

多位点串联重复序列分析在钩端螺旋体基因分型和流行病学中的应用

张翠彩 蒋秀高

【关键词】 钩端螺旋体; 多位点串联重复序列分析
Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for gene typing and epidemiology of *Leptospira interrogans* ZHANG Cui-cai, JIANG Xiu-gao. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: JIANG Xiu-gao, Email: jiangxiugao@icdc.cn

【Key words】 *Leptospira interrogans*; Multilocus variable-number tandem-repeat analysis

由于许多致病性细菌在遗传学上非常相似,使得细菌间的鉴别非常困难。近年来,随着越来越多的细菌全基因组序列分析和测定,DNA 串联重复序列逐渐吸引了人们关注的目光。

1. 简介:DNA 串联重复序列广泛存在于原核、真核生物基因组中,一般位于基因侧翼或内含子等非编码区以及染色体端粒区。根据串联重复序列核心序列碱基数目的大小,可分为三类:卫星、小卫星和微卫星。卫星通常为巨碱基 DNA,与异染色质有关,起结构性调节作用;小卫星 DNA (minisatellite)的核心序列碱基数目各文献报道大小不一,通常介于 6~100 bp,而微卫星 DNA (microsatellite, MS),又称短串联重复序列 (short tandem repeat, STR),其核心序列通常为 1~5 bp。多态性的小卫星序列又被称为数目可变串联重复序列 (variable-number tandem repeats, VNTRs),每个 VNTR 位点由中间的核心区和外围的侧翼区组成,核心区为重复的串联重复序列首尾紧密相连,不同种属生物个体间,表现为侧翼区相似而串联重复单位的拷贝数不同,每个位点可作为生物个体的 DNA 指纹参数,多位点串联重复序列组合进行个体鉴别的方法,称为多位点串联重复序列分析 (multilocus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA),主要应用于遗传性连锁分析、法医学亲子鉴定、细菌基因分型、菌株亲缘进化关系等研究领域。MLVA 作为一种有效的细菌基因分型方法,能够精确确定菌株间的亲缘进化关系,已经广泛应用于沙门菌^[1,2]、金黄色葡萄球菌^[3]、鼠疫伤寒杆菌^[4]、结核分枝杆菌^[5]、土热病杆菌^[6]、嗜肺性军团杆菌^[7]、大肠埃希菌 O157:H7^[8]、包柔氏螺旋体属^[9]、布鲁氏杆菌等。

MLVA 的原理是利用与 VNTR 位点侧翼区互补的寡核苷酸引物对相应 DNA 进行 PCR 扩增,由扩增条带分子量来推测重复单位的拷贝数。由于该操作简单快速,少量 DNA 即可满足需要,实验结果数据化,不同实验室间具有可比性等,逐渐成为一种新型的细菌基因分型方法。

目前对小卫星产生不稳定性的机制了解甚少,主要认为是由 DNA 分子内的滑链错配机制、基因重组、姐妹染色体不平等交换或基因转换等原因造成的,位点的多态性同时依赖于 DNA 错配修复系统的准确性^[10-12]。在真核细胞中存在两个导致不稳定性的机制:在减数分裂期,小卫星附近的同源染色体重组;在有丝分裂期,减少冈崎片段成熟。

小卫星多态性表现为:同一位点在生物体不同种属间、同一种属的正常与异常组织间、不同染色体间以及同一染色体的编码区和非编码区间,重复单位的拷贝数不同。根据位点的多态性和侧翼区的一致率将多态性指数分为高、中、低三种,高多态性指数 ≥ 0.6 ,中多态性指数介于 0.6~0.4,低多态性指数 < 0.4 ;MLVA 一般选择高、中度多态性位点进行分析。小卫星的突变率与长度无关,短重复片段经过数百万年进化仍可以很稳定,而长片段的突变率可高达 15%,突变位置不是随机分布的,通过 3 个 VNTR 位点的 MVR-PCR 分析发现存在特殊的极性现象,突变往往发生在位点的一端^[13],这种明显的两端突变热点也在种系突变系谱分析中发现。

小卫星的功能目前尚不甚明了,但已发现小卫星是基因重排和变异的来源,参与遗传物质结构的改变、基因调控及细胞分化等过程,影响编码蛋白的氨基酸序列。不同的 VNTR 位点对生物体的影响不同,有些 VNTR 位点变异不引起生物表型效应,而有些往往却是细菌逃逸机体免疫系统监视、优势进化、高适应性、高多样性的功能区域^[14-16],可引起有机体的遗传学相位转换,如流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、猪鼻支原体。在这些病原菌中,位于启动子-35区和-10区之间的串联重复序列,将影响到下游基因的转录,影响作用大小取决于重复序列拷贝数^[12]。

