

云南省不同环境鼠形动物巴尔通体感染情况的研究

栗冬梅 俞东征 刘起勇 龚正达

【摘要】 目的 了解云南省不同地区、环境和气候条件下鼠形动物巴尔通体感染状况。方法 对 2003 年 6~7 月在云南省 3 种不同气候类型共 5 个县、市不同生境中捕获的鼠形动物采集股动脉血,用含 5% 去纤维兔血脑心浸液琼脂培养基置于 35℃ 含 5% CO₂ 培养箱中分离培养巴尔通体,疑似菌落用巴尔通体属特异性引物进行聚合酶链反应(PCR)扩增特异基因片段,电泳图中出现目标带即判断为阳性菌株。**结果** 捕获鼠形动物 278 只,接种鼠血标本 176 份,共检获巴尔通体疑似菌株 79 份,经 PCR 证实 69 份为巴尔通体。6 种被检动物中有 4 种动物检出巴尔通体,感染鼠分属于家鼠属、绒鼠属、小鼠属。总检动物巴尔通体分离率为 39.2%;其中以黄胸鼠分离率最高为 42.0%。除大理市外,剑川、祥云、云龙和云县等县捕获的鼠类标本均分离到巴尔通体,鼠类生境涉及室内、庭院、溪场灌木丛、山地灌木丛,跨越暖温带季风气候、北亚热带季风气候、南亚热带河谷少雨气候三种气候类型。**结论** 研究再次证实云南鼠类宿主,特别是与人类关系密切的家栖鼠类巴尔通体感染率较高;巴尔通体在多种鼠类、不同地区、不同气候环境中均有分布,呈现出对不同地理和气候环境具有广泛适应性及宿主多样性特征。

【关键词】 巴尔通体;鼠形动物;感染率

Study on the prevalence of *Bartonella* species in rodent hosts from different environmental areas in Yunnan
LI Dong-mei*, YU Dong-zheng, LIU Qi-yong, Gong Zheng-da. *Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: LIU Qi-yong, Email: Liuqiuyong@icdc.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate *Bartonella* infections in small mammalian reservoir hosts from different environments and types of climate in Yunnan. **Methods** Femoral blood samples were collected from the anesthetic captured animals from five counties including three types of climate. All isolates were grown on brain and heart infusion agar plates containing 5% defibrinated rabbit blood. The agar plates were incubated at 35℃ in a humidified with 5% CO₂ environment for at least 4 weeks. *Bartonella*-like isolates were confirmed by the polymerase chain reaction and visualizing the target gene fragment by gel electrophoresis. **Results** *Bartonella* species were isolated from 69 of 176 small animals including 4 species of 3 genera from 4 counties and the total prevalence in rodents was 39.2%. The maximal prevalence was 42.0% of *Rattus tanezumi flavipectus* usually inhabiting indoors and courtyard and contacting closely to human. Moreover, *Bartonella* isolates were obtained from *Rattus norvegicus*, *Eothenomys miletus* and *Mus pahari*. Life environments of captured animals involved indoors, courtyard, brush and forest in mountain. **Conclusion** The finding in this study suggested the characteristic of diversity of *Bartonella* infections in rodent hosts in southern China included *Bartonella* species parasiting in a wide range of animal hosts in different environments as well as climate types. Further investigations were needed in different areas in China to confirm more mammalian reservoir hosts with *Bartonella* infections.

【Key words】 *Bartonella*; Rodent hosts; Prevalence

云南省为山地高原地形,属于热带、亚热带高原季风气候,但由于海拔高和地形复杂,存在着寒带、

温带和热带(包括亚热带)三种气候类型。鼠形动物是多种人兽共患病的重要宿主;近年来白瑛等^[1]首次报道了从云南部分地区鼠体中分离到巴尔通体并认为这种微生物在鼠群中高度流行。为进一步了解该省不同地区、不同环境中鼠形动物巴尔通体的感染状况,我们于 2003 年 6~7 月以云南省西部三种

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371246)

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(栗冬梅、俞东征、刘起勇);云南省地方病防治所(龚正达)

