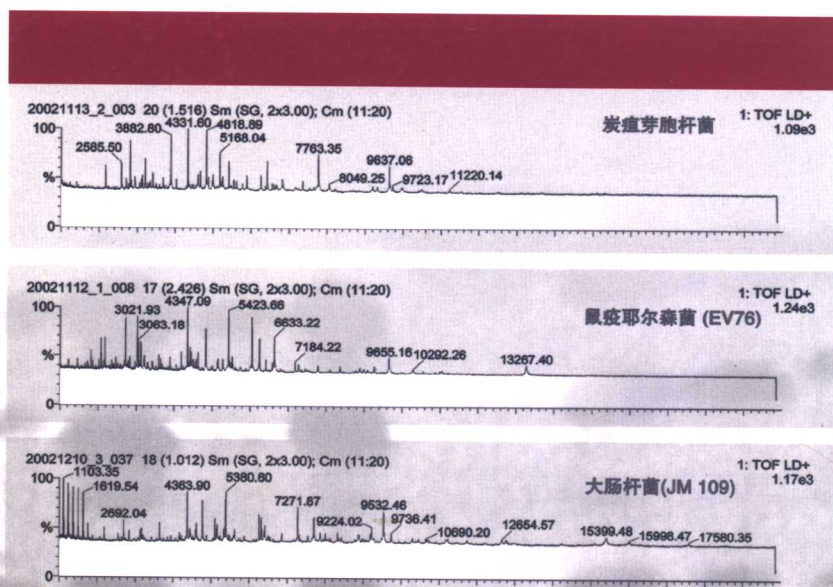


杨瑞馥 宋亚军 主编 黄培堂 主审

# 微生物法医学： 理论与技术



Chemical Industry Press



化学工业出版社  
现代生物技术与医药科技出版中心

# 微生物法医学：理论与技术

杨瑞馥 宋亚军 主编  
黄培堂 主审



化学工业出版社  
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

**图书在版编目 (CIP) 数据**

微生物法医学: 理论与技术/杨瑞馥, 宋亚军主编.

—北京: 化学工业出版社, 2004. 10

ISBN 7-5025-6173-0

I. 微… II. ①杨…②宋… III. 微生物技术-应用-  
法医学 IV. ①D919 ②Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 101864 号

---

**微生物法医学: 理论与技术**

杨瑞馥 宋亚军 主编

黄培堂 主审

责任编辑: 周 旭

文字编辑: 何 芳

责任校对: 凌亚男

封面设计: 关 飞

\*

化 学 工 业 出 版 社  
现代生物技术与医药科技出版中心 出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

\*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 23½ 字数 574 千字

2005 年 1 月第 1 版 2005 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6173-0/Q·119

定 价: 55.00 元

---

**版权所有 违者必究**

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

# 序 言

以 DNA 双螺旋结构的发现为标志,半个世纪以来,生命科学和生物技术的发展突飞猛进,成为发展最迅速、前景最诱人、最有可能取得重大突破的领域之一。因此,有人预言,21 世纪将是生命科学与生物技术的世纪。生命科学与生物技术的迅速发展是一把双刃剑,既可造福人类,也可能危害人类。2001 年发生在美国的炭疽芽孢白色粉末事件震惊了世界,一度造成了恐慌,凸显了生物犯罪和生物恐怖危害的严重性,凸显了生命科学与生物技术的另一面。几乎与此同时微生物法医学也应运而生。

微生物法医学的根本任务是对各种生物恐怖伤害事件做出具有法律效力的生物学检验与鉴定(是故意,还是无意?)从技术层面看,微生物法医学不仅涉及微生物学理论、技术和方法,而且还涉及基因组学、蛋白质组学、生物信息学等学科的理论、技术与方法;从法律层面看,不仅涉及国内法,而且还涉及国际法;既是一门实践性、操作性很强的学科,又是一门发展中的新兴交叉学科;既具有很强的专业性和学术性,又具有很强的政策性。

杨瑞馥研究员在从事微生物学研究的长期实践中,以极大的热情密切关注、积极跟踪微生物法医学的发展动向,集成国内外相关研究的进展,与编写组全体同志倾心编著了这部《微生物法医学:理论与技术》,相信本书的出版发行必将对国内同道提供有益的帮助和启发,也必将进一步推动微生物法医学的发展和进步。

微生物法医学犹如一个刚刚诞生的婴儿,难免有些幼稚——也正是因为其幼稚,更加需要特别的关爱和扶持。期望本书的出版能给社会各界提供有益的帮助,也期望微生物法医学能够得到社会各界更多的关爱和扶持,使之日益走向成熟。

军事医学科学院 院长



2004 年 7 月 6 日

# 前 言

生物恐怖主义的现实性及其危害的有增无减催生了微生物法医学。微生物法医学作为一个学科是在 2001 年美国发生炭疽芽孢恐怖事件后提出的, 并得到迅速发展, 主要宗旨是区分近缘菌毒株, 以追踪病原体的来源。虽然她是适应形势需要而诞生的一个崭新学科, 但其应用技术的相对成熟和生物法医学发展的经验都为本学科的顺利发展奠定了坚实的基础。

