

荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐异烟肼突变

马晓光¹, 李辉¹, 石洁¹, 邢进¹, 闫国蕊¹, 李庆阁²

(1.河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450016; 2.厦门大学生命科学学院生物医学科学系分子诊断教育部工程研究中心)

摘要:目的 研究荧光 PCR 熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐异烟肼突变方法, 评价检测耐多药结核病的能力。方法 对结核病人临床分离结核分枝杆菌使用荧光 PCR 熔解曲线法检测, 与金标准传统药物敏感性试验比较, 获得该方法的灵敏度、特异度和一致率。结果 检测 408 例结核病人临床分离培养样本, 药敏试验检出 278 例异烟肼敏感标本, 130 例异烟肼耐药标本; 荧光 PCR 探针熔解曲线法检出异烟肼敏感和耐药标本 281 例、127 例, 灵敏度为 87.69%, 特异性为 95.32%, 一致率为 92.89%。结论 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测速度快、特异性强、灵敏度较高, 可用于结核分枝杆菌耐异烟肼突变的快速检测, 适于耐多药结核病的快速筛查。

关键词: 结核分枝杆菌; 熔解曲线法; 异烟肼; 检测

中图分类号: R-331 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2013)22-4201-05

Detection of isoniazid-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by fluorescent PCR probes and melt-curve analysis

MA Xiao-guang*, LI Hui, SHI Jie, XING Jin, YAN Guo-rui, LI Qing-ge.

*Centers for Disease Control and Prevention of Henan, Zhengzhou, Henan 450016, China

Abstract: **OBJECTIVE** The study explored the features of fluorescent PCR/melt-curves analysis in the detection of isoniazid-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, so to evaluate the capability of the method in the identification of multidrug-resistant tuberculosis. **METHODS** *Mycobacterium tuberculosis* isolated from tuberculosis patients were subjected to fluorescent PCR/melt-curves analysis and gold standard conventional drug susceptibility test. The results were compared to obtain the sensitivity, specificity, and consistency of the new method. **RESULTS** Among the 408 culture samples isolated from tuberculosis patients, drug susceptibility test indicated 278 isoniazid-sensitive and 130 isoniazid-resistant specimens, and fluorescent PCR/melt-curves analysis revealed 281 and 127 specimens, respectively. Consequently, sensitivity, specificity, and consistency of the fluorescent PCR/melt-curves analysis were 87.69%, 95.32%, and 96.32%, respectively. **CONCLUSION** Fluorescent PCR/melt-curves analysis is time-efficient and high in specificity and sensitivity, and may be used in the rapid detection of isoniazid-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and rapid screening of multidrug-resistant tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Melt-curve analysis; Isoniazid; Detection

结核病是一种重要的传染病, 随着抗结核药物的使用, 耐药结核病人也逐渐增加^[1,2], 其中耐多药结核病 (multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB)^[3] 即至少同时耐异烟肼 (INH) 和利福平 (RFP) 两种一线抗结核药物的结核病人也逐年增加, 高治疗成本、长治疗周期、低治愈率是 MDR-TB 的特点^[4,5]。传统对耐药病人的实验室检查主要依靠临床菌株分离后的药物敏感性试验, 检测周期长, 要 2~3 个月才能获得结果, 漫长的检测周期延误了治疗时机、

增加了传染几率、降低了治愈率。快速检测耐多药结核病已经成为了结核病控制工作的关键。随着对结核杆菌分子机制的认识和分子生物学技术的发展, 发展了多种耐多药结核病的分子检测方法。结核病分子检测方法主要通过检测与结核杆菌与耐药相关的基因突变, 而获得结核杆菌耐药信息。本研究对荧光 PCR 探针熔解曲线法 (简称熔解曲线法) 检测结核分枝杆菌耐异烟肼突变方法进行临床评估, 以评价其检测耐多药结核病的应用价值。

基金项目: “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治” 科技重大专项资助项目 (2008ZX10003-004)

