

3. 讨论:近几年我国人粒细胞无形体病报告病例或疑似病例有明显上升趋势。流行病学调查数据也显示该病在我国农业人群及家畜中普遍流行。蜱是目前发现无形体病的主要传播媒介,除全沟硬蜱外,从森林革蜱、嗜群血蜱、草原革蜱等均扩增出人粒细胞无形体 16S rRNA 基因序列。本次调查检测的森林革蜱是我国中原地区尤其是山西省宁武县的优势蜱种,证实该地区此类蜱的无形体携带率高达 58.3%。16S rRNA 部分序列遗传进化分析结果显示当地无形体主要分为两个基因群,其中以 NW1 为主,占整个检出序列的 97.2%,该群与我国部分地区无形体病例检出序列遗传关系密切。

到目前为止山西省尚未报告无形体病例或疑似病例。本次发现调查地区无形体携带率之高以及对当地群众的潜在危害不容忽视。现场调查还发现,在蜱活动季节里,当地居民在外出劳动、养牧或饲养动物过程中遭受蜱叮咬的案例时有发生,存在感染无形体的风险。此次森林革蜱无形体携带率及基因型的研究也提示,宁武县部分乡镇存在无形体感染和发

病的危险,有必要在当地开展发热病例筛查以及血清学调查。

参 考 文 献

[1] Yaxue Z, Hongtao J, Qiuyue W, et al. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodid ticks in Hebei province, China. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011, 11: 1323-1327.  
 [2] Zhang LJ, Liu Y, Ni DX, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. JAMA, 2008, 300: 2263-2270.  
 [3] Wen B, Jian R, Zhang Y, et al. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. J Clin Microbiol, 2002, 40: 3286-3290.  
 [4] Zivkovic Z, Torina A, Mitra R, et al. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. BMC Immunol, 2010, 11: 7.  
 [5] Lindh JM, Terenius O, Faye I. 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae sensu lato* and *A. funestus* mosquito's reveals new species related to known insect symbionts. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 7217-7223.

(收稿日期:2012-02-14)

(本文编辑:张林东)

黑龙江林区野鼠伯氏疏螺旋体核酸检测与序列分析

左双燕 唐琨 李颖 于季红 张圆 倪雪冰 郑元春 霍秋波 宋玉东 曾小敏

【关键词】 伯氏疏螺旋体; 序列分析

**DNA detection and sequence analysis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in rodents from Helongjiang forest region** ZUO Shuang-yan<sup>1</sup>, TANG Kun<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, YU Ji-hong<sup>3</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, NI Xue-bing<sup>1</sup>, ZHENG Yuan-chun<sup>4</sup>, HUO Qiu-bo<sup>4</sup>, SONG Yu-dong<sup>4</sup>, ZENG Xiao-min<sup>1</sup>. 1 Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China; 2 School of Architecture and Urban Environment, Soochow University; 3 Department of Infection Management and Disease Control, General Hospital of the People's Liberation Army; 4 Forestry Center Hospital, Mudanjiang City, Helongjiang Province

Corresponding author: ZENG Xiao-min, Email: zxiaomin@xysm.net

This work was supported by grants from the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2010CB530201) and National Science Fund for Distinguished Young Scholar of China (No. 30725032).

【Key words】 *Borrelia burgdorferi sensu lato*; Sequence analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.06.025

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2010CB530201);

国家杰出青年基金(30725032)

作者单位:410078 长沙,中南大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(左双燕、唐琨、张圆、倪雪冰、曾小敏);苏州大学城市学院(李颖);解放军总医院感染与控制科(于季红);黑龙江省牡丹江林业中心医院(郑元春、霍秋波、宋玉东)

通信作者:曾小敏, Email: zxiaomin@xysm.net

伯氏疏螺旋体共有 13 个基因种,国内分离到的菌株包括 5 个基因种<sup>[1-3]</sup>,本研究对黑龙江地区啮齿动物中伯氏疏螺旋体进行分子流行病学调查和分析。

1. 材料与方法:

(1) 样本采集、处理及 DNA 提取:2009—2011 年 4—7 月从黑龙江林区采用夹夜法采集野鼠,每样点 100×2 夹次,按 5 m 距离布放鼠夹,晚放晨收。现场鉴定鼠种后,将捕获的鼠放入鼠袋内,乙醚麻醉后,消毒,无菌取脾脏低温保存。采用天根生化科技(北京)有限公司血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取脾脏 DNA, -20 ℃ 贮存备用。

