

## · 综述 ·

## 结核分支杆菌株水平鉴定技术及其研究进展

刘敬华 万康林 成诗明

R52 A

结核分支杆菌菌株分型对结核病流行病学调查和监测、传染源的发现、传播途径的阻断以及发病机制的研究都极为重要。结核分支杆菌的分型方法,主要分为非核酸法和核酸法。非核酸分型方法即传统分型方法,多是在细菌表型特征的基础上认识细菌的,包括生化分型法、血清分型法和噬菌体分型法。但由于结核分支杆菌分离株具有高度同源性,通过常规的生化试验和血清学方法是无法鉴别的,所以,对于结核分支杆菌,唯一可用的传统的菌株鉴定方法只有噬菌体分型法。随着分子生物学理论和技术的飞速发展,1980年以后,逐步建立了一些根据核酸序列进行菌株鉴定的高度特异的基因分型方法,即核酸法。主要包括:限制性片段长度多态性(RFLP)、DNA 指纹图谱分析、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、聚合酶链反应(PCR)酶切分型、随机扩增多态性(RAPD) DNA、DNA 序列分析以及基因芯片技术等等。随着上述方法的应用,使结核分支杆菌的菌株分型进入了一个全新的领域,也进而使结核病流行病学的研究取得了很大的进展,现将对上述各分型方法综述如下。

## 一、传统分型方法——噬菌体分型法

噬菌体具有高度的宿主特异性和一定的宿主范围,不同型别的结核杆菌对不同噬菌体的敏感性不同,以此为依据将结核杆菌的不同型别区分开来。这种方法已用于结核病爆发性流行的调查等方面,较好地了解了结核病的传播<sup>[1]</sup>。但是,在实际分离过程中,大多数分离株只能分离出几个主要的类型,很难反映菌株的遗传学关系,特异性也不够理想。此外,噬菌体分型法对技术要求高,操作复杂,准确性要受培养条件的限制,国际上只有几个实验室能大规模地进行这种分析,这使得对结核病爆发和在较大范围进行特异菌株的追踪等流行病学研究难以进行。

## 二、基因分型方法

## 1. 以 RFLP 为基础的分型方法:

(1)RFLP 分析:它是一种最早使用的基因分型方法,该方法是针对结核分支杆菌基因组 DNA 上的特征片段,如插入序列 IS6110、IS1081,多态性富含 GC 重复序列(PGRs),寡聚脱氧核苷酸(GTG)<sub>5</sub> 等,利用限制性内切酶酶切特征性片段上的某一位点,电泳分离,而形成结核分支杆菌 DNA 指纹图谱<sup>[2,3]</sup>。该方法的优点是操作简单,不用特定的探针进行

杂交,而且具有分辨能力高、图谱相对稳定的特点。但是,分离株染色体 DNA 经 RFLP 分析后,在琼脂糖凝胶上产生数百个条带难以区分,有的条带未显出或相互重叠,只有凝胶顶部的少数大片段能够进行比较,在实际工作中识别起来非常困难,几乎无法鉴别菌株类型。

(2)DNA 指纹图谱方法:DNA 指纹图谱分型方法由 RFLP 方法衍生而来,是将经过提纯的结核杆菌染色体 DNA 用限制性内切酶消化后,在琼脂糖凝胶中电泳分离,再将限制性片段转移到尼龙膜或纤维素膜上,与带标记的已知 DNA 探针杂交,然后检测与探针同源的限制性片段的数目和大小的变化,以区别菌株。每个菌株所呈现的特征性带型即指纹图谱型。在这种分型方法中所选择的用于菌株分型的遗传标志必须具有菌株内稳定性和菌种内多样性的特点,目前结核分支杆菌 DNA 指纹图谱分析方法普遍采用插入序列或其他重复序列作为分型的标志,包括:IS6110、IS1081、短的重复序列(DR)和 PGRs 等,其中应用最广泛的为 IS6110。

