

• 实验研究 •

用分子生物学技术诊断巴尔通体感染

栗冬梅 俞东征 刘起勇 海荣 郭炳衡

【摘要】 目的 应用聚合酶链反应(PCR)技术建立巴尔通体的检测鉴定方法并用于诊断临床疑似猫抓病合并双侧支气管肺炎患者。方法 根据16S~23S rRNA ITS 基因序列较其他属细菌长,而且位于这段基因序列中的tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala} 基因间隔区具有高度变异性,tRNA^{Ile}和 tRNA^{Ala} 基因序列在巴尔通体属中完全保守,设计引物;同时应用文献发表的2对引物直接扩增1例临床可疑猫抓病患者全血基因组DNA。将研究设计引物的PCR产物直接测序,并进行序列分析。结果 3对引物扩增全血基因组DNA均获得巴尔通体特异基因片段,根据其中2对引物扩增产物大小与阳性对照不同,可初步确定样本与阳性对照菌株是不同巴尔通体;序列分析结果显示,研究设计引物 T1Ile. 455p-TAla. 885n 扩增产物核苷酸序列与中国云南省巴尔通体一分离株对应位置的序列相一致,同源性100%。结论 应用PCR技术从血液中直接扩增特异基因片段,可以快速检测巴尔通体感染;测序及序列分析结果进一步提供了此种致病巴尔通体在中国南北方均存在的线索。

【关键词】 巴尔通体;聚合酶链反应;序列分析;猫抓病

Study on *Bartonella* infection using molecular biological diagnostic techniques from China LI Dong-mei*, YU Dong-zheng, LIU Qi-yong, HAI Rong, GUO Bing-heng. * Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: LIU Qi-yong. Email: liuqiyoung@iCDC.com.cn

【Abstract】 Objective To establish polymerase chain reaction (PCR) technique for the detection of specific genes related to species of genus *Bartonella*, and for diagnosing clinically suspected cat-scratch disease (CSD) case complicated with pneumonia on both lungs. The appearance of *Bartonella infectious* diseases calls for genus and species detection and tools for identification in order to make clinical diagnosis and carry on epidemiological studies. **Methods** One pair of primer T1Ile. 455p-TAla. 885n was designed based on the fact that tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala} intergenic spacer region in 16S-23S rRNA intergenic spacer (ITS) of genus *Bartonella* were high variable sequences flanked by completely conserved tRNA-encoding genes. 16S-23S rRNA was longer than that which had been described in other bacteria. Two published pairs of primers were used to directly detect the specific gene fragments of *Bartonella* species DNA extracts from human blood, followed by PCR product Sequencing and nucleotide base sequence analysis. **Results** Amplification products of the three pairs of primers had the same predicted size of those in *Bartonella* spp. According to the different length of electrophoresis bank, the sample was identified as a species of genus *Bartonella* other than the positive control. Sequence analysis showed that the nucleotide sequence from the PCR product of primer T1Ile. 455p-TAla. 885n was identical to the *Bartonella* isolated from Yunnan in China. **Conclusions** PCR-based assay provided a simple and rapid means to detect pathogenic *Bartonella* species in humans and mammalian hosts as well as in arthropod vectors. This study suggested that this pathogenic *Bartonella* species existed in patients in northern and southern parts of China.

【Key words】 *Bartonella*; Polymerase chain reaction; Sequence analysis; Cat-scratch disease

巴尔通体是一群革兰染色阴性、氧化酶阴性、营养条件要求苛刻、兼性细胞内寄生的需氧杆菌,曾引起巴尔通体病(Bartonellosis, 又称 Carrion 病,包括 Oroya 热和秘鲁疣)、战壕热、典型猫抓病(cat-scratch disease, CSD)等老传染病的爆发,20 世纪 80 年代后发现巴尔通体与心内膜炎^[1]、杆菌性血管

瘤-紫癜^[2]、菌血症^[3]、非典型 CSD 等新发传染病有关^[1]。巴尔通体感染的临床表现复杂多样,病原体分离培养困难且无特异表型,故根据临床表现及病原学诊断较为困难。随着分子生物学发展,越来越多的核酸检测方法应用于巴尔通体的检测,其中聚合酶链反应(PCR)技术由于其简单、快速、敏感且能够特异扩增目的基因,与其他分子生物学技术结合,已广泛应用于传染病病原的分离鉴定及分型,较适用于常规临床检测。本研究通过建立以 PCR 为基