作者简介: 马晓光 (1984-), 男, 本科, 研究方向: 结核病

通讯作者: 李辉, E-mail: lihui2005yan@126.com

1 材料与方法

1.1 标本收集

河南省疾病预防控制中心筛查出的痰涂片阳性

肺结核病人的痰标本进行分离培养, 痰标本分离培养按照中国防痨协会《结核病诊断实验室检验规程》^[6]进行。

1.2 药敏试验

对分离培养出的菌株进行结核分枝杆菌菌种鉴定并进行异烟肼药敏试验, 菌种鉴定使用对硝基苯甲酸 (PNB) 鉴别培养基和噻吩-2-羧酸肼 (TCH) 生长试验, 异烟肼药敏试验 (0.2 μg/ml) 为比例法, 均按照中国防痨协会《结核病诊断实验室检验规程》进行。

1.3 熔解曲线法检测 INH 耐药

按照熔解曲线法结核分枝杆菌异烟肼耐药突变检测试剂盒 (批号: 10110402, 厦门致善生物科技有限公司) 说明书操作, 简述如下。固体培养基上生长 2~3 周的结核分枝杆菌, 用标准接种环收集菌株 1 环, 振荡悬在 250 μl TB DNA 提取液中, 99℃ 加热 20 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取 5 μl 上清液, 加入到含 20 μl PCR 反应液的反应管中, 放入 IQ5 实时荧光 PCR 扩增仪 (USA, Bio-Rad) 进行扩增和熔解分析。PCR 反应程序: UNG (尿嘧啶糖苷酶) 去污染处理 50℃ 2 min, 1 个循环; 预变性 95℃ 10 min, 1 个循环; Touchdown 循环 95℃ 15 s, 70℃ 20 s (每个循环下降 1℃), 13 个循环; PCR 循环 76℃ 25 s, 95℃ 15 s, 57℃ 20 s, 76℃ 25 s, 42 个循环。熔解分析程序: 95℃ 2 min, 40℃ 2 min, 40℃~80℃ 每 1℃ 进行 FAM 和 TET 荧光信号采集, 1 个循环。当样品的熔解温度 (T_m) 与阳性对照的 T_m 一致 (误差不超过 1℃) 时判定为野生型; 样品的 T_m 低于阳性对照 2℃ 或 2℃ 以上时判定为突变型。

1.4 质量控制

(1) 进行比例法药敏试验的实验室接受国家结核参比实验室的质量控制。

(2) 熔解曲线法试验按照试剂盒说明书进行质量控制。

(3) 对熔解曲线法与比例法药敏试验检测结果不一致的样本进行测序验证, 用测序引物扩增包含 katG 待测区域的 288 bp 的 DNA 片段, 上游引物: 5'-CGAGACGTTTCGGCGCATG-3' 和下游引物: 3'-GTTATGTGGCGTTCCTGCC-5'; 扩增包含 inhA 待测区域的 261 bp 的 DNA 片段, 上游引物: 5'-ACATACCTGCTGCGCAATTC-3' 和下游引物: 3'-CTCCTTTGGCCCCCTAGCC-5'; 扩增包含 inhA94 待测区域的 305 bp 的 DNA 片段, 上游引物: 5'-CGTTTCACATCGCACGGGTAG-3' 和下游引物: 3'-GCTCTACACCTACGGGAACCTG-5'; 扩增包含 oxyR-ahpC 待测区域的 359 bp 的 DNA 片段, 上游引物: 5'-CTTTGCCGAAAGACATGCC-3' 和下游引物: 3'-TGATGAAGTGGTGATAGTGGTC-5'; 测序由

厦门大学分子诊断教育部工程研究中心进行。

1.5 统计学分析

熔解曲线法以比例法药敏试验为金标准计算灵敏度和特异度, 见表 1。

表 1 熔解曲线法与药敏试验结果比较

熔解曲线法	药敏试验	
	阳性	阴性
阳性	A	B
阴性	C	D
合计	A+C	B+D

$$\text{灵敏度} = A / (A+C) \times 100\%$$

$$\text{特异度} = D / (B+D) \times 100\%$$

$$\text{一致率} = (A+D) / (A+B+C+D) \times 100\%$$

使用 SPSS11.5 统计软件建立数据库, 并采用配对卡方检验 (McNemar Test) 和 Kappa 检验分析两种方法的一致性, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏

