

多重 PCR 和间隔区寡核苷酸分型技术应用于不同流行地区的牛结核病研究

张喜悦¹, 范承祥², 杜鹏飞¹, 曹瑞¹, 呼西旦³, 王淑娟¹, 范伟兴¹

摘要:目的 在牛结核病监测中联合应用菌株的多重 PCR 鉴定和间隔区寡核苷酸分型(spoligotyping),快速鉴定分离菌株并分析不同地区流行菌株的特点。**方法** 分别在牛结核病清净地区和流行地区进行牛型 PPD 变态反应试验, 扑杀阳性牛后进行病理检查, 并采集病料分离细菌。获取分离菌株, 进行多重 PCR 鉴定和 spoligotyping 分型, 分析不同地区的菌株特征。**结果** 结核病清净地区监测到 16 头牛型 PPD 阳性牛, 扑杀后未见有病变, 采集病料分离到 4 株分枝杆菌, 经多重 PCR 鉴定均为非典型分枝杆菌。流行地区监测牛型 PPD 阳性 23 头, 扑杀后发现 14 头有病变, 采集病料后共有 11 头分离到疑似菌, 经多重 PCR 鉴定均为牛型分枝杆菌。用 spoligotyping 分析共分为 4 个型, 其中 2 个为未见报道的新型, 报英国 AHVLA 牛结核 spoligotyping 数据库后获取通用编号 SB1903 和 SB1904。**结论** 分离菌株中的优势菌株为首次报道的 SB1903, 但也检出有国际流行菌株 SB0140, 证实该地区牛结核病的流行是以“独特菌型地域内相互传播为主、输入性感染为辅”为特征。本次监测发现国内有 SB0140 菌株分布, 提示应调查该型菌是否已经传染至我国人间。

关键词:牛结核; 多重 PCR; 间隔区寡核苷酸分型

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2015)04-0340-05

Application of multiple-PCR and spoligotyping for investigation of bovine tuberculosis from different epidemic areas

ZHANG Xi-yue¹, FAN Cheng-xiang², DU Peng-fei¹, CAO Rui¹, HU Xi-dan³, WANG Shu-juan¹, FAN Wei-xing¹

(1. China Animal Health & Epidemiology Center, Qingdao 266032, China;

2. Rizhao Animal Disease Control Center, Rizhao 276800, China;

3. Veterinary Research Institute, Animal Science Academy of Xinjiang, Wulumuqi 830000, China)

Abstract: To characterize the *Mycobacterium bovis* in the different epidemic areas, we combined the multiple-PCR and spoligotyping to investigate the bacteria isolated in the bovine tuberculosis surveillance. The bovine PPD skin tests were performed in lower-prevalence and higher-prevalence areas in China. The positives were slaughtered and their carcasses were examined for the tubercles. Isolated pathogens were identified by using multiple-PCR and then genotyped by using spoligotyping. No lesion was found from the carcasses of 16 positives in the lower-prevalence area. The 4 strains *Mycobacteria* were isolated from the lymph nodes collected from the positives and then identified as nontuberculosis *Mycobacteria* by using multiple-PCR. The 23 positives were slaughtered and examined in the higher-prevalence area. The lesions were found from 14 cattle and then the pathogens were isolated from the 11 of them. The bacteria were identified as *Mycobacterium bovis* by using multiple-PCR. Totally, 4 spoligotypes were classified and 2 of them were new types. Number SB1903 and SB1904 were given after the patterns were submitted to the bovine tuberculosis spoligotyping database. It was revealed that the character of "domestic typing SB1903" was predominant but the world-spread typing SB0140 still be insistent in the area. It suggests that the scientists should pay attention on the transmission of the typing SB0140 to human beings as the typing has been found from cattle in China.