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、海荣);北京武警总队医院(郭炳衡)

通讯作者:刘起勇 Email:liuqiyoung@iCDC.com.cn

础的巴尔通体感染检测方法,检测 1 例发热肺炎患者全血 DNA,扩增出巴尔通体特异基因片段,现将结果报告如下。

材料与方法

1. 病例情况:患者男性,57 岁,北京居住,发病前有猫抓伤史。临床表现为发热、咳嗽伴胸痛;查体发现猫抓伤侧腋窝及腹股沟淋巴结肿大,肝脾肿大;肥达氏及外斐氏试验阴性;常规血培养阴性;B 超提示肝脾有血管瘤;临床诊断为双侧支气管肺炎,猫抓病待查;经抗生素治疗患者肺炎痊愈出院。

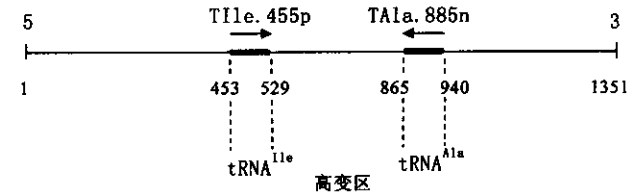
2. 阳性对照菌株:巴尔通体菌株 RT222SM (GenBank: AY277896)、RT221SM (GenBank: AY461844)、RT225SM(未测序)分离自中国云南鼠类宿主动物血液,由云南省地方病防治所提供。中国疾病预防控制中心传染病预防控制所应用 PCR 及测序技术证实为巴尔通体。

3. 全血 DNA 提取:取血 600 μ l 加入 10% SDS 终浓度为 1%, 20 mg/ml 蛋白酶 K 终浓度为 0.2 mg/ml, 400 μ g/ml RNase 终浓度为 58 μ g/ml, 混匀, 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 用饱和酚、酚/氯仿(1:1)、氯仿抽提数次;取上清液加 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 等体积冰异丙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min; 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去管中液体, 用 1 ml 70% 乙醇洗 DNA 沉淀 2 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 室温干燥后加 20 μ l 去离子水溶解 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4. 引物:从 GenBank 中查找巴尔通体 16S~23S rRNA 基因间隔区(ITS)序列,通过 DNAsis (version 2.5)序列分析软件作多序列比对,设计引物 T1le. 455p-TAla. 885n 扩增 16S~23S rRNA ITSs 中 tRNA^{Ile} 和 tRNA^{Ala} 基因间隔区序列,扩增片段大小 300~500 bp(图 1)。同时选用文献中发表引物(表 1),扩增巴尔通体的特异基因片段。

5. PCR 反应及产物检测:反应体系 25 μ l, 模板 DNA 加 1 μ l, 10 μ mol/L 引物 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 1.5 μ l, 10 \times buffer 2.5 μ l, 20 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l, 加去离子水至 25 μ l, 反应使用 Robocycler Gradient 40 型 PCR 基因扩增仪(Stratagene 公司产品)。反应循环参数见表 1。反应用试剂均购自北京华美生物工程公司。取 5 μ l 扩增产物,加入 1 μ l 电泳载样液,1% 琼脂糖电泳(4 V/cm)40 min,紫外灯下观察并拍照。为避免标本污染引起假阳性反应,标本处理区、反应液制备

区、PCR 扩增区以及产物分析在不同区域进行,加样移液器分开专用,PCR 反应同时设空白对照(去离子水)。



粗线代表引物 T1le. 455p-TAla. 885n 相对位置,参照 *B. henselae* (GenBank 注册号 L35101) 16S~23S rRNA ITS 序列设计

图 1 引物 T1le. 455p-TAla. 885n 设计示意图

表 1 PCR 反应引物

引物	序列	退火温度 (C)	<i>B. henselae</i> 扩增片段大小(bp)
BhCS. 781p ^[4]	5'-GGG GAC CAG CTC ATG GTG G-3'	48	380
BhCS. 1137n ^[4]	5'-AAT GCA AAA AGA ACA GTA AAC A-3'	48	380
Bh. 311p ^[5]	5'-CTC TTT CTT CAG ATG ATG ATC C-3'	48	163
Bh. 452n ^[5]	5'-AAC CAA CTG AGC TAC AAG CCC T-3'	48	163
T1le. 455p*	5'-GCT TGT AGC TCA GTT GGT TAG-3'	55	451
TAla. 885n*	5'-TGC TTG CAA AGC AGG TGC TCT-3'	55	451