① IS6110 DNA 指纹图谱的标准方法:IS6110 含有 1 355 bp 的核苷酸和 28 bp 的反向末端重复序列,属于插入序列 IS3 家族的一个成员。它只存在于结核杆菌复合群中,而且在结核分支杆菌不同亲本的菌株中 IS6110 的拷贝数和染色体位置是高度变异的,在菌株传播期间并能保持稳定,特别适于结核分支杆菌株水平的鉴定<sup>[2-4]</sup>。Embley 等<sup>[5]</sup>在 1993 年推荐了标准的结核分支杆菌 RFLP 分析方法,这种方法已在国际上得到广泛的认同与应用,使全球范围内结核分支杆菌株水平鉴定的比较成为可能。IS6110 指纹图谱的标准方法在结核杆菌的分型方面得到了广泛的应用,具有很强的鉴别菌株的能力。但是这种方法仍然存在着一些不足之处。一是 IS6110 拷贝数少或无 IS6110 的菌株难以进行结核分支杆菌株水平的鉴定;二是实验中需进行 Southern 杂交,较为繁琐;三是杂交带识读困难;四是实验中需大量的结核分支杆菌 DNA,要对采集临床标本做细菌培养,实验时间较长。

②其他重复序列:针对 IS6110 标准方法存在的问题,人们在此基础上又逐步研制开发出一些新的插入序列或重复序列替代 IS6110 作为分型的标志,对标准检测技术起到了很好的补充作用<sup>[6]</sup>。如牛型结核分支杆菌用上述方法不能区分,就换用了一种新的插入序列 IS1081;另外,还建立起以 DR 序列和 PGRs 为遗传标志的分型方法,用于在 IS6110 拷贝数较少的情况下结核分支杆菌的分型。

2. PFGE 分型:这种方法是用低熔点琼脂糖包埋细菌,

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(刘敬华、万康林);中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心(成诗明)

经 SDS 和蛋白酶 K 裂解和消化后,再利用酶切位点较少的限制性内切酶消化,经脉冲场凝胶电泳,EB 染色,可在一块凝胶上显示全染色体 DNA 的酶切片段。

用 PFGE 方法进行分型,只产生少量大的染色体限制性片段,带型不太复杂,易于识别,而且还不需要特异性探针,避免了放射性污染<sup>[7]</sup>。据报道,其辨别能力与 IS6110 标准方法无明显差异,主要用于 IS6110 拷贝数较少的情况下结核分支杆菌的分型,并已在结核爆发调查的传染源追踪及传播途径的确定方面起到了重要的作用<sup>[8]</sup>。但是,这种方法难于检测小的遗传变化,而且需要特殊的仪器,这些弱点限制了它在结核杆菌菌株鉴定方面的广泛应用。

3. 以 PCR 为基础的分型方法:PCR 分型方法是对 RFLP 和 PFGE 方法的补充。PCR 分型方法针对结核分支杆菌基因组 DNA 上的特征片段,如 IS6110、DR、16S rDNA,设计特异的引物进行多种方式的 PCR 电泳分离,而形成结核分支杆菌 DNA 指纹图谱。该方法只需较少的模板,约 10~100 pg 染色体 DNA,临床标本中的含量即能满足要求,又不需要进行细菌培养,简单而快速,但特异性不如 RFLP 方法,目前作为 RFLP 的补充。

(1)PCR 分型:利用 PCR 技术扩增待分析的目的基因,其扩增产物经电泳分离后,再与特异的探针杂交通过检测杂交结果实现对结核分支杆菌的分型分析。该方法是应用 IS6110 和 MPTR 引物半巢式扩增,再与 IS6110 特异的寡核苷酸探针杂交后,能够产生一种扩增产物谱型将结核分支杆菌菌株分成组。该方法稳定性好,简单快速,但分辨力较差。在结核杆菌的研究中,该方法主要用于扩增分析 rRNA 基因,以检测并区分人型和牛型结核。Plikaytis 等<sup>[9]</sup>在这方面已作出成功的尝试。由于人型结核分支杆菌含有较多的 IS6110,其扩增产物可与 IS55 探针杂交,所以通过该方法进行检验之后,人型结核分支杆菌呈杂交阳性;而牛结核分支杆菌只含低拷贝的 IS6110,其杂交后呈阴性反应而将两者相互区别。