2. 与各种分子生物学技术对比 MLVA 技术的优缺点:近些年来,各种分子生物学技术飞速发展,如多位点序列分型 (MLST)、扩增片段长度多态性分析 (AFLP)、限制性内切酶片段长度多态性分析 (RFLP) 等,但均存在诸多缺点:需高质量 DNA,分辨率低、重复性差,成本较高,实验室间不易比对等。然而目前正逐渐发展起来的脉冲场凝胶电泳 (PFGE)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病室

通讯作者:蒋秀高,Email:jiangxiugao@icdc.cn

方法,虽然具有稳定性好,实验室间可比性强,分辨率高等特点,仍然存在诸如成本较高、操作烦琐、需求菌量大、需要专门的仪器和技术人员操作等缺点。与以上各种分子生物学技术相比,MLVA 技术具有较多优点和可行性,从而在分子生物学领域获得了广泛的应用。

(1)串联重复序列的分析来源丰富化:目前许多生物基因组已经测序公布,例如 NCBI 核酸数据库和陆续构建的随机 DNA 基因组文库,可作为串联重复序列分析的主要来源。

(2)串联重复序列分析软件的发展和数据库的建立:许多 TRs 软件如:REPuter, TRF(tandem repeat Finder), mreps, ATRHunter, Repeat masker, DNA works 等,为设计出保守性强、多态性好的位点创造了便利条件;一些 TRDB 网站数据库如: <http://minisatellites.u-psud.fr/>^[17]; <http://iech5.igmors.u-psud.fr/GPMS/>; <http://tandem.bu.edu/cgi-bin/trdb/trdb.exe>; <http://vntr.csie.ntu.edu.tw/>等,方便了大家的查看。其中实用性好的 MLVA 基因分型网站 <http://minisatellites.u-psud.fr/>,包括了人类、秀丽隐杆线虫、拟南芥和一些原核生物的串联重复序列信息,利用侧翼区一致率、侧翼区所占比例等参数可进行菌株间 VNTR 位点及侧翼区对比;输入已设计好的 PCR 引物序列进行比对,可得出该位点与细菌的匹配程度及相应 PCR 产物的大小;还可进行相应细菌的基因分型。

(3)VNTR 位点数目多,保守性好,多态性高,MLVA 技术操作简单:6 个碱基及其以上长度的串联重复序列约占大肠埃希菌基因组总长度(109 kb)的 2.4%^[18]。VNTR 位点保守,不随时间、地域的变化而变化,不失作为菌株遗传变异的特征性标记。实验中只需少量 DNA,即使分解的 DNA 也可满足实验的需求,并且 MLVA 技术重复性好,操作简单。随着技术的改进,许多实验室采用多重荧光染料标记引物,有些实验室还采用毛细管序列分析仪、集成电路系统、精确的质谱分析仪等,整个过程仪器自动化操作,从 PCR 产物大小推断到 DNA 碱基序列分析,呈高流通量,方便快捷高效,是其他基因分型方法所不及的。

虽然 MLVA 技术已经成为一种新型的细菌基因分型方法,但仍不免存在一些不足之处需要改善。

(1)较难设计出特异性较好的引物:同一种细菌已公布的参考菌株基因组序列太少,而不同种属菌株的侧翼区多态性较高,或不同种属间重复序列单元中分散有插入序列或者其他转座子,从而较难设计出与侧翼区相匹配的特异性较好的引物^[19]。

(2)对实验结果的解释要慎重:VNTRs 突变率被认为是由侧翼区变异、拷贝数变异、碱基序列纯度变异、错配修复系统准确性等综合作用决定的^[20]。其中拷贝数的变异是主要原因,但须注意分子量相同的 PCR 产物,却可能是同源型(重复序列相同,但 PCR 产物长度不同)或者异源同型(重复序列不同,但 PCR 产物长度相同)。同时,由于受一些因素的影响某些等位基因无法被扩增出,如发生在引物 3' 端配对

碱基的突变^[21],侧翼区的低保守性,或缺少相应的 VNTR 位点等^[22,23]。VNTRs 变异往往是微生物产生选择效应的元件,尤其是处于编码区或启动子区域的重复序列,相同菌株如果分离于不同的疫水或者受患者免疫系统攻击等会出现 VNTRs 的变异,因此对于实验结果的解释要慎重,建议结合流行病学资料,以免发生偏倚。此外,不同串联重复序列分析软件、不同选择位点参数、不同分析方法,均可能导致不同的分析结果,因此最好应根据资料的特点,采用公认的软件和方法。

