

结核分枝杆菌常用基因分型方法研究

桂海成¹, 邵文琳^{2*}, 张 米¹, 杨翠先¹, 张桂仙¹

¹云南省传染病医院检验科, 云南 昆明

²昆明医科大学第二附属医院医院检验科, 云南 昆明

收稿日期: 2025年9月23日; 录用日期: 2025年10月16日; 发布日期: 2025年10月23日

摘 要

结核分枝杆菌(MTB)的基因分型在结核病预防领域具有重要作用, 可用于追踪疾病的传播并揭示社区中的传播链, 并确定传播的危险因素, 以指导结核病控制的公共卫生干预措施。结核杆菌基因分型方法, 传统方法有三种: IS6110-RFLP分型方法, 曾是公认的MTB基因型分型的“金标准”, 但其操作要求较高, 需依赖大量优质基因组DNA, 过程繁琐, 且生成自然条带, 结果分析复杂。相比之下, 间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping), 因其方法便捷, 重复性高, 在结核病流行病学研究中占据了重要地位, 只需要少量的DNA, 结果是数字形式表示, 但分辨力相对较差。多位点可变数目串联重复序列分析(MIRU-VNTR), 重复性、灵敏度和特异性均高, 不需要高度纯化的DNA, 数字化结果。全基因组测序, 单核苷酸差异性检测, 分型具有高通量、高分辨率和结果准确性高等优点, 在结核分子流行病学上的应用非常广泛, 有望成为MTB基因分型的下一个金标准。

关键词

结核分枝杆菌基因分型, 间隔区寡核苷酸分型, 限制性片段长度多态性分型, 多位点可变数目串联重复序列分析, 单核苷酸差异性检测

Research on Common Genetic Typing Methods of Mycobacterium Tuberculosis

Haicheng Gui¹, Wenlin Tai^{2*}, Mi Zhang¹, Cuixian Yang¹, Guixian Zhang¹

¹Department of Clinical Laboratory, Yunnan Provincial Hospital of Infectious Diseases, Kunming Yunnan

²Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan

Received: Sep. 23rd, 2025; accepted: Oct. 16th, 2025; published: Oct. 23rd, 2025

*通讯作者。

文章引用: 桂海成, 邵文琳, 张米, 杨翠先, 张桂仙. 结核分枝杆菌常用基因分型方法研究[J]. 医学诊断, 2025, 15(5): 509-517. DOI: 10.12677/md.2025.155069

Abstract

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) genotyping plays a critical role in tuberculosis prevention, enabling the tracing of disease transmission, uncovering transmission chains within communities, and identifying transmission risk factors to guide public health interventions for tuberculosis control. Traditional MTB genotyping methods include three approaches: IS6110-RFLP genotyping, previously regarded as the “gold standard” for MTB genotyping, demands high operational expertise, requires large amounts of high-quality genomic DNA, entails complex procedures, and produces natural banding patterns, making result interpretation challenging. In contrast, Spoligotyping has become widely used in tuberculosis epidemiological studies due to its convenience and high reproducibility. It requires only small amounts of DNA and generates digital results, though it offers relatively lower resolution. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MIRU-VNTR) provides high reproducibility, sensitivity, and specificity, and does not require highly purified DNA, yielding digital results. Whole-genome sequencing, coupled with single nucleotide variation detection, provides high-throughput, high-resolution genotyping with exceptional accuracy. Its widespread use in molecular tuberculosis epidemiology positions it as a promising candidate for the next gold standard in MTB genotyping.

Keywords

***Mycobacterium Tuberculosis* Genotyping, Spoligotyping, IS6110-RFLP, MIRU-VNTR, Single Nucleotide Variation Detection**

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结核病由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染, 并诱导机体产生迟发性变态反应的慢性消耗性炎症反应性疾病, 可累及侵犯全身多个部位或器官。2024 年 10 月 29 日世界卫生组织(WHO)发布《2024 年全球结核病报告》, 2023 年, 全球新发结核病患者 1080 万, 较 2022 年略有增加。2023 年, 全球共有 125 万人死于结核病。我国 2023 年估算的结核病新发患者数为 74.1 万, 在 30 个结核病高负担国家中发病数位列第三位。当前, 全球范围内结核病的预防和控制工作与世界卫生组织(WHO)和联合国共同提出的“终结结核病战略”所设定的目标相比, 仍有很大差距[1]。

