

应用多重 PCR 方法检测石蜡包埋组织 标本中的分枝杆菌 DNA

李子玲^{1*} 秦卫松¹ 岳清华² 孟奎¹ 林 勃¹

(¹ 南京军区南京总医院 南京 210002)

(² 南京市钟山医院 南京 210000)

摘 要:应用多重 PCR 方法检测并鉴别石蜡包埋组织中的结核分枝杆菌复合体与非结核分枝杆菌 DNA 扩增片段类型,为结核分枝杆菌复合体感染与非结核分枝杆菌感染的病理学诊断提供一种补充的鉴别诊断方法。应用三对具有特异性的寡核苷酸引物,进行多重 PCR 扩增。这三对引物分别对应于分枝杆菌 65kD 表面抗原、结核分枝杆菌插入序列 IS6110 及人类 β -珠蛋白基因的部分序列,其扩增产物分别为 383bp、123bp 和 268bp。此种多重 PCR 方法检测的灵敏度为 0.6pg。经多重 PCR 扩增后进行凝胶电泳,结核分枝杆菌复合体(结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、BCG)均可见 383bp、123bp 片段,而非结核分枝杆菌(鸟、龟、瘰疬、蟾蜍、堪萨斯、胞内、耻垢分枝杆菌)仅见 383bp 片段(猿猴分枝杆菌与结核分枝杆菌复合体相同)。与上述相比,分枝杆菌感染的临床标本分别增加了一条 268bp 片段。对 209 例临床初步诊断为淋巴结结核病人的石蜡包埋组织标本进行了多重 PCR 检测,193 例病理诊断为淋巴结结核、结核性肉芽组织、结核性肉芽肿性炎症病人的标本,检测结果符合结核分枝杆菌复合体感染。16 例病理诊断为可疑淋巴结结核病人的标本,15 例检测结果符合结核分枝杆菌复合体感染,1 例符合非结核分枝杆菌感染。此种多重 PCR 方法可以同时检测并鉴别结核分枝杆菌复合体及非结核分枝杆菌 DNA(猿猴分枝杆菌除外),具有高度的特异性和敏感性。

关键词:多重聚合酶链反应,结核分枝杆菌复合体,非结核分枝杆菌,石蜡包埋组织标本

中图分类号:Q939.13 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2002) 01-0069-07

近年来结核病在全球呈上升趋势,非结核分枝杆菌(*Nontuberculous mycobacteria* NTM)病亦逐渐增多^[1,2]。人体淋巴结是结核病的易发部位,在澳大利亚土著 7 岁以下儿童的淋巴结炎许多由 NTM 引起^[3]。我国与 NTM 病多发的发达国家一样,存在着 NTM 病发生的条件。积极调查寻找我国 NTM 病的分布状况和流行特点,可为其全国防治提供科学依据。

石蜡包埋组织是前瞻性和回顾性医学研究的巨大资源。由于 PCR 可以扩增较短的 DNA 片段,而且在一定程度上可以接受降解的 DNA,因此以石蜡包埋组织为代表的档案标本,能够用于包括结核病和非结核分枝杆菌病等感染性疾病研究在内的分子遗传性研究及回顾性分析。

本文报告应用多重 PCR 方法检测并鉴别石蜡包埋组织标本中的结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌 DNA 扩增片段类型。

* 通讯作者

作者简介:李子玲(1951-),女,河北省安平县人,硕士,南京军区南京总医院老年病一科主任医师。

收稿日期:2001-04-23,修回日期:2001-08-20

1 材料和方法

1.1 实验用细菌菌株的来源及 DNA 提取

1.1.1 实验用分枝杆菌菌株的来源:结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、牛型结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*)、BCG (*Mycobacterium bovis*, BCG)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、龟分枝杆菌 (*Mycobacterium chelonae*)、蟾蜍分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)、瘰疬分枝杆菌 (*Mycobacterium serofulaceum*)、堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*)、胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)、猿猴分枝杆菌 (*Mycobacterium simiae*) 国际标准株均为冻干菌种, 购自北京市中国药品生物制品检定所。结核分枝杆菌临床培养株, 由南京军区南京总医院、南京军区八一医院、南京市胸科医院检验科提供。

