

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000602

衛生福利部疾病管制署 103 年科技研究計畫

計畫名稱：開發基因分型方法及建置結核菌資料庫

103 年度 全 程 研 究 報 告

執行機構：衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：莊珮君

計畫協同主持人：周如文

研究人員：莊珮君

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 11 月 15 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、中英文摘要	(3)
貳、本文	
一、前言	(5)
二、材料與方法	(8)
三、結果	(10)
四、討論	(14)
五、結論與建議	(17)
六、計畫重要研究成果及具體建議	(18)
七、參考文獻	(19)
八、圖、表	
表一 Allelic diversity of each MIRU Locus	(22)

壹、 摘要

計畫目的：開發高鑑別力及高通量基因分型方法並建置結核菌基因資料庫，以做為監測臺灣結核菌基因型的工具，有效輔助結核病群聚事件傳染源追蹤及瞭解臺灣結核菌母群體基因型分布，達到即時監測以降低結核病傳播的最終目標。

研究方法：評估各 MIRU 或 VNTR locus 並進行組合性分析，同時與 IS6110 RFLP 進行平行比對，以建立臺灣適合的最佳化 MIRU-VNTR 組合。

主要發現：(1) 以 QUB3232、VNTR3820、QUB2163b、QUB18、Mtub21、MIRU26、QUB-26、VNTR4120、Mtub04、MIRU39 共 10 個 MIRU 位點可獲得最好的分型結果。(2) MIRU(10)須同時執行 spoligotype 分析，以正確判別菌株基因型。(3) 推測台灣 EAI 型菌株在 MIRU 基因型具有較高的相似度。在未來判定 EAI 型的疑似群聚事件時，當基因型顯示為相同時，必須進行更詳實的疫調以釐清傳染源。

結論及建議事項： MIRU(10) 基因型可建立未來判定基因型 cluster 定義的基準。spoligotype 基因型的檢驗並無法廢除。釐清群聚事件時，疫情調查的詳實度亦顯重要。為了確實找出傳染源，未來利用全基因體基因分型技術進行母群體菌株基因型的監測刻不容緩。

關鍵詞：結核病、基因分型、監測

Abstract

Aim: To establish a genotyping assay with high discriminative power and to establish a genotype database for population-based surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Based on those strategies, we can timely survey genotypes of *M. tuberculosis* complex of general tuberculosis (TB) population in Taiwan. The final goal is to decrease TB transmission in Taiwan.

Methods: The optimal combination of MRU-VNTR loci was evaluated and the discriminative power was assessed by parallel comparisons with results of the IS6110 RFLP method.

Results: (1) An optimal MIRU(10)-loci combination including QUB3232, VNTR3820, QUB2163b, QUB18, Mtub21, MIRU26, QUB-26, VNTR4120, Mtub04, and MIRU39 has been established; (2) Using MIRU(10) combined with spoligotyping analysis can correctly identify genotypes of *M. tuberculosis* complex; (3) Based on MIRU(10) results, we found high similarity of MIRU genotypes of EAI strains in Taiwan. Therefore, through epidemiology investigation is needed to identify actual infection source of TB.

Conclusions and suggestions: A genotype cluster can be determined by using results of both MIRU(10) and spoligotyping. Epidemiological information is important to define a true TB outbreak. In order to recognize the source of TB transmission, the next generation sequencing should be applied in genotyping analysis of *M. tuberculosis* complex in the near future.

Keywords : tuberculosis, genotyping, surveillance

貳、本文

一、前言

臺灣結核病發生率雖然已從 2005 年的每十萬人口 73 降至 2011 年的每十萬人口 54.5，下降率為 24.8%，台灣仍屬於中度結核病發生率地區。為了有效降低結核病的發生，除了治標的方法將已發病的病人儘快治癒，避免再傳染給他人，同時進行疑似群聚事件確認外，另一個治本的方法即是要在結核病傳播還未發生時，早期發現病人。

今年二月本署邀請國外專家進行台灣結核病防治成果外部評核時，也強烈建議針對台灣結核病群聚事件調查，實驗室必須採取更高效率及高通量的基因分型方法，有效監控母群體結核菌株基因型分布，以加強結核病群聚事件的流行病學調查與監控，才能達到防治結核病傳播的目標。