* 本研究所用

6. PCR 产物核苷酸序列测定及同源性比较:本研究设计引物 T1le. 455p-TAla. 885n 扩增产物核苷酸序列由上海生工生物工程技术公司测定。网上利用核苷酸序列比对程序 BLAST 2.0(美国国家生物技术信息中心, www. ncbi. nlm. nih. gov), 与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行同源性比较。用 DNASTAR 软件进行双序列及多序列同源性比对。

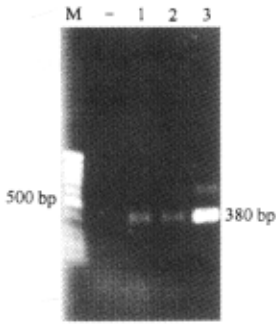
结 果

1. PCR 检测结果:3 对引物以全血基因组 DNA 为模板,均扩增出阳性产物,阳性对照均扩增出特异基因片段,空白对照均无扩增带。引物 BhCS. 781p-BhCS. 1137n 扩增 *gltA* 基因 380 bp 片段(图 2);引物 Bh. 311p-Bh. 452n 扩增出 16S~23S rRNA ITS N'-末端 163 bp 片段(图 3);本研究设计引物扩增出 451 bp 片段,符合巴尔通体 tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala} 基因间隔区预测带大小(图 4)。

2. 测序及同源性比较结果:

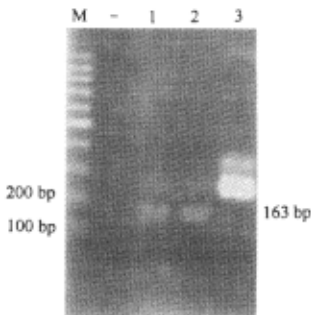
(1) 核苷酸序列:引物 T1le. 455p-TAla. 885n

PCR 扩增产物测序结果:序列长 451 bp, 1~75 bp 为部分 3'-端 tRNA^{Ile} 基因序列, 76~410 bp 为 tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala} 基因间隔区, 411~451 bp 为部分 5'-端 tRNA^{Ala} 基因序列, 其中划线部分为 T11e. 455p-TAla. 885n 引物序列; GenBank 注册号为 AY464941 (图 5)。



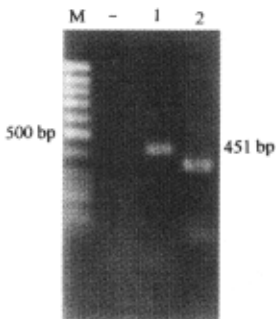
M: 100 bp DNA Ladder 分子量标准; 1、2: 样本; 3: 阳性对照 (巴尔通体菌株 RT222SM); -: 空白对照

图2 GltA 扩增产物 1% 琼脂糖电泳图



M: 100 bp DNA Ladder 分子量标准; 1、2: 样本; 3: 阳性对照 (巴尔通体菌株 RT225SM); -: 空白对照

图3 引物 Bh, 311p-Bh, 452n 扩增产物 1% 琼脂糖电泳图



M: 100 bp DNA Ladder 分子量标准; 1: 样本; 2: 阳性对照 (巴尔通体菌株 RT221SM); -: 空白对照

图4 引物 T11e. 455p-TAla, 885n 扩增产物 1% 琼脂糖电泳图

程序在 GenBank 中搜索, 进行最大同源性比较。结果发现该序列与中国云南省分离到的巴尔通体 RT222SM (GenBank: AY277896) 相对应的基因片段序列完全一致; 应用 DNASTAR5 软件中 MegAlign 程序, 将这一序列与汉赛、五日热、杆菌样、伊丽莎白等 13 种巴尔通体对应序列比对, 用 Slow-Accurate versions of ClustalW 方法进行同源性分析, 结果显示这段序列与以确认的其他巴尔通体的同源性为 57.4%~70.5% (表 2)。

```

BASE COUNT      131 a      70 c      110 g      140 t
1  GCTTGTAGCT CAGTTGGTTA GAGCGCGCGC TTGATAAGCC TGAGGTCGGA GGTTC AAGTC
61 CTCCAGGCC CACCAATTAT CCATCCATAG AAAAGCGCTT AGAAGTTTG ACTGTAAACA
121 GGTCAACGTT GTTTTGTAGG ACGCCAATAT TGTCTGAAA AAGAGCTTTC TTGTAAGTT
181 TGAGAAAAC TGTTTATCGC TTTTGTAAAG ATGTGGTGT TGTCTGCTTT TAAAGCGATC
241 GAAACTGAAA GTGTTTCAA GATAAGAGTC TTGGAACAGA AGAGTCTTGG AATAGAAAAG
301 AATATAAAGT CTAGGTGGA TTACATAGTC TAGAGTTAAA TTGTTTCATGA TTGGAACATT
361 TCATATTGAA ATGCTGCAT ATAAAGGTTT CGAATAAATT ATTCCGTTTT GGGGCCGTAG
421 CTEAGCTGGG AGAGCACCTG CTTTGAAGC A
    
```