1.1.2 实验对照细菌菌株:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷白菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae*)、鲍曼氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、军团菌 LP₁ (*Legionella* LP₁)、枸橼酸杆菌 (*Citrobacter*)、摩根摩根菌 (*Morganella morganii*)、沙雷氏菌 (*Serratia*)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、肺炎支原体 FH 株 (*Mycoplasma pneumoniae* FH), 均为我院微生物科保存株。

1.1.3 初步处理:结核分枝杆菌复合体、非结核分枝杆菌国际标准株共 10 株, 分别接种于改良罗氏培养基上, 3~4 周后, 待有菌落生长时, 用白金耳针挑取菌落 (湿重约 1mg), 放入 1mL 生理盐水内, 分别制成 1mg/mL 的混悬液, -20℃ 保存。用于实验对照的 15 种细菌 (为肺部感染的常见病原菌) 菌株、8 株结核分枝杆菌临床分离株及 1 株肺炎支原体 FH 株, 分别制成 1mg/mL 的混悬液, -20℃ 保存。

1.1.4 DNA 提取:应用“TE-Triton 煮沸法”。将细菌菌株的混悬液 1mL 放入 1.5mL Eppendorf 管中, 离心 (12 000r/min) 10 min, 弃上清。加入 TE-Triton 溶液 (10mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 1mmol/L EDTA, 1% Triton-X 100) 100 μ L, 振荡混匀后, 煮沸 30 min。离心 (1000r/min) 10 min, 取上清, -20℃ 保存。

1.2 石蜡包埋组织标本的来源及 DNA 提取

1.2.1 标本来源:包埋组织标本共 209 例, 其中颈部淋巴结标本 134 例, 其他部位淋巴结标本 75 例, 均由南京市钟山医院病理科提供。上述标本均取自南京市钟山医院瘰疬科临床初步诊断为淋巴结结核的门诊及住院病人, 其中男性 133 例, 女性 76 例。年龄分布: 3 个月~6 岁 50 例, 7~13 岁 50 例, 14~44 岁 87 例, 45~59 岁 13 例, 60 岁以上 9 例。组织标本均在手术取出后即行福尔马林固定, 然后石蜡包埋。包埋组织的年龄为 4 个月~4 年。

1.2.2 石蜡包埋组织标本的 DNA 提取:标本脱蜡时采用改良水浴脱蜡法: 取 6 μ m 石蜡切片 3 片, 放入 1.5mL Eppendorf 管中。加入 STE 液 (10mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 1% Tween20) 1mL, 72℃ 水浴 15min。离心 (6 000r/min) 6~8min, 吸尽浮蜡和 STE 液。重复上述步骤, 直至石蜡除净。消化时将已脱蜡的组织放入无菌玻璃匀浆

器内研磨,研磨前放入 TE 液(10mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 1mmol/L EDTA)200 μ L。研磨后移入新的 1.5mL Eppendorf 管内,加入反应缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 5mmol/L EDTA, 0.5% SDS)400 μ L。加入蛋白酶 K(终浓度为 1mg/mL),55 $^{\circ}$ C 水浴 3h(消化完全的样品应为透明粘稠液体)。DNA 抽提时应用临床样品基因组 DNA 小量抽提试剂盒(上海生工生物技术服务有限公司提供)进行,最后将抽提的 DNA 样品 30 μ L 收集在 0.5mL Eppendorf 管内,-20 $^{\circ}$ C 保存,待扩增。

1.3 PCR 检测

1.3.1 PCR 引物:由上海市博亚生物技术有限公司合成,引物参照 Tösteh 等^[4]设计,其设计的三对引物分别对应于分枝杆菌 65kD 表面抗原、结核分枝杆菌插入序列 IS6110 及人类 β -珠蛋白基因的部分序列,其扩增产物分别为 383bp、123bp 和 268bp。三对引物的序列如下:

引物对 A:A1 5' - GAGATCGAGCTGGAGGATCC - 3'