面对这样一个崭新的学科, 我们之所以能够撰写此专著, 主要是反生物恐怖斗争紧迫的需要和我们肩负的责任使命感, 以及我们过去在微生物学、防生物危害医学和分子流行病学工作以及核酸分析技术与化学分析技术研究经验的基础上, 加之对国内外大量文献的积累, 才使得本书顺利成稿; 在化学工业出版社的大力支持下得以这样快速地与读者见面。

本书共分十二章, 前三章为微生物法医学的基础, 介绍了微生物法医学的概念、发展及其与其他相关学科的关系、微生物法医学高通量实验室的建立及技术支撑体系。第四章至第十二章为微生物法医学发展必需的具体技术, 包括表型分析技术、核酸指纹分析技术、化学分析技术、生物芯片分析技术、基因组分析技术、蛋白质组分析技术、生物信息学分析技术、介质特性分析技术和稳定同位素分析技术。纵观全书, 既包括微生物法医学发展的理论, 也包括支撑该学科发展的主要技术体系, 理论与实践紧密结合。

在本书的编写过程中, 得到黄培堂研究员的大力支持, 并欣然主审全书; 还得到武汉大学陶天申教授、中国疾病预防控制中心徐建国研究员和军事医学科学院微生物流行病学研究所杜新安所长以及王津、郭兆彪、王宏霞等同志的大力支持, 在此一并表示衷心感谢。特别需要感谢的是我的妻子和女儿, 她们在生活和工作上给予我极大的关心和支持, 使我能够安心加班工作, 她们为本书顺利成稿做出了极大的付出。

值得说明的是, 细菌名称中以人名命名的拉丁名翻译时按照出版要求, 译文在两个汉字以上的名称中去掉了“氏”, 如“鼠疫耶尔森氏菌”中的“氏”就省略了, 写为“鼠疫耶尔森菌”。

我们希望, 在生物恐怖主义和新发传染病威胁发出严峻挑战的今天, 该书的出版能有助于我国该领域的研究和成果的应用, 并得到传染病预防工作者、微生物科研工作者、临床医生、反生物恐怖研究者和管理者以及相关法律工作者的欢迎。

杨瑞馥

2004 年 5 月 3 日

# 目 录

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| <b>第一章 微生物法医学</b> .....            | 1  |
| 第一节 微生物法医学的发展.....                 | 1  |
| 第二节 微生物法医学的任务.....                 | 3  |
| 一、证据调查.....                        | 3  |
| 二、生物犯罪中微生物的检验与鉴定.....              | 3  |
| 三、追踪微生物的来源.....                    | 6  |
| 四、调查研究.....                        | 7  |
| 五、教育培训与通讯.....                     | 7  |
| 第三节 微生物法医学的未来发展.....               | 7  |
| 一、质量保证 (QA) 与质量控制 (QC) 标准的发展.....  | 7  |
| 二、微生物基础数据库的标准设计与建立.....            | 7  |
| 三、高水平检验鉴定队伍的培养与组织指挥体系的建立.....      | 8  |
| 四、重点科研领域的支持.....                   | 8  |
| 参考文献.....                          | 8  |
| <b>第二章 高通量实验室的建立</b> .....         | 9  |
| 第一节 高通量实验室硬件建设.....                | 9  |
| 一、高通量实验室的特点 .....                  | 10 |
| 二、高通量实验室的工作内容 .....                | 10 |
| 三、高通量实验室的设施与装备 .....               | 11 |
| 第二节 高通量实验室的软件建设 .....              | 14 |
| 一、实验室认可 .....                      | 14 |
| 二、实验室信息管理系统 .....                  | 16 |
| 第三节 高通量实验室的质量保证 .....              | 17 |
| 参考文献 .....                         | 18 |
| <b>第三章 微生物法医学技术支撑</b> .....        | 19 |
| 第一节 证据调查 .....                     | 19 |
| 一、行之有效的预案的建立 .....                 | 19 |
| 二、第一反应者任务的落实与持续培训 .....            | 20 |
| 三、及时的采样与标本的正确运输 .....              | 20 |
| 四、证据调查要及时、记录要完整 .....              | 21 |
| 五、建立各交叉学科间的持久交流与培训计划 .....         | 21 |
| 六、成立一个永久的微生物专家组，为法律的实施开展咨询工作 ..... | 21 |
| 七、发展标准的操作程序，避免样品的意外损毁 .....        | 21 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 第二节 计算机网络和基础数据库建设 .....     | 22 |
| 一、计算机网络建设 .....             | 22 |
| 二、基础数据库建设 .....             | 23 |
| 第三节 微生物的鉴定与溯源技术体系 .....     | 24 |
| 一、检验、鉴定程序与技术体系 .....        | 24 |
| 二、溯源技术体系 .....              | 30 |
| 三、生物犯罪中使用微生物生物工程特性的检测 ..... | 33 |
| 第四节 分型技术的基本要求 .....         | 34 |
| 一、分辨力 .....                 | 34 |
| 二、重复性 .....                 | 34 |
| 三、分型性 .....                 | 34 |
| 四、简便性 .....                 | 34 |
| 参考文献 .....                  | 35 |
| <b>第四章 表型分析技术</b> .....     | 36 |
| 第一节 生物型分析技术 .....           | 36 |
| 一、生化反应 .....                | 36 |
| 二、生理试验 .....                | 37 |
| 三、细菌素 (bactericin) 分型 ..... | 37 |
| 四、生物型报告方法 .....             | 38 |
| 五、优缺点 .....                 | 38 |
| 六、应用 .....                  | 39 |
| 第二节 生化谱分析技术 .....           | 39 |
| 一、原理 .....                  | 39 |
| 二、操作 .....                  | 40 |
| 三、优缺点 .....                 | 43 |
| 四、应用 .....                  | 43 |
| 第三节 表型微点阵技术 .....           | 44 |
| 一、原理 .....                  | 44 |
| 二、操作 .....                  | 45 |
| 三、优缺点 .....                 | 45 |
| 四、表型微点阵的应用 .....            | 47 |
| 第四节 噬菌体分型分析技术 .....         | 48 |
| 一、对细菌进行噬菌体分型的基本要求 .....     | 48 |
| 二、噬菌体的分离、纯化与增殖技术 .....      | 48 |
| 三、噬菌体的效价和裂解谱的测定 .....       | 50 |
| 四、细菌的噬菌体分型方法 .....          | 51 |
| 五、噬菌体分型的优缺点 .....           | 52 |
| 第五节 药物敏感性试验 .....           | 52 |
| 一、耐药性产生的机制 .....            | 53 |
| 二、药物敏感性试验的方法 .....          | 53 |