结核分枝杆菌起源于非洲, 并随着人类的迁移扩散至世界各地, 逐渐演化成现今流行的九大主要谱系[2], 我国广泛流行的北京家族菌株属于第二谱系。在中国, 大多数患者的结核病是由结核分枝杆菌谱系 2 和谱系 4 引起的, 它们都比其他谱系分离株更具致病性, 常引起全球性耐多药结核病(multidrug-resistant TB, MDR-TB)/广泛耐药结核病(extensively-resistant TB, XDR-TB)大范围传播[3]。同种而不同亚型的微生物, 在致病性、耐药性等生物学特性上可能存在显著差异。

基因分型不仅有助于我们了解疾病的流行病学方面, 而且有助于通过菌株分类对患者进行临床管理, 这使得结核分枝杆菌遗传标记与重要的临床后果相关联, 例如耐药潜力、治疗失败或高传播性。依据菌株簇的定义, 指的是高相似度分型特征的结核分枝杆菌群体。当患者群体中结核分枝杆菌形成簇时, 通常意味着感染相同的传染源[4]。结核分枝杆菌分型为结核病疫情防控提供理论依据, 针对地区分析不同菌株的地域分布情况, 揭示结核病流行趋势; 针对群体区分群发与散发, 查证传播途径, 锁定传染源,

防止继续传播；针对个体区分内源性复发或外源性再感染，区分原发性耐药或获得性耐药；针对菌株深入研究不同菌株的传播水平、耐药相关因素，化解治疗困境；针对大数据形成基因型数字网络，菌株基因密码透明化，分子流行病学利用分子生物学技术与流行病学交叉相融合，实现精准防控。

在结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC)的基因组中已鉴定出许多重复序列，包括转座元件、可变数目串联重复序列、三核苷酸重复序列、散在分布重复单位和直接重复序列区域[5]。利用这些重复序列设计出了多种分型方法，传统的 MTB 基因分型方法(例如，IS6110-RFLP、spoligotyping 和 MIRU-VNTR)可以发现患者的传播链。目前，全基因组测序可以在全基因组水平上识别序列变异，具有更高的鉴别力，更有利于了解耐药性、毒力和结核病进展之间的相关性，显然，该技术将成为结核病分子流行病学研究中基因分型方法的新金标准[6]。本文综述了几种基因分型方法的遗传学背景及应用情况，希望对研究者在选择时有帮助。

2. IS6110-RFLP 分析方法

限制性片段长度多态性(IS6110-RFLP)分析方法是基于结核杆菌基因组中存在重要的重复序列，插入序列(insertion sequence, IS)，设计了 IS6110-RFLP DNA 指纹。1990 初 Thierry [7]等人首次描述了结核分枝杆菌插入序列 IS6110，发现该插入序列对属于结核分枝杆菌复合体的分枝杆菌具有特异性。IS6110 属于 IS3 系列移动元件，长度为 1355 bp，在大多数 MTB 菌株中有 0~25 个拷贝，并且它们在基因组中的位置在不同分离株之间变化很大。基因组内拷贝数和位置的差异是 IS6110 高度多态性的原因，并且该序列可用作结核分枝杆菌菌株基因分型的特异性分子标记[8]。

该方法使用 PvuII 限制性内切酶进行基因组 DNA 消化，该限制性内切酶将 IS6110 序列切割成片段。将这些片段电泳、转膜、变性，与标记过的探针进行 Southern 杂交，洗膜，即可分析其多态性结果。该方法曾是公认的 MTB 基因型分型的“金标准”，但该技术需要大量高质量的基因组 DNA，工作繁琐，结果是自然的条带，人工分析难度大[9]。此外，该方法在应用于基因组中具有 0~5 个 IS6110 序列拷贝的菌株分型时具有相当大的局限性。为了弥补其存在的不足，研究者们又发现一些新的插入序列来进行分型。IS1081-RFLP 引物已广泛应用牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)的诊断试验，由于 IS1081 靶点的多拷贝特性，被证明比 IS6110 检测具有更高的分析灵敏度，IS1081 在牛分枝杆菌中的图谱具有多态性，而在人型 *Mtb* 中仅有 6 个拷贝数，因此可作为鉴别牛型与人型的依据[10]。结核分枝杆菌复合体基因组中非常丰富的重复序列是富含 GC 的多态性重复序列(PGRS)，PGRS 元件存在于染色体上的 26~30 个位点，由许多串联重复组成，长度为 96 bp，PGRS-RFLP 方法是对具有少量序列 IS6110 拷贝或缺乏该序列的结核分枝杆菌复合体菌株分型的补充[11]。

