

基因芯片在传染病诊断及流行病学研究中的应用

付华 金奇

【关键词】 基因芯片; 传染病; 诊断; 流行病学

Application of microarray in infectious disease diagnosis and epidemiology FU Hua, JIN Qi. State Key Lab of Molecular Virology and Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

【Key words】 Microarray; Infectious disease; Diagnosis; Epidemiology

传染病具有暴发突然、传播迅速、传播范围广泛和不明原因暴发等特点,应用传统诊断和流行病学方法难以做到迅速有效的应急处置。基因芯片因其高通量、快速、灵敏、特异和简便的特点,在传染病诊断和鉴别诊断、病原生物遗传多样性分析、菌株溯源以及进化等方面广泛应用,为传染病预防和控制提供了重要保障。本文对基因芯片在传染病诊断和分子流行病学研究领域中的应用加以综述。

1. 基因芯片技术概述:

(1)定义:基因芯片,又称 DNA 微阵列或 DNA 芯片,其概念来源于计算机芯片,是指将大量的 DNA 片段或寡核苷酸序列(即探针分子)有序的排列固定于固相支持物上,与标记的靶 DNA 进行杂交,通过检测杂交信号强弱和探针位置即可获取靶 DNA 表达情况和序列信息。基因芯片是一种高通量分析方法,在一次实验中能够平行检测和分析成千上万个(目前可达到 20 000~40 000 个)靶基因。由于探针的位置与序列是已知的,故可以快速准确鉴定未知样品的序列,特别适合现代传染病快速控制与诊断的需要。

(2)类型:生物芯片种类繁多,根据所要检测的生物分子不同可分为 DNA 芯片、RNA 芯片、蛋白质芯片和组织芯片等。RNA 芯片由从各种不同的组织中提取的高质量 mRNA 组成,用于分析待测基因在不同组织细胞中的表达状况。蛋白芯片是由固定于支持介质上的蛋白或多肽构成的微阵列;蛋白芯片可获得各种不同时期、不同形态细胞的各种酶谱和蛋白谱,对疾病临床诊断、治疗、药物筛选设计、药物靶标确定有十分重要的指导作用。组织芯片是一种新型的生物芯片技术,在肿瘤学研究中非常重要。

DNA 芯片主要包括两种类型:机械点样 DNA 微阵列和寡核苷酸微阵列。制备机械点样 DNA 微阵列需要将预先合成的单链或变性的双链 DNA 分子(来自 cDNA 文库或基因组的 PCR 扩增产物)固定到玻片表面^[1]。每张玻片能排列多达 20 000 个探针,其中包括一些相邻或相距较远的重复探针,它们可以用于芯片的质控。每个 DNA 探针通常是全基

因或表达序列标签(EST),理想的探针长度为 300~800 bp。在基因表达研究中使用的 mRNA 样品被反转录成为 cDNA,并在反转录过程或随后的实验步骤中进行标记。实验组和对照组样本使用不同的荧光染料进行标记,通常是 Cy5(红色)和 Cy3(绿色)。然后将标记的两组靶分子混合后与固定在玻片上的探针分子进行特异性杂交。扫描后分别获得对应于每个探针分子形成的各点红、绿荧光信号,信号强度与每个待测基因在两种样本中的表达量成正比。如果芯片实验不要求高密度和双色标记,也可以将探针分子固定在尼龙膜而不是玻片上,并利用放射性同位素进行标记。

寡核苷酸即可以预先合成后点制于载体表面,也可以直接在固相载体表面原位合成,二者均不需要对寡核苷酸进行固定^[2]。寡核苷酸探针通常长为 20~70 bp,而不是一个基因的完整长度,因此可以针对每个基因设计多个探针分子,这样在一次实验中每个基因均可被重复检测,芯片的灵敏度和特异性得到提高。在病原体诊断与鉴定、基因分型及少数病原体的检测中多选择化学方法合成的短寡核苷酸探针(20~50 bp);而大规模病毒病原体的筛查及未知病原体的鉴定使用长的寡核苷酸探针(50~70 bp)。Affymetrix 芯片(Affymetrix, CA, USA)是寡核苷酸芯片的代表,它采用独特的 PM-MM 探针对设计,设计一对长约 20 bp 探针,其中一个是完全匹配(perfect match, PM),另一个是单碱基错配(mismatch, MM)探针。该设计可提高探针的灵敏度和特异性,尤其针对在一个复杂背景样品中低丰度表达产物的检测,而且 MM 探针有助于区分特异性结合与非特异性结合的靶片段,去除杂交中的背景信号。几项综合性实验已经对寡核苷酸微阵列在表达谱研究中的实用性进行了评价^[3,4]。寡核苷酸微阵列不仅能够辨别选择性剪接产生的不同转录本,还能区分高度同源的转录本。而且它不需要构建 cDNA 克隆、进行 PCR 扩增和序列验证,因此与 cDNA 微阵列相比,更加经济合算^[5]。