Keywords: bovine tuberculosis; multiple-PCR; spoligotyping

科技基础性工作专项(2012FY111000), 现代农业(奶牛)产业技术体系建设项目(CARS37)

通讯作者:范伟兴, Email: fwxsjl@126.com

作者单位:1. 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032;

2. 山东日照动物疫病预防控制中心, 日照 276800;

3. 新疆牧科学院兽医研究所, 乌鲁木齐 830000

Supported by the National Basic Research Program of China (No. 2012FY111000) and the China Agriculture (Dairy) Research System (No. CARS37)

Corresponding author: Fan Wei-xing, Email: fwxsjl@126.com

牛结核病主要是由牛结核分枝杆菌引起的一种人兽共患病。确诊牛结核病的关键是能够分离到并准确鉴定病原。传统的牛结核分枝杆菌鉴定方法主要包括细菌形态、染色特性和生化鉴定等,这些鉴定方法操作复杂且需时较长。根据比较基因组学的原理,Wilton 等^[1]建立了可以鉴定多种分枝杆菌的分枝杆菌多重 PCR 并在世界范围内得到了广泛的应用。近年来也出现了一些新的基因分型技术,可以从分子水平上分析不同地理区域流行的牛型分枝杆菌的特点、追踪传染源,对于了解牛结核分枝杆菌的生态分布与传播,以及时提出预警等,都具有重要的意义。目前国内外应用于结核分枝杆菌复合群基因分型方法主要分为两类:一类是以限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)为基础的方法^[2],另一类是以基因组中特定多态性区域序列进行 PCR 扩增为基础的方法,其中的间隔区寡核苷酸分型(spacer oligonucleotide typing, spoligotyping)分型方法已经被广泛用于牛结核分枝杆菌的分型,是第一个被认可的分型方法^[2-6]。

我国目前的变态反应阳性牛均要求扑杀,但很多变态反应阳性牛并不能见到结核症状,且扑杀后没有明显的病变。根据我们前期的研究,牛结核变态反应试验在流行率较低的地区假阳性相对较多,而在流行率较高的地区则相对较少^[7]。我们在前期工作的基础之上,分别扑杀在不同流行率地区检出的变态反应阳性牛并进行细菌分离,用多重 PCR 方法鉴定和 spoligotyping 方法分型,并评估这两种方法在不同地区的应用价值。

1 材料和方法

1.1 试剂和重要仪器 Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L)、PCR Master 等购自于大连宝生物公司。DNA Marker、EB(溴化乙锭)等购于 Promega 公司。Middle brook 7H11 培养基,购自美国 BD 公司。Rnase A、蛋白酶购自大连宝生物公司。Spoligotyping 试剂盒购自 Ocum Biosolution, ECL 发光检测试剂购自 Amersham International 公司,亲核素—过氧化物酶连接液购自 Boehringer 公司。显影液和定影液均购自柯达公司。Mini-blotter MN45 为荷兰 Isogen Life Science 公司产品。多重 PCR 引物 Mycgen、TB1、Mycav、Mycint 4 和 spoligotyping 引物 DRa、DRb 均由大连宝生物公司合成。多重 PCR 引物序列参考文献;DRa 序列为 5'-GGTTTGGGTCTGACGAC-3',5' 末端采用 Bio-

tin 标记;DRb 序列为 5'-CCGAGAGGGGACG-GAAAC-3'。

1.2 标准菌株 结核分枝杆菌标准株 H37Rv、牛分枝杆菌标准株 AF2122/97、BCG-Pasteur 标准株、禽分枝杆菌标准株、胞内分枝杆菌标准株和草分枝杆菌标准株,均由北京市结核病胸部肿瘤研究所细菌免疫研究实验室提供。

1.3 疫区和非疫区结核阳性牛的剖检 地区 1 历史流行率高于 2% 的 3 个结核阳性牛牛场,共计 114 头牛,在检疫后发现 23 头阳性牛;来源于历史流行率低于 0.5% 的地区 2 的 1 个牛场,共计 312 头牛,经检疫后发现 16 头阳性牛。将阳性牛剖杀后检查病变,有病变的采集结核结节,无病变的采集淋巴结。

1.4 分枝杆菌的培养及染色鉴定 无菌条件下,采集结核病变,加入适量的灭菌生理盐水,经研磨器匀浆处理后,加入 2 倍体积的 4% 硫酸,室温下处理病料 15~20 min。利用生理盐水再将处理过的病料做 10 倍稀释,用移液器分别接种 0.2 mL 至 Middle brook 7H11 培养基。37 °C 培养 6 周,将扩大培养好的临床分离菌株和牛结核分枝杆菌标准株转移到密闭的含有生理盐水的试管中,将试管置于水浴锅,经 80 °C 2 h 灭活。用 Ziehl-Neelsen(Z-N)方法染色,于显微镜下观察结果。

