文章编号:1000-5404(2014)13-1345-05

论著

基因芯片法快速检测脊柱结核临床分离株SM、EMB、LVFX、AMK、CPM耐药

程 鹏[1],张泽华[1],李力韬[1],张冠斌[2],郭 永[2],罗 飞[1],周 强[1],代 飞[1],何清义[1],许建中[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心[1];102206 北京,生物芯片北京国家工程研究中心[2])

[摘要] **目的** 制备一种用于检测链霉素(streptomycin, SM)、乙胺丁醇(ethambutol, EMB)、左氧氟沙星(levofloxacin, LVFX)、阿米卡星(amikacin, AMK)、卷曲霉素(capreomycin, CMP)耐药基因的新型微阵列芯片,测试其快速检测脊柱结核临床分离株耐药的效果。**方法** 根据SM、EMB、LVFX、AMK、CPM 5种药物的常见耐药基因及突变位点(rpsL、rrs、embB、rrs及gyrA),制备DNA微阵列芯片,脊柱结核临床分离株耐药菌株111株及敏感菌株26株,均具备完整的临床信息及药敏结果,依次进行灭活、核酸提取、PCR扩增、芯片杂交、洗涤与扫描判读,与表型药敏结果对照,计算敏感度、特异度及95% *CI*。**结果** 检测时间18~23(20.1±1.2)h。与表型药敏结果对照,基因芯片检测SM、EMB、LVFX、AMK、CPM耐药的敏感度分别为90.36%、61.90%、94.59%、66.00%、65.52%,其对应的特异度分别为70.37%、58.11%、58.00%、91.95%、80.56%;在26株全敏感菌株中,结果均显示为野生型,对5种抗结核药物耐药检测的特异度均为100%。**结论** 基因芯片法检测结核耐药耗时短,一线、二线耐药检测的敏感度、特异度令人满意,生物安全性高,能够满足临床耐多药结核快速诊断需要。

[关键词] 基因芯片;脊柱结核;耐药
[中图法分类号] R372; R446.7; R529.2 [文献标志码] A

Rapid detection of SM/EMB/LVFX/AMK/CPM resistance by DNA microarray for clinical isolates from spinal tuberculosis

Cheng Peng[1], Zhang Zehua[1], Li Litao[1], Zhang Guanbin[2], Guo Yong[2], Luo Fei[1], Zhou Qiang[1], Dai Fei[1], He Qingyi[1], Xu Jianzhong[1] ([1]Department of Orthopaedic, Center of Orthopaedic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing, 102206, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the feasibility and efficiency of newly self-designed DNA microarray for rapid detection of resistance to streptomycin (SM), ethambutol (EMB), levofloxacin (LVFX), amikacin (AMK) and capreomycin (CMP) in spinal tuberculosis. **Methods** The new DNA microarray was designed to test the resistance-determining regions in rrs and rpsL (SM), embB (EMB), gyrA and gyrB (LVFX), and rrs (AMK and CMP). A set of 111 drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, and 26 drug sensitive *Mycobacterium tuberculosis* strains with full clinical data and sensitivity test results were tested by the new DNA microarray and by DNA sequencing after inactivation, nucleic acid extraction, PCR amplification, chip hybridization, washing and scanning interpretation. The sensitivity and specificity were evaluated. **Results** The average detection time was 20.1±1.2 h (ranged from 18 to 23 h). The sensitivity of the MTBDR test was 90.36%, 61.90%, 94.59%, 66.00% and 65.52% for SM/EMB/LVFX/AMK/CPM respectively, and their specificity was 70.37%, 58.11%, 58.00%, 91.95% and 80.56%, respectively. All 26 drug sensitive *Mycobacterium tuberculosis* strains were identified as wild type, and the specificity of these wild type strains was 100% for all 5 drugs. **Conclusion** This new DNA microarray is a rapid approach of good biosafety and high sensitivity and specificity in resistance test of first and second line MTB drug for the isolated *Mycobacterium tuberculosis* strains, and is satisfying in clinical practice for rapid diagnosis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains.