(3)实验设计:基因芯片实验主要归为基因型研究和基因表达研究两种类型。基因分型(分析病原体基因组 DNA 组成)研究用于发现和鉴定细菌、病毒、寄生虫和真菌。根据参照生物的基因组序列制备 DNA 芯片,然后将各种待分离株的序列与参照基因组进行比较,寻找二者之间的保守基因。然而,这种方法无法检测只存在于待测生物中的序列。解决这个问题一个方法是使用通用寡核苷酸芯片。这种芯片包括短寡核苷酸(6~10 bp)各种可能的组合形式,因此不必预先测定生物体的基因组序列。除此以外,基因芯片还能够全面分析一个生物体的转录谱。应用转录谱不仅可以研究未知基因的功能,而且能够扩大和加深对微生物细胞生

理过程的认识。

在基因芯片实验中,来源众多的系统误差影响所测定的基因表达水平,因此为了准确测定基因表达变化,在每个实验中将随机误差(实验误差)和系统误差的影响考虑在内是非常重要的。例如,众所周知两种荧光染料标记效率的差别是产生系统误差的一个来源。对不同类型 cDNA 微阵列而言,一些标准化方法可以用于解决荧光强度和空间位置依赖的染料偏倚^[6]。由于总 RNA 提取也是产生误差的重要来源,因此在实验设计中要确保 RNA 质量高,并符合荧光标记和微阵列杂交的要求,凝胶电泳有助于在每一步监测 RNA 样品质量。尽管一些研究者使用 [³³P] 标记样品^[7],但是在微阵列分析中 Cy3/Cy5 荧光标记是最广泛使用的方法。考虑到 RNA 提取、标记和杂交条件的影响, GeneChip 芯片 (Affymetrix) 已经公布标准实验方案 (<http://www.affymetrix.com/support/technical/index.affx>)。微阵列实验设计应当包含至少三次重复实验,有时多至五次。实际上恰当的重复次数将随着研究样本和实验本身内在因素的变化而变化。一些实验由于具有多种内在因素,因此需要多次重复才能获得具有统计学意义的结果。

几种新的而且十分复杂的数据分析方法已经可以使用,有的还在开发之中,但是,关于最具有统计学意义的分析方法还存在分歧。目前, Tusher 等^[8]开发的 SAM (Significance analysis of microarrays) 分析方法是使用最多的一种方法。大体上, SAM 方法根据表达变化大小将基因排序,并用相同方法分析重复实验的数据。SAM 方法根据预先设定的阈值能够估计出数据集中结果的假阳性率。 GeneSpring (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 软件包可以对数据进行统计分析,包括 SAM 方法,从而得到在统计学上表达水平发生显著变化的基因列表。数据分析后必须通过 Northern 印记或更加准确的方法如 RT-PCR 和适时定量 PCR 测定不同批次提取 RNA 的表达水平,验证微阵列的结果。

2. 基因芯片在传染病诊断中的应用:

(1) 直接检测病原: 传染病诊断比较常用的方法有病原分离和培养、光学显微镜和电子显微镜技术、经典血清学技术、现代免疫学技术和分子生物学技术。传染病危害较大,有些病原分离和培养需要很长时间,经典血清学方法、现代免疫学技术和分子生物学方法程序复杂、工作量大、周期长,因此不能满足人们对大量基因信息进行快速低成本检测的要求,特别是对于多病原混合感染的诊断。基因芯片是全基因组检测方法,其特异性比检测单个基因的传统诊断方法更高^[9]。

