

动与患者沟通,告知患者采集血标本的注意事项,帮助其做好采集前准备。采集标本时,要认真核对患者信息,确认后再按要求进行标本采集。采集标本后应贴好标签,并及时送检。标本运输过程中谨防标签混乱、标本污染等人为因素造成的错误。若标本被放射性物质或荧光物质污染,在用放射免疫法或时间分辨免疫荧光法进行测定时,会引起检测结果假性升高。实验室工作人员应拒收不合格标本以确保检测质量。

4 小结与展望

甲状腺功能的检测受到多种分析前因素的影响,需控制可控因素,减少干扰因素。患者方面,可控因素包括抽烟、药物服用等,一些重要的影响检测结果的信息需在申请单上注明,方便结果分析。严格按照要求进行标本采集,在标本采集合格的情况下,若检测结果同临床不符,应考虑内源性因素的影响。注重医务人员培训,并要建立严格的标本拒收制度。每个实验室应根据实际情况建立合适的参考区间。对于一些特殊的标本,如妊娠标本,也需建立合适的参考区间。严密的分析前质量控制会为临床提供更可靠、有效的检测结果。

参考文献

- [1] Kratzsch J, Fiedler GM, Leichtle A, et al. New reference intervals for thyrotropin and thyroid hormones based on national academy of clinical biochemistry criteria and regular ultrasonography of the thyroid[J]. Clin Chem, 2005, 51(8):1480-1486.
- [2] Benhadi N, Wiersinga WM, Reitsmavt JB, et al. Ethnic differences in TSH but not in free T4 concentrations or TPO antibodies during pregnancy[J]. Clin Endocrinol, 2007, 66(6):765-770.
- [3] Pearce EN, Oken E, Gillman MW, et al. Association of first-trimester thyroid function test values with thyroperoxidase antibody status, smoking, and multivitamin use[J]. Endocr Pract, 2008, 14(1):33-39.
- [4] Papanastasiou L, Vatalas IA, Koutras DA, et al. Thyroid autoimmunity in the current iodine environment[J]. Thyroid, 2007, 17(8):729-739.
- [5] Kratzsch J, Schubert G, Pulzer F, et al. Reference intervals for TSH and thyroid hormones are mainly affected by age, body mass index and number of blood leucocytes, but hardly by gender and thyroid autoantibodies during the first decades of life[J]. Clin Biochem, 2008, 41(13):1091-1098.
- [6] Santini F, Mantovani A, Cristaudo A, et al. Thyroid function and exposure to styrene[J]. Thyroid, 2008, 18(10):1065-1069.
- [7] Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions[J].

Toxicol Lett, 2009, 189(1):67-77.

- [8] Lopez-Espinosa MJ, Vizcaino E, Murcia M, et al. Association between thyroid hormone levels and 4,4'-DDE concentrations in pregnant women (Valencia, Spain)[J]. Environ Res, 2009, 109(4):479-485.
- [9] 莫素芳, 刘秀琴. 广州市放射工作人员甲状腺功能调查与分析[J]. 中国公共卫生管理, 2006, 22(6):517-518.
- [10] Gruning T, Zophel K, Wunderlich G, et al. Influence of female sex hormones on thyroid parameters determined in a thyroid screening[J]. Clin lab, 2007, 53(9-12):547-553.
- [11] 杜国有, 顾向明. 糖尿病及心血管疾病患者血清甲状腺激素水平的变化[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3):288-289.
- [12] Holtkamp U, Klein J, Sander J, et al. Blankenstein O. EDTA in dried blood spots leads to false results in neonatal endocrinologic screening[J]. Clin Chem, 2008, 54(3):602-605.
- [13] Bowen RAR, Chan Y, Ruddel ME, et al. Immunoassay interference by a commonly used blood collection tube additive, the organosilicone surfactant silwet L-720[J]. Clin Chem, 2005, 51(10):1874-1882.
- [14] Bowen RAR, Chan Y, Cohen J, et al. Effect of blood collection tubes on total triiodothyronine and other laboratory assays[J]. Clin Chem, 2005, 51(2):424-433.
- [15] 王志刚, 曹浩强. 人抗鼠抗体对免疫实验诊断的影响与对策[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1):68-70.
- [16] Chin KP, Pin YC. Heterophile antibody interference with thyroid assay[J]. Intern Med, 2008, 47(23):2033-2037.
- [17] Monchamp T, Chopra IJ, Wah DT, et al. Falsely elevated thyroid hormone levels due to anti-sheep antibody interference in an automated electrochemiluminescent immunoassay[J]. Thyroid, 2007, 17(3):271-275.
- [18] Glendenning P, Siriwardhana D, Hoad K, et al. Thyroxine autoantibody interference is an uncommon cause of inappropriate TSH secretion using the Immulite 2000 assay[J]. Clin Chim Acta, 2009, 403(1-2):136-138.
- [19] Sakai H, Fukuda G, Suzuki N, et al. Falsely elevated thyroid-stimulating hormone(TSH) level due to macro-TSH[J]. Endocrine J, 2009, 56(3):435-440.
- [20] Toldy E, Locsei Z, Szabolcs I, et al. Protein interference in thyroid assays: an in vitro study with in vivo consequences[J]. Clin Chim Acta, 2005, 352(1-2):93-104.