通讯作者:刘起勇,Email:Liuqiuyong@icdc.com.cn

不同气候类型地区作为样区,对当地室内、庭院、农田和山地灌木丛等环境内的鼠形动物巴尔通体感染情况进行了调查。

材料与方 法

1. 鼠形动物标本采集: 2003 年 6~7 月间,在云南省西部海拔 1100~2200 m 属温带季风气候的云龙、剑川县,南亚热带河谷少雨气候的云县和北亚热带季风气候的大理市和祥云县,对当地室内、庭院、农田和山地灌木丛采用笼捕及夹捕法捕获鼠形动物共 278 只(表 1)。其中,啮齿类动物有 4 属 6 种,分别是黄胸鼠、褐家鼠、斯氏家鼠、齐氏姬鼠、大绒鼠和锡金小鼠;食虫类动物有 2 属 2 种,为树鼩和灰麝鼩。进行分类鉴定后,分别装入鼠袋中用乙醚麻醉后在无菌条件下经股动脉采集血液并置于含 EDTA-Na₂ 冷冻管中保存于液氮或 -20℃ 冰箱中。

表 1 云南省 5 县、市鼠形动物的捕获只数

鼠种	剑川县	云龙县	大理市	祥云县	云县	合计
大绒鼠	33	3	0	0	0	36
齐氏姬鼠	21	4	0	0	0	25
斯氏家鼠	0	4	0	0	0	4
锡金小鼠	0	9	0	0	0	9
黄胸鼠	2	19	12	3	118	154
褐家鼠	11	12	0	21	0	44
树鼩	0	4	0	0	0	4
灰麝鼩	0	2	0	0	0	2
合计	67	57	12	24	118	278

2. 巴尔通体的分离培养:

(1) 培养基的制备: 配制 1.4% 脑心浸液(BHI)琼脂培养基,高压灭菌;无菌操作采集兔心血,置于含玻璃珠的三角烧瓶中,经振摇去掉血纤维蛋白;待培养基冷却至 45~50℃,加入去纤维兔血,使终浓度为 5%;倒平板后将培养基置于 37℃ 普通培养箱中,24 h 后观察,将有污染的培养基弃之。

(2) 接种与保存: 将被检鼠血标本用灭菌 BHI 按 1:4 稀释,接种于含 5% 兔血的 BHI 琼脂培养基上,置含 5% CO₂ 培养箱中,潮湿环境中 35℃ 培养最长达 30 天,对疑似巴尔通体菌落进行 2~4 次纯分后,收集纯菌培养物于 BHI(含 50% 甘油)中,保存于 -70℃。

(3) 培养物检测: ① 菌落观察: 在初次分离培养后常需 2~5 周才能长出白色、干燥、陷入琼脂内的小菌落(*B. henselae* 菌落有时呈菜花状),传代后生长加快,培养 3~4 天可见菌落形成,多为光滑、黏稠状、圆形凸起、光滑或粗糙的微小菌落^[1,2]。参照文

献[1]在最初的培养过程中将每一个接近以上描述的形态的菌落进行聚合酶链反应(PCR)鉴定,以确定疑似菌落。② PCR 的检测鉴定: 挑取疑似菌落收集于含 100 μl TE(pH 8.0)的 1.5 ml 离心管中,振荡混匀,100℃ 煮 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清液即为模板。用引物 BhCS. 781p~BhCS. 1137n 和 TIlc. 455p~TAla. 885n 扩增疑似菌株 DNA(表 2)。其中 1 对引物扩增出目标带,就作为研究对象。

表 2 PCR 反应引物

引物	核苷酸序列(5'-3')	退火温度(℃)	扩增片段大小(bp)
BhCS. 781p ^[3]	5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3'	48	380
BhCS. 1137n ^[3]	5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3'	48	380
TIlc. 455p ^[4]	5'-GCTGTAGCTCAGTTGGTTAG-3'	55	200~500*
TAla. 885n ^[4]	5'-TGCTTGCAAAGCAGGTGCTCT-3'	55	200~500*

* 片段大小在不同巴尔通体菌株间有差异

结 果

1. 巴尔通体分离培养情况: 菌落形态观察: 接种后每 24 h 观察培养基 1 次,最早可在接种后第 3 天(平均 1 周长出菌落)观察到微小的圆形凸起菌落(φ<1.0 mm),呈灰白色、略微透明、边缘光滑或粗糙;菌落数多少不等,在 10~1000 CFU 以上;培养时间延长时可见到菌落中央呈现“空心”,经接种环刮起后可见培养基生长处留下圆形小坑,是巴尔通体菌落向培养基中下陷生长造成这种现象,与文献报道一致^[5]。传代培养后菌落生长较快,且可见较原代培养略大的菌落 φ<1.5 mm。在培养过程中,巴尔通体菌落最早可以出现于接种后第 3 天,早于文献报道的时间,菌落形态(图 1)与文献中描述相一致^[1,2,5]。