3. VNTR 位点的选择:选择合适的 VNTR 位点作为基因分型的标记物,是决定该基因分型方法分辨率高低的关键影响因素。位点使用之前要经过长时间的菌株连续传代和多次分型验证,以保证位点的稳定性和可重复性,并且要注意与其他的分型技术进行比较,从而得知已选择位点分辨率的高低^[19]。

2005 年 Majed 等^[22]以问号钩端螺旋体赖株基因组作为参考,选用重复序列单位长度、拷贝数、碱基序列一致率等参数,筛选出 44 个 VNTR 位点,然后用种属明确的问号钩端螺旋体菌株来检验 44 个 VNTR 位点的多态性,删除 PCR 条带微弱或者没有产物的位点,最后选定 7 个保守性较好、多态性较高的位点(VNTR4、VNTR7、VNTR9、VNTR10、VNTR11、VNTR19、VNTR23)进行实验,研究发现,双曲基因种和迈尔基因种 7 个 VNTR 位点 PCR 结果阴性,可能由于侧翼区和其他基因种不同等原因造成的,利用相同的引物不能扩增出相应的产物。MLVA 方法可区分 51 株中的 43 株问号钩端螺旋体菌株,诸位点多态性较高,虽然和 PFGE 相似,同样不能区分黄疸出血型和哥本哈根血清型,但不同的是,PFGE 用 Not I 限制性内切酶不能区分的澳洲群中的血清型:慕尼黑型、捷那型、布拉迪斯拉发型,仅仅只用 VNTR19 或 VNTR23 即可分辨,澳洲群中澳洲型和布拉迪斯拉发型不能被 MLVA 方法区分,却能被 PFGE 区分。总之,以 VNTR 多态性为主的分析方法重复性好,分辨率较高,高效、快速,不失是一种较好的分子分型技术,尤其适用于仪器简陋的发展中国家。

2005 年 Slack 等^[23]以问号钩端螺旋体哥本哈根型 Fi L1-130 菌株基因组为参考,用重复序列单位长度、拷贝数、碱基序列一致率等参数,筛选出 53 个 VNTR 位点,然后用 39 株标准钩端螺旋体菌株选出多态性较好的 25 个位点,再用 98 株问号钩端螺旋体澳洲型标本鉴定是否具有型间的高多态性,对于 PCR 产物结果阴性的菌株重复 3 次,以排除假阴性,最后确定 6 个多态性较好的位点(V8、V27、V29、V30、V36、V50),多态性指数介于 0.80~0.93 之间,98 株澳洲型菌株被聚为 3 大类,其中 2 类存在明显的地域聚集性,主要是集中在 Tully 和 Innisfail 地区,而第 3 类菌株具有地区多样性。已经选定的 6 个多态性较好的位点,将成为钩端螺旋体分子流行病学的有利工具。

4. 钩端螺旋体 MLVA 目前的发展概况:钩端螺旋体病

是由问号钩端螺旋体引起的一种人兽共患自然疫源性疾病,在世界范围内均有流行,尤其流行于热带地区。我国受钩端螺旋体病危害严重,自 1955 年该病被列入法定报告传染病以来,发生过几十次大规模钩端螺旋体病流行。近年来随着洪涝灾害的增多,福建、湖南、江西、浙江、四川、安徽等省夏秋季节依然存在不同程度的钩端螺旋体病散发或局部地区的暴发。钩端螺旋体菌群型复杂、分布广泛,我国现已发现问号钩端螺旋体有 18 个血清群 75 个血清型。因此,分子流行病学调查对确定暴发或流行、追溯传染源和传播媒介以及控制该病的流行尤为重要。

目前对重复序列片段的具体功能了解甚少,相应的 VNTR 位点散布在基因组中,表明频繁发生基因重组或者作为可移动因子。对重复序列结构、功能的研究,有助于加深对钩端螺旋体重复序列功能的认识。

2006 年 Slack 等^[24]重新设计引物,采用多重荧光标记的毛细管电泳,选取 96 株问号钩端螺旋体澳洲型标本,其中包括 57 株病例分离标本和 39 株动物标本,MLVA 研究发现:多态性指数介于 0.563~0.794 之间,聚类分析可分为 50 个 MVT 型和 A~G 七个组别,其中 B 组是最大的致病组,Innisfail 地区以 MVT1 为主,Tully 地区以 MVT28 为主,可以明确展现不同地区的优势菌株,相同血清型具有明显的地理聚集性。Slack 等同时采用荧光标记扩增片段长度多态性 (FAFLP) 方法,对已经 MLVA 分型的 30 个澳洲群菌株进行研究,虽两种方法结果一致性较好并具有可比性,但尚需较多数量的不同血清群菌株来进一步鉴别两种方法的分辨率高低,而 MLVA 比 FAFLP 更能展示一些独特的分型模式,虽然两者在技术和仪器要求上一样,但是 MLVA 实验结果分析简单,在没有培养环境的条件下,直接利用 PCR 阳性的 DNA 即可开展,这是 FAFLP 所不及的。