目前針對疑似結核病群聚事件，本實驗室例行性利用結核菌基因分型檢驗協助釐清。本實驗室主要利用 IS6110 結核桿菌限制酵素片段長度多型性分型法 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 【1】做為黃金標準判定檢驗方法。唯當 IS6110 片段數目小於 6 時，必須利用 15-locus 結核桿菌散置重複單元-可變重複序列分子分型法 (mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeat, MIRU-VNTR) 【2,3】及間隔寡核酸分子分型法 (spacer oligonucleotide typing, spoligotyping) 【4】檢驗方法進行判定。由於 IS6110 RFLP 檢驗方法耗時耗力，僅能就流行病學調查疑似群聚事件的個案檢體進行分析，屬於被動檢驗。要達到可主動監測並追蹤結核病傳染源，則必須利用高效率的分子檢驗方法。

高效率的分子檢驗方法主要為 PCR 為基礎的方法，如：(1)利用結核桿菌散置重複單元-可變重複序列分子分型法 (mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeat, MIRU-VNTR)，相較於 RFLP，可有效地進行大量結核菌基因型分析，因此可針對台灣結核菌母群

體基因型進行抽樣代表性的監測，以建立母群體的基因資料庫，可供群聚事件調查比對或協助找出尚未發現的結核病群聚事件；(2)利用近年發展的全基因體定序 (whole genome sequencing, WGS) 分析方法，利用 SNP (single nucleotide polymorphism) 的分析，可分析瞭解菌株傳播的時序性，找出真正的傳染源，以達到有效阻斷結核病繼續傳播的最終目標。

在 MIRU-VNTR 基因分型方法的建立，儘管 2006 年國際間已有建議的 24-locus MIRU-VNTR 的方法【5】，宣稱具有高鑑別力足以進行結核菌基因型辨別，然根據近年研究指出，針對不同 spoligotype 基因型別如北京型或是結核病盛行率較高的區域，利用建議的 24-locus MIRU-VNTR 的方法是無法獲得足夠的鑑別效力【6,7,8,9】。根據本實驗室之前的研究，特別是針對臺灣盛行的 Beijing、Haarlem、EAI (East-African-Indian)，當與 RFLP 進行比對時，也得到相似的結論。因此本計畫將進行各 MIRU 或 VNTR locus 分析，並與 IS6110 RFLP 進行比對，針對臺灣結核菌株，建立最佳化的 MIRU-VNTR 基因型分析組合，可彌補 RFLP 檢驗的耗時耗力，並大幅提升檢驗量以建立母群體基因型監測資料庫。

由於全基因體定序技術的精進，同時近年定序的時間與花費也逐漸減少，結核菌全基因體定序應用於群聚事件調查的研究自 2010 年起已陸續逐漸被報導【10,11,12,13,14,15】。根據文獻，利用全基因體定序，可計算出結核菌演化的速率【12】，並確實可釐清結核病傳播在同一事件的傳染時序性，協助導入正確的流行病學調查。根據研究也發現，利用全基因體定序分析，可發現原來沒有被調查出的流行病學關聯性【10】，也因此證明全基因體定序在方法學準確率逐漸增加與價格逐漸下降的情況下，未來更可以廣泛被應用於結核病的群聚調查與監測。

因此本計畫將開發高鑑別力基因分型方法，建立最佳化的 MIRU-VNTR 基因型分析組合，用以監測台灣結核菌母群體基因型分布以建立結核菌基

因資料庫，及有效輔助結核病群聚事件傳染源追蹤，達到即時監測以降低結核病傳播的最終目標。

二、材料與方法

1. 菌株收集

選取 2013-2014 年已經 IS6110 RFLP 基因分型方法確認之群聚事件送驗菌株進行 MIRU-VNTR 基因分型位點評估。

2. MIRU-VNTR 基因分型

(1) 基因位點選擇

根據文獻，選擇已發表的基因位點進行分析，包括：MIRU 2、MIRU 4、MIRU 10、MIRU 16、MIRU 20、MIRU 23、MIRU 24、MIRU 26、MIRU 27、MIRU 31、MIRU 39、MIRU 40、ETR A、ETR B、ETR C、QUB 15、QUB 18、QUB 23、QUB 26、QUB 11a、QUB 11b、Mtub 04、Mtub 21、Mtub 24、Mtub 29、Mtub 30、Mtub 34、Mtub 39、VNTR1895、VNTR 2372、VNTR 3336、VNTR 4156、VNTR 3232、VNTR 4120、VNTR 3820 等。