(收稿日期:2010-07-01)

• 综 述 •

MLST 分析在病原微生物基因分型应用中的研究进展

姬小薇, 廖亚玲, 毛旭虎 综述, 邹全明[△] 审校

(第三军医大学临床微生物教研室, 重庆 400038)

关键词: 序列分析; 等位基因; 研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.051

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)02-0246-04

鉴别细菌的方法有很多,其中有其表型、特异性的血清型的方法^[1];还有单克隆抗体等免疫学分型,(这些方法的缺

点是其有限的抗原不能够代表全基因组的,不能预测分型反应)^[2]。然而随着分子生物学技术的不断发展,微生物的基因分型已占据了十分重要的地位。尤其是病原微生物在其存活

[△] 通讯作者, E-mail: xiaowei8099@yahoo.com.cn

和引起疾病的过程中,其基因组会在选择性压力(selective pressure)的作用下发生变异进化,通过掌握这种变异的模式和规律,不仅可以监测感染性疾病的爆发流行,还能进行有效的预防,对可能产生的耐药株进行针对性的治疗,为疾病的预防、诊断和治疗提供有力的依据和参考。目前许多分子技术已被应用于临床实验室分型,但是一些分型方法在阐述细菌的整体流行病学方面还有一定的局限性^[3]。常见的病原微生物分型的方法有:随机扩增引物多态性(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点酶电泳(MLEE)、多位点序列分析(MLST)。MLST(Multilocus sequence typing, MLST)是今年发展起来的分子生物学分析方法,结合了高通量的序列测定和生物信息学的方法,具有高的分辨率,反映细菌群体的变异进化,为整体流行病的监测和微生物分型、进化的基础研究提供了一种简便可行的方法^[1]。

随着分子生物学技术的迅速发展,使得快速、准确检测病原微生物成为可能,并为该领域的研究开拓了更广阔的前景。本文对目前常见的病原微生物分型方法以及重点对 MLST 方法做简要综述。

1 病原微生物的分型方法

1.1 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)

1990 年由 Williams^[4] 和 Welsh^[5] 建立了 RAPD 分型方法。RAPD 可快速检测整个基因组 DNA 的多态性^[6]。在 PCR 反应中应用较短的随机引物对基因组 DNA 进行任意扩增,所需的 DNA 样本量较少,此法简便、快速、经济,适用于从食物样品和粪便中分离的多个菌株的分析,也可用于法医学鉴定物种上的生物标本^[7]。不同物种的基因组与引物相匹配其碱基序列的空间位置和数目都存在着差异,经过 PCR 的扩增后,所得到的扩增产物的大小和数量也将不同,这些差异通过凝胶电泳可以显示^[8]。也就是说,当模板上一定范围内有与引物互补的序列时,此范围内的 DNA 片段就可以扩增出来。进而可以检测在引物结合序列上所发生的碱基突变,扩增区域内发生的大片段缺失、重复、易位、插入。但是 RAPD 也存在很多问题,比如:稳定性差,标记呈现隐性遗传的缺点^[9],虽然相对于 PFGE 其区分能力略逊一筹,但它快速简单,不像 PFGE 需要较长时间,可作为 PFGE 方法的参照。