A2 5' - AGCTGCAGCCCAAAGGTGTT - 3'

引物对 B:B1 5' - CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG - 3'

B2 5' - CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG - 3'

引物对 C:C1 5' - CAACTTCATCCACGTTACCC - 3'

C2 5' - GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'

1.3.2 PCR 扩增及电泳:扩增反应体积为 50 μ L,其中含 10 \times 缓冲液(100mmol/L Tris-HCl pH8.3,500mmol/L KCl,15mmol/L MgCl₂,0.01 gelatin)5 μ L,dNTPs 各 200 μ mol/L,三对引物各 0.5 μ mol/L,模板 DNA 10 μ L(如为细菌 DNA 则为 1 μ L),双蒸水加至 50 μ L。混匀后 93 $^{\circ}$ C 变性 5min,加入 FD DNA 多聚酶 2.5U。然后应用 PCR 扩增仪进行扩增;变性 93 $^{\circ}$ C 40s,退火 55 $^{\circ}$ C 30s,延伸 72 $^{\circ}$ C 50s,共 35 次循环,最后增加一次 5~7min 的延伸时间。用含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外检测仪上观察。实验中设阳性对照与阴性对照。

1.3.3 PCR 检测预期结果及判断:结核分枝杆菌复合体国际标准株(结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、BCG),可见有 383bp、123bp 的特异性扩增片段;非结核分枝杆菌国际标准株(鸟、龟、蟾蜍、瘰疬、堪萨斯、胞内、耻垢分枝杆菌)可见有 383bp 的特异性扩增片段(猿猴分枝杆菌与结核分枝杆菌复合体相同);除分枝杆菌外的 15 种细菌及肺炎支原体 FH 株 DNA,均无上述特异性扩增带。石蜡包埋组织标本:如为结核分枝杆菌复合体感染,应可见有 383bp、123bp 和 268bp 的特异性扩增带;如为非结核分枝杆菌感染,应可见有 383bp、268bp 的特异性扩增片段;PCR 检测结果为阳性。如仅有 268bp 的特异性扩增片段,PCR 检测结果为阴性。如三条特异性扩增片段均未出现(说明操作有误,DNA 丢失),应重新进行检测。

2 结果

2.1 应用多重 PCR 方法检测分枝杆菌 DNA 的特异性

此种多重 PCR 方法检测分枝杆菌 DNA 扩增片段类型,其结果与预期结果相同。结核分枝杆菌复合体国际标准株(结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、BCG),可见有 383bp、123bp 的结核分枝杆菌复合体特异性扩增片段;非结核分枝杆菌国际标准株(鸟、龟、蟾

表 1 多重 PCR 方法检测分枝杆菌 DNA 的特异性

Table 1 The Specificity of detecting *Mycobacterium* DNA by the triplex polymerase chain reaction

The name of bacterium	The amplified production of PCR		
	383bp	123bp	268bp
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	-
<i>Mycobacterium bovis</i>	+	+	-
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	+	+	-
<i>Mycobacterium simiae</i>	+	+	-
<i>Mycobacterium avium</i>	+	-	-
<i>Mycobacterium chelonae</i>	+	-	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	+	-	-
<i>Mycobacterium xenopi</i>	+	-	-
<i>Mycobacterium kansasii</i>	+	-	-
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	+	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Hemophilus influenzae</i>	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-
<i>Legionella</i> LP ₁	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-
<i>Serratia</i>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> FH	-	-	-

Additional remarks: the band's presence is showed by "+";

the band's absence is showed by "-".