(2) multiplexPCR 反應與條件

PCR 反應試劑：

試劑	體積(μL)
H ₂ O	0.8
2x multiplexPCR master mix	5.0
5x Q solution	2.0
Primer mixture	0.2
DNA	2.0
總反應體積為 10 μL	

PCR 反應條件：

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95°C	10分鐘
2. Denature	95°C	1分鐘
3. Annealing	59°C	1分鐘
4. Extension	72°C	2分鐘
步驟2至步驟4重複35次		
5. Final extension	72°C	8分鐘
6. Store for o/n	4°C	∞

(3) PCR 產物以自動快速核酸分型系統或全自動核酸基因分析儀進行片段分析。

3. MIRU-VNTR 基因型組合分析

(1) 計算每個位點的 HGDI (h) value：

$$h = 1 - \sum X_i^2 \{ n/(n-1) \}$$

h 為變異度， n 為檢體個數， X_i 為個體在第 i 個基因型別 (cluster) 中出現的機率。

藉由每個 MIRU-VNTR 位點所得的 HGDI value，進行 MIRU-VNTR 基因型組合分析，以找出最佳化及最經濟化的 MIRU-VNTR 基因分析組合。

三、結果

1. 進行 5 個 multiplex PCR (14 個新的 MIRU 位點) 上機條件測試及與電泳膠比對確認

- (1) 14 個新的 MIRU 位點包括：Mtub30、Mtub39、QUB4156、QUB2163b、Mtub21、QUB-26、Mtub04、QUB18、VNTR2372、Mtub29、VNTR4120、Mtub34、VNTR3820、QUB3232。
- (2) 針對新的 14 個 MIRU 位點，以 3 個為一組，利用 3 種標定不同螢光的引子對進行 multiplex PCR，有效提升 PCR 效率，並利用自動核酸定序儀片段分析進行 PCR 產物大小偵測，以獲得各 MIRU 位點的 Repeat 數。
- (3) 將自動核酸定序儀片段分析所得之各 MIRU 位點的各 Repeat 數以單一 manual PCR 的方法，進行電泳膠直接分析，並確認由自動核酸定序儀所設定的 Repeat 數正確無誤。

2. 分析樣本結果

- (1) 選取 2013-2014 年疑似群聚事件送驗並已完成 IS6110 RFLP、spoligotyping 及 MIRU(15) (包括 MIRU04、MIRU26、MIRU40、MIRU10、MIRU16、MIRU31、MIRU02、MIRU23、MIRU39、MIRU20、MIRU24、MIRU27、ETR-A、ETR-B、ETR-C) 之樣本共計 457 株進行研究。菌株 spoligotype 基因型包含 Beijing 型 190 (41.6%) 株、Haarlem 型 82 (17.9%) 株、EAI 型 61 (13.3%) 株、T 型 49 (10.7%) 株、Bovis 型 5 (1.1%) 株、LAM 型 5 (1.1%) 株、Manu 型 6 (1.3%) 株、X 型 1 株 (0.2%)、unknown 型 13 (2.8%) 株、undefined 型 45 (9.8%) 株。針對 457 株分析樣本，14 個新的 MIRU

位點中，Mtub30、Mtub39、QUB4156、QUB-26、Mtub04、VNTR2372、Mtub29、VNTR4120、Mtub34 之 PCR 成功率為 100.0%，QUB2163b 之 PCR 成功率為 93.22% (31 株為 PCR 陰性)、Mtub21、VNTR3820、QUB3232 之 PCR 成功率為 99.56% (2 株為 PCR 陰性)、QUB18 之 PCR 成功率為 99.78% (1 株為 PCR 陰性)。分析 457 株新的 14 個 MIRU 位點及 MIRU(15) 共計 29 個 MIRU 位點的鑑別力結果如表一。