1.5 分离菌株的分枝杆菌多重 PCR 鉴定 以灭活的分离菌株作为样品,以牛分枝杆菌标准株作为阳性对照,用 Mycgen、TB1、Mycav 和 Mycint 4 对引物进行扩增,扩增出 1 030 bp 片段表明为分枝杆菌种,扩增出 372 bp 片段为 MTC 群(包括人分枝杆菌和牛分枝杆菌等)。如果只扩增出 1 030 bp 片段而没有 372 bp 片段则为非结核分枝杆菌。

1.6 spoligotyping 鉴定分离菌株 采用 Kamber-beek J 推荐 Spoligotyping 方法并做适当改进^[8]。

1.6.1 PCR 扩增直接重复区(DR 区) 用结核分枝杆菌标准株 H37Rv、牛分枝杆菌标准株 AF2122/97 和 BCG-Pasteur 标准株的 DNA 为阳性对照,以 DRa 和 DRb 作为引物。对临床分离株的 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系为 2×PCR Master Mix 12.5 μ L、引物(10 pmol/L)各 2 μ L、模板 DNA 2 μ L、双蒸水 8.5 μ L,总体积 25 μ L。反应程序为 96 °C 预变性 3 min, 96 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 30 s 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min。

1.6.2 PCR 产物的杂交与检测 将 25 μ L PCR 产物加入到 175 μ L 2×SSPE/0.1% SDS 中,100 °C 水浴 10 min, 取出立即放入冰上。用 250 mL 的 2×

SSPE/0.1% SDS 在 60 ℃ 洗杂交膜 5 min, 将杂交膜放入 miniblotter, 并使狭缝和寡核苷酸的线型模型相垂直。将稀释的 PCR 产物填入狭缝, 并用防水胶带将 miniblotter 密封, 放置于 60 ℃ 水浴锅的水平表面杂交 60 min。洗膜并晾干放入保鲜袋中冷却, 加入 10 μL 亲核素-过氧化物酶连接液 42 ℃ 孵育 60 min。洗膜后加入 ECL 液并曝光 10 min、显影 5 min, 定影 5 min, 清洗胶片。

2 结 果

2.1 疫区和非疫区结核阳性牛的剖检结果 地区 1 的 3 个历史结核阳性牛场的共计 23 头阳性牛; 其中群 1 剖杀 9 头, 有 6 头有结核病变; 群 2 剖杀 11 头, 7 头发现结核病变, 群 3 剖杀 3 头, 1 头发现结核病变; 采集结核病变或淋巴结至实验室进行细菌分离。其中部分病变见图 1。地区 2 牛场检出的阳性牛共计 16 份, 剖杀后未发现病变, 采集淋巴结至实验室进行细菌分离。



A: Tubercle on lung of PPD positive cattle; B: Pearl-like tubercles on chest wall of PPD positive cattle.

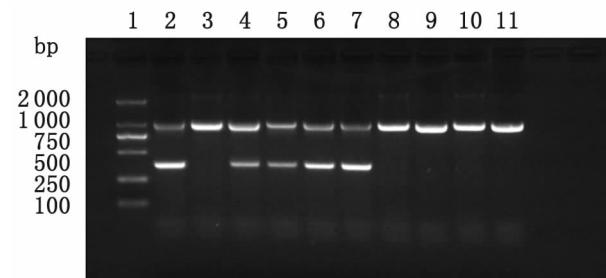
图 1 PPD 阳性牛解剖后发现的结核病变

Fig. 1 Tubercles formed in the chest of the skin test reactor

2.2 细菌分离结果 将结节内的干酪样坏死取出, 或者将淋巴结匀浆后经酸处理, 接种于 Middle brook 7H11 培养基。37 ℃ 培养 6 周, 培养阳性者可见有不透明的颗粒状菌落生长, 表面皱褶粗糙, 呈乳白色结节状, 阴性则无菌生长。结果地区 1 的 23 份病料中, 14 份病变组织中有 9 份分离到可疑菌, 9 份非病变淋巴结中有 2 份分离到可疑菌, 从病料中分离到细菌的几率为 47.8%(11/23); 地区 2 的 16 份病料中, 4 份分离到可疑菌, 从病料中分离到细菌的几率为 25%(4/16)。