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| 三、各种微生物的药物敏感性试验 .....          | 57        |
| 四、药物敏感性流行病学 .....              | 59        |
| 第六节 血清学分析技术 .....              | 60        |
| 一、凝集反应 .....                   | 60        |
| 二、血清学分型的应用 .....               | 60        |
| 三、血清学方法的优缺点 .....              | 62        |
| 第七节 LPS 谱分析 .....              | 63        |
| 一、原理 .....                     | 63        |
| 二、操作 .....                     | 63        |
| 三、优缺点 .....                    | 64        |
| 四、应用 .....                     | 64        |
| 第八节 PAGE/免疫印迹分析技术 .....        | 65        |
| 一、蛋白质免疫印迹的基本流程 .....           | 65        |
| 二、蛋白质免疫印迹技术的实验步骤 .....         | 65        |
| 三、免疫印迹技术关键点 .....              | 69        |
| 四、免疫印迹技术优缺点 .....              | 69        |
| 五、PAGE/免疫印迹技术的应用 .....         | 69        |
| 第九节 多位点酶电泳分析技术 .....           | 71        |
| 一、原理 .....                     | 72        |
| 二、方法 .....                     | 72        |
| 三、优缺点 .....                    | 76        |
| 四、应用 .....                     | 76        |
| 参考文献 .....                     | 77        |
| <b>第五章 核酸指纹分析技术 .....</b>      | <b>80</b> |
| 第一节 微生物 DNA 多态性的演化及其分析技术 ..... | 80        |
| 一、微生物基因组 .....                 | 80        |
| 二、微生物基因组的分子进化 .....            | 83        |
| 三、遗传多态性分析技术 .....              | 90        |
| 第二节 质粒指纹图分析技术 .....            | 92        |
| 一、基本原理 .....                   | 92        |
| 二、质粒指纹图分析的基本方法 .....           | 93        |
| 三、质粒指纹图谱技术的优缺点 .....           | 95        |
| 四、质粒指纹图谱技术的应用 .....            | 95        |
| 第三节 核酸探针杂交分型技术 .....           | 98        |
| 一、原理 .....                     | 98        |
| 二、操作步骤 .....                   | 99        |
| 三、优缺点 .....                    | 105       |
| 四、应用 .....                     | 106       |
| 第四节 随机扩增多态性 DNA 分析技术 .....     | 108       |
| 一、原理 .....                     | 109       |



|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 二、方法                      | 110 |
| 三、RAPD 方法的评价              | 114 |
| 四、应用                      | 116 |
| 五、展望                      | 120 |
| 第五节 rep-PCR 分析技术          | 121 |
| 一、简介                      | 121 |
| 二、材料                      | 122 |
| 三、方法                      | 124 |
| 四、注意事项                    | 127 |
| 第六节 限制性核酸片段多态性分析技术 (RFLP) | 128 |
| 一、限制性核酸片段多态性分析基本原理        | 128 |
| 二、限制性核酸片段多态性分析 RFLP 的基本方法 | 128 |
| 三、RFLP 技术的特点              | 131 |
| 四、RFLP 技术的应用              | 131 |
| 五、RFLP 技术的展望              | 132 |
| 六、PCR-RFLP 分析技术           | 133 |
| 第七节 间区寡核苷酸分型分析技术          | 138 |
| 一、原理                      | 138 |
| 二、试验方法                    | 139 |
| 三、优缺点                     | 141 |
| 四、应用                      | 141 |
| 第八节 脉冲场凝胶电泳               | 144 |
| 一、PFGE 的技术原理              | 144 |
| 二、脉冲场凝胶电泳用于细菌分型的原理        | 146 |
| 三、PulseNet 简介             | 149 |
| 四、PFGE 在微生物法医学中的应用        | 152 |
| 五、PFGE 应用展望               | 153 |
| 第九节 AFLP 分析技术             | 154 |
| 一、AFLP 的基本原理              | 154 |
| 二、AFLP 的操作过程              | 155 |
| 三、优缺点                     | 157 |
| 四、应用                      | 158 |
| 第十节 SNP 分析技术              | 159 |
| 一、新 SNP 的鉴定               | 160 |
| 二、SNP 分型技术                | 161 |
| 第十一节 多位点序列分型技术            | 167 |
| 一、原理                      | 167 |
| 二、操作                      | 168 |
| 三、优缺点                     | 169 |
| 四、应用                      | 170 |