(2) 進行 MIRU 位點最佳化組合分析：

- (A) 依據 2006 年 Supply 等人研究所建議的 MIRU04、MIRU26、MIRU40、MIRU10、MIRU16、MIRU31、Mtub04、ETR-C、ETR-A、Mtub30、Mtub39、QUB4156、QUB2163b、Mtub21、QUB-26 為組合分析，結果顯示如預期地會對部份 RFLP 基因型不同的 Beijing、Haarlem、EAI 菌株無法鑑別分開。
- (B) 根據(1)所得各位點鑑別力結果進行 MIRU 位點重新排列組合分析，且以使用最少 MIRU 位點數目為目標，並與 IS6110 RFLP 進行平行比對須一致。結果顯示以 QUB3232、VNTR3820、QUB2163b、QUB18、Mtub21、MIRU26、QUB-26、VNTR4120、Mtub04、MIRU39 共 10 個 MIRU 位點 [以下簡稱 MIRU(10)] 可獲得最好的分型結果。
- (a) 分析的 457 株疑似群聚事件送驗的樣本中，包含了 32 個 RFLP 基因型別相同確認的群聚事件菌株共 83 株 (18.2%，83/457)。32 個確認群聚事件菌株包含 11 個屬於 Beijing 型、6 個屬於 T 型、5 個屬於 Haarlem 型、4 個屬於 EAI 型、2 個屬於 unknown 型 (ST32)、4 個屬於 undefined 型。32 個

確認群聚事件中，有 27 個事件之菌株皆可由 MIRU(10) 獲得與 RFLP 一致的分型結果。其餘 5 個 RFLP 基因型相同的群聚事件，分別各有 1 株有 1 或 2 個 MIRU 位點不同，2 個為 EAI 型、1 個為 T 型、1 個為 Beijing 型、1 個為 Haarlem 型的 RFLP cluster，分別屬台北某大學、南部某機構、中部某養護中心、東部某榮民醫院、花蓮縣某餐廳之群聚事件。

- (b) 比對所有 457 株之 MIRU(10) 結果，有 2 組 RFLP 基因型不同的 Haarlem 型菌株 (分別含 2 株及 4 株) 之 MIRU(10) 相同，甚至所有 29 個 MIRU 位點 Repeat 數皆相同，需藉由 spoligotype 基因型不同鑑別分開。另有 1 組 RFLP 基因型不同的 Beijing 型菌株 (包含 2 株) 之 MIRU(10) 相同，其餘 MIRU 位點除了 Mtub29 之外 Repeat 數皆相同，2 者亦可藉由 spoligotype 基因型不同 (Beijing-like) 鑑別分開。
- (c) 457 株之 MIRU(10) 結果中，有 1 株 Haarlem 菌株為花蓮縣同一群聚事件送驗為 RFLP 基因型不同者，但其 MIRU(10) 基因型相同而無法鑑別分開。另有 1 株 EAI 菌株為屏東縣某養護中心疑似群聚事件送驗但 MIRU(10) 與另一屏東市某老人養護之家送驗之個案相同，然 RFLP 基因型並不同，因而無法鑑別分開。
- (d) 有 12 組菌株雖屬不同群聚事件送驗，但 MIRU(10) 相同，包括 Beijing 型 5 組、EAI 型 5 組、T 型 2 組。甚至有些為 29 個 MIRU 位點皆相同而無法鑑別分開。另有 2 組 RFLP 基因型 (ST32 及 undefined 型) 相同的菌株則因為 QUB-26 位點不同被過度鑑別分開。

- (e) 分析檢體中包含 5 株 Bovis 菌株，為不同疑似群聚事件送驗，但皆來自中區，其中 1 株因 MIRU(10) 基因型中的 QUB-18 可與其他 4 株鑑別分開。

四、討論

1. 根據分析結果顯示，以 QUB3232、VNTR3820、QUB2163b、QUB18、Mtub21、MIRU26、QUB-26、VNTR4120、Mtub04、MIRU39 共 10 個 MIRU 位點可獲得最好的分型結果。若為了避免以上所述 5 個 RFLP 基因型相同的群聚事件，因各有 1 株有 1 或 2 個 MIRU 位點不同被過度鑑別分開，而捨棄相對應的 MIRU 位點時，會犧牲掉對部份 Beijing、EAI、Haarlem 的鑑別力。