基因芯片是临床或环境中微生物种属鉴定的强有力工具。由于细菌 16S rRNA 和 23S rRNA 基因高度保守且进化速度缓慢,是细菌的活化石,所以在分类学研究中具有重要意义。针对以上两基因设计通用 PCR 引物,作为通用性靶标对所有细菌进行高通量检测,而其中的变异区为不同种属细菌所特有,可用于对不同种属细菌进行特异性鉴定^[10]。16S rDNA 已被用于分枝杆菌属和葡萄球菌属的检测^[11]。最近,

针对 16S 和 23S 基因中两个变异区的基因芯片被用于检测肠道病原。总共检测 99 份临床样本,结果表明这种芯片能够成功区分 15 个种属肠道致病菌,准确率为 80%,而其他病原由于芯片上没有相应的探针或滴度低等原因而未检出^[12]。环境中的病原体和他的毒素可以成为潜在的生物武器,对生物防御和公众健康构成巨大威胁,基因芯片可以迅速分析成千上万 DNA 序列,因此是环境中(如水和食物)病原体监测的有利工具^[13]。除了核糖体基因以外, *gyr* 基因、毒力因子和耐药基因等也可以作为基因芯片检测的靶基因^[14]。

变异和基因突变给病毒的分子诊断带来了困难。目前基因芯片检测病毒的方法已逐渐得到应用,其中一些是针对某一种属病毒的检测,如流感病毒、乙肝病毒和疱疹病毒等^[15-17]。例如,一些 A 型流感病毒诊断芯片包含 15 000 个长度 60-mer 的寡核苷酸探针,能够识别 16 种血球凝集素和 9 种神经氨酸酶基因。研究人员在这些芯片和探针制备以及结果分析等各方面均采用了先进技术^[15]。基因芯片还能检测混合病毒样本,例如 Chiu 等^[18]利用一种泛病毒 DNA 微阵列 (Virochip) 对 222 例儿童样本进行呼吸道病毒检测, Virochip 不仅能够检测流感病毒和呼吸道合胞病毒等 7 种常规病毒,还可以检测更多呼吸道病毒并发现双重感染。它的敏感性达到 85%, 特异性超过 99%; 因此研究者认为基因芯片有望用于儿童呼吸道感染的临床诊断。其他的例子还有利用基因芯片同时对血液标本中的 HIV-1、HBV 和 HCV 病毒进行检测^[19]。

由于基因芯片可以包含针对不同病原的大量探针,因此它在病原检测中不受种属甚至科别的限制。哥伦比亚大学的 Greene 感染性疾病实验室开发一个新的检测芯片系统 GreeneChip System, 能快速且灵敏地筛检病例组织、血液或尿液中的各种病原菌,包括病毒、细菌、真菌或寄生虫^[20]。 GreeneChip 共包括 29 455 个长度为 60-mer 的探针分子,分析流程不需超过 10 h。研究人员对若干患有呼吸道疾病、出血热和肺结核的病例采样,对芯片进行了测试,其分析结果都和传统方法(如培养法或 PCR 测试法)一致。新发传染病不断出现并对公共卫生和社会稳定构成巨大威胁,但是现有诊断方法往往无法迅速对未知病原进行鉴定。随着微生物基因组计划的快速进展,许多微生物已获得全基因组序列。由于同一属及同一种微生物部分序列的高度同源性,可以利用基因芯片技术实现对未知病原体的确定。例如, Wang 等^[21]选择各类病毒高度保守的 70-mer 序列,制备可用于检测 1000 种已知病毒和各科中新型别病毒的基因芯片 (Virochip)。通过微阵列杂交和随后直接测定病毒序列,研究人员确定 SARS 病毒为冠状病毒科的一个新成员。

(2) 间接检测病原: 宿主可以识别不同种属病原相关分子,例如细菌细胞壁成分、病毒核酸和毒力因子等,因此宿主受到不同的病原刺激后能够做出特异性反应,即病原感染后宿主细胞基因表达出现变化。 Octavio 等分析 131 例由 A 型流感病毒、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌引起

的急性感染患者外周血样本。发现 35 个 A 型流感病毒诱导的特异基因。它们可以用于区分流感病毒与大肠埃希菌或肺炎链球菌的感染,准确率达到 95%。根据不同的转录特征还能区分大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌之间的感染。由于不同病原体在呼吸道感染患者外周血白细胞中诱发的基因表达模式各不相同,因此利用芯片分析患者外周血白细胞有助于感染性疾病的间接诊断^[22]。