3. 间隔寡核苷酸分型(Spoligotyping)

Spoligotyping 的方法是根据在结核分枝杆菌中存在直接重复(Direct Repeat, DR)区，DR 区间的寡核苷酸序列呈多态性而构建的，DR 区域扩增的基因分型方法，它是一种相对简单、快速、经济高效且基于高通量聚合酶链反应(PCR)的 MTBC 菌株分型方法[12]。DR 区域是研究最广泛的基因座之一，由直接重复序列 36 个碱基(base pair, bp)组成，和独特的间隔序列(34 至 41 bp)组成，这些序列统称为直接可变重复序列(Direct Variable Repeat Sequences, DVR)序列。MTBC 菌株中的直接重复区域由多个直接变异重复序列(DVR)组成，先前研究已经表明，由于 DVR 的可变存在，临床分离株在 DR 区域显示出广泛的多态性，并且这种多态性已用于结核病的流行病学。DR 区域通过同源重组、单核苷酸突变和 IS6110 元件整合导致 DVR 序列缺失而进化。这些事件被认为是单向的，并且会随着时间的推移而发生，使 DR 区域成为研究结核分枝杆菌复合体的进化和流行病学的信息位点[13]。

Spoligotyping 流程设计了一种特殊的寡核苷酸探针,并将其固定在尼龙膜上。引物用地高辛标记,将扩增产物与膜上探针进行反向杂交,通过增强化学发光试剂盒进行检测,探针的数量和类型随菌株间隔序列距离的不同而不同。该方法便捷,重复性高,只需要少量的 DNA,结果是数字形式表示,但分辨力相对差。直接重复(DR)区,显示出相当大的菌株间多态性,这在北京菌株家族中尤为明显,其中 DR 区域似乎处于(进化)固定状态[14]。北京家族含有相同的 Spoligotype,因此无法进一步分型[15]。

然而,对于同一菌 Spoligotyping 的鉴别力低于 RFLP 分型,因为基因座中的间隔物会随着时间的推移而变化[16]。Spoligotyping 与 RFLP 分型方法相结合,在分枝杆菌菌株的分子表征中显示出更好的精度和分辨率。

4. MIRU-VNTR 基因分型

结核分枝杆菌基因组中存在着一些数目可变的串联重复序列(Variable Number of Tandem Repeat, VNTR),称为结核分枝杆菌散在分布重复单位(Mycobacterial Interspersed Repetitive Units, MIRUs)。MIRUs 最初由 Supply 等描述为 46~101 bp 串联重复序列,散布在结核分枝杆菌 H37Rv 的 41 个位点,根据对每个位点的序列分析,发现 12 个位点在串联重复拷贝数上显示差异,因此被选为结核分枝杆菌分离株的基因分型[17],MIRU 以连续重复的形式,在不同种菌株中存在不同的拷贝数,由此被用来进行菌型鉴定。每个特定的 VNTR 位点由两部分组成,即中间的核心区和外围的侧翼区,核心区含有至少一个以上重复单元的短序列,该重复单元的碱基对数目不变,然而串联在一起重复单元的数目是可变的[14]。基于 VNTR 位点多态性的分型系统的原理都是,每个 VNTR 位点都用与侧翼区域互补的特异性引物进行 PCR 扩增,并且所得 PCR 产物通过标准凝胶电泳,然后通过凝胶电泳确定扩增子的大小,或者在运行多重 PCR 后,在自动荧光测序仪上确定扩增子的大小,由于重复单元的长度是已知的,因此计算出的大小反映了扩增的 MIRU 拷贝的数量。结果以简单的数字格式表示,其中每个数字代表特定位点的拷贝数。最终确定结核分枝杆菌的基因型。MIRU-VNTR 分型在技术上非常灵活,因为可以使用毛细管或凝胶电泳或非变性高效液相色谱法进行定量测定,最终结果是一个多位数数字代码(所谓的 MIRU-VNTR 代码),对应于每个分析位点的重复数,这种编码系统使结果可以很容易地在世界各地的实验室之间进行比较,并有助于通过互联网将数据存入全球数据库,用于大规模的流行病学和群体遗传学研究。