共收集涂片阳性的肺结核病人 413 例, 经分离培养, 剔除污染和未生长菌株 5 株, 共获得 408 株菌株, 经鉴定均为结核分枝杆菌, 其中 278 例异烟肼敏感菌株, 130 例异烟肼耐药菌株。

2.2 熔解曲线法

获得的 408 株临床分离结核分枝杆菌经熔解曲线法检测, 其中 127 株为异烟肼耐药株, 281 株为异烟肼敏感菌株。熔解曲线法检测典型结果见图 1。

2.3 灵敏度和特异度

熔解曲线法同比例法药敏试验比较, 灵敏度为 87.69% (114/130), 特异性为 95.32% (265/278), 结果见表 2。

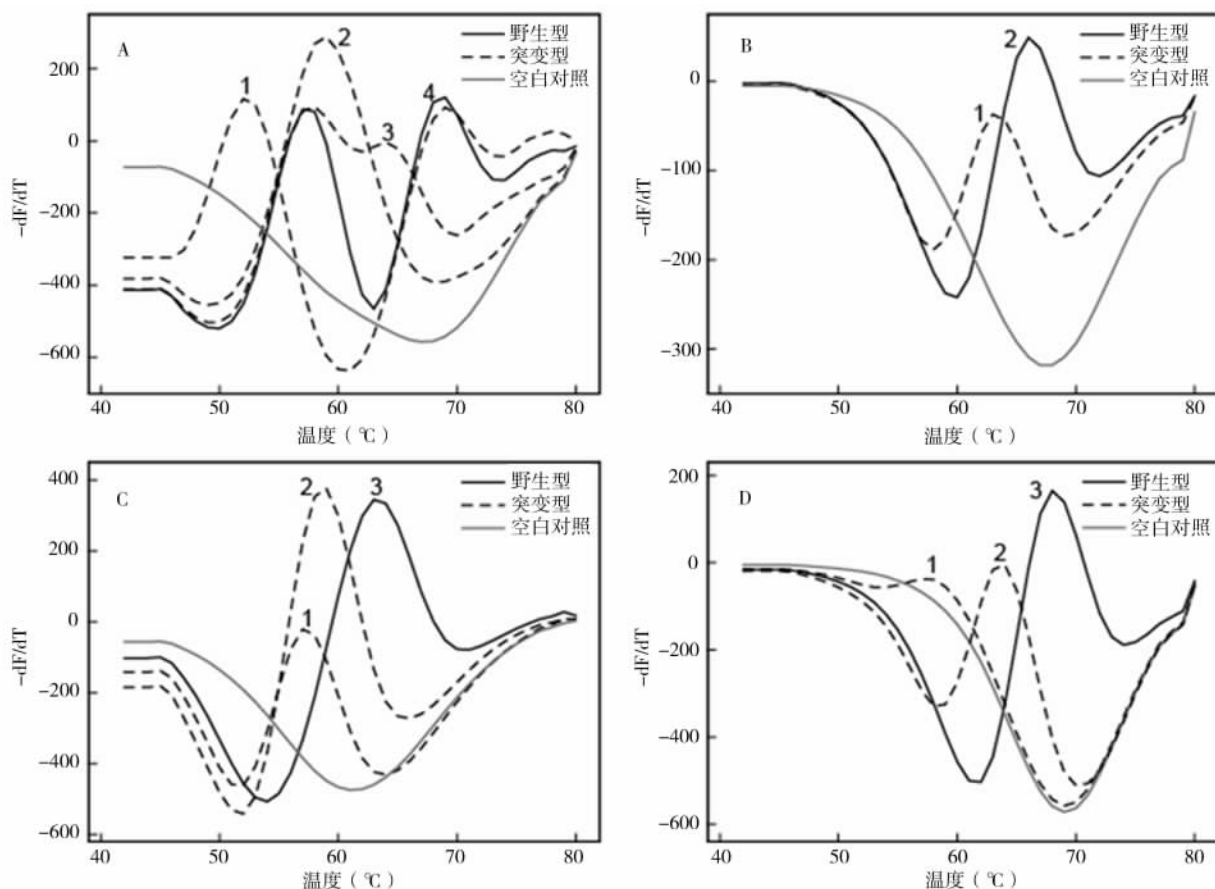
熔解曲线法同比例法药敏试验检测方法结果一致率为 92.89%, Kappa 值为 0.821 ($P = 0.007 < 0.05$), Kappa 值大于 0.75^[7] 说明两种检测方法结果有极好的一致性。