(1) 其中 1 個過度被鑑別的 T 型 cluster，為中部某養護中心所送驗共 2 個個案檢體，RFLP 基因型為 1-band pattern，依目前群聚事件送驗基因型比對標準，因為該 cluster 之 RFLP、spoligotype、MIRU(15) 基因型皆相同，故判定為 cluster。然其他 5 個為 T 型群聚事件菌株，2 個為 1-band RFLP pattern，且為疫調確認之學校群聚事件菌株，spoligotype 與所有 29 個 MIRU 位點皆相同，其餘 2 個及 1 個為 8-band 及 7-band RFLP pattern，也是 spoligotype 與所有 29 個 MIRU 位點皆相同，推測若為真的 cluster，以 T 基因型言，MIRU 基因型應該相同。而該養護中心送驗個案為居在同一病房的臥床病人，分別為 82 歲及 95 歲，且有 2 個新的 MIRU 位點不同，因此需進一步進行詳實的疫情調查以確認是否為真正的群聚事件。

(2) 其中 1 個過度被鑑別的 EAI 型 cluster 為台北某大學群聚事件，共送驗 3 個案為同班同學，其中 1 人有結核病家族史，該個案菌株在所有 29 個 MIRU 位點中，僅 1 個新的 hypervariable MIRU 位點 (VNTR3820) 不同，若疫調顯示為真正的群聚事件，則未來在定義 MIRU cluster 時，必須考量 hypervariable MIRU 位點以進行基因型 cluster 定義。

(3) 另一個被過度鑑別的 EAI 型 cluster 為南部某機構群聚事件，自 2011 年至 2013 年皆有送驗個案共計 11 人，目前已完成 2013 年 4 名個案菌株的 MIRU(10) 基因型分析，其中 1 人菌株在新的 14 個 MIRU 位點中除了 Mtub34 外，其餘 13 個位點皆不同，另 1 人菌株則僅 1 個非 hypervariable MIRU 位點 (Mtb21) 不同，Repeat 數差 1。將待進一步完成其餘 7 人之檢體後，並進行更詳實的疫調比對及 MIRU 位點分析，以釐清真正的 cluster 個案。

(4) 另 1 個被過度鑑別的 Beijing 型 cluster 為東部某榮民醫院群聚事件，2 人菌株之 MIRU(10) 位點中除了 QUB-26 外皆相同，且 QUB-26 Repeat 數目僅差 1。且其餘 19 個 MIRU 位點也全部相同。RFLP 基因型顯示為 modern Beijing，IS6110 band 數目也完全一模一樣，應為相同基因型之菌株。由此結果推論若具有疫調關聯性且菌株基因型極為相似，則當僅出現如 QUB-26 且 Repeat 數僅差 1 時，需保守判定為基因型相同。此結果也與研究中另外發現的 2 組 RFLP 基因型 (ST32 及 undefined 型) 相同的菌株，也僅因 QUB-26 位點 Repeat 數差 1 被過度鑑別分開之結果一致。

(5) 另 1 個被過度鑑別的 Haarlem 型 cluster 為花蓮縣某餐廳群聚事件，4 人菌株之 MIRU(10) 僅 1 人菌株之非 hypervariable MIRU 位點 (Mtb21) 不同，Repeat 數差 1，此結果與(3)相似，由於在花蓮縣之菌株基因型相似度高，必須搭配疫調及未來進行母群體菌株基因型分析，以了解群聚事件的發生是否也與當地盛行菌株基因型有關。

2. 由目前已知群聚事件分析經驗可知，具有相同的 RFLP 及 MIRU(15) 基因型的 Haarlem 型菌株，需要 spoligotype 基因型的確認才可判定

是否同屬一 cluster。而具相同 spoligotype 及 RFLP 基因型的 EAI 型菌株，則需要 MIRU(15)位點的確認以判定是否為真的 cluster。根據本研究的分析結果，也可得到同樣的驗證：(1) 對於 Haarlem 型菌株，MIRU(10) 基因型需同時比對 spoligotype 基因型；(2) EAI 型菌株則需要 MIRU(10) 組合中的 MIRU39 位點以避免鑑別力降低。