然而随着结核分枝杆菌 H37Rv 基因组测序完成,已经鉴定出新的 VNTR 型位点。结核杆菌 H37Rv 基因组中有 65 个拷贝的 MIRU,分布于 41 个位点,主要位于操纵子的基因之间[17]。实验室常用的有 15 位点和 24 位点两种分型方法,15 位点常用于分子流行病学研究,24 位点常用于系统发育学研究[18]。由于我国北京型菌株高发,基因同质化比率高,使用 15 位点分型技术无法有效区分菌株。24 个位点的分型方法分辨率足够,但推广难度较大。因此,VNTR 分型技术的位点选择具有明显的地域特征,需要寻找适合本地的多态性位点,或者与其他分型技术结合以提升分辨率[19]。VNTR 分型技术因其操作简便、重复性高、结果易比较,并且与 IS6110-RFLP 技术的分辨率相近,已广泛用于结核分枝杆菌分子流行病学研究的分型手段。其速度超过 IS6110-RFLP、Spoligotyping 等分型方法;所需设备和软件容易获得,该方法结果数字化,适用于大规模菌株基因型鉴定;便于全球范围结核病分子流行病学研究[4]。

传统分型方法操作简单,应用广泛。但所分析的基因组信息仅为全基因组的 1%,信息量小、难以判断传播方向和过程[20],故引入了全基因组测序。

5. 全基因组测序分型方法

5.1. 技术原理与优势

全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)方法是利用 DNA 测序平台重新构建生物体基因组的

完整 DNA 序列[21]。通过序列分析, 识别菌株间单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的差异, 这种在核苷酸层面上的遗传变异研究揭示了一些遗传标记。这些标记不仅有助于区分各种临床分离株, 还有助于研究这些菌株之间的系统发育关系。SNP 可位于基因组的基因编码区、非基因编码区和基因间隔区, 如果 SNP 发生在基因编码区未造成基因编码的氨基酸序列改变称同义 SNP (synonymous SNP, sSNP), 若造成基因编码的氨基酸序列改变或肽链被提前终止称为非同义 SNP (non-synonymous SNP, nsSNP)两种类型[22]。

早些时候, Mtb 基因组被认为是稳定的, 缺乏多态性[23]。1990 年代中期进行的研究结果表明, 在细菌基因组中发现了单态性和多态性位点, 这些位点可分为三组, 即单核苷酸多态性(SNPs)、大序列多态性(LSPs)和重复序列中的多态性。一般来说, nsSNPs 会引起氨基酸的变化, 也会引起决定耐药性的基因位点的变化, 从而导致内部或外部压力和表型耐药性的变化, 这些赋予耐药性的 nsSNP 基因可以帮助理解耐药分离株在人群中的传播和性质。相比之下, sSNPs 被认为是功能上中性的, 因为它们不会改变氨基酸谱。这些中性改变, 当在结构或管家基因中时, 可以为研究分枝杆菌菌株之间的进化关系提供基础, 除了有助于研究临床分离株的系统发育相关性外, sSNP 还用于确定特定人群中的不同流行病学[24]。

1998 年, Cole 等[25]公布了 MTB 菌株 H37Rv 包含的约 440 万个碱基对和 4000 个基因在内的完整基因组序列。2013~2017 年进行的研究表明, 从确诊流行病学联系的患者中分离出的菌株之间的遗传距离通常在 0-5SNP 范围内, MTB 的遗传多样性非常低, MTB 的突变率约为 0.3~0.5 突变/基因组/年。根据突变率和流行病学观察结果, 建议将少于 5 个 SNP, 定义为菌株成簇, 表示近期传播, 相隔 > 12 个 SNP 的菌株被认为不参与直接传播[26]。

5.2. 测序技术发展

全基因组测序由一代的 Sanger 测序发展到二代(Next-Generation Sequencing, NGS)高通量短读长测序和三代的单分子长片段测序。DNA 测序技术的最新进展正在降低测序成本, 同时以前所未有的速度提高通量, WGS 在 MTB 基因组研究中的基本步骤主要涉及 MTB 样品的制备、DNA 提取和全基因组测序, 序列比对和遗传变异检测, 传播成簇分析等。将测序数据比对至参考基因组后, 对变异进行注释, 进行 SNP、插入/缺失(insertion-deletion, indel)和结构变异(structure variation, SV)等基因组变异的检测。WGS 在 MTB 分型与溯源方面比传统的标准基因分型技术具有更高的分辨率和精准度。把原始测序数据导入自动化分析工具, 通过分析 SNP 的差异与缺失, 把 MTB 菌株划分到特定谱系或亚型, 及耐药性预测结果等[27]。