2. 鼠类宿主血液标本巴尔通体分离培养结果: 接种 5 县、市所获黄胸鼠、斯氏家鼠、大绒鼠、褐家鼠、锡金小鼠和灰麝鼩的 6 种鼠血标本 176 份,有 79 份检获巴尔通体疑似菌株。

3. PCR 检测鉴定结果: 疑似菌株用引物 BhCS. 781p~BhCS. 1137n 和 TIlc. 455p~TAla. 885n 进行 PCR 扩增,检测呈阳性确定为巴尔通体共有 69 份,其中 BhCS. 781p~BhCS. 1137n 引物阳性结果 67 份,2 份阴性结果的菌株经 TIlc. 455p~TAla. 885n 引物扩增为阳性。6 种被检动物中有 4 种动物查出阳性,鼠种感染率为 66.7%。总检动物巴尔通体分离率为 39.2%;其中检测黄胸鼠 150 只,63 只为阳性,分离率为 42.0%;19 只褐家鼠中 3 只

阳性,分离率为15.8%;大绒鼠检测 2 只均为阳性;被检的 1 只锡金小鼠为阳性结果;斯氏家鼠和灰麝鼯未能检出阳性。除大理市外,剑川、祥云、云龙和云县等县采获的鼠类标本均分离到巴尔通体,各地区不同鼠种带菌情况见表 3。

5 个县、市样区捕获的黄胸鼠、褐家鼠、大绒鼠和锡金小鼠等 4 种家、野鼠种中分离到了巴尔通体,其中锡金小鼠为本研究首次发现的带菌鼠种,总分离率达39.2%,鼠种的感染率为66.7%,在被检动物中斯氏家鼠和灰麝鼯未能检出巴尔通体,可能与样本量较少有关。上述情况说明巴尔通体不仅对鼠类动物有较高的感染率,并对不同地理和气候环境具有广泛适应性及宿主多样性较高的特征,而这种地理分布多样性又是其宿主动物分布决定的^[9]。因此有理由认为,随着国内对巴尔通体的逐步认识和调查研究工作的开展,它在我国的宿主种类、分布地区及范围无疑将会随之增加和扩大。

黄胸鼠为我国南方各省、区广为分布的常见或优势鼠种^[10,11],其繁殖力强,种群数量多而恒定,分布广泛,主要栖居在室内、庭院周围,与人类关系密切,又是南方家鼠鼠疫的主要宿主动物。云南西南部各地区 3 次鼠群巴尔通体感染率的调查结果都显示了黄胸鼠对巴尔通体感染率(分别达41.4%、56.7%和42.0%)很高的特征,这表明黄胸鼠在巴尔通体家栖鼠类宿主中占有很重要的地位。

白瑛等的研究已证实云南省黄胸鼠群中存在致病巴尔通体 *B. elizabethae*,我们的研究发现黄胸鼠中存在另一种具有潜在致病性的巴尔通体,代表菌株为 RT222SM^[4]。*B. elizabethae* 可引起人类心内膜炎合并瓣膜损害,与 RT222SM 菌株基因型相同的巴尔通体可通过猫抓伤引起肺炎。在同一种宿主中存在 2 种致病巴尔通体,进一步说明黄胸鼠是这种病原微生物的重要宿主动物。那么,这些致病巴尔通体是通过哪种媒介和什么途径传染给人类的,鼠类体表常见的寄生虫如蚤类等是否起到生物媒介的作用? 这些问题需要通过对鼠体表的蚤类、蜱或螨等吸血节肢动物进行巴尔通体感染状况的调查及其传播机制等实验研究进一步加以证实和解决。

国外研究还发现巴尔通体和鼠疫杆菌可同时感染鼠蚤^[12],国内还未见相关的报道。目前,云南省西南部地区广泛存在着家鼠鼠疫疫源地,既往和本次的研究均发现当地家、野鼠鼠疫的主要宿主及优势种黄胸鼠和齐氏姬鼠(巴尔通体感染率为62.5%)对巴尔通体的感染率极高,由于这 2 种微生物对宿主的要求都存在共趋性,因此不能排除巴尔通体和鼠疫杆菌共同寄生于同一宿主或媒介体内,并有可能通过媒介生物在自然界动物中传播同时又能传播给人类的可能性。此外,这两种微生物在同一宿主