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 第十二节 VNTR/MLVA 分析技术 .....            | 172 |
| 一、VNTR/MLVA 的应用原理 .....              | 172 |
| 二、VNTR 的研究方法 .....                   | 174 |
| 三、以 VNTR 为基础的菌株分型研究 .....            | 177 |
| 第十三节 病毒的基因分型及核酸指纹图谱技术在病毒分型中的应用 ..... | 182 |
| 一、病毒的血清型和基因型 .....                   | 182 |
| 二、核酸指纹图分析法及其在病毒基因分型中的应用 .....        | 183 |
| 三、其他病毒基因分型法概述 .....                  | 185 |
| 四、几种重要病毒的基因分型及所采用的基因分型方法 .....       | 191 |
| 参考文献 .....                           | 194 |
| <b>第六章 化学分析技术</b> .....              | 199 |
| 第一节 脂肪酸分析技术 .....                    | 199 |
| 一、原理 .....                           | 199 |
| 二、气相色谱分析方法 .....                     | 200 |
| 三、结果解析 .....                         | 202 |
| 四、应用实例 .....                         | 204 |
| 五、展望 .....                           | 206 |
| 第二节 质谱质量指纹图技术 .....                  | 208 |
| 一、质谱的发展历史 .....                      | 208 |
| 二、原理与方法 .....                        | 209 |
| 三、应用 .....                           | 215 |
| 四、发展与展望 .....                        | 229 |
| 第三节 细菌红外光谱分析技术 .....                 | 231 |
| 一、红外光谱测定原理 .....                     | 231 |
| 二、实验方法 .....                         | 231 |
| 三、分类鉴别方法与应用 .....                    | 232 |
| 参考文献 .....                           | 232 |
| <b>第七章 生物芯片分析技术</b> .....            | 234 |
| 第一节 DNA 芯片技术 .....                   | 234 |
| 一、DNA 芯片(微点阵) .....                  | 234 |
| 二、DNA 芯片技术在微生物法医学上的应用 .....          | 235 |
| 第二节 蛋白质芯片 .....                      | 243 |
| 一、蛋白质芯片的制备 .....                     | 244 |
| 二、蛋白质芯片在微生物法医学中的应用 .....             | 248 |
| 三、其他方面的应用 .....                      | 249 |
| 四、蛋白质芯片检测 SARS 冠状病毒特异性抗体 .....       | 250 |
| 参考文献 .....                           | 251 |
| <b>第八章 基因组学分析</b> .....              | 252 |
| 第一节 细菌基因组概述 .....                    | 252 |
| 一、基因组大小 .....                        | 252 |

|                                                    |     |
|----------------------------------------------------|-----|
| 二、编码密度高                                            | 260 |
| 三、基因组拓扑结构                                          | 260 |
| 四、原噬菌体 (Prophages) 和隐性原噬菌体 (Cryptic Prophages)     | 261 |
| 五、插入序列 (insertion sequence, IS) 和转座子 (transposons) | 261 |
| 六、DNA 链组成的不对称性                                     | 262 |
| 七、基因组重排                                            | 264 |
| 八、原核生物基因组的 (G+C) 含量                                | 264 |
| 第二节 全基因组鸟枪法测序                                      | 265 |
| 一、基因组 DNA 提取                                       | 266 |
| 二、文库构建                                             | 266 |
| 三、大规模培养、质粒提取、测序                                    | 268 |
| 四、序列拼接                                             | 269 |
| 五、完成图的绘制                                           | 269 |
| 六、完成图的验证                                           | 271 |
| 第三节 基因组功能注释及比较基因组学分析                               | 272 |
| 一、碱基组成分析                                           | 272 |
| 二、RNA 基因的预测                                        | 273 |
| 三、重复序列                                             | 273 |
| 四、蛋白编码基因的预测和组功能注释                                  | 274 |
| 五、运用 Artemis 软件人工注释                                | 280 |
| 六、序列发布和递交 (GenBank)                                | 280 |
| 七、比较基因组学分析                                         | 280 |
| 第四节 基因组学在生物恐怖及不明原因突发性疾病中的应用                        | 281 |
| 一、基因组分析在 1999 年美国东北部脑膜炎流行的病原体——西尼罗河病毒研究中的应用        | 282 |
| 二、基因组分析在炭疽生物恐怖中的应用                                 | 282 |
| 三、基因组学分析在 SARS 防治中的应用                              | 283 |
| 四、比较基因组学在鼠疫耶尔森菌的基因组分型和菌源追踪的应用                      | 284 |
| 参考文献                                               | 289 |
| 第九章 蛋白质组学方法的应用                                     | 292 |
| 第一节 蛋白质组简介                                         | 292 |
| 第二节 蛋白质组学研究方法                                      | 293 |
| 第三节 蛋白质组学研究方法在微生物法医学中的应用                           | 307 |
| 参考文献                                               | 310 |
| 第十章 生物信息学分析技术                                      | 311 |
| 第一节 生物信息学简介                                        | 311 |
| 一、生物信息学概念                                          | 311 |
| 二、生物信息学的研究对象                                       | 312 |
| 三、生物信息学的研究目标和任务                                    | 313 |
| 四、生物信息学的研究内容                                       | 314 |

