论著

文章编号:1000-5404(2006)18-1846-04

应用PCR技术快速鉴定结核分枝杆菌复合群菌种

庄 燕[1],白 云[1],吴雪琼[2],张俊仙[2],梁建琴[2],阳幼荣[2],梁 艳[2],吕翠环[3],张广宇[3],李洪敏[2] ([1]第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038;[2]解放军总医院第二附属医院结核病研究室,北京 100091;[3]河北省胸科医院结核内科,石家庄 050041)

提 要:目的 建立快速鉴定结核分枝杆菌复合群菌种的方法。**方法** 将7对结核分枝杆菌复合群各菌种特异性引物(Mtbc1-7)进行聚合酶链反应(PCR)扩增,通过对扩增产物的不同系带型进行分析,对已知标准株和96株临床分离株进行菌种鉴定。**结果** 用3株结核分枝杆菌复合群(MTBC)标准株,9株非分枝杆菌标准株以及27株非结核分枝杆菌的分枝杆菌(MOTT)对7对结核分枝杆菌复合群各菌种特异性引物进行特异性鉴定,结果证明引物Mtbc1能鉴定出分枝杆菌和非分枝杆菌;引物Mtbc2能鉴定出MOTT和MTBC;引物Mtbc3能鉴定出田鼠分枝杆菌;引物Mtbc4能从MTBC中识别出牛分枝杆菌和卡介苗;引物Mtbc5能鉴定出非洲分枝杆菌Ⅱ型和结核分枝杆菌;引物Mtbc6和引物Mtbc4结合能鉴定出卡介苗;引物Mtbc7和引物Mtbc5联合能鉴定出canettii分枝杆菌。96株临床分离株经7对引物扩增,扩增结果显示MOTT 20株,牛分枝杆菌1株,卡介苗1株,canettii分枝杆菌3株,田鼠分枝杆菌3株,非洲分枝杆菌Ⅰ型3株,caprae分枝杆菌1株,结核分枝杆菌或非洲分枝杆菌Ⅱ型64株。**结论** 应用PCR技术鉴定结核分枝杆菌复合群菌种结果准确可靠,且具有简便和快速等优点,有较大的分子流行病学应用价值。

关键词: 结核分枝杆菌复合群;聚合酶链反应;菌种鉴定

中图法分类号: R378.911;R446.5;R446.61 **文献标识码:** A

Rapid species identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR

ZHUANG Yan[1], BAI Yun[1], WU Xue-qiong[2], ZHANG Jun-xian[2], LIANG Jian-qin[2], YANG You-rong[2], LIANG Yan[2], LU Cui-huan[3], ZHANG Guan-yu[3], LI Hong-min[2] ([1]Department of Medicine Heredity, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Tuberculosis Research Laboratory, Tuberculosis Center, The second affiliated Hospital, The Gerenal Hospital of PLA, Beijing 100091; [3]Chest Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: Objective To develop a new, rapid and easy method for species identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Methods Seven sets of primers (Mtbc1-7) for MTBC were used to amplify the genomic DNA from the reference strains and 96 clinical isolates. Results The specificities of 7 sets of primers were identified by PCR with 3 MTBC reference strains, 9 non-mycobacterium reference strains and 27 non-tuberculosis mycobacterium (NTM) reference strains. The results showed that mycobacterium and non-mycobacterium were identified by Mtbc1; NTM and MTBC by Mtbc2; *M. microti* by Mtbc3; *M. bovis* and *M. bovis* BCG by Mtbc4; *M. africanum* subtypeI and *M. tuberculosis* by Mtbc5; *M. bovis* BCG by Mtbc4 and Mtbc6 together; *M. canettii* by Mtbc5 and Mtbc7 together. Of 96 clinical isolates, 20 MOTT, 3 *M. microti*, 1 *M. bovis*, 1 *M. bovis BCG*, 3 *M. africanum subtype* Ⅰ, 1 *M. caprae*, 3 *M. canettii*, 64 *M. africanum subtype* Ⅱ and *M. tuberculosis* were identified. Conclusion PCR is a rapid and effective method for the species identification of MTBC, and can be used for molecular epidemiology.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex; polymerase chain reaction; species identification