(2)DRE-PCR 和 Spoligotyping 分型:DR 序列是一含有 36 bp 核苷酸的短的重复序列,集中于染色体的一个特殊的区域,DR 之间常被一些不同的间隔序列分开,这些间隔序列的长度和碱基序列不同。DR 序列特异的存在于结核分支杆菌复合群中,最多可达 50 个拷贝,DR 之间的非重复间隔序列目前已发现了 43 种。DR 及相邻的间隔序列合称为直接可变重复单位(DVR)。DRE-PCR 分型方法是根据 DR 序列设计引物,扩增 DVR,然后直接根据 PCR 的条带数目和大小对菌株进行分型。

Spoligo typing 分型(直接可变重复空间寡型)是在 DRE-PCR 分型的基础上,针对不同的间隔序列来设计各自的特异的寡核苷酸探针,并将探针固定到尼龙膜上,然后进行 DVR 序列的 PCR 扩增。实验中所用的引物先用地高辛或生物素等进行标记,这样,扩增产物与膜上的探针进行反向点杂交。由于不同菌株的间隔序列不同,所以杂交的探针数量和种类

也不一样,通过检测到的不同图谱可将结核杆菌的不同型别区分开来。

这两种方法的分辨力强,稳定性好,结果容易观察,尤其是后一种方法,操作简便、快速、重复性又好,而且结果易于记录和比较。常用于进行人型和牛型结核杆菌的菌株鉴定,也可用于培养阳性的临床标本的检测,并已在中国和蒙古区域内的“北京家族”的探索研究中发挥了重要的作用<sup>[10]</sup>。目前,这种方法在国内外已得到了广泛的应用,但是是否可以完全取代 IS6110 标准方法尚没有定论。Spoligotyping 的分辨能力在 IS6110 拷贝数较多时不如 RFLP,而当 IS6110 拷贝数较少时优于后者。所以一般是在 IS6110 的拷贝数少于 5 个的时候才使用 Spoligotyping 分型方法<sup>[11]</sup>。

(3)RAPD 分析——随机引物 PCR 分型:RAPD 也称 AP-PCR(arbitraty primer, AP-PCR)。它是用一条人工合成的寡核苷酸引物对整个 DNA 链进行探索,在足够近的间距(200~2 000 bp)内,于较低的温度下与匹配或部分匹配的退火位点结合,扩增出多态的 DNA 片段。如果 DNA 链之间存在差异,所产生的 DNA 片段数量及长度就会不同,经电泳将这些产物分开后,可得到多态性很好的 DNA 指纹图谱,进而分型鉴定。

这种方法是 Welsh, McClelland<sup>[12]</sup> 和 Williams 等<sup>[13]</sup> 于 1990 年几乎同时建立的,与其他常用的指纹分析方法相比,其具有很好的多态性和较好的特异性,无放射性污染,且具有快速、简便、需用模板量少(10~25 ng)、费用相对低廉等特点,又无需预知靶 DNA 的核苷酸序列,更无需放射性标记的 DNA 特异性探针便可直接得到该 DNA 的多态性指纹图谱<sup>[14]</sup>。目前已显示出很好的应用前景,据报道,该技术在研究结核分支杆菌遗传多态性方面已取得了较好的效果<sup>[15]</sup>,并作为一个重要的分型鉴定技术在大型结核病爆发性流行的调查以及结核病疫情监测中发挥了一定的作用<sup>[16,17]</sup>。但是这种方法仍存在着明显的缺陷,其结果的稳定性和可重复性较差,且对模板的要求较 Spoligotyping 严格,另外,不同实验条件、不同引物所得到的结果有一定差异,所以不同实验室所得到的结果缺乏可比性。为克服这些缺陷,有关学者进行了反复摸索,已使这种方法得到了进一步的改进,取得了很好的效果<sup>[18,20]</sup>。

(4)DNA 序列分析:DNA 序列分析是利用 PCR 扩增待测基因,以荧光素为标记物,然后用测序仪测序,根据所得结果即可将待测菌株分型,主要用于对结核分支杆菌进行耐药检测<sup>[21,22]</sup>。目前使用的仪器设备可使从标本的处理到最后结果的判定在一个工作日内完成,而且检测结果非常精确;但是,测序的成本较高,工作量又很大,现在仅限于在几个研究性实验室中开展,很难普及推广<sup>[23]</sup>。