(2) PCR 扩增:采用巢式 PCR 检测伯氏疏螺旋体 5S ~ 23S rRNA 基因间隔保守区,引物序列参照文献[3], DNA 模板提取、PCR 反应体系配制、加样、扩增、电泳均在不同的房间操作,加样与体系配制所用移液器为专用,同时每次实验均设立空白(水)对照。

(3) 测序及序列分析:从 PCR 扩增阳性结果的样本中随机抽取部分样本送公司测序,将测序结果放入 GenBank 中进行同源性比较,选择相关代表性菌株序列,采用 MEGA 5.0 软件构建进化树(Bootstrap=5000)。

(4) 统计学分析:应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。

2. 结果:

(1) 鼠类感染情况:共捕获野鼠 514 只,包括仓鼠、大仓鼠、大林姬鼠、褐家鼠、黑线姬鼠、红背鼯、胸鼯、棕背鼯、东方田鼠、黑线仓鼠、明纹花松鼠,以黑线姬鼠、棕背鼯数量最多,分别占 46.30%(238/514)、18.48%(95/514)。经 PCR 检测, 35 只野鼠检出伯氏疏螺旋体 DNA, 阳性率为 6.81%

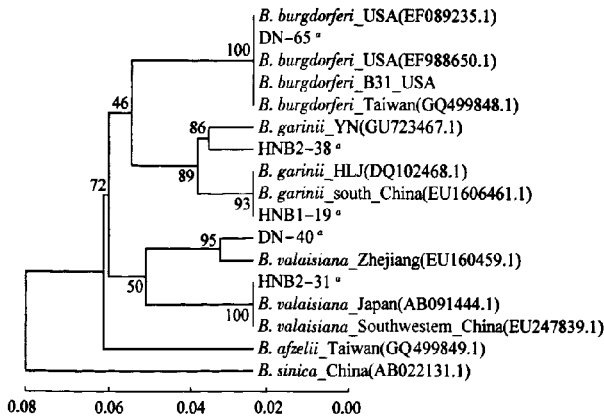
(35/514), 其中黑线姬鼠、棕背䟽阳性率分别为 6.72%、7.37%, 各鼠种间阳性率差异无统计学意义( $P=0.465$ )。野鼠地区分布为牡丹江 314 只、绥芬河郊区 57 只、同江口岸 51 只、东宁边境 92 只, 伯氏疏螺旋体阳性率分别为 6.05%、15.79%、3.92%、5.43%, 不同地区阳性率差异有统计学意义( $P=0.037<0.05$ ), 其中绥芬河地区的阳性率(15.79%)最高(表 1)。

表 1 黑龙江林区鼠伯氏疏螺旋体感染状况

鼠种 <sup>a</sup>	东宁	牡丹江	绥芬河郊区	同江口岸	合计
仓鼠	-	1/21(4.76)	-	-	1/21(4.76)
大仓鼠	1/10(10.00)	0/3	0/1	0/2	1/16(6.25)
大林姬鼠	0/6	0/8	3/21(14.29)	-	3/35(8.57)
褐家鼠	0/14	0/38	1/6(16.67)	-	1/58(1.72)
黑线姬鼠	4/61(6.56)	10/139(7.19)	1/11(9.09)	1/27(3.70)	16/238(6.72)
红背䟽	-	-	1/2(50.00)	1/15(6.67)	2/17(11.76)
胸䟽	-	2/17(11.76)	-	-	2/17(11.76)
棕背䟽	-	5/82(6.10)	2/13(15.38)	-	7/95(7.37)
其他 <sup>b</sup>	0/1	1/6(16.67)	1/3(33.33)	0/7	2/17(11.76)
合计	5/92(5.43%)	19/314(6.05%)	9/57(15.79%)	2/51(3.92%)	35/514(6.81%)

注: 括号内数据为阳性率(%), 括号外数据分母为检测只数, 分子为阳性只数; <sup>a</sup>鼠种间伯氏疏螺旋体感染率比较采用 Fisher 确切概率法,  $P=0.465$ ; <sup>b</sup>包括东方田鼠 4 只、明纹花松鼠 1 只、黑线仓鼠 12 只; <sup>c</sup>不同地区鼠伯氏疏螺旋体感染率比较, 采用行×列的 $\chi^2$ 检验,  $\chi^2=8.472, P=0.037$ ; - 为未采到样本