3. 基因芯片在病原生物遗传多样性研究中的应用:世界各国对传染病疫苗研究、药物研发非常重视,投入巨大,但至今为止,一些重要传染病现有疫苗保护效果仍不理想(如结核)或仍无安全有效的疫苗问世(如艾滋病),同时药物治疗效果也不理想。这些均与传染病病原高度变异及重组密切相关。病原生物突变和重组造成了丰富的遗传多样性。病原生物遗传多样性将直接影响传染病传播、疾病进程、治疗效果及疫苗研发,因此遗传多样性在传染病流行病学监测中具有重要意义。

病原遗传多样性主要表现为不同的型、组、亚型、亚亚型及亚型间流行重组形式等。传统血清型分类方法需要大量昂贵的抗血清,存在交叉反应,而且还有许多病原微生物无法用现有血清型方法分类。DNA 芯片克服单独应用多重 PCR 技术的不足之处,为病原微生物快速分子分型提供了切实有效的方法。研究人员采用包含肺炎链球菌血清型特异性探针的 DNA 芯片对多个国家 169 例样本进行分析。结果证明 DNA 芯片敏感性高,能够迅速辨别大多数肺炎链球菌血清型,并监测他们在各组病例以及不同地理位置中的分布情况。这些信息有利于疾病监测和评估疫苗效果^[23]。同样,研究人员选择来自 *ompA* 第二和第四功能域中的 35 个探针分子制备了一种具有高度特异性的 DNA 芯片。该芯片通过分析 *ompA* 在鸚鵡热嗜性衣原体种属内部的遗传多样性,研究鸚鵡热嗜性衣原体基因型的分布情况并发现非典型病原^[24]。Chizhikov 等根据轮状病毒高度保守的 VP7 基因设计寡核苷酸芯片,该芯片能够将 20 个轮状病毒归为 5 个已知的基因型^[25]。以上研究表明,基因芯片技术在病原生物基因分型研究方面有很高价值。

病原生物在疾病过程中易发生多种变异,从而导致对多种药物的耐药性,因此检测和分析其变异性与多态性具有重要临床意义。Gryadunov 等^[26]设计了一种寡核苷酸芯片,用于检测耐利福平和耐异烟肼的结核杆菌。结果表明这种芯片能够从唾液样本中检出 95% 利福平耐药菌株和 80% 异烟肼耐药菌。同样,Chen 等^[27]对 HBV 耐药株的检测也获得成功。在经直接测序证实的全部 388 个 HBV 突变株中,DNA 聚合酶基因所有预期的突变均完全被芯片检出,而且在野生型病毒和突变株混合感染的患者标本中,芯片也能成功检测出突变株。HIV 耐药机制十分复杂,难以通过病毒序列推测耐药水平。实际上,HIV 耐药研究大多数来自临床观察。然而某种 HIV 多态性(其中一些与耐药机制相关)可以通过专门的微阵列进行分析并应用于流行病学研究。Kozal 等^[28]通

过应用高密度寡核苷酸芯片对 167 个 HIV-1 临床分离株进行研究,发现美国 HIV-1 包膜 B 蛋白的变异性高于其他已知的 HIV-1 包膜蛋白,且具有自然多变性,其中许多基因的改变与抗蛋白酶抑制剂的耐药性有关。这对进一步探索人免疫缺陷病毒的耐药基因和耐药机制很有帮助。胶体固定的寡核苷酸芯片能够区分单碱基错配突变,Roudinskii 等^[29]使用这种芯片精确筛选了东欧 100 份病毒样本,发现 V77I 突变体并对其在东欧的流行传播进行详细分析。