据WHO统计表明,结核病在全世界范围内出现上升趋势,结核分枝杆菌复合群是引起人类结核病的主要病原菌。结核分枝杆菌复合群包括结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌Ⅰ型和Ⅱ型、牛分枝杆菌、卡介苗、田鼠分枝杆菌、*caprae* 分枝杆菌以及 *canettii* 分枝杆菌。结核分枝杆菌复合群在动物和人之间相互感染,因此有必要对结核分枝杆菌复合群进行菌种鉴定。而大多

基金项目: 全军医学"十一五"重大专项科研基金资助项目(20062056)
Supported by the Key Research Project of the "Eleventh Five-year Plan" of Medical Science of PLA(20062056)

作者简介: 庄 燕(1975-),女,湖南省长沙市人,硕士研究生,主管技师,主要从事结核分枝杆菌菌种鉴定及菌株分型方面的研究。电话:(010)66361536

通讯作者: 吴雪琼,电话:(010)66775109,E-mail: wu-xueqiong@263.net

收稿日期: 2006-04-04;**修回日期:** 2006-06-28

数实验室还不能完全鉴定结核分枝杆菌复合群各菌种。现在结核分枝杆菌复合群的菌种鉴定方法有 PCR 扩增 IS6110 鉴定法,PCR-RFLP 鉴定法[1,2]。PCR 扩增 IS6110 鉴定法是用 4 对分别针对 IS6110 不同区域的引物和 1 对分枝杆菌属特异的 16SrRNA 基因引物鉴定结核分枝杆菌复合群,但其结果的可靠性差。PCR-RFLP 鉴定法是以结核分枝杆菌复合群各菌种的特异引物对标本的 $oxyR^{285}$、$pncA^{57}$、$hsp65^{631}$、$gyrB^{\triangle}$、$gyrA^{95}$、$katG^{203}$、$katG^{463}$、16SrRNA(long)基因进行扩增,然后用 *Hae*Ⅲ、*Msp*Ⅰ、*Bst* XⅠ限制性内切酶消化扩增片段,通过电泳分析酶切图谱来鉴定菌种,可是重复性不够理想。本研究旨在应用 PCR 技术快速鉴定结核分枝杆菌复合群各菌种,为进一步菌种鉴定奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

菌株来源:结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv(93009)和其他分枝杆菌非分枝杆菌标准株,来源于中国药品生物制品检定所,结核和非结核临床分离株来源于解放军总医院第二附属医院临床实验室和河北省胸科医院。临床分离株已依据"全国结核病诊断细菌学检验规程"方法鉴定。主要试剂和相关酶:*red-Taq* DNA 聚合酶、dNTP 等 PCR 相关试剂购于北京赛百盛公司。

1.2　方法

1.2.1　DNA 的制备　　采用解放军总医院第二附属医院结核病研究室分枝杆菌提取方法。从固体培养基上刮取菌落,悬浮于 500 μl TE(pH 8.0)中,至 80 ℃水浴,灭活至少 30 min。加入溶菌酶至终浓度 2 mg/ml,37 ℃孵育 2 h,加入蛋白酶 K 和 10% SDS 至终浓度 50 μg/ml 和 1%,55 ℃孵育 2 h 以上。加入等体积 Tris 饱和酚,充分混匀至水相与酚相混匀成乳状,于 4 ℃ 8 000 r/min离心 10 min,取上层水相放入 1.5 ml 离心管中。加入等体积酚:氯仿(1∶1)充分混匀,于 4 ℃ 8 000 r/min 离心10 min,取上层水相放入 1.5 ml 离心管中。加入等体积氯仿充分混匀,于4 ℃ 8 000 r/min 离心 10 min,取上层水相放入 1.5 ml 离心管中。加入 1/10 体积的乙酸钠和 2 ~ 2.5 倍体积的无水乙醇,充分混匀, -20 ℃放置 2 h 以上。

1.2.2　PCR 引物的设计及合成　　根据 Richard 等[3]方法设计,引物 Mtbc1 可扩增分枝杆菌 16SrRNA 基因;引物 Mtbc2 可扩增结核分枝杆菌 Rv0577 基因;引物 Mtbc3 可扩增结核分枝杆菌复合群 IS1561' 基因;引物 Mtbc4 可扩增结核分枝杆菌复合群 Rv1510 基因;引物 Mtbc5 可扩增结核分枝杆菌复合群 Rv1970 基因;引物 Mtbc6 可扩增结核分枝杆菌复合群 Rv3877/8 基因;引物 Mtbc7 可扩增结核分枝杆菌复合群 Rv3120 基因(表 1),由上海生物工程公司合成。