3. 在本研究中，除了 5 組 Beijing 型外，也發現有 5 組 EAI 型的菌株無法用 MIRU(10)，甚至是所有的 29 個 MIRU 位點皆相同而無法鑑別分開。在所有 29 個 MIRU 位點鑑別力分析結果也顯示，針對 EAI 菌株僅 3 個位點為高鑑別力，3 個為中鑑別力，其餘 23 個為低鑑別力。相較於 Beijing、Haarlem、T 型，具高鑑別力的位點較少，也推測台灣 EAI 型菌株在 MIRU 基因型具有較高的相似度。比對 EAI 型菌株的 RFLP 基因型 pattern，可發現有些菌株確實非常相像，因此在未來判定 EAI 型的疑似群聚事件時，當基因型顯示為相同時，必須進行更詳實的疫調以釐清傳染源。
4. 本研究的另一個發現為送驗群聚事件的菌株中有 4 株為 Bovis 菌株，其中 1 株可被新的 MIRU 位點鑑別分開，故針對台灣主要具相同 MIRU(15)基因型的 Bovis 菌株可進一步以新的 MIRU 分析，以釐清台灣 Bovis 基因型的分布。

五、結論與建議

根據本研究結果顯示所選擇的 MIRU(10) 基因型，以目前 457 菌株分析結果可建立未來判定基因型 cluster 定義的基準。同時在未來不進行 RFLP 基因型檢驗時，spoligotype 基因型的檢驗並無法廢除，故建議未來執行以高效率高通量的 MIRU 基因型及 spoligotype 基因型取代 RFLP 的標準方法時，除了重新對基因型 cluster 加以定義，同時在釐清群聚事件時，疫情調查的詳實度亦顯重要，且為了確實找出傳染源，母群體菌株基因型的監測更是刻不容緩。

由本研究的分析也發現，除了 Beijing 型之外，在台灣的 EAI 型菌株也可能遇到相似的問題，儘管使用了 29 個 MIRU 位點仍無法像 RFLP 基因型一樣鑑別分開。然加入了 hypervariable MIRU 位點，Beijing 型的鑑別力增加，研究結果顯示僅 2.6% (5/190) Beijing 型菌株無法鑑別分開，而卻有 9.8% (6/61) EAI 型菌株無法鑑別分開。同時以過去疑似群聚事件送驗菌株之 RFLP 基因型分析結果顯示，台灣的 EAI 群聚事件並不如 Haarlem 型及 T 型多，主要可發現 EAI 型菌株之 RFLP pattern IS6110 band 數目可能相同或接近，但 band 分布是不同的。因此 EAI 型的鑑別與 Beijing 同等重要，須避免因技術限制而導致錯誤的群聚事件調查。

因此在基因型技術逐漸成熟及推展之際，不久的將來使用全基因體分析已為必定的趨勢，可解決 RFLP 或 MIRU 基因分型只看特定 genetic marker (如 IS6110 或 MIRU 位點) 而忽略了其他基因變化，導致無法正確鑑別的問題。期望未來使用更有效率的基因型分析技術，並進行母群體菌株基因型監測，方可有效防治結核病的傳播。

六、計畫重要研究成果及具體建議

(一) 成果

1. 以 QUB3232、VNTR3820、QUB2163b、QUB18、Mtub21、MIRU26、QUB-26、VNTR4120、Mtub04、MIRU39 共 10 個 MIRU 位點可獲得最好的分型結果。
2. 加入了 hypervariable MIRU 位點，Beijing 型的鑑別力增加，研究結果顯示僅 2.6% (5/190) Beijing 型菌株無法鑑別分開，而卻有 9.8% (6/61) EAI 型菌株無法鑑別分開，必須搭配疫調正確判斷。

(二) 具體建議

1. 使用全基因體分析已為必定的趨勢，可解決 RFLP 或 MIRU 基因分型只看特定 genetic marker (如 IS6110 或 MIRU 位點) 而忽略了其他基因變化，導致無法正確鑑別的問題。
2. 未來須使用更有效率的基因型分析技術，並進行母群體菌株基因型監測，以有效防治結核病的傳播。