[**Key words**] gene chip; spinal tuberculosis; drug resistance

Supported by the Major Special Project of National Science and Technology Program (2013ZX10003003) and the Key Tackling Project of Science and Technology of Chongqing (CSTC2011AB5036). Corresponding author: Xu Jianzhong, E-mail: xjzslw@163.com

[基金项目] 国家科技重大专项(2013ZX10003003);重庆市重点攻关项目(CSTC2011AB5036)
[通信作者] 许建中,E-mail:xjzslw@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140303.1011.007.html(2014-03-03)

耐药结核分枝杆菌的传播流行正成为公共卫生的重大威胁。WHO 全球结核报告 2012[1] 显示:2011 年全球新发结核病例中约 28 万例为耐多药结核(multi-drug-resistant TB, MDR-TB)和广泛耐药结核(extensively drug-resistant TB, XDR-TB),既往病例中约 20% 出现耐药。耐药结核多由不规范化疗引起,其治疗困难、预后较差[2]。脊柱结核同样面临严峻的耐药问题。耐药脊柱结核容易引起初治失败或结核局部复发,因此早期诊断耐药脊柱结核对采取合理的治疗方案至关重要[3]。传统的基于分枝杆菌液体培养系统及改良罗氏绝对浓度法的药敏试验是耐药结核诊断的金标准。但其耗时较长,平均 1 ~2 个月的操作时间容易造成诊断延误,使耐药脊柱结核患者无法得到有效化疗,容易导致获得性耐药、结核复发或切口处窦道形成[4]。近年来,基于检测耐药基因突变来推测结核分枝杆菌的耐药表型的分子生物学技术,具有快速、准确、安全等优势[5-9]。在前期成功研发快速检测异烟肼、利福平耐药检测的基因芯片并市场化的基础上[10],为进一步拓宽耐药检测种类,特别是二线抗结核药物检测,满足多耐药、广泛耐药结核快速诊断需求,本研究设计新型微阵列芯片,可同时检测链霉素(streptomycin, SM)、乙胺丁醇(ethambutol, EMB)、左氧氟沙星(levofloxacin, LVFX)、阿米卡星(amikacin, AMK)、卷曲霉素(capreomycin, CPM)最常见突变位点,以脊柱结核耐药临床分离株做验证,研究其用于耐药结核诊断的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

BACTEC MGIT 960 分枝杆菌液体培养系统(becton dickinson),1200TE 生物安全柜(上海力申科学仪器公司),ABI 3500 型基因分析仪(applied biosystems);晶芯® LuxScan™ 10K-B 微阵列芯片扫描仪、晶芯® Extractor™ 36 核酸快速提取仪、E-Cycler™ 96 PCR 扩增仪、HybSet 基因微阵列芯片杂交盒、晶芯® Slidewasher™芯片洗干仪、晶芯® BioMixer™Ⅱ芯片杂交仪、晶芯® 结核分枝杆菌耐药检测芯片判别系统(北京博奥生物有限公司)。

1.2 样本收集

共 137 株脊柱结核分枝杆菌临床分离株,其中包括 111 株耐药菌株及 26 株敏感菌株,均筛选自重庆市公共医疗救治中心检验科的结核分枝杆菌菌株库。药敏试验采用 BACTEC MGIT 960 分枝杆菌液体培养系统及改良罗氏绝对浓度药敏法进行 11 种抗结核药物的敏感性试验,具体操作步骤参照《结核病诊断细菌学检验规程》。11 种测定药物的界限浓度如下(μg/mL):异烟肼(isoniazid, INH) 1、10,利福平(rifampicin, RMP) 50、250,SM 10、100,EMB 5、50,LVFX 5、50,对氨基水杨酸(para-aminosalicylic, PAS) 1、10,丙硫异烟肼(protionamid, Pto) 25、100,帕星肼(dipasic, Dip) 0.1、1,利福喷汀(rifapentine, RPT) 50、250,AMK 10、100,CPM 10、100。全部菌株具备完整的临床信息(包括年龄、性别、临床诊断、标本类型、涂片结果、菌株号)以及药敏结果(包括 EMB、SM、LVFX、AMK、CPM)。