1.2.3　目的基因的 PCR 扩增　　以结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 得到最优 PCR 扩增条件,在 25 μl 反应体系中,4 种脱氧核糖核酸(dNTP)的终浓度 25 μmol/L,上下液引物的终浓度各为 3.75 μmol/L,DNA 模板 10 ~ 100 mg, *redTaq*DNA 1 μl,反应条件 98 ℃预变性 10 min,热启动后转入 94 ℃ 90 s,65 ℃ 3 min,35 个循环,72 ℃延伸 7 min,每次扩增分别设阳性及阴性对照。用 7 对引物扩增产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示。

1.2.4　扩增产物的分析　　基于 PCR 片段的存在,MOTT 的扩增只有 Mtbc1 扩增阳性的第 1 号引物条带。结核分枝杆菌和非洲分枝杆菌Ⅱ型为 7 对引物全扩增阳性的 1、2、3、4、5、6、7 号条带;田鼠分枝杆菌是 Mtbc3 和 Mtbc5 阴性的第 1、2、4、6、7 号引物阳性条带;canettii 分枝杆菌有除 Mtbc7 阴性以外的另 6 对引物扩增阳性的第 1、2、3、4、5、6 号条带,非洲分枝杆菌Ⅰ型有除 Mtbc5 阴性外的第 1、2、3、4、6、7 号引物扩增阳性条带,caprae 分枝杆菌为除 Mtbc5 和 Mtbc7 外的第 1、2、3、4、6 号引物扩增阳性条带,牛分枝杆菌为 Mtbc1, Mtbc2, Mtbc3, Mtbc6 阳性的第 1、2、3、6 号引物条带,卡介苗比牛分枝杆菌少 1 个 Mtbc6 阳性的结果,为第 1、2、3 号引物阳性扩增条带。