2.4 测序验证

对 29 株解曲线法与药敏试验结果不一致的结核分枝杆菌菌株进行了测序, 16 株药敏试验耐药而熔解曲线法检测敏感的菌株经测序, 其中 14 株试剂盒设计覆盖的位点无突变, 为野生型菌株; 1 株发生 inhA 启动子区-15C→Y 突变, 1 株发生 katG315AGC→ASC 突变。

13 株药敏试验敏感而熔解曲线法检测耐药的菌株, 5 株发现在 ahpC 启动子区有突变, 4 株发现在 inhA 启动子区有突变, 3 株发现在 katG315 位点有突变, 另有 1 株同时发生 ahpC 启动子区和 katG315

位点突变。结果见表 3。



注：图中 A, B, C, D 分别为 4 个检测通道的典型熔解曲线结果。A 图 1: *ahpC* -32 G→A 突变型, 2: *ahpC* -10 C→T 突变型, 3: *ahpC* -12 C→T 突变型, 4: 野生型; B 图 1: *inhA* 94 TCG→GCG 突变型, 2: 野生型; C 图中 1: *inhA* -8 T→C 突变型, 2: *inhA* -15 C→T 突变型, 3: 野生型; D 图 1: *KatG* 315 AGC→ACG 突变型, 2: *KatG* 315 AGC→ACC 突变型, 3: 野生型。图中纵坐标“-dF/dT”表示荧光强度对温度的负倒数。

图 1 熔解曲线法检测的典型结果

表 2 熔解曲线法与药敏试验检测结核分枝杆菌耐 INH 结果比较

熔解曲线法	比例法药敏试验		合计
	耐药	敏感	
耐药	114	13	127
敏感	16	265	281
合计	130	278	408

3 讨论

结核病耐药的分子检测方法基于对结核分枝杆菌的基因位点突变实现, 结核分枝杆菌对药物的耐受性主要是基因位点突变引起的, 不同基因位点的突变联系了不同的药物耐受。但结核杆菌耐 INH 的机制比较复杂^[8], 突变能引起 INH 耐药的基因有 *KatG*、*inhA*、*ahpC*、*ndh*、*Kas*。有研究显示^[9,10], *KatG* 和 *inhA* 突变为结核杆菌耐 INH 的主要方式, DNA 微阵列芯片技术晶芯 (中国, 博奥)^[10]和线性探针膜杂交技术 GenoType MTBDRplus assay (德国, HAINS)^[11], 这两种方法均检测异烟肼耐药突变位点

KatG 和 *inhA*。而荧光 PCR 探针熔解曲线法除检测异烟肼耐药突变位点 *KatG* 和 *inhA* 外又增加了 *ahpC* 启动子区 (-44~-30 以及 -15~3 位点), 这比基因芯片和线性探针增加了检测位点和突变类型, 同时获得了更高的灵敏度、特异度和一致性。此外, 芯片和线性探针技术可在 6~8 h 获得结果, 但需要特殊仪器, 操作步骤繁琐, 对操作人员的技术要求高, 而荧光 PCR 探针熔解曲线法在通用的荧光定量 PCR 仪上就能完成, 不需要特殊的仪器设备, 2~3 h 内就可以获得检测结果。

本研究中熔解曲线法未能检测出的 16 份药敏试验检测为耐药的标本, 经测序验证, 其中 14 株试剂盒设计覆盖的位点无突变, 说明本方法设计的探针未完全包含耐异烟肼结核杆菌的基因突变区, 为提高检测灵敏度还需覆盖更多的基因突变区。13 例药敏试验为敏感而熔解曲线法检出为耐药的标本, 测序证实, 5 例 *ahpC* 启动子区突变, 4 例 *inhA* 启动子区突变, 3 例 *katG315* 位点突变, 1 例同时发生 *ahpC* 启动子区和 *katG315* 位点突变。测序结果同探针熔