(2)测序分析: 从 35 份鼠脏器样本扩增到的伯氏疏螺旋体 5S ~ 23S rRNA 基因间隔区片段中随机抽取 19 份进行测序, 应用聚类分析分为 3 大类, 不同类别各挑选 1 个代表序列 DN-65、HNB1-19、HNB2-31 和 HNB2-38、DN-40 与 GenBank 中选择的 12 个参照菌株构建进化树(图 1), 结果显示 DN-65 同伯氏疏螺旋体基因种落在同一分支, 与美国伯氏疏螺旋体的同源性为 100%。HNB1-19 和 HNB2-38 同嘎氏疏螺旋体基因种序列落在同一分支, HNB1-19 与我国黑



注: \* 阳性代表序列

图 1 伯氏疏螺旋体 5S ~ 23S rRNA 间隔区核苷酸序列同源性

龙江地区的嘎氏疏螺旋体同源性为 100%、与我国云南地区嘎氏疏螺旋体的同源性为 99%。HNB2-31 和 DN-40 同法雷斯疏螺旋体基因种落在同一分支, HNB2-31 与我国南方地区以及日本法雷斯疏螺旋体的同源性为 100%。

3. 讨论: 本研究捕获的 514 只野鼠中, 黑线姬鼠、棕背䟽分别占 46.30%、18.48%, 两种鼠的伯氏疏螺旋体阳性率分别为 6.72%、7.37%, 说明黑线姬鼠和棕背䟽是黑龙江林区莱姆病的重要贮存宿主。同源性比较结果显示, 黑龙江林区鼠中存在多种伯氏疏螺旋体感染, 主要为伯氏疏螺旋体、嘎氏疏螺旋体和法雷斯疏螺旋体。嘎氏疏螺旋体和阿氏疏螺旋体是我国北方主要基因型<sup>[1]</sup>, 但本研究未检测到阿氏疏螺旋体, 这可能与样本量小有关。本研究首次在黑龙江林区鼠中检测到伯氏疏螺旋体和法雷斯疏螺旋体, 后者此前仅在南方地区发现<sup>[4,5]</sup>。

(感谢军事医学科学院微生物流行病学研究所的曹务春、刘玮、江佳富等老师和同学在实验和文章写作过程中给予的帮助)

参 考 文 献

[1] Zhang ZF, Wan KL, Zhang JS, et al. Studies on epidemiology and etiology of Lyme disease in China. Chin J Epidemiol, 1997, 18(1): 8-11. (in Chinese)  
张哲夫, 万康林, 张金声, 等. 我国莱姆病的流行病学和病原学研究. 中华流行病学杂志, 1997, 18(1): 8-11.

[2] Niu QL, Yang JF, Guan GQ, et al. Identification and phylogenetic analysis of Lyme disease *Borrelia* spp. isolated from Shangzhi prefecture of Heilongjiang province. Chin Veter Sci, 2010, 40(7): 661-666. (in Chinese)  
牛庆丽, 杨吉飞, 关贵全, 等. 黑龙江尚志地区莱姆病伯氏疏螺旋体的鉴定与遗传进化分析. 中国兽医科学, 2010, 40(7): 661-666.

[3] Masuzawa T, Takada N, Kudaken M, et al. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(5): 1817-1824.

[4] Chu CY, He J, Zhao QM, et al. Molecular epidemiological studies on *Borrelia burgdorferi* in rodents collected in the forest area of several provinces and autonomous regions of China. Chin J Zoonoses, 2006, 22(9): 817-820. (in Chinese)  
褚宸一, 何静, 赵秋敏, 等. 我国部分林区鼠中莱姆病螺旋体的分子流行病学调查研究. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(9): 817-820.

[5] Wang DM, Hao Q, Cai XH, et al. Study on ribotyping of Lyme borreliosis spirochete in Guizhou province. Chin J Epidemiol, 2003, 24(12): 1129-1131. (in Chinese)  
王定明, 郝琴, 蔡星和, 等. 贵州省莱姆病螺旋体的核糖体基因分型研究. 中华流行病学杂志, 2003, 24(12): 1129-1131.

(收稿日期: 2011-11-28)

(本文编辑: 万玉立)