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 第二节 微生物法医学中的生物信息学技术.....        | 318 |
| 一、数据库建设和维护.....                 | 318 |
| 二、序列比较.....                     | 319 |
| 三、系统进化树构建.....                  | 322 |
| 第三节 生物信息学资源.....                | 327 |
| 一、因特网数据库资源.....                 | 327 |
| 二、生物信息学分析软件.....                | 331 |
| 参考文献.....                       | 332 |
| <b>第十一章 微生物介质分析</b> .....       | 333 |
| 第一节 微生物介质的特点与采集.....            | 333 |
| 一、微生物介质的定义.....                 | 333 |
| 二、微生物介质的特点.....                 | 333 |
| 三、微生物介质的采集、包装和运输.....           | 333 |
| 第二节 微生物介质的分析.....               | 335 |
| 一、微生物介质的分析内容及其对微生物法医学调查的意义..... | 335 |
| 二、微生物介质分析手段的要求.....             | 336 |
| 三、微生物介质分析的常用方法.....             | 337 |
| 参考文献.....                       | 340 |
| <b>第十二章 稳定同位素技术</b> .....       | 341 |
| 第一节 稳定同位素技术的原理和基本概念.....        | 341 |
| 一、稳定同位素技术的原理.....               | 341 |
| 二、稳定同位素技术的几个基本概念.....           | 341 |
| 第二节 稳定同位素分析方法.....              | 344 |
| 一、传统的稳定同位素分析方法.....             | 344 |
| 二、自动分析仪器简介.....                 | 344 |
| 第三节 稳定同位素技术的优缺点及应用.....         | 346 |
| 一、稳定同位素技术的优缺点.....              | 346 |
| 二、稳定同位素技术的应用.....               | 347 |
| 三、稳定同位素技术在微生物法医学中的应用探讨.....     | 348 |
| 参考文献.....                       | 349 |
| <b>附录 微生物法医学实验室质量保证指南</b> ..... | 350 |

# 第一章 微生物法医学

法医学是一门运用医学（尸体解剖、临床医学检查和动物实验）、生物学（如分子生物学技术）、化学（如毒物的化学分析）和物理学（如电子显微镜技术）等学科相关技术解决法律上有关医学问题的一门学科。而微生物法医学就是通过微生物表型、免疫学、分子生物学和分析化学等各种分析手段检测相近微生物株间可靠变异，并用来推测特定微生物来源、亲缘关系或传播途径的一门学科，针对生物恐怖袭击与生物犯罪，为追踪犯罪实施者提供科学依据。该学科的发展还有助于微生物的群体结构、物种进化和毒力获得的研究。

法医学是对现有的证据进行比较分析，以便把它和正在调查的事件或犯罪联系起来。法医学的发展过程中有两次巨大的飞跃，分别为根据人类的指纹图进行鉴定和 ABO 血型的发现。近十年来，法医学领域取得了极大的进步，最显著的进步就是将 DNA 指纹图直接应用于人类、植物和动物。这一有力的工具可结合生物信息学，为许多国家提供了犯罪审判的依据，作为一种具高度识别能力的工具可以对生物学证据的来源进行归因和排除。

生物犯罪是指故意使用微生物导致敏感人群、动物和植物疾病或使用微生物毒素导致敏感人群和动物中毒，威胁人类健康，破坏农业与畜牧业发展，引起社会的广泛恐慌或威胁社会安全与安定以达到政治或信仰目的的行为。生物犯罪对法医学鉴定造成生物威胁微生物的来源和犯罪者的能力提出了挑战。传统上，微生物来源的鉴定主要用在流行病学调查中，很少用于生物犯罪的调查。微生物法医学的概念是随着生物恐怖与生物战威胁的增加而提出的，它将成为解决生物犯罪包括生物恐怖问题的核心力量。

## 第一节 微生物法医学的发展

早在 1995 年，时任美国联邦调查局副局长的 Murch 博士就曾经建议生物恐怖事件的调查与解决将在很大程度上依赖于法医学，之所以如此预言，因为生物恐怖没有常规法医学断案所需的基本证据，如肉眼识别的特征、居民及时报告的异常现象、评估与分析用的记录、偶然发现的或有意收集的情报或证据。另外，这种预言还基于当时对生物恐怖威胁现实性的判断，那些拥有生物恐怖剂和生产技术的不法人员将会在合适时机用生物恐怖手段制造恐怖事件。2001 年美国“9.11”事件后的炭疽芽孢邮件恐怖事件使这一预言成为现实。这更加促进了微生物法医学的发展。

