB 基因:该基因编码结核分枝杆菌 RNA 聚合酶的  $\beta$  亚单位,它含有 3534 bp 的开放阅读框,编码 1178 个氨基酸与大肠埃希菌 rpoB 基因的同源性为 57%<sup>[16]</sup>。Williams 等<sup>[17]</sup>检测了 110 株耐 RFP 菌株,其中 102 株耐 RFP 菌株中检测到 16 个突变,可以影响 13 种氨基酸,但在 RFP 敏感株中却没有检测到任何变异。rpoB 基因存在多种点突变,如:缺失、插入,并且主要发生在一个 81 bp 的区域内<sup>[18]</sup>。

(2) rpsL 基因与 rrs 基因:大多数结核分枝杆菌耐 SM 的产生是由于 rpsL 基因与 rrs 基因突变所导致的,rpsL 基因编码核蛋白体 S12 蛋白,rrs 基因编码 16S rRNA。通过对来自于世界各地的 SM 耐药株的检测发现,这两个基因的多处位点均可发生变异<sup>[19-22]</sup>。相反,在 2 株 MDR-TB 菌株中没有检测到这两个基因上的变异,提示在这些菌株中还存在其他的耐药机理<sup>[19]</sup>。

(3) KatG、inhA、ahpC 基因:多项研究结果表明结核分枝杆菌耐 INH 与 KatG 基因(过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因),inhA 基因(分枝菌酸合成过程中烯醇酰基还原酶编码基因),ahpC 基因(烷基过氧化氢还原酶编码基因)变异有关<sup>[23-27]</sup>。但是,Mdluli 等<sup>[28]</sup>将质粒上的 inhA 基因(该基因的上游启动子发生了改变)分别转入耻垢分枝杆菌和结核分枝

杆菌中,发现耻垢分枝杆菌产生很强的耐 INH 水平,而结核分枝杆菌并没有表现出这一现象,因此他们认为 inhA 基因所编码的 InhA 蛋白并不是 INH 作用的主要目标。

(4) pncA 基因:该基因突变是结核分枝杆菌耐 PZA 的原因之一,大约 72% 的耐 PZA 菌中可以检测到 pncA 基因上发生的变异。而 pncA 基因不同位点发生的变异所导致的菌株 MIC 结果也不尽相同,但是发生在 pncA 基因的变异可以作为耐药株 MIC  $\geq 100 \mu\text{g/ml}$  的指示标准<sup>[29,30]</sup>。

(5) gyrA 和 gyrB 基因:这两种基因分别编码 DNA 旋转酶的 A、B 两个亚单位,而氟喹诺酮主要作用于 DNA 旋转酶。gyrA 基因突变导致高度耐喹诺酮和 gyrB 基因突变导致低度耐喹诺酮<sup>[31]</sup>。

(6) 结核分枝杆菌耐多药的分子机制:根据我国的实际情况将 MDR-TB 定义为 HRZES(H:异烟肼,R:利福平,Z:吡嗪酰胺,E:乙胺丁醇,S:链霉素)五种主要抗结核药物中任何两种及两种以上产生耐药者<sup>[32]</sup>。国内外学者对耐多药的分子机制进行了大量研究,但是耐药基因发生的突变与所表现出来的耐药水平不完全相符<sup>[33-37]</sup>。Karunakara, Davies<sup>[38]</sup> 在一项实验中观察到:当从 RFP 耐药株中分离到 SM 突变(或从 SM 耐药株中分离到 RFP 变异)时,亲本耐药基因突变回复到野生型的几率非常高;将耐 SM 耻垢分枝杆菌接种于含有 SM 和 RFP 选择性浓度的平皿中,它所发生的 SM 和 RFP 双突变的几率远远低于只含有一种(RFP 或 SM)抗生素的培养基中所培养的菌株发生突变的几率。由此,他们认为 rpsL 和 rpoB 基因突变不能同时有效地发挥作用,即在二者之间存在拮抗作用。另外,在某些特殊的培养条件下,耻垢分枝杆菌耐药基因具有高突变性,这可以解释为什么不恰当的化疗方案可以导致 MDR-TB 的产生。

2. 耐药基因的检测方法:随着分子生物学的发展,尤其是聚合酶链反应(PCR)技术的问世,建立在 PCR 基础上的基因检测技术也不断涌现。目前,许多技术已经被人们所熟知并越来越多的应用于结核分枝杆菌耐药监测中来,如:PCR-单链构象多态性(SSCP)、限制性片段长度多态性(RFLP)、复合 PCR、RNA:RNA 错配试验、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、DNA 序列测定等方法。以此为基础,许多新技术新方法也不断见诸于报道。