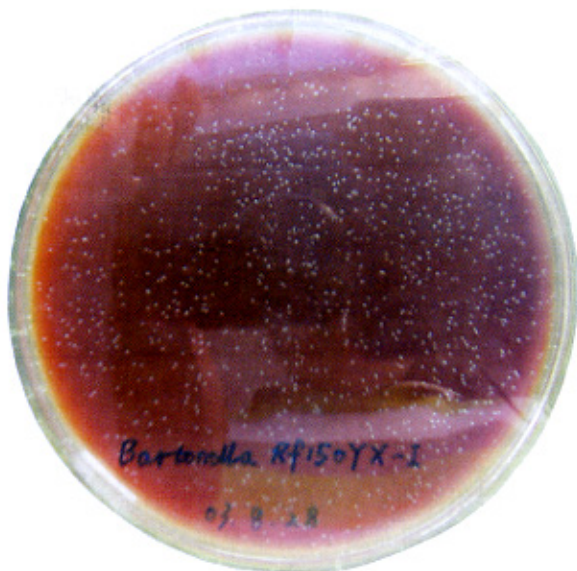


图1 含 5% 兔血 BHI 培养基上巴尔通体菌落 (分离自鼠血)

表3 云南省 5 县、市不同鼠种巴尔通体的感染情况

调查地区	鼠种	生境	接种只数	PCR 阳性只数	分离率 (%)
云县	黄胸鼠	室内	118	56	47.5
祥云县	褐家鼠	庭院	17	2	11.8
	黄胸鼠	庭院	2	0	0.0
剑川县	大绒鼠	溪场灌木丛	1	1	100.0
云龙县	黄胸鼠	庭院	18	7	38.9
	斯氏家鼠	耕地	3	0	0.0
	褐家鼠	庭院	2	1	50.0
	锡金小鼠	山地灌木丛	1	1	100.0
	大绒鼠	山地灌木丛	1	1	100.0
大理市	灰麝鼯	山地灌木丛	1	0	0.0
	黄胸鼠	庭院	12	0	0.0
合计			176	69	39.2

讨 论

国外研究证实巴尔通体的鼠类宿主动物带菌率较高,在英国及美国东南部鼠群带菌率为62.2%和42.2%^[6,7]。国内的白瑛等对云南西南地区分别两次共 8 个县、市的调查中,从所有调查地和捕获的 7 种家、野鼠种都分离到了巴尔通体,总感染率分别为44.3%、27.3%,鼠种的感染率达 100%^[1,8]。本次研究从云南省西南、西北地区 3 种不同气候类型共

体内寄生,他们的共生关系是怎样的、与共同宿主之间相互作用如何,这些生物及生态学问题都值得进一步研究和探讨。

(对云南省地方病防治所、剑川县鼠疫防治所、云龙县和云龙县疾病预防控制中心提供的帮助,一并致谢)

参 考 文 献

- 1 白瑛, Kosoy MY, Maupin GO, 等. 首次证实巴尔通体在我国云南鼠群中流行. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18: 5-9.
- 2 俞树荣, 陈香蕊. 立克次体与立克次体病. 北京: 军事医学科学出版社, 1999. 161.
- 3 Norman AF, Regnery R, Jameson P, et al. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J Clin Microbiol, 1995, 33: 1797-1803.
- 4 栗冬梅, 俞东征, 刘起勇, 等. 用分子生物学技术诊断巴尔通体感染. 中华流行病学杂志, 2004, 25: 602-606.
- 5 Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev, 1997, 10: 203-219.

- 6 Birtles RJ, Harrison TG, Molyneux DH. *Grahamella* in small woodland mammals in the U. K: isolation, prevalence and host specificity. Ann Trop Med Parasitol, 1994, 88: 317-327.
- 7 Kosoy MY, Regnery RL, Tzianabos T, et al. Distribution, diversity and host specificity of *Bartonella* in rodents from the southeastern United States. Am J Trop Med Hyg, 1997, 57: 578-588.
- 8 白瑛, 王国良, 左兵, 等. 从云南滇西南地区鼠群中分离到巴尔通体. 中华流行病学杂志, 2003, 24 增刊: 96-98.
- 9 Houpiqian P, Raoult D. Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? EMS Microbiol Lett, 2001, 200: 1-7.
- 10 王应祥. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全. 北京: 中国林业出版社, 2003. 1-25, 90-198.
- 11 云南省卫生防疫站. 云南医学动物名录. 昆明: 云南科技出版社, 1989. 179-212.
- 12 Stevenson HL, Bai Y, Kosoy MY, et al. Detection of novel *Bartonella* strains and *Yersinia pestis* in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction. J Med Entomol, 2003, 40: 329-337.