在法医学研究中，利用分子标识分析微生物已经在一些关键案例中取得了分子证据。例如，在美国佛罗里达州牙医传染给数个患者 HIV 的起诉中，对 HIV 扩增片段序列分析获得了这种传播的证据；对日本奥姆真理教在其办公楼顶气溶胶释放炭疽芽孢杆菌的案例调查中，用可变数目串联重复序列（VNTR）分析证明他们所用的菌株为日本市场上可以获得的动物疫苗株 Sterne 34F2 株；美国 2001 年“9.11”恐怖事件后的炭疽芽孢恐怖所用的菌株经过 TIGR 中心序列测定和单核苷酸多态性（SNP）分析表明，所用炭疽芽孢杆菌为美国军

方拥有的菌株；对 1999 年美国东北部西尼罗河病毒脑炎暴发的调查表明，在纽约从鸟和人分离株的核酸序列与从以色列一只死鹅分离出的毒株非常相似，得出了这一暴发为自然来源的结论。

微生物法医学作为一个学科是在 2001 年美国炭疽芽孢恐怖事件后提出的，并得到迅速发展，主要宗旨是区分近缘菌毒株，以追踪病原体的来源。所用的技术包括表型分析技术、免疫分析技术、核酸分析技术和化学分析技术，这些技术早就用于不同学科的研究与应用领域。在某种程度上，微生物法医学类似于分子流行病学研究的目的，但是它比流行病学包含的内容更加广泛，不仅注重菌毒株本身的区别，更重要的是将菌毒株与犯罪分子联系起来，获得法庭上更有力的证据。对基因分型而言，有时没有必要培养出微生物，由皮克级 DNA 随机或特定基因组扩增可促进微量单细胞操作的微生物法医学分析和临床标本的直接分析。

微生物法医学是在微生物学、微生物遗传学、微生物基因组学、微生物进化与系统发生学、分析化学、免疫学、流行病学、计算机科学与生物信息学等学科基础上，随着反生物恐怖与反生物战的需要而发展起来的，并汲取了人类 DNA 法医学和法医信息学的经验。在微生物鉴定方面它与微生物学是一致的，技术上也是通用的；微生物遗传学与基因组学的发展，使我们对生物恐怖剂遗传基础与代谢调控机制认识更加深入，在此基础上，我们可以发展更精细的分析手段来更准确地区分不同菌毒株；我们不能孤立地认识微生物本身，而只有将微生物与环境、宿主、媒介等因素结合起来才能正确认识微生物的意义，从而，可以利用系统发生学的理论与技术研究微生物在自然界中的演化，因此，微生物进化与系统发生学的研究对发展区分菌毒株细微差异的技术具有重要的帮助；分析化学技术的进步使得微生物本身所有成分都能用于其鉴定与菌毒株的区分，为寻找微生物特异生物标志物奠定了重要基础；免疫学的不断发展促进了微生物法医学分析技术的进步；计算机与生物信息学的结合使我们能够研制微生物的基础指纹数据库，用于微生物法医学的分析，而其分析手段和思想大多来源于传统流行病学和分子流行病学，流行病学和法医学是相近的学科，二者在生物犯罪调查中目的相同，然而法医学调查要求更严格，采样需要组织严密，避免污染，保持样品中微生物的活性和安全的保管与运送。另外，应用微生物法医学不仅可以详细鉴定造成生物威胁的微生物，而且还要注意那些对于公众防护无关紧要的病原体特点，因为它们可能会提供重要的法医学调查线索。如美国“9.11”恐怖事件后，炭疽芽孢的袭击来源之追踪就是通过芽孢中一种只有美国军方特有的保护剂和核酸序列分析得出恐怖来源于美国国内的结论。

生物恐怖与生物战问题由来已久，可以追溯到 14 世纪的第二次鼠疫大流行，18 世纪俄亥俄河谷的土著美洲部落天花流行，第一次和第二次世界大战期间德国、日本、美国等军队制造的生物战事件，1979 年前苏联一个军事微生物研究所炭疽芽孢的意外泄漏事件，伊拉克的生物武器计划以及系列的恐怖组织制造的生物恐怖事件 [1984 年美国潜水艇艇员的肉毒毒素中毒事件、日本奥姆真理教的生物恐怖活动、拉金尼什教派 (Rajneeshees) 教徒在美国俄勒冈州的一家餐馆制造了用鼠伤寒沙门菌故意污染色拉的事件、美国得克萨斯州医疗中心实验室工作人员痢疾杆菌感染事件等]。美国“9.11”恐怖事件后，炭疽芽孢恐怖首先在美国成为现实，炭疽恐慌在世界各地蔓延（陆续发生炭疽菌疑案的国家包括加拿大、法国、德国、英国、瑞典、奥地利、波兰、日本、墨西哥、以色列和新西兰等）。在生物恐怖的事实面前，我们不禁提出造成生物恐怖的炭疽芽孢是同一来源吗？这些菌株来自何处？这些含芽孢的信件是同一个人寄出的吗？寄信人是谁？这些恐怖是国内的恐怖还是国际的恐怖？这就涉及一些法律学的问题，要求我们按照法律需求鉴定和区分这些炭疽芽孢杆菌分离