1.3 基因芯片的探针设计与排布

通过 TB Drug Resistance Mutation Database 数据库查找 5 种药物的常见耐药基因及突变位点(表 1)。采用基因芯片微量点样技术,将寡核苷酸探针固定在经过醛基修饰的玻璃基片上,每种探针均重复点样 3 次,共 29 种寡核苷酸探针被用于检测以下基因相应位点的突变(表 1、2)。

表 1 5 种检测药物及对应的常见耐药基因和突变位点

检测药物	耐药相关基因	突变位点
EMB	embB	embB 306, embB 406, embB 497
SM	rrs	rrs 906, rrs 491, rrs 512, rrs 513, rrs 514, rrs 516, rrs 517
	rpsL	rpsL 43, rpsL 88
LVFX	gyrA	gyrA 88, gyrA 90, gyrA 91, gyrA 94
	gyrB	gyrB 472, gyrB 510, gyrB 512, gyrB 515
AMI(AMK/CPM)	rrs	rrs 1401, rrs 1402, rrs 1484

表 2 结核分枝杆菌 SM、EMB、LVFX、AMK、CPM 耐药基因微阵列检测芯片的探针排布情况

QC	BC	EC
Mycobacterium app	M. tuberculosis	rpsL-IC
rpsL 43WT(AAG)	rpsL AAG43AGG	embB-IC
rpsL 88WT(AAG)	rpsL AAG88AGG	rrs 517(C→T)
rrs 514&517WT	rrs 514(A→C)	BC
embB 306WT(ATG)	embB ATG306GTG	embB ATG306 CTG
embB ATG306ATA	embB ATG306ATC	embB ATG306ATT
rrs 1401&1402WT	rrs 1401(A→G)	rrs 1402(C→T)
rrs 1484WT	rrs 1484(G→T)	rrs IC
gyrA 88WT	gyrA GGC88GCC	gyrA IC
gyrA 90&91WT	gyrA GCG90GTG	gyrA TCG91CCG
gyrA 94WT	gyrA GAC94GGC	gyrA GAC94GCC
gyrA GAC94CAC	gyrA GAC94TAC	gyrA GAC94AAC
EC	NC	QC

QC:表面化学质控探针;BC:空白对照;EC:杂交阳性外对照探针;NC:阴性对照探针;IC:内对照探针;WT:野生型

SM 耐药检测微阵列包含 2 种用于检测野生型 rpsL 基因的探针及 2 种用于检测突变型 rpsL 基因的探针,1 种用于检测野生型 rrs 基因的探针及 2 种用于检测突变型 rrs 基因的探针;EMB 耐药检测微阵列包含 1 种用于检测野生型 embB 基因的探针及 5 种用于检测突变型 embB 基因的探针;LVFX 耐药检测微阵列包含 3 种用于检测野生型 gyrA 基因的探针及 8 种用于检测突变型 gyrA 基因的探针;AMK/CPM 耐药检测微阵列包含 2 种用于检测野生型 rrs 基因的探针及 3 种用于检测突变型

rrs 基因的探针;每种探针均水平点样 3 次。

1.4 标本处理、核酸提取、PCR 扩增芯片杂交、洗涤与扫描判读

参考产品操作说明介绍及文献[10-11]。

1.5 DNA 测序

若基因芯片杂交结果与表型药敏结果不符,则行 DNA 测序,以验证基因芯片检测耐药基因突变的准确性。

1.6 统计学方法

通过计算敏感度(真阳性率)、特异度(真阴性率)及其 95% *CI*,以评价基因芯片检测结核耐药的准确性。真阳性率指表型药敏与基因芯片均显示为阳性结果,真阴性率指表型药敏与基因芯片均显示为阴性结果。