(收稿日期: 2004-06-17)

(本文编辑: 尹廉)

· 疾病控制 ·

江苏省赣榆县 1996~2002 年居民自杀死亡流行现状分析

王旭善 吴德林 张晓峰 顾绍升 潘振庆

1. 资料分析与结果: 通过对 1996~1999 年江苏省卫生厅组织的专题回顾性调查资料和 2000~2002 年赣榆县全死因登记报告系统资料进行统计分析, 结果表明: ① 自杀死亡水平: 1996~2002 年赣榆县年均自杀粗死亡率 26.90/10 万 (1952/7 257 257), 1982 年标化率 21.15/10 万, 1990 年标化率 23.96/10 万, 居同期居民伤害死亡首位 (38.70%)。7 年间自杀粗死亡率下降趋势不明显 ($r = -0.62$, $u = 1.95$, $P > 0.05$)。居民自杀累积死亡率 (0~74 岁) 为 2.42%; 自杀死亡共造成 4749 人年的潜在寿命损失 (YPLL, 1~69 岁), 在全死因造成损失中占 12.26%, 平均每一位自杀死亡者造成的 YPLL 是 25.36 人年; 自杀中位死亡年龄为 58.01 岁。去除自杀死因, 目前居民平均期望寿命 (寿命表法) 有望增加 0.92%。② 自杀三间分布: 性别分布: 7 年间男性自杀粗死亡率 23.06/10 万, 女性 31.06/10 万, 差异有显著性 ($\chi^2 = 43.11$, $P < 0.001$); 年龄分布: 15~19 岁保持较低死亡率水平 (5/10 万); 20~59 岁较 15~19 岁死亡率有大幅上升, 但平稳波动于 22/10 万~38/10 万; 60 岁以上以 2~2.4 倍的递增速度上升, 在 80 岁以上年龄段达高峰 (322.80/10 万), 按性别死亡率比不同可划分三类年龄区间, 即 15~39 岁男性较低于女性, 40~59 岁男性较接近女性, 60 岁以上男性较高于女性; 地区分布: 丘陵山区 (10 个乡镇) 死亡率 28.75/10 万 (619/2 152 856), 内陆平原 (11 个乡镇) 死亡率 28.02/10 万 (845/3 015 277), 沿海地区 (8 个乡镇) 死亡率最低, 为 22.45/10 万

(469/2 089 121)。季节分布 (圆形分布法): 6 月前是后是自杀死亡的高峰月份, 平均角 $a = 180.29^\circ$, 雷氏检验 $Z = 6.97$, $P < 0.05$; ③ 死亡方式: 1952 名自杀死亡者中, 50.46% 选择喝农药, 38.17% 选择自缢, 6.81% 选择投河, 其他方式占 4.56%; 喝农药自杀主要在 15~39 岁组、女性及非文盲人群, 分别为 70.93%、57.69% 和 63.28%; 选择自缢主要在 60 岁以上组、男性及文盲人群, 分别为 52.47%、47.07% 和 46.31%。

2. 结论: 1996~2002 年赣榆县居民自杀标化死亡率 (1982 年) 远高于 1990~2000 年全国死因监测系统报告的总人群自杀死亡率 (16.81/10 万)^[1]。平均每位自杀者造成的 YPLL 是 25.36 人年, 远高于我县居民因恶性肿瘤、脑血管病、呼吸系统疾病及心脏病等死亡造成的 YPLL^[2]。不同性别间在各年龄段的自杀死亡率呈现交叉现象, 即 60 岁以前自杀死亡率女性高于男性, 突出表现在 15~39 岁年龄组, 60 岁以后男性高于女性, 正好是死亡率呈快速上升阶段, 自杀死亡集中在 6 月前与农药在这一季节广泛使用有关。

参 考 文 献

- 1 杨功焕, 周灵妮, 黄正京, 等. 中国人群自杀水平的变化趋势和地理分布特点. 中华流行病学杂志, 2004, 25: 280-284.
- 2 王靖元. 赣榆县 1996~2002 年居民主要死因及控制策略. 中国公共卫生管理, 2003, 19: 461.

(收稿日期: 2004-07-01)

(本文编辑: 尹廉)