虽然目前流行菌株主要是以钩端螺旋体问号基因种的黄疸出血群为主,但是近年来波尔波特生基因型和柯尔施纳基因种也被发现与人类和动物的感染密切相关。2006 年 Salaün 等^[25]为更好的区分不同基因种间的钩端螺旋体,以问号基因型钩端螺旋体赖型 56601、哥本哈根型 Fi L1-130 和波尔波特生基因型钩端螺旋体哈焦型 L550 基因组为参考,重新设计引物,选取 99 株钩端螺旋体参考菌株,其中包括 34 株不同地区人类和动物分离标本,研究发现, VNTR4、VNTR7 和 VNTR10 可以成功扩增并区分 92% 问号基因型钩端螺旋体和 90% 柯尔施纳基因型钩端螺旋体,说明问号基因型和柯尔施纳基因型亲缘关系较近,该亲缘关系也被 DNA-DNA 杂交分析、MLST 和 16S RNA 基因序列分析证明过。对于 VNTR7 扩增阴性而 VNTR4、VNTR10 成功扩增的 23 株波尔波特生基因型钩端螺旋体,由于两位点多态性低仍不能将该基因型分开,于是重新筛选专门位点设计引物,研究发现 VNTR-Lb4 和 VNTR-Lb5 可以区分 60% 的波尔波特生基因型钩端螺旋体。为验证该方法是否是一种较好的流行病学调查工具,Salaün 等对南太平洋上的钩端螺旋

体多发区新喀里多尼亚群岛进行溯源性调查,选取 156 株 1989-2001 年间部分人类和动物标本,MLVA 研究发现,黄疸出血群是主要的致病血清群,鼠类是主要的宿主;从临床分离菌株发现,拜伦血清群和巴拿马血清群也是常见的致病性血清群,与啮齿类动物接触以及牛、猪饲养活动等均为感染钩端螺旋体的危险性因素,该方法较好的应用于钩端螺旋体高发区的大规模流行病学调查。总而言之,钩端螺旋体进化缓慢, VNTR 位点稳定保守,不随时间、地域的变化而变化,不失作为菌株遗传变异特征性标记;实验中少量 DNA 既可满足要求,因此 MLVA 在基因分型、传染病暴发或流行的溯源方面具有重要意义。

土拉热杆菌、鼠疫杆菌文献报道串联重复序列位点的拷贝数越多,该位点的多态性越高^[6,26],但是 Slack 在钩端螺旋体的研究中尚未发现,可能与该实验所选位点的拷贝数较接近有关,除 V27 位点为 138 bp,其他均介于 36~47 bp。在基因组较远的 BCG 亚组菌株的 12 个 MIRU (mycobacterial interspersed repetitive unit) 位点研究中发现^[27],在无菌水环境中培养了 30 年以上、经历了几百次进化过程以后,其中 11 个位点多态性仍然可以保持不变,仅有位点 4 的多态性在一些菌株中发生变化,提示在体内环境 MIRUs 位点所在区域有很好的时间稳定性。

5. MLVA 在钩端螺旋体基因分型和流行病学研究中的应用:MLVA 在疾病预防控制的流行病学暴发调查、种系进化分析中起到极其重要的作用。例如,它可以用于调查鉴别医院内或医院外金黄色葡萄球菌或绿脓杆菌感染;可用于大规模的调查,追溯新发、高致病性或耐药性的结核菌;可用于生物恐怖、生物武器等相关调查,例如对美国的 9·11 事件、日本 1993 年奥姆真理教炭疽事件中炭疽芽孢杆菌病原体的来源作了很好的解释^[28-31]。

钩端螺旋体血清型分布随地区和宿主种类不同而不同,一般认为血清型与宿主动物相关^[22],如犬型与犬,波摩那型与牛和猪,拜伦型与鼠类,黄疸出血型与野鼠相关。采用 MLVA 技术对菌株基因分型分析便于寻找地理分布的优势菌株,根据菌株和宿主之间的特异性,可以为追踪传染源提供直接的依据,能够更好的监测控制宿主,并且通过比较成簇与非成簇菌株来区分是散发还是暴发或流行,从而能够更好地控制钩端螺旋体病。