2 结果

检测时间 18~23(20.1±1.2) h,DNA 测序与基因芯片检测的符合率为 96.35%(132/137)。

2.1 临床分离株的表型药敏结果

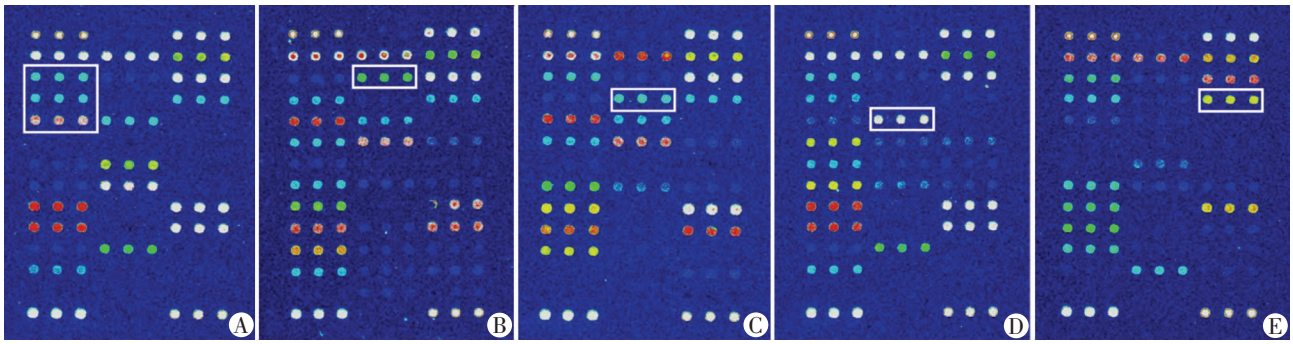
137 株结核分枝杆菌临床分离株样本中,包括 111 株不同耐药类型的耐药菌株及 26 株对全部药物敏感的菌株。其中,SM 耐药菌株 83 株,SM 敏感菌株 54 株;EMB 耐药菌株 63 株,EMB 敏感菌株 74 株;LVFX 耐药菌株 37 株,LVFX 敏感菌株 100 株;AMK 耐药菌株 50 株,AMK 敏感菌株 87 株;CPM 耐药菌株 29 株,CPM 敏感菌株 108 株。

2.2 基因芯片检测 SM、EMB、LVFX、AMK、CPM 耐药的敏感度与特异度

2.2.1 SM 耐药菌株 基因芯片检出 90.36%(75/83)发生突变,频率由高至低为:rpsL 43(A→G)(94.67%)、rpsL 88(A→G)(5.33%)、rrs 514(A→C)(5.33%)、rrs 517(C→T)(1.33%),另有 9.64%(8/83)结果为野生型;SM 敏感菌株中,基因芯片检出 29.62%(16/54)发生突变,其中 10 例为 rpsL 43(A→G)、4 例为 rpsL 88(A→G)、1 例为 rrs 514(A→C)、1 例为 rrs 517(C→T)(图 1、表 3)。

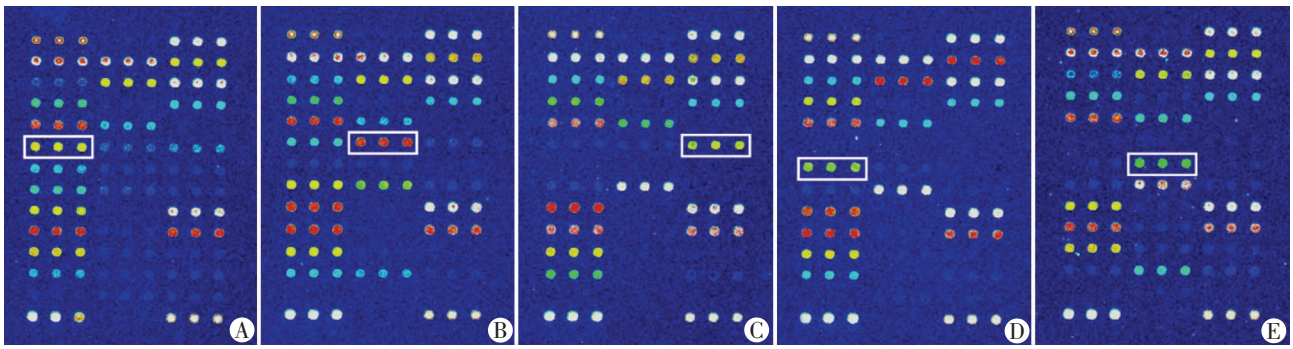
2.2.2 EMB 耐药菌株 基因芯片检出 61.90%(39/63)突变,频率由高至低为:embB 306(A→G)(45.94%)、embB 306(G→C)(24.32%)、embB 306(G→A)(18.92%)、embB 306(A→C)(10.81%),另有 38.09%(24/63)结果为野生型;EMB 敏感菌株中,基因芯片检出 41.89%(31/74)突变,其中 10 例为 embB 306(G→A)、8 例为 embB 306(A→C)、8 例为 embB 306(G→C)、5 例为 embB 306(A→G)(图 2、表 3)。