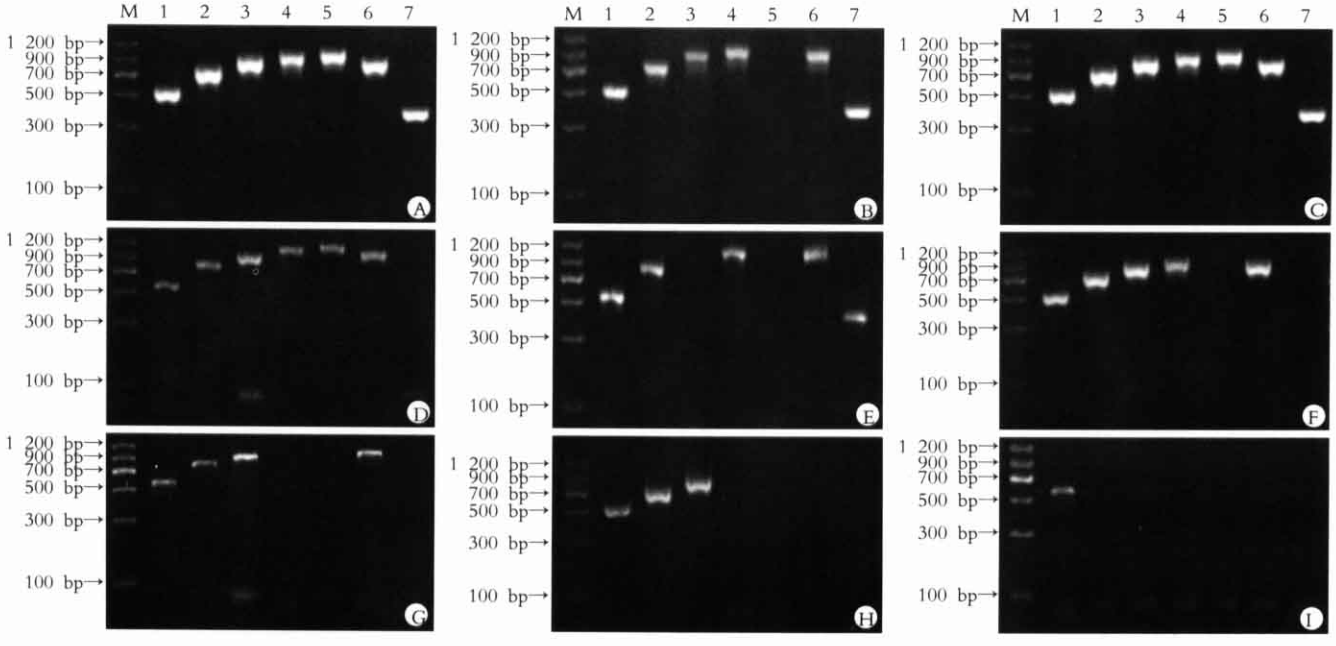
表 1　PCR 扩增所用引物序列

引物名称	序列 5'-3'	扩增产物大小(bp)
Mtbc1	5'-ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC-3'	543
	5'-TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA-3'	
Mtbc2	5'-ATGCCCAAGAGAAGCGAATACAGGCAA-3'	786
	5'-CTATTGCTGCGGTGCGGGCTTCAA-3'	
Mtbc3	5'-GCTGGGTGGGCCCTGGAATACGTGAACTCT-3'	943
	5'-AACTGCTCACCCTGGCCACCACCATTGACT-3'	
Mtbc4	5'-GTGCGCTCCACCCAAATAGTTGC-3'	1 033
	5'-TGTCGACCTGGGGCACAAATCAGTC-3'	
Mtbc5	5GCGCAGCTGCCGGATGTCAAC-3'	1 116
	5'-CGCCGGCAGCCTCACGAAATG-3'	
Mtbc6	5'-CGACGGGTCTGACGGCCAAACTCATC-3'	999
	5'-CTTGCTCGGTGGCCGGTTTTTCAGC-3'	
Mtbc7	5'-GTCGGCGATAGACCATGAGTCCGTCTCCAT-3'	404
	5'-GCGAAAAGTGGGCGGATGCCAGAATAGT-3'	

2　结果

引物 Mtbc1 对 9 株非分枝杆菌标准株和 29 株分枝杆菌标准株(表 2)进行扩增,非分枝杆菌标准株扩增结果呈阴性,分枝杆菌标准株扩增结果都呈阳性,均产生 543 bp DNA 目的片段。对 97 株临床分离株进行扩增,鉴定出其中 1 株为非分枝杆菌,96 株为分枝杆菌。引物 Mtbc2 对 27 株 MOTT 标准株和 3 株结核分枝杆菌标准株进行扩增,MOTT 标准株扩增结果全为阴性,而结核分枝杆菌为阳性,得到 786 bp DNA 目的片段。对 96 株临床分离株进行扩增,鉴定出其中 20 株为 MOTT,76 株为结核分枝杆菌。引物 Mtbc3 对 H37Rv,牛分枝杆菌,卡介苗标准株的 IS1561' 基因进行扩增呈阳性,得到 943 bp DNA 目的片段,对 76 株结核分枝杆菌复合群临床分离株进行鉴定,其中 3 株为田鼠分枝杆菌,扩增结果为阴性。以 H37Rv 为阳性对照,用引物 Mtbc4 对牛分枝杆菌和卡介苗标准株进行扩增,得到阴性结果,以此作为引物 Mtbc4 扩增的阴性对照,对 73 株结核分枝杆菌临床分离株 Rv1510 基因进行扩增鉴定,其中 2 株为阴性,这 2 株结核分枝杆菌临床分离株经引物 Mtbc5, Mtbc6 进一步扩增,扩增结果与牛分枝杆菌和卡介苗标准株对照,鉴定其中 1 株为牛分枝杆菌,1 株为卡介苗。76 株结核分枝杆菌临床分离株经引物 Mtbc5 对 Rv1970 基因进行扩增,其中 67 株为阳

性结果，得到1 116 bp DNA目的片段，9株为阴性；阳性结果的菌株为结核分枝杆菌、*canettii*分枝杆菌、及非洲分枝杆菌Ⅱ型。引物Mtbc6对76株结核分枝杆菌临床分离株和3株结核分枝杆菌复合群标准菌进行扩增，只有卡介苗标准株和1株结核分枝杆菌临床分离株为阴性，证明此株为卡介苗，而其余75株均为阳性，产生1条999 bp DNA条带。引物Mtbc7扩增了只有*canettii*分枝杆菌缺失的部分RD^{CAN}位点上的Rv3120基因，对76株结核分枝杆菌临床分离株和结核分枝杆菌复合群标准株进行扩增，H37Rv标准株为阳性结果，而卡介苗、牛分枝杆菌标准株则为阴性，共有70株结核分枝杆菌临床分离株为阳性结果，产生1条404 bp DNA条带。96株临床分离株最后鉴定结果（表3）。见图1。