第一代桑格测序是由弗雷德里克·桑格和他的同事开发的 DNA 测序方法。利用双脱氧核苷酸会终止 PCR 的原理, 测序读长可达 1000 bp, 但成本高通量低, 它使用 ABI 3730xL 平台进行测序[28]。该方法的主要缺点是, 由于引物结合, 序列的前 15~40 个碱基质量较差, 700~900 个碱基之后的测序迹线质量变差[29]。WGS 被认为是在流行病学尺度上确定序列变异、确定菌株进化关系以及确定感染源和疾病在不同患者之间传播的重要工具, 在不久的将来, WGS 有可能成为分子流行病学研究菌株分型的金标准。

第二代测序(NGS)技术。NGS 技术, 其运用的原理为循环微阵列法, 特点是通量高, 读长短, 可产生整个基因组的数百万个短读段, 然后由专门的软件进行分析。已经出现了几种 NGS 技术, 这些技术产生的序列数量是 Sanger 的 3 到 4 倍, 并且比 Sanger 的测序方法便宜得多, 各种 NGS 测序平台被广泛使用, 如 Roche/454 FLX, Illumina/SolexaGenome Analyzer, Applied Biosystems SOLiD™ System, Helicos Heliscope™、Ion Personal Genome Machine (Ion PGM), Pacific Biosciences Single Molecule Real Time (SMRT), 这些仪器允许在 DNA 测序之前简单和逐步制备样品, 从而节省时间, 由于 DNA 序列的微小变化, 这些

菌株可以很容易地相互区分，此外，可以毫不费力地识别更复杂的 SNP 和 LSP 测定。除此之外，NGS 还用于比较基因组研究和传播动力学领域。自从对整个分枝杆菌基因组进行测序以来，研究人员一直在使用低分辨率和高分辨率的比较基因组技术来识别各种菌株之间的微小差异[30]。随着 NGS 的发展，这种应用使得区分各种菌株变得更加容易。

第三代测序技术，又叫单分子测序技术，不需要 PCR 扩增，直接对单个 DNA 分子进行实时读取，特点是读长长、错误率高、成本高[31]。

以下是几款常用测序数据分析软件，例如 TB Profiler、Mykrobe 和 MTBSeq，它们有助于抗结核耐药性预测和测序读长的 MTB 谱系分类。Ridom SeqSphere+、Bionumerics 和 CLC Genomics Workbench 软件广泛用于基因分型和疫情调查。

5.3. 参考基因组的局限与泛基因组学的应用

基于 MTBC 菌株的全基因组测序(WGS)通常涉及数据分析，方法是将菌株的短序列读数映射到完整的参考基因组[32]。通常是 H37Rv。然后将所得的 SNP 用于耐药性测定、亚型分型和传播分析。然而，由于 H37Rv 是 L4 菌株，因此它可能无法代表其他 MTBC 谱系菌株的基因组，当使用 H37Rv 作为参考基因组时，可能会高估近期传播，因此，如果将 H37Rv 用作基因组分析的基础，则可能会遗漏几个基因或更大的基因组区域，从而导致对其他谱系菌株的基因组多样性的低估[33]。由于不同谱系之间存在着很多差异，故引入了泛基因组概念。

泛基因组：指某一物种全部基因的集合[33]。单一个体的参考基因组远不能涵盖整个物种的所有遗传序列，大量缺失序列导致群体遗传变异图谱不完整。泛基因组的总长相较于 H37Rv 基因组增加了大约 1.5 Mb (34.7%)。全基因组比对分析，表明泛基因组中包含了不同谱系菌株之间全部共有的和特异的序列，有效地提升了参考基因组的代表性[34]。泛基因组学的应用至关重要：第一，它提供了更完整的遗传变异图谱，极大提升了分型和溯源准确性，避免了参考基因组偏倚；第二，有助于发现与 MTB 适应性、毒力和耐药性相关的谱系特异性基因，为理解 MTB 的致病机制和进化动力学提供了全新视角。因此，构建基于泛基因组的分析框架是未来 WGS 研究的重要方向。结核分枝杆菌主要几种基因分型方法比较见表 1。