2.3 分枝杆菌多重 PCR 鉴定结果 以灭活的分离菌株作为样品, 以牛分枝杆菌标准株作为阳性对照, 以草分枝杆菌作为阴性对照进行分枝杆菌多重 PCR。反应结束后取 5 μL 产物进行 1% 琼脂糖电泳, 紫外凝胶成像分析系统上观察。结果阳性、阴性对照均成立, 牛结核疫区的临床样品分离菌株同牛分枝杆菌标准株一样, 引物 MYCGEN-F 和 MYC-

GEN-R 有 1 030 bp 片段扩增, 引物 TB1-F 和 TB1-R 有 372 bp 片段扩增, 而非结核疫区的阳性牛分离菌株则仅有 1 030 bp 片段扩增, 没有 372 bp 片段扩增(见图 2)。证实地区 1 的临床样品分离菌株属于 MTC 群, 而地区 2 的临床样品分离菌株则为非结核分枝杆菌。



1: DNA Marker; 2: *Mycobacterium bovis* AF2122/97; 3: *Mycobacterium phlei*; 4-7: Pathogens isolated from higher prevalence area were identified as *M. tuberculosis*-complex (MTC); 8-11: Pathogens isolated from lower prevalence area were identified as nontuberculous mycobacteria (NTM).

图 2 污染牛群和非污染牛群结核阳性牛病料分离菌株的多重 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Multi-PCR identification of mycobacterium isolates from several areas of China

2.4 spoligotyping 分型结果 应用 spoligotyping 分型技术对牛分枝杆菌临床分离株、结核分枝杆菌标准株 H37Rv、牛分枝杆菌标准株 AF2122/97 和 BCG-Pasteur 标准株进行鉴定。其中结核分枝杆菌标准株 H37Rv、牛分枝杆菌标准株 AF2122/97 和 BCG-Pasteur 标准株的杂交图谱与国际报道的标准一致。牛分枝杆菌临床分离株均缺失 39~43 之间的杂交, 符合牛分枝杆菌的特点。

Spoligotyping 可将临床分离的牛分枝杆菌分为 4 个基因型(见表 1)。通过查询国际牛结核分枝杆菌 spoligotyping 数据库(<http://www.mbovis.org/spoligodatabase>), 4 个型中的 2 个型国外已有报道, 分别为 SB0140(世界范围内流行)^[9-13]、SB1694(意大利有报道, 参见数据库); 另有 2 个型国际上尚无报道, 我们将这 2 个型的数据提交数据库, 获取其统一编号为 SB1903 和 SB1904。SB1903 型菌株 Spoligotyping 图谱缺失 3、9、16、26、28 和 39-43 号间隔区, SB1904 型菌株 Spoligotyping 图谱缺失 3、4、9、16、26 和 39-43 号间隔区, 其共同特点是缺失 26 号间隔区(牛结核分枝杆菌均缺失 3、9、16、39-43 号间隔区), 该特点可能是地区 1 流行的牛结核分枝杆菌菌株特征。

表 1 较高流行率地区(地区 1)流行菌株的 spoligotyping 分型结果

Tab. 1 Spoligotyping patterns of *Mycobacterium bovis* isolates from several areas of China

3 讨 论

3.1 多重 PCR 和 Spoligotyping 在我国结核病监

测中的应用价值。我国应用较多的牛结核病检测方法(颈部变态反应)的特异性较低(88.8%~100%),国际上已被认可的 γ 干扰素试验仍然具有较高的非特异性(3.4%)^[14],用这些方法监测牛结核病会产生很高的非特异反应,因此必须联合使用细菌的分离与鉴定方法(特异性100%)才能提高监测的准确性。但由于细菌分离鉴定过于繁琐,常规的生化试验如噻吩-2-羧酸肼培养基生长试验、硝酸还原试验和烟酸试验等方法复杂,需时较长,且具有生物风险,在我国牛结核病监测的实践中很少有应用。国际上病原鉴定中广泛应用的多重PCR方法和spoligotyping方法在我国的应用极少,本实验尝试联合应用这两种方法鉴定牛结核分枝杆菌,简便快速且能进行分子流行病学分析,促进我国牛结核病监测的范围和准确性提升。