测结果

2.3.1 病理诊断为结核的标本:病理诊断为淋巴结核、结核性肉芽组织、结核性肉芽肿性炎症者 193 例,多重 PCR 检测均为阳性,电泳时均可见 383bp、123bp 和 268bp 片段(检测结果符合结核分枝杆菌复合体感染)。

2.3.2 病理诊断为“结合临床考虑结核”的标本:在组织切片中可见类上皮细胞和郎汉斯巨细胞,有的可见类上皮细胞和极少许干酪样坏死,故病理诊断为“结合临床考虑结核”。此类标本 16 例,多重 PCR 检测均为阳性,电泳时可见 383bp、123bp 和 268bp 片段者 15 例(检测结果符合结核分枝杆菌复合体感染);电泳时可见 383bp、268bp 片段者 1 例(检测结果符合非结核分枝杆菌感染,但原始资料中没有细菌学培养资料,病人未做 NTM 皮肤试验,故尚不符合目前已制定的 NTM 感染的临床诊断标准)(见图 3)。

除、瘰癧、堪萨斯、胞内、耻垢分枝杆菌)可见有 383bp 的分枝杆菌属特异性扩增片段(猿猴分枝杆菌与结核分枝杆菌复合体相同);除分枝杆菌外的 15 种细菌及肺炎支原体 FH 株 DNA,经多重 PCR 方法检测,均无上述特异性扩增带(见图 1 和表 1)。实验结果表明,此法具有良好的特异性,可用于检测并鉴别结核分枝杆菌复合体与非结核分枝杆菌 DNA(猿猴分枝杆菌除外)。

2.2 多重 PCR 方法检测分枝杆菌 DNA 的敏感性

将结核分枝杆菌复合体(结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、BCG)、非结核分枝杆菌(鸟、龟、蟾蜍、瘰癧、堪萨斯、胞内、耻垢分枝杆菌)国际标准株的纯化 DNA 进行倍比稀释($0.6 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{L} \rightarrow 0.6 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$)后,进行多重 PCR 扩增(从 60ng 至 0.6pg 的分枝杆菌 DNA),均可见有特异性扩增带,其敏感性为 0.6pg 水平(见图 2)。

2.3 石蜡包埋组织标本的检

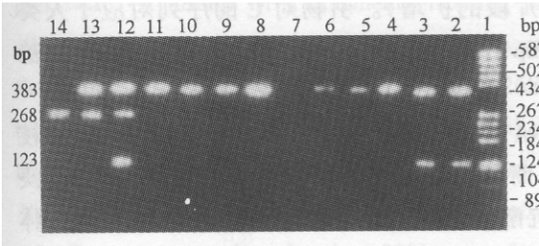


图 1 多重 PCR 方法检测分枝杆菌 DNA 的电泳结果

Fig.1 The electrophoretic result of detecting *mycobacteria* DNA by the triplex polymerase chain reaction

1. DNA Marker (pBR322 DNA/*Hae* III); 2. *Mycobacterium bovis*; 3. *M. tuberculosis*; 4. *M. avium* 5. *M. chelonae*; 6. *M. smegmatis*; 7. *Staphylococcus aureus*; 8. *M. scrofulaceum*; 9. *M. xenopi*; 10. *M. kansasii*; 11. *M. intracellulare*; 12. The clinical sample of simulated *Myoobacterium tuberculosis* infection; 13. the clinical sample of simulated nontuberculous *mycobacteria* infection; 14. The patient's blood sample of having no mycobacteria infection.

3 讨论

随着艾滋病(AIDS)在世界范围内的流行, AIDS患者合并非结核分枝杆菌病者日趋增多。国内目前仅报告社区获得性非结核分枝杆菌病 123 例,这与患病而未被发现的现象大量客观存在有关^[5]。以石蜡包埋组织为代表的档案标本能够长期保存,而 PCR 方法可以扩增较短的 DNA 片段,且在一定程度上可以接受降解的 DNA,其高度敏感性为石蜡包埋组织标本的分子研究提供了条件。

我们参考国外有关文献^[4]自 1996 年始进行了应用多重 PCR 方法检测并鉴别结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌 DNA 的研究。我们应用的这三对引物,其中引物对 A 可以扩增位于编码 65kD 分枝杆菌表面抗原的基因内的一个 383bp 片段^[6],该抗原存在于各种分枝杆菌中,仅在少数的序列变异中有不同^[7,8]。引物对 B 可以扩增结核分枝杆菌插入序列 IS6110^[9,10,11]的一个片段,此插入序列存在于结核分枝杆菌复合体(包括结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、BCG、非洲结核分枝杆菌、田鼠分枝杆菌)中,其