4. 基因芯片在微生物进化与历史性研究中的应用:在广义流行病学研究中,基因芯片可以用于研究在生物进化过程中保守和异化基因,进而研究生物之间存在的联系。与传统实验方法相比基因芯片的优势在于它是一种全基因组研究方法,既可以研究历史性进化,又能分析比较新近的变化。基于全基因组微阵列的比较基因组杂交技术(CGH)能够检测其他微生物基因组中是否存在与所研究微生物相似的 DNA 片段,即实现全基因组范围内遗传物质比较。为了研究肺炎链球菌之间的基因重组,Hakenbeck 等^[30]采用包含 2000 个参照菌株基因的 Affymetrix 寡核苷酸芯片,与 20 个肺炎链球菌主要耐药分离株进行比较基因组杂交实验。结果表明这些耐药菌与参照菌同源性为 75%,存在的差异包括青霉素结合蛋白编码基因,他们代表微生物基因组中的镶嵌基因(mosaic genes),通过基因水平转移获取。轻型链球菌与肺炎链球菌标准株具有相似序列,说明二者之间可能发生基因水平转移和基因重组。Dobrindt 等^[31]进行了相似的研究,他使用 cDNA 芯片将 36 株肠外和肠道致病性和非致病性大肠埃希菌基因组进行比较;结果表明通过噬菌体获取基因或基因缺失均促进大肠埃希菌整体进化过程,更为重要的是,甚至在共生菌株中也可以找到毒力相关基因。随着时间变化,为了评价 BCG 疫苗的效果,研究人员制备了覆盖 99% 致病性结核分枝杆菌基因组的 cDNA 芯片,与致病性牛型结核分枝杆菌基因组进行比较,发现 91 个结核分枝杆菌中存在的 ORF 在牛型结核分枝杆菌中缺失,38 个在牛型结核分枝杆菌中存在的 ORF 在一些 BCG 菌株中缺失,这些结果为研究 BCG 菌株进化过程提高依据^[32]。Cherkasova 等^[33]的研究表明,基因芯片在脊髓灰质炎(polio)病毒流行病学研究中起着重要作用。遗传重组造成病毒自然群落趋异进化,易于出现变异较小的突变株,后者无法通过直接测序的方法进行检测,除非额外构建克隆。但是由于基因芯片灵敏度高,所以易于对这种遗传变异进行检测。另一项研究利用基因芯片发现 polio 疫苗株通过自发突变能够产生回复毒力的新突变株,这为口服减毒活疫苗株的进化研究提供宝贵线索^[34]。

菌株溯源为研究历史上暴发的传染病之间的联系提供新的线索。研究人员利用 cDNA 芯片研究几起不同时期出现的急性风湿热暴发^[35],通过比较 A 组 M18 血清型的 36 个链球菌分离株,发现 12 年来在盐湖城发生的这些暴发是由同一起源的菌株引起;但是如果设有这种细菌全基因组分析方法,实际上无法完成这种研究。

5. 其他应用:微阵列还用于分析病原体是否存在与致病性相关的遗传元件。研究人员设计了一种40-mer寡核苷酸低密度微阵列,由来源于各种沙门菌和大肠埃希菌中多种重要遗传标记组成,包括耐药性、致病性、菌毛和噬菌体相关基因,以及纤毛(H抗原)和脂多糖(O抗原)等。这种微阵列将在传染病流行、暴发以及风险评估研究(耐药基因传播)中发挥重要作用。它还将用于检测沙门菌的毒力和宿主特异性等^[36]。

6. 不足与展望:基因芯片是在长期以来发展完善的原位杂交技术基础之上发展起来的高通量研究方法,能够同时检测成千上万个靶标。尽管 DNA 微阵列技术已经取得长足的发展,但仍然存在巨大的挑战,例如成本昂贵、操作复杂、重复性差以及质控体系有待于进一步完善等问题。这些问题主要表现在样品制备、探针合成与固定、分子标记以及数据的读取与分析等几个方面。在病原检测方面,基因芯片的灵敏度还达不到直接检测病毒 RNA 的程度,还不能绕开样品扩增的步骤,目前普遍应用 PCR 扩增实现病毒靶基因的扩增,这在一定程度上削弱了它的优势。而且基因芯片的灵敏度还有待于进一步提高,尤其是对于滴度较低的病原。另外,与指纹识别技术如末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)或变性梯度凝胶电泳(DGGE)等相比,基因芯片只限于评估有可用探针的病原。传染病诊断 DNA 芯片面临的重要挑战还包括提高基因芯片的特异性,从而更好地区分芯片杂交背景所造成的假阳性和由于传染病样品中由于病原体拷贝数太低所造成的弱阳性^[37]。

参 考 文 献

[1] Schena M, Shalon D, Heller R. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20):10614-10619.

[2] Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(13):1675-1680.

[3] Dai H, Meyer M, Stepaniants S. Use of hybridization kinetics for differentiating specific from non-specific binding to oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acid Res*, 2002, 30(16):86-95.

[4] Wang HY, Malek RL, Kwitek AE. Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarrays. *Genome Biol*, 2003, 4(1):5-12.