Table 1. Comparison of main genotyping methods for mycobacterium tuberculosis
表 1. 结核分枝杆菌主要基因分型方法比较

特征指标	IS6110-RFLP	Spoligotyping	MIRU-VNTR	WGS (全基因组测序)
分辨率	高(但对低拷贝数菌株分辨率低)	低(尤其对北京家族等同源性高菌株分辨率有限)	中-高(取决于位点数，常用 15/24 位点)	极高(可识别单核苷酸多态性)
通量	低(手工操作多，耗时)	中 - 高(可批量进行)	高(可自动化，适合大规模筛查)	极高(二代测序通量高，可同时处理大量样本)
成本	较低(但耗时人工成本高)	低	中	高(测序和数据分析成本较高)
操作复杂度	高(步骤繁琐，需 Southern 杂交)	低(PCR 为基础，操作简单)	中(PCR + 电泳或毛细管分析)	中 - 高(实验操作相对简单，但数据分析复杂)
数据格式	模拟(条带模式，需人工判读)	数字(二进制或八进制格式)	数字(每个位点的重复单元数目)	数字(序列文件，SNP 列表等)
对 DNA 要求	高(需大量高质量 DNA)	低(少量 DNA 即可)	中(需要一定质量和浓度的 DNA)	中 - 高(需高质量 DNA，避免降解)

续表

主要应用领域	早期传播链研究, 曾是金标准	菌株初步分型、谱系鉴定(如北京家族)	分子流行病学研究、传播调查、系统发育分析	精准溯源、传播链分析、耐药机制研究、进化研究
主要局限性	对 IS6110 低拷贝(<5)菌株无效; 操作繁琐耗时	分辨率较低; 无法区分某些同源菌株(如北京家族)	位点选择需有地域代表性; 同质化菌株区分能力有限	成本高; 数据分析复杂; 需生物信息学支持; 参考基因组选择影响结果(泛基因组概念引入)

6. 总结与展望

结核病的有效控制离不开对 MTB 病原体的精准识别和深入理解。基因分型技术从基于有限遗传标记的 IS6110-RFLP、Spoligotyping 和 MIRU-VNTR, 发展到基于全部遗传信息的 WGS, 其分辨力、通量和应用广度得到了前所未有的提升。传统分型方法各有优势, 仍在特定场景下(如资源有限实验室的初步筛查)发挥重要作用。但 WGS 凭借其“金标准”级的分辨率、结合分型与耐药预测的双重能力, 正逐渐成为分子流行病学研究的核心工具, WGS 在药物和疫苗研发, 毒力的检测及菌种的鉴定中发挥了很好的作用。特别是随着高通量测序技术的快速发展, 测序成本的下降和生物信息学工具的普及。该技术手段使得结核病防治以及结核分枝杆菌的研究更加快捷可靠高效, 为结核防控提供依据。

未来的研究方向应包括: 第一, 推动 WGS 技术的标准化和自动化, 使其更易于在公共卫生实验室中推广应用; 第二, 深入利用泛基因组学资源, 挖掘与毒力、传播性和耐药性相关的新的遗传决定因子; 第三, 整合宏基因组学、转录组学等多组学数据, 更全面地揭示 MTB 的感染与致病机制; 最后, 建立全球共享的 WGS 数据平台, 促进国际合作, 共同应对耐多药结核病的威胁, 最终为实现 WHO “终结结核病战略” 目标提供强大的技术驱动力。

参考文献

[1] 李媛媛, 谢晶晶, 李树涛, 等. 2024 年 WHO 全球结核病报告: 全球与中国关键数据分析[J]. 新发传染病电子杂志, 2024, 9(6): 92-98.

[2] Xu, A., He, C., Cheng, X., Abuduaini, A., Tuerxun, Z., Sha, Y., *et al.* (2022) Distribution and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Lineage in Kashgar Prefecture. *BMC Infectious Diseases*, **22**, Article No. 312. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07307-4>

[3] 周崇兴. 结核分枝杆菌基因分型及命名规则[J]. 华西医学, 2022, 37(11): 1742-1748.

[4] 刘丙雨, 贾鹏霞, 李新月, 等. 新疆阿克苏地区结核分枝杆菌的基因分型与耐药性分析[J]. 吉林医学, 2020, 41(8): 1904-1908.