七、参考文献

1. van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M., Small, P.M., 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 31, 406-409.
2. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C., 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J. Clin. Microbiol. 39, 3563-3571.
3. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA., 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 144, 1189-96.
4. Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35, 907-914.
5. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D., 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*.. J. Clin. Microbiol. 44, 4498-4510.
6. Velji P, Nikolayevskyy V, Brown T, Drobniowski F., 2009. Discriminatory ability of hypervariable variable number tandem repeat loci in population-based analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains, London, UK. Emerg Infect Dis. 15, 1609-1616.
7. Luo T, Yang C, Gagneux S, Gicquel B, Mei J, Gao Q., 2012. Combination of

- single nucleotide polymorphism and variable-number tandem repeats for genotyping a homogenous population of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in China. *J. Clin. Microbiol.* 50, 633-639.
8. Yokoyama E, Hachisu Y, Hashimoto R, Kishida K., 2012. Population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing subgroup strains. *Infect Genet Evol.* 12, 630-636.
 9. Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S, Maeda S., 2008. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol.* 57(Pt 7), 873-880.
 10. Schürch AC, Kremer K, Daviena O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, van Soolingen D., 2010. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *J Clin Microbiol.* 48, 3403-3406.
 11. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJ, Brinkman FS, Brunham RC, Tang P., 2011. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med.* 2011 Feb 24;364(8):730-9.
 12. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE., 2013. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 13, 137-146.
 13. Török ME, Reuter S, Bryant J, Köser CU, Stinchcombe SV, Nazareth B, Ellington MJ, Bentley SD, Smith GP, Parkhill J, Peacock SJ., 2013. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a suspected tuberculosis outbreak. *J Clin Microbiol.* 51, 611-614.
 14. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, Blom J, Wirth T, Jaenicke S, Schuback S, Rüsck-Gerdes S, Supply P, Kalinowski J, Niemann S. 2013. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a

Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. PLoS Med. 10, e1001387.

15. Kato-Maeda M, Ho C, Passarelli B, Banaei N, Grinsdale J, Flores L, Anderson J, Murray M, Rose G, Kawamura LM, Pourmand N, Tariq MA, Gagneux S, Hopewell PC., 2013. Use of whole genome sequencing to determine the microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* during an outbreak. PLoS One. 2013;8(3):e58235.

表一 Allelic diversity of each MIRU Locus

Locus	<i>h</i> (Total) (457)	Discrimination power	<i>h</i> (Beijing) (190)	Discrimination power	<i>h</i> (non-Beijing) (267)	Discrimination power
QUB3232	0.908	High	0.827	High	0.864	High
VNTR3820	0.890	High	0.791	High	0.824	High
QUB2163b	0.851	High	0.719	High	0.810	High
QUB18	0.841	High	0.686	High	0.749	High
Mtub21	0.826	High	0.621	High	0.775	High
MIRU26	0.782	High	0.426	Medium	0.723	High
QUB-26	0.740	High	0.549	Medium	0.796	High
VNTR4120	0.740	High	0.814	High	0.379	Medium
Mtub04	0.712	High	0.358	Medium	0.660	High
MIRU31	0.687	High	0.224	Low	0.554	Medium
MIRU10	0.667	High	0.199	Low	0.582	Medium
ETR-B	0.619	High	0.057	Low	0.710	High
VNTR2372	0.588	Medium	0.321	Medium	0.300	Medium
ETR-A	0.575	Medium	0.186	Low	0.659	High
Mtub39	0.567	Medium	0.208	Low	0.691	High
MIRU40	0.556	Medium	0.262	Low	0.620	High
MIRU39	0.527	Medium	0.171	Low	0.429	Medium
QUB4156	0.522	Medium	0.423	Medium	0.502	Medium
Mtub30	0.504	Medium	0.124	Low	0.151	Low
MIRU4	0.429	Medium	0.026	Low	0.613	High
MIRU23	0.376	Medium	0.057	Low	0.519	Medium
Mtub29	0.361	Medium	0.067	Low	0.485	Medium
MIRU16	0.288	Low	0.152	Low	0.365	Medium
MIRU24	0.270	Low	-0.005	Low	0.398	Medium
MIRU27	0.222	Low	0.047	Low	0.319	Medium
ETR-C	0.186	Low	0.116	Low	0.229	Low
Mtub34	0.095	Low	0.106	Low	0.083	Low
MIRU2	0.053	Low	-0.005	Low	0.089	Low
MIRU20	0.050	Low	0.036	Low	0.056	Low