1.2 扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

Vos 和 colleagues 在 1995 年提出 AFLP^[10]。该方法结合了 RFLP 和 RAPD 技术的特点是一个非常快速和相对简单的实验室工作,可提供大量的多态性标记^[11]。在全基因组分型时,AFLP 提供的数据可以作为附属的遗传因素是下一个基因组多态性的核心。AFLP 用限制性内切酶检测多态性,在限制性位点侧翼的核苷酸与引物的选择性碱基相匹配片段才可被扩增。DNA 片段经两种或两种以上的酶同时切割,如果遗传特性发生改变,则酶切片段数目、长短发生变化,从而实现多态性。这个方法分型很有效,通过不同实验室的比较其重复性好,其最大的优点是不要预先了解序列的信息,所以该方法的应用很广泛^[12-14]。但是该方法检测存在很多问题,诸如显性标记不易转化成位点特异标记以及扩增片段偏短等问题。AFLP 对所存在的一些问题进行了改进,产生了一些新的技术,如单限制性酶切 AFLP(SADF-AFLP)、二次消化 AFLP(SD-AFLP)、三限制性酶切 AFLP(TE-AFLP)、差减 AFLP(Substracted AFLP)、微卫星 AFLP(Microsatellite-AFLP)和互补 DNA AFLP(cDNA-AFLP)新技术^[15]。

1.3 脉冲场凝胶电泳 (Pulsed-field gelelectrophoresis, PFGE)

在全基因组分型、检测基因变异的方法中,PFGE 已被公认为是流行病学调查最经典的方法,有很高的分辨率,常用于疾病爆发时的监测。通过计算机处理得到大量不同的 PFGE 数据,能够准确解释流行病学研究中亚型的数据,可追溯菌株的来源和在食品工业中的污染源^[16]。Alwaleed Alaidan 等^[17]对 PFGE 方法中细菌溶解、冲洗、限制性酶切的时间进行调整,建立了快速的 PFGE 方法检测粘质沙雷菌,其获得结果的时间与常规 PFGE 相比较只需要 3 d 的时间。限制性内切酶脉冲场电泳(GM-PFGE)是选择切割位点少的限制性内切酶对全基因组 DNA 酶切,借助脉冲电场凝胶电泳(PFGE)技术,对得到的 DNA 大片段进行分离。韩黎等^[18]对 20 株铜绿假单胞菌进行 GM-PFGE 图谱分析,结果可显示染色体结构的区域多型性,重复性好,分辨率高于表型的分型。尽管 PFGE 区分的方法分辨率高,有标准的操作流程和标结果分析,该法的缺点是结果不易分析,没有国际统一标准,不易于在实验室之间进行比较,且仪器价格昂贵,费力、步骤多和费时,而且 PFGE 不适合长期的流行病学检测。为了克服这种困难进行了改进,C-PFGE 比以前能较快速的检测^[19-20]。但是其结果不能在不同的实验室比较。

1.4 多位点酶电泳 (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)

MLEE 适用于遗传变异进化速度相对较慢的菌株。MLEE 通过在凝胶中分析管家基因经酶切后的电泳泳动率,每个泳动都是潜在的遗传等位基因的不同变种^[21]。在每一个位点所检测到变种较少的,较高的分辨率要通过至少 20 或者更多的位点来实现。MLEE 分类的结果可通过电泳形成的差异矩阵树状图显示。MLEE 提供的数据可用于微生物菌群遗传的进化分析。尽管 MLEE 在建立菌群长期流行病学调查中起到很重要的作用,但是这个技术操作麻烦,不适合广泛的常规监测。另外,不同的实验室其结果不能比较^[22]。将 MLEE 方法改进后,衍变出了 MLST 分型方法,该方法应用 DNA 自动测序技术,能快速、简单的进行全球性的流行病学的调查。

2 多位点序列分析 (multi-locus sequence typing, MLST)