该基因分型方法,可以较好地分析菌株间的亲缘进化关系和功能基因的改变。有研究表明,串联重复序列有利于微生物更好的适应周围的环境,因此利用该方法可以较好地了解宿主与环境的变化,如何影响细菌基因组进化及致病性的改变等,从而采取相应地干预措施以控制传染病的流行。

由于不同地区、不同年代钩端螺旋体地方优势菌群不同,而该菌的全菌群灭活疫苗交叉免疫效果较差,给疫苗的制造带来许多不便,如果能够充分利用 MLVA 分型技术,及时发现、追踪不同地区的钩端螺旋体流行菌株,提取相关抗原,组成有效的多价疫苗,既能节约成本避免盲目做大量多

价疫苗造成不必要的浪费,又能够更好的保护易感人群。

6. 展望:鉴于 MLVA 操作简便,可靠性高,鉴别能力强,所需仪器设备简单,实验结果便于实验室内比对等优点,相信随着人们对小卫星标记技术的改进(如多重荧光标记引物)、更多细菌基因组测序的竣工、PCR 产物检测自动化、片段序列分析软件和统计分析软件的日趋完善,该分型方法为细菌的分子流行病学研究、建立全球数字化数据库开辟了新的途径,它将成为细菌基因分型、基因组进化、流行病学调查研究领域里强有力的工具。

参 考 文 献

- [1] Ramisse V, Houssu P, Hernandez E, et al. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5722-5730.
- [2] Liu Y, Lee MA, Ooi EE, et al. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable number tandem repeats. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(9): 4388-4394.
- [3] Sabat A, Krzysztow-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1801-1804.
- [4] Adair DM, Worsham PL, Hill KK, et al. Diversity in a variable number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(4): 1516-1519.
- [5] Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 1998, 144(Pt 5): 1189-1196.
- [6] Farlow J, Smith KL, Wong J, et al. Francisella tularensis strain typing using multiple-locus, variable number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9): 3186-3192.
- [7] Pourcel C, Vidgop Y, Ramisse F, et al. Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5): 1819-1826.
- [8] Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AG, et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5389-5397.
- [9] Farlow J, Postic D, Smith KL, et al. Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(12): 4612-4618.
- [10] Caporale LH. Natural selection and the emergence of a mutation phenotype: an update of the evolutionary synthesis considering mechanisms that affect genome variation. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57(10): 467-485.
- [11] Prunier AL, Leclercq R. Role of *mutS* and *mutL* genes in hypermutability and recombination in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2005, 187(10): 3455-3464.
- [12] van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, et al. Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(2): 275-293.
- [13] Jeffreys AJ, MacLeod A, Tamaki K, et al. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, 1991, 354(6350): 204-209.
- [14] van der Woude M, Baumler AJ. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(3): 581-611.
- [15] Rivas JM, Speziale P, Patti JM, et al. MSCRAMM-targetted vaccines and immunotherapy for staphylococcal infection. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7(2): 223-227.
- [16] Zaleski P, Wojciechowski M, Piekarowicz A. The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 10): 3361-3369.
- [17] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(2): 573-580.
- [18] Gur-Arie R, Cohen CJ, Eitan Y, et al. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: Abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Res*, 2000, 10(1): 62-71.
- [19] Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 2005, 26(13): 2567-2582.
- [20] Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet*, 2000, 16(12): 551-558.
- [21] Koorey DJ, Bishop GA, McCaughan GW. Allele non-amplification: a source of confusion in linkage studies employing microsatellite polymorphisms. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(3): 289-291.
- [22] Majed Z, Bellenger E, Postic D, et al. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2): 539-545.
- [23] Slack AT, Dohnt M, Symonds M, et al. Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2005, 30(6): 4-10.
- [24] Slack AT, Symonds M, Dohnt M, et al. An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 11): 1549-1557.
- [25] Salaün L, Mérian F, Gurianova S, et al. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of Leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(11): 3954-3962.
- [26] Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9): 3179-3185.
- [27] Supply P, Lesjean S, Savine E, et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(10): 3563-3571.
- [28] Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, et al. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(10): 1111-1116.
- [29] Keim P, Smith KL, Keys C, et al. Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(12): 4566-4567.
- [30] Chang CH, Chang YC, Underwood A, et al. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(1): D416-421.
- [31] Belkum AV. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007, 49(1): 22-27.

(收稿日期: 2007-11-29)

(本文编辑: 尹廉)