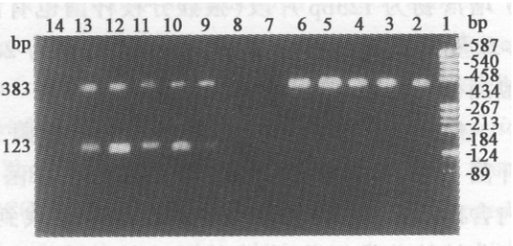


图 2 多重 PCR 方法对分枝杆菌 DNA 的检测水平测定结果

Fig.2 The result of detecting level for *mycobacteria* DNA by the triplex polymerase chain reaction

1. DNA marker (pBR322 DNA/*Hae* III); 2. *M. scrofulaceum* DNA($0.6 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 3. *M. scrofulaceum* DNA ($0.6 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 4. *M. scrofulaceum* DNA ($0.6 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 5. *M. scrofulaceum* DNA($0.6 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 6. *M. scrofulaceum* DNA ($0.6 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 7. *M. scrofulaceum* DNA($0.6 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 9. *M. tuberculosis* DNA ($0.6 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 10. *M. tuberculosis* DNA ($0.6 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 11. *M. tuberculosis* DNA ($0.6 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 12. *M. tuberculosis* DNA ($0.6 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 13. *M. tuberculosis* DNA($0.6 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$); 14. *M. tuberculosis* DNA($0.6 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

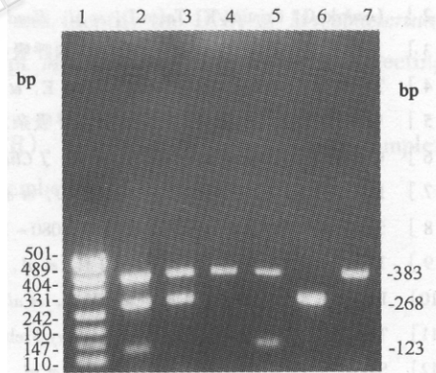


图 3 多重 PCR 方法检测石蜡包埋组织标本中分枝杆菌 DNA 电泳

Fig.3 The electrophoretic result of *mycobacteria* DNA by the triplex PCR in the paraffin-embedded tissue samples

1. DNA marker (pUC19 DNA/*Msp*I); 2. The paraffin-embedded tissue sample of the patient who has infected *Mycobacterium tuberculosis* complex; 3. The paraffin-embedded tissue sample of the patient who has infected nontuberculous *mycobacteria*; 4,7. Nontuberculous *mycobacteria*; 5. *Mycobacterium tuberculosis*; 6. The paraffin-embedded tissue sample of the patient whose detecting result is negative by the triplex-PCR.

扩增产物为 123bp 片段(猿猴分枝杆菌也有该片段的扩增)。引物对 C 的序列对应于人类 β -珠蛋白基因的部分序列,其扩增产物为 268bp 片段,该对引物用做内在对照,可作为被检测样品 DNA 质量的试验评估。

应用此种多重 PCR 方法检测分枝杆菌 DNA 扩增片段类型,最低检测限为 0.6pg 分枝杆菌 DNA,大约相当于 120 个结核分枝杆菌。而目前临床常用的抗酸染色镜检,每毫升痰内含菌量至少有 5 000 个才能在涂片上找到抗酸杆菌,且不能区分结核分枝杆菌复合体与非结核分枝杆菌;分离培养法的敏感性远远高于涂片法,但在应用抗结核药物后或在死菌多而活菌少的状态下,其阳性率低且需时长。而本文应用的多重 PCR 技术,可以同时检测并鉴别结核分枝杆菌复合体与非结核分枝杆菌 DNA(猿猴分枝杆菌除外)。因此,无论在检测的敏感性方面,还是在特异性方面,都明显优于上述两种常用方法。尤其是当组织标本已被保存在福尔马林或其他物质中以致于失去了培养的可能性时,此种多重 PCR 技术可为临床医生提供更多的所需要的帮助^[12]。普通的石蜡包埋组织标本,在光学显微镜下很难鉴别结核分枝杆菌复合体感染与非结核分枝杆菌感染。本文报告的此种多重 PCR 方法可为结核分枝杆菌复合体感染与非结核分枝杆菌感染的病理学诊断提供一种补充的鉴别诊断方法。