3.2 流行率不同地区的分离菌株的不同 地区 1(流行率较高地区)一共 23 头牛, 扑杀后有 14 头有病变, 共有 11 头牛分离出可疑菌, 经多重 PCR 鉴定均为牛结核分枝杆菌; 而地区 2(流行率较低地区)扑杀 16 头牛, 均没有发现病变, 细菌分离仅有 4 份病料分离出非特异性分枝杆菌。本实验在牛结核流行率较高的地区, 变态反应阳性牛扑杀后发现病变的几率(60.9%), 以及从病料中分离到可疑菌的几率(47.8%), 高于流行率较低地区(分别为 0% 和 25%)。这也从侧面证实, 在牛结核清净地区的检疫过程中, 会产生较高的假阳性或者是非特异性分枝杆菌感染。这与我们前期的试验结果一致且与理论相符, 即在流行率较低的地区进行监测, 检测出来的阳性有很大一部分为非特异性反应, 按照国标方法扑杀后必须要进行细菌分离与鉴定等工作以增加监测的准确性。

3.3 spoligotyping 的应用价值 Spoligotyping 在

我国的应用较少,本次调查,发现地区 1 流行的主要菌型为 SB1903。但其在独特菌型在地区 1 优势流行时,试验涉及的 3 个牛场,均分离出了 SB0140 型菌,证实这株国际上广为流行的菌株,也分布于该地区。证实该地区的菌株分布呈现出“独特菌型地域内相互传播为主、输入性感染为辅”的特征。随着国内牛结核分枝杆菌分离菌株的增多,不同地区将呈现出其当地的独特型菌株分布。因此,根据不同地区不同牛分离菌株的 spoligotyping 分析结果,就可以追溯传染源,并从分子水平上展开预警分析。

3.4 SB0140 型牛分枝杆菌的公共卫生意义

SB0140 型牛分枝杆菌广泛分布在英国、澳大利亚、新西兰、加拿大等世界范围内，而且在这些国家的分离菌株中占有很大比例^[9]。如 Joanne McLernon^[10] 等对爱尔兰的 386 株细菌进行 spoligotyping 分型，结果 SB0140 型约占 50%；^[11] 等对来自于阿根廷、巴西、智利、墨西哥和委内瑞拉的 1 684 株牛结核分枝杆菌进行 spoligotyping 分型，结果 SB0140 所占比例最大，为 24.6%。更值得关注的是，SB0140 具有重要的公共卫生意义。Olabisi Ojo^[12] 等报道，1998—2006 年 501 位爱尔兰人患者，有 15 位（3%）为人感染牛结核分枝杆菌，分离的 11 株细菌中 3 株（27%）为 SB0140 型。Timothy C. Rodwell^[13] 等对美国的 106 例人感染牛结核分枝杆菌进行调查，91% 的感染人的牛结核分枝杆菌 spoligotyping 分型结果与感染墨西哥牛的分枝杆菌分型结果一致，证实加州南部的牛结核分枝杆菌感染人病例与墨西哥牛相关，而这 106 人中有 39 人（36.8%）的牛结核分枝杆菌分型结果为 SB0140 型。本次在我国也发现了 SB0140 型在牛群中的感染，但至于该型菌是否存在我国人的感染病例中，尚需进一步研究。SB0140 型牛结核分枝杆菌的分离与鉴定，很显然具有重要的公共卫生意义。