图5 tRNA^{Ile} 和 tRNA^{Ala} 基因部分核苷酸序列及间隔区核苷酸序列

表2 测定序列与其他巴尔通体 tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala} 基因间隔区对应位置序列比较

巴尔通体种	宿主	引物序列长度 (bp)	核苷酸同源性 (%)	GeneBank 注册号
<i>B. grahamii</i>	鼠	405	70.5	AJ269785
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	田鼠	360	70.4	L35102
<i>B. taylorii</i>	鼠	501	69.9	AJ269784
<i>B. quintana</i>	人	480	69.8	L35100
<i>B. alsatica</i>	兔	380	69.7	AF312506
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	牛	470	67.7	AF312504
<i>B. bacilliformis</i>	人	238	64.5	L26364
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	狗	419	63.3	AF167988
<i>B. doshiae</i>	鼠	342	62.9	AJ269786
<i>B. koehlerae</i>	猫	425	62.2	AF312490
<i>B. tribocorum</i>	鼠	416	60.3	AF312505
<i>B. henselae</i>	猫	451	58.7	L35101
<i>B. elizabethae</i>	鼠	451	57.4	L35103

为了解已知巴尔通体此段序列的变异程度, 及不同种巴尔通体之间的同源性, 我们按同样方法将这 13 种巴尔通体作同源性比较。结果发现 *B. tribocorum* 与 *B. elizabethae* 同源性最高为 92.6%; *B. bacilliformis* 与 *B. alsatica* 同源性为 58.5%, 最低; *B. vinsonii* 的 3 个亚种同源性为 87.8%~91.4% (表 3)。

(2) 同源性比较: 网上将序列输入 BLAST 分析

表3 13种巴尔通体 tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}基因间隔区序列同源性(%)

	<i>alsatica</i>	<i>bacilli formis</i>	<i>doshiae</i>	<i>elizabethae</i>	<i>vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	<i>vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	<i>vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	<i>tribocorum</i>	<i>taylorii</i>	<i>quintana</i>	<i>koehlerae</i>	<i>henselae</i>	<i>grahamii</i>
<i>alsatica</i>		58.5	73.1	66.8	67.0	65.5	65.8	67.9	71.3	68.2	68.2	70.3	65.3
<i>bacilli formis</i>	61.7		65.4	62.4	58.5	59.0	55.1	66.2	60.3	60.7	63.2	62.4	64.5
<i>doshiae</i>	35.4	46.4		74.6	66.1	68.1	64.6	73.7	73.7	71.1	71.1	62.3	65.2
<i>elizabethae</i>	56.6	59.0	54.5		70.4	66.0	70.4	83.3	67.9	69.6	61.7	60.9	91.0
<i>vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	56.9	66.9	53.8	51.2		87.8	88.9	70.1	66.2	63.7	68.7	70.4	64.0
<i>vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	56.7	66.7	55.4	52.3	16.2		91.4	62.6	58.5	67.5	62.1	61.4	71.0
<i>vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	56.7	63.7	54.1	50.4	12.2	8.4		68.7	62.0	64.2	65.8	69.8	64.8
<i>tribocorum</i>	51.8	56.2	55.2	20.9	45.5	50.6	42.9		66.4	68.5	61.0	61.6	92.6
<i>taylorii</i>	35.8	68.7	42.1	64.7	62.7	67.0	62.4	58.0		67.5	63.9	66.2	68.9
<i>quintana</i>	43.7	62.2	41.9	57.6	53.2	60.4	51.3	59.5	51.1		71.4	74.0	66.7
<i>koehlerae</i>	48.0	71.6	46.4	62.6	57.2	67.2	58.0	61.1	61.5	30.4		89.0	69.1
<i>henselae</i>	51.9	74.6	50.3	64.4	65.5	72.2	64.8	64.4	62.9	31.7	11.1		70.2
<i>grahamii</i>	47.9	54.4	48.0	11.6	45.0	47.1	43.4	7.5	56.4	51.4	53.0	55.1	