(5)混合连锁(mix linked, ML)PCR<sup>[24]</sup>:属于 PCR 分型中的一种,是用混合接头(mix-linker)PCR 进行分型的方法。首先提取细菌染色体 DNA,利用内切酶 Hha I 消化,然后将消化产物与过量的 Hha I 接头进行连接反应,再将一个以 UTP

代替 TTP 的接头连接于染色体的限制性片段上。PCR 所用引物有两条,一条针对 IS6110 设计,另一条针对 Hha I 接头设计,利用这两条引物特异的扩增这个含单个拷贝 IS6110 和临近核苷酸(一侧的周边序列)的 Hha I 限制性片段,再以尿嘧啶-N-糖基化酶消除含 UTP 的末端,获含 IS6110 的 DNA 特异片段,在 8% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,溴化乙锭染色后观察结果。通过这种方法产生的指纹图谱型与 IS6110 指纹分析一样,两者可直接进行比较(IS6110 拷贝数较少的菌株除外)<sup>[25]</sup>。

由 Haas 建立的这种 ML-PCR 分型方法敏感、特异、分辨力强,获取分离物后,两天内即可出结果。而且其分辨率和重复性与 IS6110 标准方法非常接近。该方法不仅用于分型,而且可用于鉴别实验室交叉感染及误判断;虽然该方法的重复性和适用性是否适宜应用于结核病患者临床标本的检测尚有待于进一步的考证,但是已有应用 PCR 为基础的 PFLP 技术用于检测临床标本来证实结核爆发的存在的相关报道<sup>[26,27]</sup>。所以此方法的应用前景非常广阔。

(6) PCR 单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) 分析: SSCP 是在 1989 年由 Orita 等<sup>[28]</sup>首先报道的一种 PCR 扩增产物的单链 DNA 凝胶电泳技术,现在已在基因突变和 DNA 多态性的检测和筛查方面得到了最广泛的应用。该方法是将 PCR 产物经变性后,部分或全部裂解为两条互补的单链 DNA,长短不同及空间构型各异的 DNA 片段经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,由于其迁移率的差别,在凝胶上呈现出不同的带型,将其与野生型标准株对照,即可确定野生型和突变型基因,将二者区分开来。该方法灵敏度高,稳定性好,简单快速,而且通过技术方法的改进(用银染色代替同位素标记或 EB 染色),防止了放射性污染,目前已广泛应用于结核杆菌耐药基因的检测中<sup>[29,31]</sup>。

(7) 串联重复序列 (VNTR) 分型方法: VNTR 分型方法建立在数目可变的 VNTR 之上,被检测的菌株根据散在于基因组中的不同独立位点的 VNTR 重复单元的拷贝数的多少来进行数码编码,然后根据每个菌株的数字编码的不同利用相关软件通过计算机来对这些菌株进行自动分型<sup>[32]</sup>。该方法操作简单,并能提供数字式的分型信息,具有很高的可重复性,在实验室内和实验室间具有非常好的可比性,可以同时大量样本进行分析。这种分型方法的分辨能力虽然在 IS6110 拷贝数较多时不如传统的 IS6110-RFLP 和 ML-PCR,但对 IS6110 拷贝数较少的菌株进行分型时,却明显优于 IS6110 标准方法,具有很好的应用前景<sup>[33]</sup>。

4. 基因芯片技术: 结核分支杆菌分型鉴定技术虽然在建立了 PCR 为基础的分型方法之后,大大减少了实验时间,但是仍然存在操作复杂、自动化程度低、操作序列数量少、检测效率低等不足<sup>[34]</sup>,因此迫切需要一种快速鉴定方法。最近发展起来的基因芯片技术正好弥补了这些方面的缺憾。该技术始创于 20 世纪 90 年代初,首先由美国 Affymetrix 公司的 Fodor 博士提出并开始相关研究<sup>[35]</sup>。这种技术的原理