[5] Couvin, D., Segretier, W., Stattner, E. and Rastogi, N. (2020) Novel Methods Included in Spollineages Tool for Fast and Precise Prediction of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Spoligotype Families. *Database*, **2020**, baaa108. <https://doi.org/10.1093/database/baaa108>

[6] Dohál, M., Porvazník, I., Pršo, K., Rasmussen, E.M., Solovič, I. and Mokřý, J. (2020) Whole-genome Sequencing and *Mycobacterium tuberculosis*: Challenges in Sample Preparation and Sequencing Data Analysis. *Tuberculosis*, **123**, Article ID: 101946. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101946>

[7] Couvin, D., Allaguy, A., Ez-zari, A., Jagielski, T. and Rastogi, N. (2025) Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: A Review of Current Methods, Databases, Softwares, and Analytical Tools. *FEMS Microbiology Reviews*, **49**, fuaf017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaf017>

[8] Comín, J., Otal, I. and Samper, S. (2022) In-Depth Analysis of IS6110 Genomic Variability in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article 767912. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.767912>

[9] Arora, J., Suresh, N., Porwal, C., Pandey, P., Pande, J.N. and Singh, U.B. (2020) Genotyping *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Few Copies of IS6110: Value of Additional Genetic Markers. *Infection, Genetics and Evolution*, **81**, Article ID: 104230. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104230>

[10] Lyu, L., Li, Z., Pan, L., Jia, H., Sun, Q., Liu, Q., *et al.* (2020) Evaluation of Digital PCR Assay in Detection of *M.tuberculosis* IS6110 and IS1081 in Tuberculosis Patients Plasma. *BMC Infectious Diseases*, **20**, Article No. 657.