A：结核分枝杆菌；B：非洲分枝杆菌Ⅰ型；C：非洲分枝杆菌Ⅱ型；D：canettii分枝杆菌；E：田鼠分枝杆菌；F：caprae分枝杆菌；G：牛分枝杆菌；H：卡介菌；I：非结核杆菌的分枝杆菌　M：标准；1：Mtbc1；2：Mtbc2；3：Mtbc3；4：Mtbc4；5：MTBC5；6：Mtbc6；7：Mtbc7

图1　结核分枝杆菌复合群和MOTT分离株的扩增代表图

表2　标准菌株的PCR扩增结果

菌株名称	扩增产物						
	Mtbc1	Mtbc2	Mtbc3	Mtbc4	Mtbc5	Mtbc6	Mtbc7
结核分枝杆菌	+	+	+	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	−	−	−	−	−	−	−
鲍曼不动杆菌	−	−	−	−	−	−	−
人葡萄球菌	−	−	−	−	−	−	−
嗜麦芽窄食单胞菌	−	−	−	−	−	−	−
埃希大肠杆菌	−	−	−	−	−	−	−
洛菲不动杆菌	−	−	−	−	−	−	−
铜绿假单胞菌	−	−	−	−	−	−	−
弗劳地枸橼酸盐杆菌	−	−	−	−	−	−	−
产酸克雷伯氏菌	−	−	−	−	−	−	−
耻垢分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
微黄分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
抗热分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
斯氏分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
田野分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
鸟分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
苏加分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
次要分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
龟分枝杆菌龟亚种	+	−	−	−	−	−	−
猿猴分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
母牛分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−

续表2

楚布分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
不产色分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
胞内分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
金色分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
草分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
戈登分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
海分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
偶发分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
浅黄分枝杆菌	+	−	−	−	−	−	−
牛分枝杆菌	+	+	+	−	−	+	−
卡介苗	+	+	+	−	−	−	−

表3　96株临床分离株PCR扩增结果

菌株	株数	Mtbc1	Mtbc2	Mtbc3	Mtbc4	Mtbc5	Mtbc6	Mtbc7
MOTT	20	+	−	−	−	−	−	−
牛分枝杆菌	1	+	+	+	−	−	+	−
卡介苗	1	+	+	+	−	−	−	−
canettii分枝杆菌	3	+	+	+	+	+	+	−
田鼠分枝杆菌	3	+	+	−	+	−	+	+
非洲分枝杆菌Ⅰ型	3	+	+	+	+	−	+	+
caprae分枝杆菌	1	+	+	+	+	−	+	−
结核杆菌或非洲分枝杆菌Ⅱ型	64	+	+	+	+	+	+	+