2.1 MLST 简介

1998 年 Achtman 等提出 MLST,能够提供精确的、便携数据,适合微生物长期、短期内的流行病学调查,还能较好的反映区进化和菌群生物学变异^[1,23]。MLST 方法是建立在 MLEE 的基础上,针对的靶点是看家基因上存在的变异位点。MLST 鉴定变异是通过对比等位基因片段(allele)核苷酸序列测定,核苷酸序列测定的结果容易验证、保存和电子分享,是标准化的技术。MLST 分析,每一个等位基因位点被命名为相应的基因序号,这个相当于 MLEE 中的电泳泳动率形态。结合不同的等位基因位点的信息就构成了一个等位基因图谱(allele profile),被命名为序列型(sequence type, ST)^[23],这就相当于 MLEE 中的电泳型(ET)。研究证明 MLST 的分辨率较高,可以和 PFGE 相媲美^[21]。在种群内部可通过比较的等位基因图谱之间的联系,即紧密的相关的菌株,其等位基因图谱是相同或相近的,可被鉴定为一个 STs;无相关性的菌株的图谱是没有关联的。MLST 的优势在于试验只需要基因组 DNA,不需要培养,可从感染、腐烂的材料中或是死亡的细胞悬液获得需要准备 DNA,运输保存较为便捷。而且方法是标准化的核苷酸测序技术,操作简便,获得数据易于保存、不同实验室内结果可以进行比较。MLST 方法已被报道用在多种的真核生物或是原核生物的分型、进化分析上^[24]。MLST 的操作流程如图 1。

MLST 选择的样本菌株要用最初的原代菌株,这样能够更

好的体现菌株本身的状态;选择基因的位点要有特异性,一般选择具有代表性的管家基因位点。1996 最早开始的 MLST 核苷酸序列测定仪在 450 bp, 尽管太长的序列可以获得,但是有人研究过看家基因片段的大小要适合^[23,25],数目在 7~10 个,就能有较好的分辨能力。

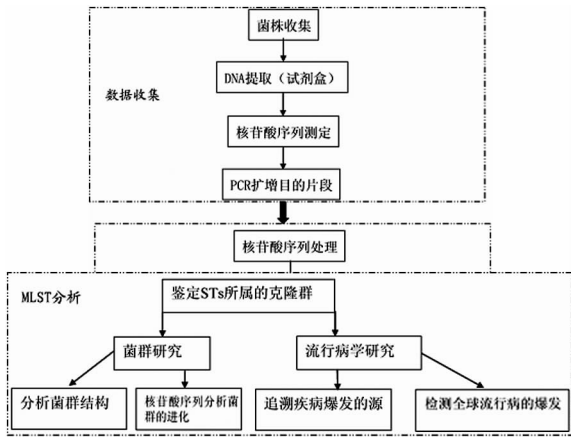


图 1 MLST 分析细菌病原体操作流程^[37]

2.2 MLST 在脑膜炎和空肠弯曲菌中的应用 MLST 最初是用于脑膜炎奈瑟氏菌的分型,选择了 6 个位点^[23],另外加了一个毒力抗原相关的位点(fumC),以提高分析的分辨力^[26]。此后的一些研究也证明,与抗原基因或是毒力相关基因位点结合,能够提高分型的分辨率,能更好的反应与致病性的关系^[27]。在设计 PCR 的引物时,需要适合 MLST 体系,设计一个嵌套的策略,如巢式 PCR,选择的 DNA 片段大于最初的所需扩增的序列^[28-31]。每个细菌的群体内部可能存在不同的克隆群,克隆群是由在遗传上相关的菌株组成的。现在还没有什么标准模式来鉴定克隆群,建立在遗传和微生物标准上的 MLST 方法是个很实用的方法。一些 MLST 的分析数据可能包含了大量不同的 STs,然而,应用相关生物信息学方法分析这些数据发现,很多 STs 在非流行菌株中出现的频率较低,相比之下常见的 STs 来自不同的分离地点流行菌株。进一步的进化研究可用 BURST (based upon related sequence-types)^[27,32], START (sequence type analysis and recombinational tests) 进行分析^[33]。MLST 数据所得到的克隆群可用于流行病学的研究和表型相关性分析,Dingle 等人收集来自不同地方的 814 株空肠弯曲菌,包含有 379 个 STs,属于 17 个克隆群,其中 6 个克隆群中 60% 与人疾病有关系。MLST 数据通过用进化树的方法可以解释细菌群体变异的主要方式,核苷酸的置换、重组以及水平基因转移等^[29]。作为分析方法,进一步还可以解释在变异株的进化过程中细菌的哪些正向选择导致了遗传的改变、表型的差异。MLST 方法的一个最大的优势在于不同实验室间的结果可以进行比较,数据在 Internet 是共享的,这对于临床诊断,流行病学监控和菌群的研究提供了便利,有利于对微生物微进化数据的整体分析。现已建立了很多 MLST 系统平台,比如:(<http://pubmlst.org/software/analysis/>、(<http://www.shigatox.net/cgi-bin/stec/index>)等,有助于不同的研究人员对相关微生物的综合性研究^[35]。