株，为回答上述问题提供科学依据。

生物犯罪不仅严重冲击着政治经济的稳定，也将长时间影响农业和食物供给，危害人类的健康，因此必须根据法律以及公共卫生和农业之间的关系，制定长期计划，利用微生物法医学提供的快速准确的生物恐怖情报，加大对可能的生物恐怖事件的调查力度，从而更好地完成预测，做出反应，有效地预防和阻止犯罪。

由此可见，微生物法医学的发展不是孤立的，它有着雄厚的学科基础与现实需求。

微生物法医学已经成为一门新学科，发展迅速，体现了一个国家的综合国力，诸如在法律执行、情报、防御、公共卫生、农业、政策方针、外交、防扩散和反恐怖等方面，应用已确证的科学和技术为国家服务，并为许多国家间（可能国际间）的交流提供了基础。

微生物法医学的研究应同微生物功能基因组、生态学和分类学日益丰硕的研究成果紧密相连，而且需要了解微生物的背景知识，有效地监测环境中生物恐怖病原体，才能在公共卫生中和紧急情况下发挥重要作用。

## 第二节 微生物法医学的任务

在生物犯罪中，微生物法医学的任务集中体现为证据调查，鉴定生物威胁微生物，并追踪其来源，最后确定生物犯罪的实施者。同时对各层次的人员包括政府官员、科学家、公众等进行微生物法医学相关的教育和培训，使生物犯罪的调查接近标准化和程序化，更加快速有效地解决生物犯罪问题。

### 一、证据调查

生物犯罪一般不会立即客观的表现出来，因此需要将常规诊断、流行病学调查和犯罪调查三者联系起来。在可疑生物犯罪现场搜集证据对于快速的侦检和防护至关重要。证据调查需要遵循的原则详见第三章第一节。

### 二、生物犯罪中微生物的检验与鉴定

完成生物威胁性微生物的鉴定需要多方面的技术方法和仪器，如核酸分析、蛋白质分析、质谱和生物芯片技术等。采集的样品可以现场分析，也可以运送到有关实验室进行分析。在生物犯罪中，生物威胁微生物经分析鉴定后还要由专家组进行严格的调查研究，才能做出最终的结论。

由于许多生物恐怖病原导致的疾病都有潜伏期，当通过临床症状判断受到攻击时，往往是生物恐怖病原的危害已经相当严重，因此通过对一些可疑材料进行生物恐怖病原的检验，可以赢得时间，减小损失。

生物恐怖病原的检验需要相应质量可靠、性能稳定的多种试剂和器材，由训练有素的专业人员完成。在遭到生物攻击后，早一分钟得到确切的结果，就可能挽救众多的生命。因此平时应该加强方法研究和演练，并保证物资、技术和人力的储备。

生物恐怖病原种类繁多，检验不同的生物恐怖病原所需的手段和时间也不相同，需要不同层次、不同等级的检验实验室来完成。一般基层检验室负责初步检验，以及按要求采集合适的标本，供中心实验室检验；中心实验室则负责对基层实验室进行技术指导和物资供应，并对标本进行确证性检验和鉴定。

生物恐怖病原的检验和鉴定是政治性很强的工作，如果发生漏报，可能会造成无法弥补的损失；如果误报，可能会造成不必要的恐慌，甚至引发国际争端。为慎重起见，生物恐怖病原检验和鉴定应该遵循如下基本原则。

① 制定全面完善的检验程序，并严格执行；在操作过程中，应注意进行防护，避免实验室感染；在实验中，应使用成套的和有质量控制的试剂。

② 要特别注意检查患者标本和可疑为生物恐怖病原的投放物和媒介物，这类标本最易获得阳性结果，有助于做出确证性判断。

③ 实验中应使用生物恐怖病原的敏感动物，这可以在排除非致病菌干扰的同时起到选择性增菌作用；在可能的情况下，应根据科赫原则证明病原，以免漏检表型变异的生物恐怖病原。

检验和鉴定是两个相关而有区别的概念。在未获得生物恐怖病原纯种之前，通过形态学、血清学、生物学和遗传学等特征快速地从标本中确定生物恐怖病原存在与否，是一种初步检验，这种检验可以对某些恐怖病原做出种的判断，但不能揭示毒力强弱、药物敏感性、抗原结构等重要信息。在经分离培养或细胞传代等方法获得纯种后，可以对其进行一些表型指征和遗传指征等的鉴定，进一步明确其分类地位、药物敏感性和毒力等特征，为免疫预防以及治疗提供依据。