3　讨论

PCR 菌种鉴定法是用结核分枝杆菌复合群各菌种的特异性引物对标本 DNA 进行 PCR 扩增,根据扩增产物所产生的特异性片段进行鉴定。本实验选择分枝杆菌的 16SrRNA 基因进行扩增是想区分开分枝杆菌和非分枝杆菌,16SrRNA 是分枝杆菌的特有分枝杆菌基因。而 Rv0577 是所有结核分枝杆菌复合群的保守基因[4]。是否缺失 IS1561' 基因是田鼠分枝杆菌和其他结核分枝杆菌复合群的区别,Gordon 等[5]曾注意到在对所有结核分枝杆菌复合群 IS1561' 基因进行扩增时,除了田鼠分枝杆菌外的其他所有结核分枝杆菌复合群都呈阳性,因此,他们认为缺失 IS1561' 基因可以作为田鼠分枝杆菌的特性[6]。最新的序列多态性(LPS)研究表明田鼠分枝杆菌缺失 IS1561' 基因。另外 Rv1510 基因的缺失是牛分枝杆菌和卡介苗与结核分枝杆菌复合群其他菌种的区别之一。先前的研究证明可以利用 RD4 片段将牛分枝杆菌和卡介苗与结核分枝杆菌复合群其他菌种区分开[5,6],设计针对 Rv1510(位于 RD4 片段内部)基因的引物 Mtbc4 对标准株进行扩增结果表明牛分枝杆菌和卡介苗确实缺失 Rv1510 基因,而其他结核分枝杆菌复合群菌种,都含有 Rv1510 基因,对临床分离株的扩增,也得到同样的结果,牛分枝杆菌和卡介苗都呈阴性,结核分枝杆菌复合群其他菌种呈阳性结果,因此,RD4 缺失或缺失 Rv1510 基因可作为区分牛分枝杆菌、卡介苗与结核分枝杆菌复合群其他菌种的依据。Rv1970 基因是结核分枝杆菌和非洲分枝杆菌Ⅱ型,以及 canettii 分枝杆菌与结核分枝杆菌复合群其他菌种的区别之一[5,6],Rv1970 基因位于 RD7 片段内,在先前的 PCR 扩增试验中,已显示 RD7 存在于所有受测的结核分枝杆菌、canettii 分枝杆菌、及非洲分离株中[2,5,7]。缺失 Rv3877 和 Rv3878 基因的 RD 位点使卡介苗区别于结核分枝杆菌复合群其他菌种[5,6]。在以前的实验中,已表明 RD 位点在所有的卡介苗分离株中被选择性缺失,RD 位点存在的 Rv3120 基因使牛分枝杆菌、卡介苗、caprae 分枝杆菌和 canettii 分枝杆菌区别于结核分枝杆菌复合群其他菌种,RD^{CAN} 和 RD12 都包括 Rv3120 基因,结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌Ⅱ型、Ⅰ型和田鼠分枝杆菌扩增阳性,牛分枝杆菌、卡介苗、caprae 分枝杆菌和 canettii 分枝杆菌扩增结果呈阴性,缺失 Rv3877 和 Rv3878 基因对于卡介苗来说是一个非常好的阳性标记[8,9]。本研究针对这 7 个结核分枝杆菌各菌种所特异的基因,设计了 7 对相应的特异性引物 Mtbc1-7,通过进行简便的 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳,快速的鉴定出了结核分枝杆菌复合群各菌种;其结果与国外文献[3]报道一致。但由于所选取的引物数目和菌株数量均较少,其得到的结果还较粗略。同时它有一个最大的局限性,不能从非洲分枝杆菌Ⅱ型中分出人型结核分枝杆菌,不能从染色体的不同,对其进行分开,也无法用单独基于 DNA 基础的方法区分所有非洲分枝杆菌Ⅱ型。在 DNA 分析中,有一个观点非洲分枝杆菌Ⅱ型只是 1 个带有变异的非洲分枝杆菌的另 1 个亚种,其缺乏"现代"结核分枝杆菌识别的 TbD1 位点[2],因而没有形成一个单独的种。随着分子生物学技术的发展,我们将得到更多的结核分枝杆菌复合群各菌种特异性基因,将其鉴定得更细,更精确。

结核病在全球范围内的广泛流行,已经成为全球性的重大公共卫生问题。在全球交通发展迅速和人口流动频繁以及艾滋病流行的背景下,迫切需要对结核病进行流行病学的研究,以利于更好的制定控制策略。在我国利用合适的结核分枝杆菌复合群菌种鉴定方法,进行分子流行病学调查和研究,能够为制定有效的控制和治疗策略提供理论依据。

参考文献:

[1] FROTHINGHAM R, STRICKLAND P L, BRETZEL G, *et al*. Phenotypic and genotypic characterization of Mycobacterium africanum isolates from West Africa[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1921 - 1926.

[2] BROSCH R, GORDON S V, MARMIESSE M, *et al*. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6): 3684 - 3689.

[3] HUARD R C, DE-OLIVEIRA-LAZZARINI L C, BUTLER W R, *et al*. PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1637 - 1650.

[4] COLE S T, BROSCH R, PARKHILL J, *et al*. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence[J]. Nature, 1998, 393(6685): 537 - 544.

[5] GORDON S V, BROSCH R, BILLAULT A, *et al*. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays[J]. Mol Microbiol, 1999, 32(3): 643 - 655.

[6] BEHR M A, WILSON M A, GILL W P, *et al*. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray[J]. Science, 1999, 284(5419): 1520 - 1523.

[7] MOSTOWY S, COUSINS D, BRINKMAN J, *et al*. Genomic deletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculosis complex[J]. J Infect Dis, 2002, 186(1): 74 - 80.

[8] PARSONS L M, BROSCH R, COLE S T, *et al*. Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2339 - 2345.

[9] TALBOT E A, WILLIAMS D L, FROTHINGHAM R. PCR identification of Mycobacterium bovis BCG[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(3): 566 - 569.

(编辑　陈聪连)