2.3 多位点序列分析在 O157:H7 中的应用 肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic Escherichia coli, EHEC) O157:H7 是一种重要的人兽共患传染病病原菌^[36-37]。可引起一系列并发症,包括腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒综合征(hemolytic ure-

mic syndrome, HUS)及血栓性血小板减少性紫癜(Thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)等严重并发症,严重者可导致死亡^[38]。自 1982 年美国首次发现 O157:H7 大肠杆菌引起的出血性肠炎暴发之后,在世界各地都有爆发,严重影响人们的生产和工作。我国也于 1986 年从患者身上检出 O157:H7 大肠杆菌^[39]。猪和牛是 O157:H7 的主要宿主,通过食物链可感染人群,感染人群和动物的菌株之间存在多态性的差异。O157:H7 的遗传变异和种群的多样性可通过对其管家基因和毒力基因上的 400~500 bp 碱基来测定,可得到不同的序列型。目前 O157:H7 的多态性研究是对其毒力因子(stx, eaeA, HlyA^[40])产生志和毒素和相关蛋白 TCCP 的重复片段与细菌粘附的关系等的结构和功能的研究,这些对于 O157:H7 的菌群微生态和流行病学研究都是不够的。

O157:H7 的流行病学和多态性方法主要是用 PFGE,该方法被评为监测的“金标准”,但是其检测费时,结果在不同的实验室比较。使得该方法收到了局限性。MLST 方法作为一种简便、快速的分子生物学方法被广泛的用于流行病学和菌群多态性的研究。通过 MLST 方法可以快速、准确地对 O157:H7 分型,提高监测力度,制定有效的预防和控制措施,预防疾病的流行和爆发^[41]。

3 结 语

运用分子生物学分型方法分析微生物的多态性,为调查病原微生物是否潜在暴发流行,微生物在环境中的适应性微进化等研究提供了有效手段。AFLP、RAPD、RFLP、PGEF、MLEE 等方法都在基因组多态性的分型研究发挥了作用,但同时也存在各自相应的局限性。MLST 逐渐成为了微生物常规的分型方法,建立一种全新的分型系统,使不同实验室的研究结果可以得以整合,对分布于不同地区的微生物菌群进行比较分析。可用于很多方面:如抗生素耐药株的变异,特异基因型与毒力因子的关联或是引起的疾病的新的抗原特异性变异,研究细菌群体进化关系等。

参考文献

[1] Popoff MY. Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann-White scheme[J]. Res Microbiol, 1998, 149(8): 601-604.
[2] Gupta S, Maiden MCJ. Exploring the evolution of diversity in pathogen populations[J]. Trends Microbiol, 2001, 9(4): 181-185.
[3] Achtman M. A surfeit of YATMs? [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(7): 1870-1872.
[4] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
[5] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7213-7219.
[6] Azfer A, Bashamboo A, Ahmed N, et al. Random amplification of polymorphic DNA with conserved sequences reveals genome specific monomorphic amplicons: Implications in clad Identification [J]. J Biosci, 1999, 24(1): 35-41.
[7] Chattopadhyay P. RAPD markers system as a useful tool for rapid identification of the origin of lizard contaminants in food[J]. Food Chem Toxicol, 2003, 41(12): 1719-1725.
[8] Zheng DJ, Liang YF, Liu GM, et al. RAPD Analysis of Germplasm Resources of Kudingcha Species in Oleaceae[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(7): 784-792.
[9] 姜自锋, 林乃铨, 徐梅. RAPD 技术及其应用中的一些问题[J]. 福