表 3 熔解曲线法与药敏试验检测结核分枝杆菌耐 INH 不一致菌株测序结果

样品编号	标本	比例法药敏试验	熔解曲线法	测序结果
HN001	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>inhA</i> 启动子-8T→G
HN012	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>ahpC</i> 启动子-10C→Y
HN013	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>katG315</i> AGC→ARC
HN014	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>katG315</i> AGC→ARC
HN023	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>ahpC</i> 启动子-10C→T
HN033	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>katG315</i> AGC→AAC
HN034	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>ahpC</i> 启动子-10C→T
HN084	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN104	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序 <i>inhA</i> 启动子-15C→Y
HN105	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序 <i>katG315</i> AGC→ASC
HN177	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>ahpC</i> 启动子-6G→A, <i>katG315</i> AGC→GGC
HN232	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>inhA</i> 启动子-15C→T
HN233	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN234	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>inhA</i> 启动子-15C→T
HN235	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>inhA</i> 启动子-15C→T
HN298	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN308	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>ahpC</i> 启动子-39C→T
HN333	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN337	结核分枝杆菌	敏感	耐药	测序 <i>ahpC</i> 启动子-6G→A
HN353	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN370	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN375	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN377	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN380	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN384	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN392	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN393	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN400	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变
HN403	结核分枝杆菌	耐药	敏感	测序检测区无突变

解曲线检测结果相一致,但因不同突变菌株个体在耐药水平上存在差异及表型检测方法的不足,会在基因检测发生了突变,而表型检测上可能显示不耐药或耐药水平很低,如 *KatG* 和 *inhA* 突变联系着不同的耐药水平, *KatG* 联系高耐药 ($> 1 \mu\text{g/ml}$), *inhA* 联系低耐药 ($< 1 \mu\text{g/ml}$)^[12]。

熔解曲线法技术上采用了闭管法,检测样本和试剂一经混合于反应管中,直至获得结果,反应管不再打开,这使得检测过程中减少了扩增产物的污染。该方法也可先在普通 PCR 仪器上扩增出产物,再至荧光 PCR 仪器上进行熔解曲线分析,使得扩增和熔解分析完全分开,这样就提高了操作的灵活性。

本研究表明,熔解曲线检测结核分枝杆菌耐异烟肼与药敏试验比较有很高的符合率和特异性,有较高的灵敏度,且检测快速、操作简便,可应用于结核分枝杆菌分离培养标本的耐异烟肼检测,适于对耐多药结核病的快速筛查。

参考文献

- [1] WHO. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing [R/OL]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/en/.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告 (2007~2008 年)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [3] CDC. Meeting the challenge of multidrug-resistant tuberculosis: summary of a conference [J]. *MMWR Recomm Rep*, 1992, 41 (RR-11): 51-57.
- [4] American Thoracic Society; CDC; Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2003, 52 (RR-11): 1-77.
- [5] Caminero Luna JA. Tuberculosis guide for specialist physicians [M]. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2004.
- [6] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程 [M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006.
- [7] 李永红. 实验研究列表资料的 SPSS 分析 [J]. *中国热带医学*, 2007, 7 (10): 1941-1943, 1958.

(下转第 4207 页)

3 讨论

过敏性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是特应性个体接触致敏原后由 IgE 介导的递质释放、并有多种免疫活性细胞和细胞因子参与的鼻黏膜慢性炎症反应性疾病。AR 的主要临床表现有鼻塞、流鼻涕、鼻痒、打喷嚏以及嗅觉功能障碍等。AR 的发病机制极其复杂, 涉及大量的细胞因子和炎症介质, 是多因素、多环节的共同作用。从免疫学角度来看, AR 是体外环境因素作用于机体导致的异常免疫反应, 造成 Th1 和 Th2 免疫反应失衡而引发的、以鼻腔黏膜 Th2 免疫反应为主的变应性炎症反应, 其主要的免疫病理学特征是组织中大量表达 Th2 细胞因子的细胞浸润^[1]。Th1 细胞的功能主要依赖 IFN- γ 实现。而 Th2 细胞功能主要依赖 IL-4、IL-5 等。有研究证据表明, 通过诱导 Th1 型细胞的反应来调节 Th2 型细胞的细胞因子分泌谱可以改善与 Th2 相关的疾病。据报道, IFN- γ 和 IL-12 等 Th1 型淋巴细胞及其细胞因子可以抵抗并抑制 Th2 型反应导致的过敏性疾病^[2,3]。事实上, IFN- γ 分泌的下调会增加过敏性疾病发病的可能, 患严重哮喘的患者接触过敏原后常呈现出明显的 IFN- γ 下调^[4]。因此, Th1/Th2 淋巴细胞亚群平衡及自身调节对过敏性疾病的发生发展有着极其重要的作用。