是将已用荧光标记的核苷酸靶序列和大量结合在无机基片或有机合成基片上的基础探针杂交,通过激光共聚焦荧光扫描或电荷偶联摄像机 (CCD) 对每个探针分子的荧光信号的强度进行检测,以此来获得待测标本分子的数量和序列信息<sup>[36]</sup>。基因芯片技术是一种简便、快捷的新技术,是目前分子生物学最前沿的方法,它集物理学、微电子学和生命科学于一体,受到了国内外学者的普遍关注,现已广泛应用于结核分支杆菌的菌种鉴定、耐药性检测及其基因组比较分析等研究领域<sup>[37,39]</sup>。尤其在结核分支杆菌利福平耐药检测方面应用广泛,并表现出高度的敏感性和特异性<sup>[39,40]</sup>。

几年来,基因芯片技术已经取得了很大的进展,但是仍有一些问题尚有待于进一步解决。如:在 DNA 芯片上原位合成探针时会有错误的核苷酸或一些杂质混入,影响检测的特异性;另外,制备芯片的过程比较复杂,待测标本的标记又较为繁琐;再有,其所需的仪器设备又非常昂贵,这些不利因素都阻碍了这项新技术的普及推广和应用。目前以 Affymetrix 公司为首的国内外众多的科学家正在加紧努力的探索<sup>[35]</sup>,相信在不久的将来,基因芯片技术会作为一种简便、快捷的新技术应用于结核分支杆菌分型鉴定和快速诊断中,为有效控制结核病、保护人民健康发挥重要的作用。

### 三、小结

理想的结核分支杆菌的分型方法应具有快速、分辨率高、重复性好、容易操作、费用低廉、能直接对临床标本进行检测等优点,但是现有的方法没有一种能完全符合以上条件,都是各具有自己的优点,又各自有不足之处。迄今为止,还没有合适的结核分支杆菌分型技术能完全区分所有来源不同的结核分支杆菌菌株,目前结核分支杆菌的分型方法仍以传统的核酸印记技术为主,在这些方法中,以 RFLP 为基础的分型方法具有高度的稳定性和重复性,尤其是 IS6110 标准方法在 IS6110 拷贝数较多时仍是首选用于结核分支杆菌的分型。而以 PCR 为基础的分型方法的分辨力和重复性相对差一些,其中 ML-PCR 的重复性相对较好,其次为 VNTR 和 Spoligotyping 方法,可以选择用于分型。由于以 PCR 为基础的分型方法具有简洁、快速、不需细菌培养等优点,所以虽然存在一些缺陷,现在仍越来越多的应用于结核分支杆菌分型鉴定的领域中。相比较而言,在所有的结核分支杆菌的分型方法中 IS6110 方法和 ML-PCR 方法的分辨力最强,其中 ML-PCR 是最好的进行自动化检测的 DNA 指纹方法。大型的流行病学调查中,一般选用 IS6110-RFLP typing 或 ML-PCR 方法来进行分型;当需要分型的菌株较少时,也可选用 VNTR 方法和 Spoligotyping 方法<sup>[41]</sup>。基因芯片技术是在传统核酸印记技术基础上发展起来的,现在正处于研制开发阶段,还不是特别成熟,尚需要进一步完善,但这种简便、快捷的新技术在结核病大型流行病学调查和结核分支杆菌临床鉴定等领域具有很广阔的应用前景。

结核分支杆菌分型鉴定技术在结核病研究领域内的应用,推动了结核病流行病学的迅速发展,其在研究结核病的

病原演变、跟踪和确定传染源、确定流行病学事件(如:结核病爆发和医源性感染)、揭示疾病传播机制、确定药物敏感性和筛选易感人群等方面发挥了重要的作用。另外还可以通过对接核分支杆菌种、型水平上的鉴定,进一步挖掘结核病不同的表现型和其内在基因型之间的联系,这对于此种疾病的预防、治疗和控制将会具有非常重要的指导意义。