- 建农林大学学报:自然科学版,2002,31(3):356-360.
- [10] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. NAR, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [11] Mueller GU, Wolfenbarger LL. AFLP genotyping and fingerprinting[J]. TREE, 1999, 14(10): 389-394.
- [12] Lucchini V. AFLP: a useful tool for biodiversity conservation and management[J]. C R Biol, 2003, 326(Suppl 1): S43-48.
- [13] Wang ZH, Tsoi KH, Chu KH. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp[J]. Biochem System Ecol, 2004, 32(4): 399-407.
- [14] Lee JH, Han TH. Identification of parental species of the *Alstroemeria* cv. 'Jubilee' using AFLP marker technique[J]. Scientia Horticulturæ, 2006, 111(1): 63-67.
- [15] 田舜, 李韬. AFLP 技术操作流程的变革及其衍生技术[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 27(4): 62-66.
- [16] Neves E, Lourenc A, Silva AC, et al. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars[J]. Syst Appl Microbiol, 2008, 31(5): 387-392.
- [17] Alaidan A, Bohol MF, Al-Thawadi SI, et al. Rapid PFGE method for fingerprinting of *Serratia marcescens* isolates[J]. J Microbiol Methods, 2009, 78(2): 238-241.
- [18] 韩黎, 吴桂, 陈世平, 等. 铜绿假单胞菌的 GM-PFGE 分型的研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1999, 19(4): 338-341.
- [19] Goering RV, Winters MA. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(3): 577-580.
- [20] Matushek MG, Bonten MJ, Hayden MK. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(10): 2598-2600.
- [21] Selander RK. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics[J]. Appl Environ Microbiol, 1986, 51(5): 873-884.
- [22] Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing[J]. Trends Microbiol, 1999, 7(12): 482-487.
- [23] Maiden MCJ. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [24] Jefferies J. Automated pneumococcal MLST using liquid handling robotics and a capillary DNA sequencer[J]. Mol Biotechnol, 2003, 24(3): 303-308.
- [25] Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease[J]. Microbiol, 1998, 144(11): 3049-3060.
- [26] Holmes EC. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*[J]. Mol Biol Evol, 1999, 16(6): 741-749.
- [27] Bygraves JA. Population genetic and evolutionary approaches to the analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the ET-5 complex[J]. J Bacteriol, 1999, 16(181): 5551-5556.
- [28] Feil EJ. How clonal is *Staphylococcus aureus*? [J]. J Bacteriol, 2003, 185(11): 3307-3316.
- [29] Meats E. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1623-1636.
- [30] Godoy D. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 2068-2079.
- [31] Jones N. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2530-2536.
- [32] Enright MC. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11): 7687-7692.
- [33] Jolley KA. Sequence type analysis and recombinational tests (START) [J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1230-1231.
- [34] Dingle KE. Molecular characterisation of *Campylobacter jejuni* clones: a rational basis for epidemiological investigations [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 949-955.
- [35] Urwin R, Martin C, Maiden J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(10): 479-487.
- [36] Riley LW, Remis RS, Helgeson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype[J]. N Engl J Med, 1983, 308(12): 681-685.
- [37] Jing HQ, Pang B. Study on diarrhea disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Xuzhou city[J]. Chin J Epidemiol, 2002, 2(23): 119-122.
- [38] Li Y, Frey E, Mackenzie AM, et al. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors [J]. Infect Immun, 2000, 68(9): 5090-5095.
- [39] 徐建国, 景怀奇. 中国 1997~1998 年 O157:H7 大肠杆菌检测情况分析[J]. 疾病监测, 1999, 14(5): 176-178.
- [40] Pradel N, Boukhors K, Bertin Y, et al. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(6): 2460-2468.
- [41] 郭喜玲, 史智扬, 顾玲, 等. 大肠埃希菌 O157:H7 特异基因检测与毒力基因分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2002, 13(6): 450-453.

(收稿日期: 2010-07-16)

误差

误差指测量值与真值之差, 也指样本指标与总体指标之差。包括系统误差、随机测量误差和抽样误差。系统误差指数据收集和测量过程中由于仪器不准确、标准不规范等原因, 造成观察(检测)结果呈倾向性的偏大或偏小, 是可避免或可通过研究设计解决的。随机测量误差指由于一些非人为的偶然因素使观察(检测)结果或大或小, 是不可避免的。抽样误差指由于抽样原因造成样本指标与总体指标的差异, 是不可避免但可减少的。