2.2.3 LVFX 耐药菌株 基因芯片检出 94.59%(35/37)突变,突变频率由高至低为:gyrA 94(A→G)(37.5%)、gyrA 90(C→T)(37.5%)、gyrA 94(G→A)(9.38%)、gyrA 94(A→C)(9.38%)、gyrA 88(G→T)(6.25%),另有 5.41%(2/37)结果为野生型;LVFX 敏感菌株中,基因芯片检出 42.00%(42/100)突变,其中 17 例为 gyrA 90(C→T)、9 例为 gyrA 94(A→G)、9 例为 gyrA 94(G→A)、7 例为 gyrA 94(A→C)(图 3、表 3)。



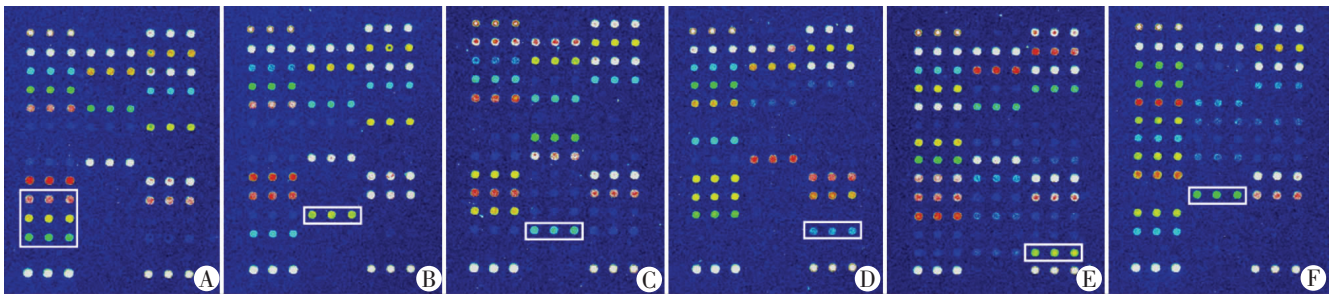
A:rpsL 43WT、rpsL 88WT、rpsL 514&517WT;B:rpsL 43(AAG→AGG);C:rpsL 88(AAG→AGG);D:rrs 514(A→C);E:rrs 517(C→T) 白色框:示相应位点发生突变

图 1 SM 耐药基因突变检测的基因芯片杂交图



A:embB 306WT;B:embB 306(ATG→GTG);C:embB 306(ATG→CTG);D:embB 306(ATG→ATA);E:embB 306(ATG→ATC) 白色框:示相应位点发生突变

图 2 EMB 耐药基因突变检测的基因芯片杂交图



A:gyrA 88WT、gyrA 90&91WT、gyrA 94WT;B: gyrA 90(GCG→GTG);C:gyrA 94(GAC→GGC);D:gyrA 94(GAC→GCC);E:gyrA 94(GAC→AAC);F: gyrA 88(GGC→GCC) 白色框:示相应位点发生突变

图3 LVFX耐药基因突变检测的基因芯片杂交图

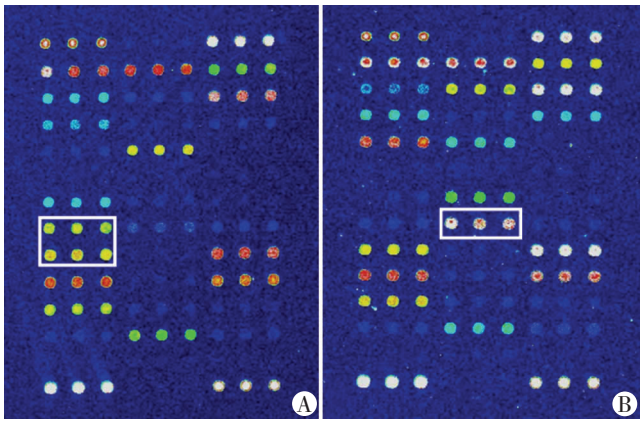
表3 基因芯片检测SM、EMB、LVFX、AMK、CPM耐药结核的敏感度与特异度(%)