(1) 双梯度(DG)-DGGE:该方法是在 DGGE 基础上发展的更加灵敏的试验方法。利用 DG-DGGE 检测临床分离株 rpoB 基因变异,所得到的结果与 DNA 序列测定和药敏试验结果完全一致,可以替代 DGGE 作为基因变异的检测方法<sup>[18]</sup>。

(2) 痰液中直接洗提 DNA:PCR 方法检测结核杆菌耐药基因往往需要花费六个星期的时间。Datnaik 等直接从痰液中洗提 DNA,进行巢式 PCR 放大,然后用 4% 的琼脂糖凝胶电泳,来分析 168 bp 产物,执行自动测序与资料相比,以检查 rpoB 基因中的变异,这也就暗示了 RFP 耐药性。应用这种方法检测 47 例痰标本,同时与培养试验和培养物 PCR 结果

相比较,结果基本一致<sup>[39]</sup>。

(3)单管分子信号检测:这是一种非常敏感的单管 PCR 检测方法。在一个反应中,使用了五种探针,每一种都完美地与存在于 RFP 敏感菌 rpoB 基因中的不同的目标序列互补,每一种探针都用带有不同颜色的荧光素标记。他们的目标序列包围了整个 81 bp 的核心区域(与耐 RFP 有关的突变 95%发生于这一区域内)。在 PCR 扩增过程中五种颜色荧光的产生提示 RFP 敏感株的存在。而在核心区域任何变异的存在都将阻止一种分子信号,结果造成五种荧光中的一种的缺失。由于 DNA 直接从痰液中提取,因此该法可以在 3 h 之内得到可靠判断。经过对 148 株临床分离的结核杆菌和 11 例感染了耐 RFP 结核杆菌患者的痰液的单管分子信号检测试验,证实这种方法是简单、快速,有较高特异性与敏感性的方法<sup>[40]</sup>。

(4)反转录 PCR:反转录 PCR 可以描述 mRNA 水平上的量的变化,因此用这种方法是一种快速可靠的检测组织存活力的方法。Elitringham 等<sup>[5]</sup>采用一种基于检测热休克蛋白 mRNA (dnaK mRNA)的量的变化的检测方法。经过与比例法比较,敏感株和耐药株结果的符合率分别是 96% 和 97%。

(5)在基因芯片上进行的杂交、PCR 和连接酶检测试验:在聚丙烯酰胺凝胶上固定寡核苷酸链,进行杂交、PCR 和连接酶试验,是一种快速的结核杆菌耐药基因检测方法。杂交试验可以在 24 h 内检测 rpoB 基因的 30 种不同的变异。PCR 方可以直接从患者的痰液中检测到基因变异,用时仅 1.5 h。连接酶试验相当灵敏,标本中含有 1% 的耐药菌株即可用这种方法检测到<sup>[41]</sup>。

### 三、小结

不合理化疗促使结核杆菌耐药性的产生,结核杆菌的耐药性在很大程度上影响了治疗效果,因此如何快速准确鉴别耐药结核杆菌的耐药类型成为目前结核病控制的关键问题。传统的药敏试验需要对结核杆菌进行分离培养,这需要一定的时间和培养条件,不利于临床使用,而且成本比较高,会增加患者的负担。快速、简便、准确、低成本的耐药结核杆菌检测方法的研究与推广成为结核病控制中亟待解决的问题。近年来,以分子生物学技术为基础的检测方法有了突飞猛进的发展。但遗憾的是我国在这方面的研究仍处于起步阶段,这些方法在工作中的应用也鲜见报道。我国是世界结核病高负担国家之一,而且结核病已经成为很多地区“因病返贫”的主要原因之一,解决好耐药结核杆菌问题是控制我国结核病流行的前提之一,因此,积极开展结核分枝杆菌耐药检测方法的研究并加以推广具有重大意义,必将为我国成功控制结核病的蔓延起到极大的促进作用。

### 参 考 文 献

- 1 于恩庶,主编. 全球结核病的紧急状态及防治研究. 新发现和再肆虐的传染病. 香港: 亚洲医药出版社,2000. 131-164.
- 2 王苏民,张福生,端木宏璜. 山东省耐药结核病流行状况研究.

中华结核和呼吸杂志,1999,22:728-730.