### 参 考 文 献

- Snider D, Jones W, Good R. The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolate. *Am Rev Respir Dis*, 1984, 130: 1095-1099.
- Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, et al. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1991, 29: 2030-2033.
- Van Soolingen D, Hermans PW, De Haas PE, et al. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphism in *M. tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 1772-1777.
- Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S, et al. Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains in actual chains of transmission. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 2563-2567.
- Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting; recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 406-409.
- Van Soolingen D, De Haas PE, Hermans PW, et al. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 1987-1995.
- Zhang YS, Mazurek GH, Cave MD, et al. DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 1293-1299.
- Singh SP, Salamon H, Lahti CJ, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 1927-1931.
- Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, et al. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J General Microbiol*, 1993, 139: 1537-1542.
- Van Soolingen D, Qian L, De Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *M. tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 3234-3238.
- Bauer J, Andersen AB, Kremer K, et al. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 2602-2606.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213-7218.
- Williams JG, Kubeilk AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- Linton CJ, Smart AD, Leeming JP, et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA with restriction fragment length polymorphism as epidemiological typing methods for *M. tuberculosis*. *J Clin Pathol Mol Pathol*, 1995, 48: 133-135.
- Richner SM, Mciring J, Kirby R. A study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in the eastern province of South Africa using random amplified polymorphic DNA profiling. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1570-1576.
- Rodriguez JC, Royo G, Rodriguez-Valera F. Application of four molecular techniques for typing outbreak-associated *Mycobacterium tuberculosis* strains. *APMIS*, 2000, 108: 231-236.
- Harn HJ, Shen KL, Ho LI, et al. Evidence of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei city, Taiwan. *J Clin Pathol*, 1997, 50: 505-508.
- Abed Y, Davin-Regli A, Bollet C, et al. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 1418-1420.
- Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, et al. Rapid discrimination of *M. tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 2169-2174.
- Abed Y, Bolted C, Mica P. Identification and strain differentiation of *Mycobacterium* species on the basis of DNA 16S-23S spacer region polymorphism. *Res Microbiol*, 1995, 146: 405-413.
- Gonzalez N, Torres MJ, Palomares JC, et al. Characterization of the *rpoB* gene mutations in clinical isolates of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1998, 16: 404-407.
- Caugant DA, Sandven P, Eng J, et al. Detection of rifampin resistance among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mozambique. *Microb Drug Resist*, 1995, 1: 321-326.
- Felmlee TA, Liu Q, Whelen AC, et al. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 1617-1623.
- Haas WH, Butler WR, Woodley CL, et al. Mix-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *M. tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 1293-1298.
- Haas WH, Butler WR, Woodley CL, et al. Mixed-linker polymerase *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 1298-1393.
- Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, et al. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *M. tuberculosis* isolates. *J Infect Dis*, 1993, 168: 1219-1224.
- Zaza S, Blumberg HM, Beck-Sague C, et al. Nosocomial transmission of *M. tuberculosis*: role of health care workers in outbreak propagation. *J Infect Dis*, 1995, 172: 1542-1549.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5: 874-879.
- Yamazaki T, Haga S, Nakamura RM, et al. Detection of rifampicin-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by a non-radioactive PCR-SSCP method. *Kekkaku*, 1996, 71: 465-471.
- 程绍基, 严碧滢, 潘毓章, 等. 聚合酶链反应-冷单链构象多态性

- 快速检测结核分支杆菌 *tpoB* 基因突变. 中华结核和呼吸杂志, 1996, 19: 333-337.
- 31 何秀云, 庄玉辉, 李国利, 等. 聚合酶链反应-单链构象多态性用于耐利福平结核分支杆菌 *tpoB* 基因突变的研究. 中华结核和呼吸杂志, 1996, 19: 338-341.
- 32 Frothingham R, Meeker O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology, 1998, 144: 1189-1196.
- 33 Kremer K, van Soolingen K, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiologic markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol, 1999, 37: 2607-2618.
- 34 Cheung VG, Morley M, Aguilari F, et al. Making and reading microarrays. Nat Genet, 1999, 21(suppl 1): s15-s19.
- 35 Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide assay for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5022-5026.
- 36 万群, 魏东芝, 袁勤生. DNA 技术. 生命的化学, 1999, 19: 83-88.
- 37 Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chem, 2001, 47: 809-814.
- 38 Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Res, 2001, 11: 547-554.
- 39 景泰香, 胡忠义, 孙悦, 等. 用 DNA 芯片快速检测结核分支杆菌对利福平的耐药性. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24: 551-554.
- 40 Tillib SV, Strizhkov BN, Mirzabekov AD. Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. Anal Biochem, 2001, 292: 155-160.
- 41 Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. Clin Microbiol, 1999, 37: 2607-2618.