- <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05375-y>
- [11] Ansarin, K., Sahebi, L., Aftabi, Y., Khalili, M. and Seyyedi, M. (2020) Comparing IS6110-RFLP, PGRS-RFLP and IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR Methods for Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Journal of Applied Microbiology*, **129**, 1062-1070. <https://doi.org/10.1111/jam.14676>
 - [12] Hussien, B., Zewude, A., Wondale, B., Hailu, A. and Ameni, G. (2022) Spoligotyping of Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Species in the Oromia Region of Ethiopia. *Frontiers in Public Health*, **10**, Article 808626. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.808626>
 - [13] Güner Giray, B., Aslantürk, A., Şimşek, H., Özgür, D., Kılıç, S. and Aslan, G. (2022) Determination of Genetic Diversity of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Turkey Using 15 Locus MIRU-VNTR and Spoligotyping Methods. *Pathogens and Global Health*, **117**, 85-91. <https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2084807>
 - [14] van Embden, J.D.A., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van der Zeijst, B.A.M. and Schouls, L.M. (2000) Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. *Journal of Bacteriology*, **182**, 2393-2401. <https://doi.org/10.1128/jb.182.9.2393-2401.2000>
 - [15] Moe Sann, W.W., Namwat, W., Faksri, K., Swe, T.L., Swe, K.K., Thwin, T., *et al.* (2020) Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Using 24-Locus MIRU-VNTR Typing and Spoligotyping in Upper Myanmar. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **14**, 1296-1305. <https://doi.org/10.3855/jidc.12998>
 - [16] Kone, B., Somboro, A.M., Holl, J.L., *et al.* (2020) Exploring the Usefulness of Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Africa: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, **11**, 1-15.
 - [17] Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. and Locht, C. (2000) Variable Human Minisatellite-Like Regions in the *Mycobacterium tuberculosis* Genome. *Molecular Microbiology*, **36**, 762-771. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>
 - [18] 方梓昊, 赵文丽, 徐雁南, 等. 基因分型方法在结核分枝杆菌分型中的应用进展[J]. 山东医药, 2024, 64(15): 103-107.
 - [19] Weerasekera, D., Pathirane, H., Madegedara, D., Dissanayake, N., Thevanesam, V. and Magana-Arachchi, D.N. (2019) Evaluation of the 15 and 24-loci MIRU-VNTR Genotyping Tools with Spoligotyping in the Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Their Genetic Diversity in Molecular Epidemiology Studies. *Infectious Diseases*, **51**, 206-215. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1551619>
 - [20] 凌曦, 王璐, 张泽文, 等. 全基因组测序技术在结核病分子流行病学中的应用进展[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(4): 399-403.
 - [21] 张洁, 任怡宣, 潘丽萍, 等. 全基因组测序在结核分枝杆菌研究中的应用[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(7): 737-740.
 - [22] Qian, W., Ma, N., Zeng, X., Shi, M., Wang, M., Yang, Z., *et al.* (2024) Identification of Novel Single Nucleotide Variants in the Drug Resistance Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Whole-Genome Analysis. *BMC Genomics*, **25**, Article No. 478. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10390-3>
 - [23] Kanabalan, R.D., Lee, L.J., Lee, T.Y., Chong, P.P., Hassan, L., Ismail, R., *et al.* (2021) Human Tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* Complex: A Review on Genetic Diversity, Pathogenesis and Omics Approaches in Host Biomarkers Discovery. *Microbiological Research*, **246**, Article ID: 126674. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>
 - [24] Chaichat, P., Chaiprasert, A., Nonghanphithak, D., Smitthikarn, S., Kamolwat, P., Pungrassami, P., *et al.* (2021) Whole-Genome Analysis of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Reveals Novel Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **58**, Article ID: 106385. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106385>
 - [25] Chitale, P., Lemenze, A.D., Fogarty, E.C., Shah, A., Grady, C., Odom-Mabey, A.R., *et al.* (2022) Author Correction: A Comprehensive Update to the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Reference Genome. *Nature Communications*, **13**, Article No. 7538. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35402-2>
 - [26] Nikolayevskyy, V., Niemann, S., Anthony, R., van Soolingen, D., Tagliani, E., Ködmön, C., *et al.* (2019) Role and Value of Whole Genome Sequencing in Studying Tuberculosis Transmission. *Clinical Microbiology and Infection*, **25**, 1377-1382. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.022>
 - [27] Napier, G., Campino, S., Merid, Y., Abebe, M., Woldeamanuel, Y., Aseffa, A., *et al.* (2020) Robust Barcoding and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Lineages for Epidemiological and Clinical Studies. *Genome Medicine*, **12**, Article No. 114. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00817-3>
 - [28] Marcinkowska-Swojak, M., Rakoczy, M., Podkowiński, J., Handschuh, J., Wojciechowski, P. and Handschuh, L. (2024) Od Sanger do sekwencjonowania genomów—Przegląd technologii sekwencjonowania DNA [From Sanger to Genome Sequencing—An Overview of DNA Sequencing Technologies]. *Postępy Biochemii*, **70**, 173-189. https://doi.org/10.18388/pb.2021_534
 - [29] Narayanan, S. and Desikan, S. (2015) Genetic Markers, Genotyping Methods & Next Generation Sequencing in

- Mycobacterium tuberculosis*. *Indian Journal of Medical Research*, **141**, 761-774. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.160695>
- [30] Dale, K., Globan, M., Horan, K., Sherry, N., Ballard, S., Tay, E.L., *et al.* (2022) Whole Genome Sequencing for Tuberculosis in Victoria, Australia: A Genomic Implementation Study from 2017 to 2020. *The Lancet Regional Health - Western Pacific*, **28**, Article ID: 100556. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2022.100556>
- [31] Zheng, P., Zhou, C., Ding, Y., Liu, B., Lu, L., Zhu, F., *et al.* (2023) Nanopore Sequencing Technology and Its Applications. *MedComm*, **4**, e316. <https://doi.org/10.1002/mco2.316>
- [32] Meehan, C.J., Goig, G.A., Kohl, T.A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., *et al.* (2019) Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: Current Standards and Open Issues. *Nature Reviews Microbiology*, **17**, 533-545. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0214-5>
- [33] Sanoussi, C.N., Coscolla, M., Ofori-Anyinam, B., Otchere, I.D., Antonio, M., Niemann, S., *et al.* (2021) *Mycobacterium tuberculosis* Complex Lineage 5 Exhibits High Levels of Within-Lineage Genomic Diversity and Differing Gene Content Compared to the Type Strain H37Rv. *Microbial Genomics*, **7**, Article ID: 000437. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000437>
- [34] Dur-e-Shahwar Tariq (2024) Pangenomic Analyses of Tuberculosis Strains to Identify Resistomes Using Computational Approaches. *Journal of the Pakistan Medical Association*, **74**, S74-S78. <https://doi.org/10.47391/jpma-duhs-s15>