[5] Nielsen PS, Ohlsson H, Alsbo C. Expression profiling by oligonucleotide microarrays spotted on coated polymer slides. *J Biotech*, 2005, 116(2):125-134.

[6] Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discover*, 2002, 1(12):51-60.

[7] Garcia-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(2):536-545.

[8] Tusher GV, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(9):5116-5121.

[9] Slezak T, Kuczmarowski T, Ott L. Comparative genomics tools applied to bioterrorism defence. *Brief Bioinform*, 2003, 4(2):133-149.

[10] Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 1996, 142(Pt1):3-16.

[11] Vernet G, Jay C, Rodrigue M. Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. *J Appl Microbiol*, 2004, 96(1):59-68.

[12] Jin DZ, Wen SY, Chen SH. Detection and identification of intestinal pathogens in clinical specimens using DNA microarrays. *Mol Cell Probes*, 2006, 20(6):337-347.

[13] Seregev N, Distler M, Courtney S. Multipathogen oligonucleotide microarray for environmental and biodefense applications. *Biosens*

Bioelectron, 2004, 20(4):684-698.

[14] Mikhailovich V, Gryadunov D, Kolchinsky A, et al. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases. *Biosens*, 2008, 30(7):673-682.

[15] Quan PL, Palacios G, Jabado OJ. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by Greene Chip Respi oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8):2359-2364.

[16] Sun Z, Ma W, Wei M. Identification of HCV-1b by low-density cDNA microarray-based assay. *Curr Microbiol*, 2007, 55(3):211-216.

[17] Zheng ZB, Wu YD, Yu XL. DNA microarray technology for simultaneous detection and species identification of seven human herpes viruses. *J Med Virol*, 2008, 80(6):1042-1050.

[18] Chiu CY, Urisman A, Greenhow TL. Utility of DNA microarrays for detection of viruses in acute respiratory tract infections in children. *J Pediatr*, 2008, 153(1):76-83.

[19] Khodakov DA, Zakharova NV, Gryadunov DA. An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. *Biotechniques*, 2008, 44(2):241-248.

[20] Palacios G, Quan PL, Jabado OJ. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(1):73-81.

[21] Wang D, Urisman A, Liu YT. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol*, 2003, 1(2):E2.

[22] Ramilo O, Allman W, Chung W. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood*, 2007, 109(5):2066-2077.

[23] Wang Q, Wang M, Kong F. Development of a DNA microarray to identify the *Streptococcus pneumoniae* serotypes contained in the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine and closely related serotypes. *J Microbiol Methods*, 2007, 68(1):128-136.

[24] Sachse K, Laroucau K, Hotzel H. Genotyping of *Chlamydia psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiol*, 2008, 17(8):63.

[25] Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(7):2398-2407.

[26] Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S. Evaluation of hybridization on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(7):531-539.

[27] Chen LY, Huang J, Zhang XP. Clinical evaluation of oligonucleotide microarrays for the detection of HBV mutants associated with lamivudine resistance. *Pharmacogenomics*, 2005, 6(7):721-730.

[28] Kozal MJ, Shah N, Shen N. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Medicine*, 1996, 2(7):753-759.

[29] Roudinskii NI, Sukhanova AL, Kazennova EV. Diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtype A2 and CRF03_AB protease in Eastern Europe: Selection of the V771 variant and its rapid spread in injecting drug user populations. *J Virol*, 2004, 78(20):11276-11287.

[30] Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B. Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 2001, 69(4):2477-2486.

[31] Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol*, 2003, 185(6):1831-1840.

[32] Behr MA, Wilson MA, Gill WP. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999, 284(5419):1520-1523.

[33] Cherkasova E, Laassri M, Chizhikov V. Microarray analysis of evolution of RNA viruses: evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16):9398-9403.

[34] Cherkasova EA, Yakovenko ML, Rezapkin GV. Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child; an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J Virol*, 2005, 79:1062-1070.

[35] Smoot JC, Barbian KD, van Gompel JJ. Genomesque analysis and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7):4668-4673.

[36] Malorny B, Bunge C, Guerra B. Molecular characterisation of *Salmonella* strains by an oligonucleotide multiprobe microarray. *Mol Cell Probes*, 2007, 21(1):56-65.

[37] 曾浔, 张建中. 基因芯片在传染病分子流行病学中的应用. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(5):399-401.

(收稿日期:2008-09-16)
(本文编辑:尹廉)