过敏原进入机体后, 最初引起 B 细胞和巨噬细胞对其的吞噬。细胞内的过敏原碎片被传递到过敏原特异性 T 细胞表面, 以分泌 IL-4、IL-5、IL-13 的 Th2 细胞为主。IL-4 及其他 Th2 细胞因子, 辅助招募可产生 IgE 抗体并能诱导过敏发生的 B 细胞、肥大细胞及嗜酸性粒细胞 (EOS) 等^[5]。IgE 抗体与嗜碱性粒细胞及肥大细胞相连后激活被 IgE 致敏的细胞, 分泌各种炎症介质, 如组胺、嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin)、花生四烯酸代谢产物 (LTB₄、PGD₂、LTC₄、LTD₄ 等), 引起各种临床症状^[6,7]。IL-4 为 IgE 的正性调节因子, 是过敏性鼻炎患者血清中 IgE 合成过多的主要原因, 所以降低 IL-4 的含量, 减少 IgE 合成是治疗过敏性鼻炎有效途径之一^[8]。

实验结果证实, 乳酸杆菌组能显著降低大鼠鼻分泌物中 EOS 含量 ($P < 0.05$), 与阳性药对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组的 IgE、IL-4 水平、IFN- γ 含量与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 证实了过敏性鼻炎大鼠模型中存在着以 Th2 免疫反应为主的变应性炎症反应。同时, 乳酸杆菌组能显著下调 IgE、IL-4 水平, 上调 IFN- γ 水平, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 乳酸杆菌组与阳性药对照组 IgE、IL-4、IFN- γ 的含量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示乳酸杆菌可以通过下调 IgE、IL-4 水平, 上调 IFN- γ 的含量, 影响 EOS 增殖和活化, 改变促进变态反应的 Th2 细胞偏倚, 通过调节宿主免疫功能而发挥抗过敏作用。

参考文献

- [1] Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts [J]. N Engl J Med, 2001, 344 (1): 30-37.
- [2] Cohn L, Homer RJ, Niu N, et al. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production [J]. J Exp Med, 1999, 190 (9): 1309-1318.
- [3] Dow SW, Schwarze J, Heath TD, et al. Systemic and local interferon gamma gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10 (12): 1905-1914.
- [4] Renzi PM, Turgeon JP, Marcotte JE, et al. Reduced interferon-gamma production in infants with bronchiolitis and asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159 (5 Pt 1): 1417-1422.
- [5] Maggi E. The TH1/TH2 paradigm in allergy [J]. Immunotechnology, 1998, 3 (4): 233-244.
- [6] Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy [J]. Immunol Res, 1999, 20 (2): 147-161.
- [7] Zhai Y, Ghobrial RM, Busuttill RW, et al. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost [J]. Crit Rev Immunol, 1999, 19 (2): 155-172.
- [8] 李彦华, 张新日, 亚生江, 等. 欧博鼻炎冲剂对变应性鼻炎大鼠血清总 IgE、Th2 细胞因子活性的影响 [J]. 陕西中医, 2012, 33 (3): 369-370.

收稿日期: 2012-11-01

(上接第 4204 页)

- [8] Kaufmann SE, Rubin E. Handbook of Tuberculosis: Molecular Biology and Biochemistry [M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
- [9] Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50 (8): 2640-2649.
- [10] Guo Y, Zhou Y, Wang C, et al. Rapid, accurate determination of multidrug resistance in M. tuberculosis isolates and sputum using a biochip system [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13 (7):

914-920.

- [11] Hain Lifescience. GenoType MTBDRplus - Your Test System for a Fast and Reliable Way to detect MDR-TB [EB/OL]. <http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/genotype-mtbdplus.html>
- [12] Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, et al. Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis isolates [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (7): 2338-2342.

收稿日期: 2012-11-07