检测药物	敏感度(95% *CI*)	特异度(95% *CI*)
SM	90.36(84.01~96.71)	70.37(58.19~82.55)
EMB	61.90(49.91~73.90)	58.11(46.87~69.35)
LVFX	94.59(87.31~100.00)	58.00(48.33~67.67)
AMK	66.00(44.39~72.28)	91.95(78.96~93.45)
CPM	65.52(33.54~69.91)	80.56(69.39~85.33)

2.2.4 AMK耐药菌株 基因芯片检出66.00%(33/50)rrs1401(A→G)位点突变,另有34.00%(17/50)结果为野生型;AMK敏感菌株中,基因芯片检出8.05%(7/87)rrs 1401(A→G)位点突变,但其中4例对CPM耐药(图4、表3)。

2.2.5 CPM耐药菌株 基因芯片检出65.52%(19/29)rrs1401(A→G)位点突变,另有34.48%(10/29)结果显示为野生型;CPM敏感菌株中,基因芯片检出19.44%(21/108)rrs 1401(A→G)位点突变,,但其中17例对AMK耐药(图4、表3)。

在26株全敏感菌株中,基因芯片杂交结果均显示为野生型,对5种抗结核药物耐药检测的特异度均为100%。



A:rrs 1401&1402WT、rrs 1484WT;B:rrs 1401(A→G) 白色框:示相应位点发生突变

图4 AMK与CPM耐药基因突变检测的基因芯片杂交图

3 讨论

目前,全球已开发出多种竞争性的结核耐药分子检测仪器,都是基于检测耐药基因突变来推测结核分枝杆菌的耐药表型,具有快速、准确、相对低的技术要求和简便的标本运输等优势,其中Xpert MTB/RIF、INNO-LiPA Rif. TB与Genotype MDR-Tbplus等技术还成为WHO推荐的分子药敏检测方法。由于M/XDR-TB的广泛流行,对其他一线药物及二线药物耐药的结核病患者也逐渐增多。而上述几种方法中,除Genotype MDR-Tbplus与Genotype MTBDRsl可用于检测一线药物及部分二线药物外,其余只针对一线药物中的RMP及INH设计[5-10]。因此,本研究制备出用于检测SM、EMB、LVFX、AMK、CPM 5种常用抗结核药物耐药性的DNA微阵列芯片。

研究报道,结核分枝杆菌对SM的耐药机制主要与rpsL基因及rrs基因的突变有关[12]。本研究应用的基因芯片覆盖了rpsL基因43、88位点及rrs基因514、517位点,检测SM耐药性的敏感度较高,显示基因位点的覆盖比较完全,但特异度仍然有待提高。

本研究中,基因芯片检测EMB耐药的敏感度与特异度分别为61.90%与58.11%,与文献[6]报道的Genotype MTBDRsl的敏感度相当,但特异度较其更低。然而,还有学者发现EMB敏感菌株中也存在embB基因306位点的突变,因此更倾向于将该位点的突变作为EMB耐药的预测标志,而非鉴定标志。因此,关于EMB耐药表型与embB突变间的关系,仍需进一步的基础研究证实[13-14]。本基因芯片覆盖了gyrA基因的88、90、91与94位点,检测LVFX耐药的敏感度较高(94.59%),较Genotype MTBDRsl的敏感度(87%)更高,但特异度较其明显更低,仍无法满足临床

应用需求,而 gyrA 基因 90 与 94 位点的突变频率较高,与既往报道相同[15-17]。另外,基因芯片检测 AMK/CPM 耐药性的敏感度较低,仅为 60.34%,以后需将检测 glyA 基因突变的探针也设计入基因芯片中,以提高检测准确性。特异度较高。最后,Genotype MTBDRsl 与本研究中的基因芯片覆盖同样的突变位点,且突变类型也主要为 rrs 1401(A→G),但本基因芯片检测 AMK/CPM 的敏感度、特异度均较 Genotype MTBDRsl 更低[6,18]。