#### 1. 生物恐怖病原体

生物恐怖病原体包括对人类、动物、植物或环境和物质（如食物和水等）来源等有潜在威胁的病原。到目前为止，至少 20 种传染性病原体可被用于生物恐怖。可能的生物恐怖病原体的列表应根据微生物的病原学特性、可操作性、可保护性（例如疫苗或有效的治疗）、可接近性、武器化的潜能和具威胁性的情报或证据制定。列表应不断地发展、更新，有统一的标准和先后次序。这些列表是决定法医学首先追踪何种生物恐怖病原体的基础，也是发展和确证技术和方法、建立研究和储存库中的生物恐怖病原体的次序、发展法医学数据库和情报学的必备条件。

尽管任何致病微生物或生物毒素都可以用于生物恐怖，但是最可能应用的是那些毒力确定、能引起高发病率与高致死率，并可能发生人-人间传播的病原。符合这一标准的病原很多，但生物恐怖病原也应该具有生物战的某些特定性质，因此，符合下列标准的微生物及毒素才最有可能用于生物恐怖：

① 必须能够“武器化”，即生物剂必须经过包装与释放，释放时对生物剂本身影响极小，但能影响和污染广大的地区；

② 感染剂量低或毒性高；

③ 潜伏期短，发病率高；

④ 在平民中具有高度传染性；

⑤ 能通过不同途径，尤其是通过呼吸道途径感染或中毒；

⑥ 引起失能或死亡的程度高；

⑦ 缺乏有效的预防（如免疫血清、疫苗、抗生素）和治疗措施；

⑧ 在环境中稳定性高；

⑨（在早期）难以检测或鉴定；

⑩ 易于生产和运输。

生物恐怖病原主要依据其释放后能否产生大规模危害来确定的，美国疾病预防控制中心



(CDC) 按照生物恐怖病原的致病性分成三类。

(1) A类 致病性强, 播撒后可导致国家安全隐患的病原。这些病原具有如下特征: ①容易播撒, 可导致人与人之间的传播; ②致死率高, 并对卫生系统造成严重影响; ③可导致社会动荡; ④需要医疗卫生系统的特殊准备才能应付。

这些病原包括: 天花病毒、炭疽芽孢杆菌、鼠疫耶尔森菌、肉毒毒素、土拉弗朗西斯菌、埃博拉病毒、马尔堡病毒、拉沙病毒、胡宁病毒等出血热病毒。

(2) B类 致病性比甲类病原弱, 这些病原具有如下特征: ①相对容易播撒; ②发病率中等, 致死率不高; ③需要专业实验室检测与诊断。

这些病原包括: 贝氏柯克斯体、布氏杆菌、类鼻疽伯克霍尔德菌、委内瑞拉马脑炎病毒、东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒、蓖麻毒素、产气荚膜梭菌  $\epsilon$  毒素、金黄色葡萄球菌肠毒素 B。

下面这些病原是水源或食源性肠道传染病病原体, 也可以用于生物恐怖, 但不如上述病原危害大: 沙门菌、痢疾志贺菌、大肠杆菌 O157 : H7、霍乱弧菌、微小隐孢子菌 (*Cryptosporidium parvum*)。

(3) C类 该类病原包括新出现的病原, 这些病原可通过生物工程改构后用于大规模释放。这些病原具有如下特点: ①来源方便; ②容易生产与播撒; ③具有潜在的高致病性与致死率; ④对人类健康影响较大。

这些病原包括: 立百(尼帕)病毒、汉坦病毒、蜱传出血热病毒、蜱传脑炎病毒、黄热病毒、多重耐药结核分枝杆菌。

## 2. 国家计算机网络的建立

建立国家计算机网络追踪人类、动物、植物、食物和水受到污染发生的疾病和不常见的症状, 及时发现传染病的暴发, 在可能的生物袭击早期提出警告, 而不是在有大量可疑症状的患者出现后再报告。如美国建立的食源性病原监测系统 PulseNet 和异常与正常症状报告系统 Promed 在这方面做出了典范。

实际上, 如果分散的病例没有经过网络系统联系在一起, 往往无法发现生物袭击。生物袭击发生后, 应采用多种方法(包括基因组测序分析、生理学分析和化学分析等)鉴定微生物, 分析其特性和追踪来源。除病原外, 污染的芽孢或花粉、培养基成分和样品中的水等也都是鉴定信息的来源。重组技术可使病原致病性增强, 也可能用于生物犯罪, 因此对每一个病例都应进行必要的检验。将以上分析得到的数据和结果进行计算机处理和网络情报分析, 可提供生物犯罪中可能使用了何种微生物的线索。

## 3. 基础数据库的建立

建立基于核苷酸、DNA/RNA 图谱、蛋白质组、脂肪酸和其他表型特征的病原数据库。DNA 数据库应涵盖生物恐怖病原体的所有可获得的生物学和遗传学数据, 具有发展比目前鉴定能力更高的技术平台。数据库必需储存许多微生物和分离物的完整基因组序列数据, 并能快速搜索, 以比较相互之间的全基因组序列, 或比较其他数据如蛋白质组和系统发生学数据。

建立政府、学术界、临床实验室和私人机构的用户注册数据库。该数据库应包含用户的个人信息、信任程度、具有的仪器设备、保存的生物恐怖病原体种类、接近生物恐怖病原体的人员和应用现有技术鉴定微生物的必要数据。

建立与地域性相关的生物威胁微生物的数据库。