- 3 Kristian KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol,2002,40:553-555.
- 4 Arditto F, Posteraro B, Sanguinetti M, et al. Evaluation of BACTEC *Mycobacteria* growth indicator yube (MGIT960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2001, 39:4440-4444.
- 5 Elitringham IJ, Wilson SM, Drobniewski FA. Evaluation of a bacterio-phage-based assay (phage amplified biological assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazimide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1999, 37 : 3528-3532.
- 6 Elitringham IJ, Drobniewski FA, Mangan JA, et al. Evaluation of reverse transcription-PCR and a bacteriophage-based assay for rapid phenotypical detection of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1999, 37 : 3524-3527.
- 7 张敦熔,主编. 现代结核病学.北京:人民军医出版社,2000.
- 8 Viader-Salvado JM, Garza-Gonzalez E, Valdez-Leal R, et al. Mycolic acid index susceptibility method for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol,2001, 39: 2642- 2645.
- 9 Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, et al. Colorimetric method for determing MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol,1995,33:2324-2327.
- 10 Kirk SM, Schell RF, Moore AV, et al. Flow cytometric testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* islates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. J Clin Microbiol, 1998, 36 : 1568-1573.
- 11 Jacobs WR, Barlitta RG, Udani R, et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science, 1993,260:819-822.
- 12 Carriere C, Riska PF, Zimhony O, et al. Conditionally replicating luciferase reporter phages:improved sensitivity for rapid dection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol,1997,35:3232-3239.
- 13 Arain TM, Resconi AE, Hickey MJ, et al. Bioluminescence screening in vitro (Bio-Siv) assays for high-volume antimycro bacterial drug discover. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40:1536-1541.
- 14 Riska PF, Su Y, Bardarov S, et al. Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a luciferase reporter phage and the bronx box. J Clin Microbiol, 1999,37:1144-1149.
- 15 Sarkis GJ, Jacobas WR, Hatfull GF, et al. L5 luciferase reporter mycobacteriophages:a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. Molecular Microbiol,1995,15:1055-1067.
- 16 Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994, 38:805-811.

- 17 Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al. Characterization of rifampin resistance in pathogenic *Mycobacteria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, 38:2380-2386.
- 18 Scarpellin P, Braglia S, Carrera P, et al. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43:2550-2554.
- 19 Nair J, Rouse DA, Bai GH, et al. The rpsL gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiol*, 1993, 10: 521-527.
- 20 Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistance *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40:1024-1026.
- 21 Honore N, Marchal G, Cole ST. Novel mutation in 16S rRNA associated with streptomycin dependence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39: 769-770.
- 22 Meier A, Kirschner P, Bange FC, et al. Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of mutations conferring resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, 38:228-233.
- 23 Tracevska T, Jansone I, Broka L, et al. Mutations in the rpoB and katG genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 3789-3792.
- 24 Zhang Y, Young D. Strain variation in the katG region of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiol*, 1994, 14: 301-308.
- 25 Rouse DA, Devito JA, Li ZM, et al. Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase peroxidase activities and isoniazid resistance. *Molecular Microbiol*, 1996, 22:583-592.
- 26 Rouse DA, Li ZG, Bai GH, et al. Characterization of the katG and inhA genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39: 2472-2477.
- 27 Wilson TM, Collins DM. AhpC, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Molecular Microbiol*, 1996, 19:1025-1034.
- 28 Mdluli K, Sherman DR, Hickey MJ, et al. Biochemical and genetic data suggest that inhA is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infe Dise* 1996, 174: 1085-1090.
- 29 Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, et al. Phenotypic characterization of pncA mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44:2291-2295.
- 30 Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, et al. Mutations associated with pyrazinamide resistance in pncA of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41:636-640.
- 31 Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, 38:773-780.
- 32 汪谋岳, 王娟. 全国多耐药结核病学术会议纪要. *中华结核和呼吸杂志*, 1997, 20:382-383.
- 33 Victor TC, Warren R, Butt JL, et al. Genome and MIC stability in *Mycobacterium tuberculosis* and indications for continuation of use of isoniazid in multidrug-resistant tuberculosis. *J Med Microbiol*, 1997, 46:847-857.
- 34 Fang Z, Doig C, Rayner A, et al. Molecular evidence for heterogeneity of the multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in Scotland. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:998-1003.
- 35 Rie AV, Warren R, Mshanga I, et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:636-641.
- 36 Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, et al. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:1542-1546.
- 37 Morris S, Bai GH, PHIL Suffys IP, et al. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 1995, 171:954-960.
- 38 Karunakara, Davies J. Genetic antagonism and hypermutability in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 2000, 182:3331-3335.
- 39 Patnaik M, Liegmann K, Peter JB. Rapid detection of smear-negative *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and sequencing for rifampin resistance with DNA extracted directly from slides. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:51-52.
- 40 El-Hajj HH, Marras SAE, Tyagi S, et al. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:4131-4137.
- 41 Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:2531-2540.

(收稿日期:2003-06-12)

(本文编辑:尹廉)