(收稿日期: 2003-02-10)

(本文编辑: 尹廉)

## · 疾病控制 ·

## 天津市 2002 年冬至 2003 年春流行性感冒病原学检测分析

段卫平 郭小华 孔梅 解晓华 王世荣 张晓娜 周信芝 路欣畅 AS11 B

为了解天津市流行性感冒(流感)流行情况,自 2002 年 10 月至 2003 年 3 月对天津市四家医院和两所学校采集流感样患者咽拭子标本,用 MDCK 细胞和鸡胚两种接种方法分离流感病毒。结果共采集流感样患者咽拭子标本 305 份,分离到流感病毒 123 株,其中 B 型 90 株占 73.2%, A(H3N2) 亚型 33 株占 26.8%, A(H1N1) 亚型未被分离到。总分离率为 40.3%,如将 2002 年 12 月医院门诊(55/99)与学校采样(9/13)的两组数据汇总,该月的病毒分离率达 57.1% (64/112),形成峰顶。所分离的 90 株 B 型流感病毒,其中 4 株为 Yamagata 系,占 4.4% (4/90);其余的 95.6% 均为 Victoria 系。123 株流感病毒均首先自 MDCK 细胞,将对应的标本液直接接种鸡胚,仅收获到 3 株阳性尿囊液,阳性率 2.4% (3/123),且均为 B 型毒株;阳性细胞液转种,有 96.7% 的 B 型毒株能适应生长,而 33 株 A(H3N2) 亚型毒株虽经反复转种却无一株转变为鸡胚生长适应株(0%)。红细胞凝集试验中 96.7% (87/90) 的 B 型毒株的第一代细胞培养液具有 D 相特征(即与人 O 型红细胞及鸡红细胞均凝集良好),其余 3 株(3.3%) B 型毒株及全部 33 株 A(H3N2) 亚型毒株均具只凝集人 O 型红细胞的 O 相特征,将 A(H3N2) 毒株在 MDCK 细胞上反复传代,但仍持续保持 O 相特征。

天津市流感活动开始于 11 月,首株为 A(H3N2) 亚型。

12 月分离率的 57.1% 中, B 型流感病毒就占 55.4% (62/112), 学生病例中全部为 B 型, 表明我市流感流行的高峰在 12 月, 且主要是由于 B 型流感病毒的活动形成。1 月中旬开始, A(H3N2) 亚型活动有所加强, 在阳性数中的比例逐步上扬, 于 2 月份大幅升至 83.3% (10/12), 但由于流感样患者总人数的减少, 可以说 A(H3N2) 亚型流感一直处于散发状态。本监测季创历年分离率新高, 其根本原因是 B 型流感病毒在我市人群中的活动已平息 2 年, 特别是 B 型中的 Victoria 系, 近 2 年我市从未检测到, 可推知人群对其免疫力已处于较低水平。另据张烨等报告, 对 2001 年国内罕见的 Victoria 系毒株 B/浙江/2/2001 进行的分子生物学研究揭示, 其 HA1 上有两个位点的氨基酸不同于 B/山东/7/97, 即发生了抗原性漂移, 据此推测这类 B 型 Victoria 系毒株可能再次在人群中引起爆发或流行。而我市新分离的 90 株 B 型毒株中有 86 株为 Victoria 系(B/浙江/2/2001 类似株), 从国家流感中心进行的 B 型毒株间 HI 测定结果看, B/浙江/2/2001 的抗血清对 B/天津/174/2002 抗原的 HI 测定滴度是 480 而 B/浙江/2/2001 抗原的 HI 测定滴度是 560, 表明两毒株间的抗原性之间未发生大的变异, 因此说是 B 型 Victoria 系(B/浙江/2/2001 类似株) 流感病毒形成了去冬今春在我市流行的优势株。

(收稿日期: 2003-07-06)

(本文编辑: 尹廉)

作者单位: 300011 天津市卫生防病中心