本研究 EMB 与 LVFX 耐药检测特异度较低,原因可能为:①样本选择存在偏倚,111 株耐药菌株的耐药程度较重。而在 26 株全敏感菌株中,基因芯片检测的特异度均为 100%;②WHO 将比例浓度法药敏试验作为诊断耐药结核的金标准,而本研究采用绝对浓度法药敏试验,二者的一致性存在争议;③临床分离株由临床标本培养所得,为不同表型及基因型细菌的混合群体。另外,基因芯片检测 EMB、AMK、CPM 耐药性的敏感度较低,分析其原因可能为:①或存在其他耐药机制;②基因芯片覆盖的突变位点及类型不完全。药敏表型与基因芯片结果不符样本的 DNA 测序结果显示,基因芯片检测结果与测序结果有较高一致性,但与表型有一定差异,在接下来的研究中,可考虑调整检测基因的位点,提高芯片检测结果与表型的一致性。

综上所述,本实验对基因芯片检测 SM、EMB、LVFX、AMK、CPM 5 种药物耐药结核的准确性作了初步评价,检测结核耐药耗时短,一线、二线耐药检测的敏感度、特异度令人满意,生物安全性高,能够满足临床耐多药结核快速诊断需要。

参考文献:

[1] WHO report 2012. Global tuberculosis control[R]. Geneva: World Health Organization, 2012.

[2] Caminero J A, Sotgiu G, Zumla A, *et al*. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9): 621-629.

[3] Mukherjee J S, Rich M L, Socci A R, *et al*. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis[J]. Lancet, 2004, 363(9407): 474-481.

[4] Li L, Zhang Z, Luo F, *et al*. Management of drug-resistant spinal tuberculosis with a combination of surgery and individualised chemotherapy: a retrospective analysis of thirty-five patients[J]. Int Orthop, 2012, 36(2): 277-283.

[5] Boehme C C, Nabeta P, Hillemann D, *et al*. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.

[6] Bazira J, Asiimwe B B, Joloba M L, *et al*. Use of the GenoType® MTBDRplus assay to assess drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in rural Uganda[J]. BMC Clin Pathol, 2010, 10: 5.

[7] Boehme C C, Nicol M P, Nabeta P, *et al*. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study[J]. Lancet, 2011, 377(9776): 1495-1505.

[8] Abebe G, Paasch F, Apers L, *et al*. Tuberculosis drug resistance testing by molecular methods: opportunities and challenges in resource limited settings[J]. J Microbiol Methods, 2011, 84(2): 155-160.

[9] Brossier F, Veziris N, Aubry A, *et al*. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1683-1689.

[10] Zhu L, Jiang G, Wang S, *et al*. Biochip system for rapid and accurate identification of mycobacterial species from isolates and sputum[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3654-3660.

[11] Zhang Z, Li L, Luo F, *et al*. Rapid and accurate detection of RMP- and INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in spinal tuberculosis specimens by CapitalBio™ DNA microarray: a prospective validation study[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 303.

[12] Finken M, Kirschner P, Meier A, *et al*. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot[J]. Mol Microbiol, 1993, 9(6): 1239-1246.

[13] Sreevatsan S, Stockbauer K E, Pan X, *et al*. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(8): 1677-1681.

[14] Plinke C, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Significance of mutations in embB codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(5): 1900-1902.

[15] Malik S, Willby M, Sikes D, *et al*. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of gyrA and gyrB mutations[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39754.

[16] Wang J Y, Lee L N, Lai H C, *et al*. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5): 860-865.

[17] Lau R W, Ho P L, Kao R Y, *et al*. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of gyrA mutation at position 74[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(2): 608-614.

[18] Maus C E, Plikaytis B B, Shinnick T M. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8): 3192-3197.

(收稿:2013-11-22;修回:2014-01-22)

(编辑 栾 嘉)