参 考 文 献

- [1] Wark P, Goldbegr H, Ferson M, et al. *Aust N Z J Med*, 1998, **28**: 453 ~ 458.
- [2] Losurdo G, Cristina E, Tasso L, et al. *Head & Neck*, 1998, **5**: 245 ~ 248.
- [3] 王忠仁,张宗德,张 本. 中华结核和呼吸杂志, 2000, **23**(5): 263 ~ 265.
- [4] Töstch M, Schmid K W, Brommelkamp E, et al. *Diagn Mol Pathol*, 1994, **3**: 260 ~ 264.
- [5] 中华医学会结核分会. 中华结核和呼吸杂志, 2000, **11**(23): 651.
- [6] Catherine P, Denise L, Yves B, et al. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**: 712 ~ 717.
- [7] Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al. *Lancet*, 1989, **4**: 1069 ~ 1071.
- [8] Shinnick T M. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 1080 ~ 1088.
- [9] Eisenach K D, Cave M D, Bates J H, et al. *J Infect Dis*, 1990, **161**: 977 ~ 981.
- [10] Eisenach K D, Sifford M D, Cave M D, et al. *Am Rev Respir Dis*, 1991, **144**: 1160 ~ 1163.
- [11] Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, et al. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**: 2668 ~ 2273.
- [12] Salian N V, Rish J A, Eisenach K D, et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **158**: 1150 ~ 1155.

Study on Detection of the *Mycobacteria* DNA in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Samples by Triplex Polymerase Chain Reaction

Li Ziling^{1*} Qin Weisong¹ Yue Qinghua² Meng Kui¹ Lin Qin¹

(¹ Nanjing General Hospital, Nanjing Command PLA, Nanjing 210002, China)

(² Nanjing Zhongshan Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract: To supply an additional differential diagnostic method for pathological diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous *mycobacteria* infections in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by triplex-PCR. Three pairs of oligonucleotide primer were used in tri-

plex-PCR. A 383bp DNA fragment encoding part of the 65kD mycobacterial surface antigen, a 123bp fragment corresponding to a specific *Mycobacterium tuberculosis* complex sequence which was the insertion sequence 6110 (IS6110) and a 268bp fragment for human β -globin were amplified by triplex-PCR respectively. The sensitivity of the triplex-PCR-electrophoresis for the *mycobacteria* DNA was 0.6 picogram. The specific bands of 383bp and 123bp among the amplified DNA from *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG and *M. simiae* were present in the agarose gel. By contrast, only a band of 383bp was found among the nontuberculosis *mycobacteria* which contained *M. avium*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* and *M. smegmatis*. Compared with the standard strains, there was an additional 268bp band in simulated clinic samples infected by mycobacteria, 209 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of the patients diagnosed as scrofula by clinic doctor at first visit were examined by triplex polymerase chain reaction. Among them, 193 tissue samples of the patients pathologically diagnosed as scrofula, tuberculous granulomatous tissue or tuberculous granulomatous inflammation were positive: the specific bands of 383bp, 123bp and 268bp were present in the agarose gel and this tallied with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection. Of 16 tissue samples of the patients pathologically diagnosed as suspicious scrofula, 15 samples were same positive results and this tallied with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection, too; 1 sample could find the specific bands of 383bp and 268bp which were present in the agarose gel and this tallied with nontuberculous *mycobacteria* infection. The results showed that the triplex-PCR could detect and identify the DNA of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous *mycobacteria* except *M. simiae*. It is a valuable detecting method which has high sensitivity and specificity.

Key words: Triplex polymerase chain reaction (triplex-PCR), *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), Nontuberculous *mycobacteria* (NTM), Paraffin-embedded tissue sample

* Author for correspondence