参考文献：

- [1] Wilton S, Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in single tube[J]. PCR Methods Appl, 1992, 1(4): 269-273. DOI: 10.1101/gr.1.4.269
- [2] Awah-Ndukum J, Kudi AC, Bradley G, et al. Molecular genotyping of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle tissues in the North West Region of Cameroon[J]. Trop Anim Health Prod, 2013, 45(3): 829-836. DOI: 10.1007/s11250-012-0295-x
- [3] Mekibeb A, Fulasa TT, Firdessa R, et al. Prevalence study on bovine tuberculosis and molecular characterization of its causative agents in cattle slaughtered at Addis Ababa municipal abattoir, Central Ethiopia[J]. Trop Anim Health Prod, 2013, 45(3): 763-769. DOI: 10.1007/s11250-012-0287-x
- [4] Adesokan HK, Jenkins AO, van Soolingen D, et al. *Mycobacterium bovis* infection in livestock workers in Ibadan, Nigeria: evidence of occupational exposure[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2012, 16(10): 1388-1392. DOI: 10.5588/ijtd.12.0109
- [5] Rodriguez-Campos S, Gonzalez S, de Juan L, et al. A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis [J]. Infect Genet Evol, 2012, 12(4): 877-882. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.10.008
- [6] Chambers MA, Lyashchenko KP, Greenwald R, et al. Evaluation of a rapid serological test for the determination of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) found dead[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(3): 408-411. DOI: 10.1128/CVI.00424-09
- [7] Zhang XY, Hu XD, Yang JW. Application of interferon-Y testing and the comparative cervical skin test in herds infected with *Mycobacterium bovis*[J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(1): 53-56. (in Chinese)
- 张喜悦, 呼西旦, 杨经纬, 等. 干扰素试验及比较皮试在结核污染牛群的应用研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26 (1): 53-56.
- [8] Judith K, Leo S, Arend K, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(4): 9077.
- [9] Ian B. The story of bovine TB -- The attack of the clones[EB/OL]. (2014-04-03) [2014-04-15] <http://tacklingbovinetb.tumblr.com/post/47025052679/the-story-of-bovine-tb-the-attack-of-the-clones>.
- [10] McLernon J, Costello E, Flynn O, et al. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48 (12): 4541-4545. DOI: 10.1128/JCM.01175-10
- [11] Zum MJ, Arriaga C, Barandiaran S, et al. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries[J]. Res Vet Sci, 2013, 94 (1): 9-21. DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.07.012
- [12] Ojo O, Sheehan S, Corcoran GD, et al. *Mycobacterium bovis* strains causing smear-positive human tuberculosis, Southwest Ireland[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(12): 1931-1934. DOI: 10.3201/eid1412.071135
- [13] Rodwel TC, Kapasi AJ, Moore M, et al. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14: 129-135. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.11.037
- [14] Veterinary Laboratory Agency. Specificity Trial of the BOVIG-AM IFN-Gamma Test in GB Cattle[EB/OL]. (2013-03-01) [2014-04-05] http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb/documents/gifn_specificityreport.pdf.

收稿日期:2014-02-14;修回日期:2014-10-20

(上接第 333 页)

- [2] Violari A, Cotton MF, Gibb DM, et al. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV infected infants[J]. N Engl J Med, 2008, 359 (21): 2233-2244. DOI: 10.1056/NEJMoa0800971
- [3] Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2): 247-277. DOI: 10.1128/CMR.15.2.247-277.2002
- [4] Ma Y, Zhang F, Li H, et al. Monitoring HIV drug resistance using early warning indicators in china: results from a pilot survey conducted in 2008[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(S4): S300-S302. DOI: 10.1093/cid/cir1018
- [5] Jiao L, Li H, Li L, et al. Impact of novel resistance profiles in HIV-1 reverse transcriptase on phenotypic resistance to NVP
- [J]. AIDS Res treat, 2012, 2012(2): 1-8. DOI: 10.1155/2012/637263
- [6] Yan PP, Xie MR, Wu SL, et al. Evaluation of the effectiveness of anti-retroviral therapy on AIDS patients in Fujian province and the current status of their drug resistance pattern[J]. Chin J Zoonoses, 2008, 24(10): 896-900. (in Chinese)
- 颜萍萍, 谢美榕, 吴守丽, 等. 福建省艾滋病患者抗病毒疗效和耐药性检测分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 896-900.
- [7] Tam LW, Hogg RS, Yip B, et al. Performance of a World Health Organization first-line regimen (stavudine/lamivudine) in anti-retroviral-naïve individuals in a Western setting[J]. HIV Med, 2007, 8(5): 267-270.

收稿日期:2014-07-17;修回日期:2014-10-29