注: 对角线以上为序列同源性的一致性(%), 以下为差异性(%)

讨 论

巴尔通体属于变形菌纲(*Proteobacteria*)、 α 亚群 (*Alpha proteobacteria*)、根瘤菌目 (*Rhizobiales*), 与根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、布鲁氏菌等具有较高同源性^[4]。目前, 已发现的巴尔通体有 19 个种, 还有一些未定种, 其中已知 7 种可致人类疾病, 包括杆菌样 (*B. bacilli formis*)、五日热 (*B. quintana*)、汉赛 (*B. henselae*)、伊丽莎白 (*B. elizabethae*)、克氏 (*B. clrridgeiae*)、文氏巴尔通体伯格霍夫亚种 (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*)、格拉范姆 (*B. grahamii*) 巴尔通体。

由于细菌分子遗传学及分子生物学检测方法的发展, 越来越多的致病巴尔通体以及巴尔通体感染所导致的不良预后被发现, 人们对这种病原微生物的研究越来越重视。但巴尔通体培养较为困难, 营养条件苛刻, 需要细胞培养或在含有全血或血红素的高营养培养基上, 35~37℃ 含 5% CO₂ 的潮湿环境下培养至少 5~45 天, 且无明显的表型特异性, 因而从病原学角度诊断较为困难。近些年发展起来的 PCR 和序列测定技术为临床采样检测病原体, 鉴定致病微生物提供一种有效且实用的手段。16S rRNA、gltA、htrA、16S~23S rRNA ITS、rpo β 、ribC、ftsZ 基因等都被探索用于检测鉴别巴尔通体。

引物 BhCS. 781p-BhCS. 1137n 可扩增各种巴尔通体片段^[5], 扩增与巴尔通体同源性较高的根癌

土壤杆菌、布鲁氏菌等都无扩增产物, 具有属水平特异性, 在国外已较为广泛用于巴尔通体感染的实验室诊断与调查研究。巴尔通体 16S~23S rRNA ITS 长约 900~1500 bp^[6], 较其他细菌长^[7], 根据其 N'-末端约 200 bp 核苷酸序列设计的引物具有高度特异性, 不同巴尔通体扩增产物大小不同, 对汉赛巴尔通体扩增片段为 163 bp^[8], 对五日热巴尔通体为 148 bp; 对根癌土壤杆菌、布鲁氏菌等 13 种细菌均无扩增产物, 且可从临床血样中直接扩增出巴尔通体特异基因片段。本研究设计的引物 Tlle. 455p-TAla. 885n 扩增 tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala} 基因间隔区, 引物序列在编码 tRNA^{Ile} 和 tRNA^{Ala} 基因序列中, 此段序列在不同种巴尔通体中具高度变异性^[6], 理论上不同种巴尔通体扩增产物大小不同。用该引物扩增布鲁氏菌、大肠埃希菌、小肠结肠耶尔森菌、幽门螺杆菌、军团菌等阴性对照菌均无特异扩增带, 根据 16S rRNA 基因序列, 巴尔通体与布鲁氏菌同源性较高^[4], 及 16S~23S rRNA ITS 高度变异性特征, 可证明本研究设计引物具有较高特异性。

3 对引物均扩增出与预测带大小相符的扩增带, 提示扩增产物为巴尔通体特异基因片段, 根据 gltA 基因设计的引物 BhCS. 781p-BhCS. 1137n 可以扩增出巴尔通体约 380 bp 基因片段, 具有属水平特异性; 2 个根据 16S~23S rRNA ITS 基因设计的引物可鉴别部分不同种巴尔通体, 因此, 结果中 gltA 基因扩增出的基因片段与阳性对照大小一致 (图 2), 而另 2 个根据 16S~23S rRNA ITS 基因设计的

引物扩增出的基因片段与阳性对照有差异(图 3, 4),这提示样本与阳性对照菌可能是不同种的巴尔通体。

为进一步验证本研究设计引物 T11e. 455p-TAla. 885n 的特异性,我们选择其扩增产物进行测序,并做核苷酸序列比对分析。结果显示,与中国云南巴尔通体分离株 RT222SM 对应基因片段完全一致,同源性 100%,与其他种巴尔通体核苷酸同源性在 57.4%~70.5%之间。

同许多细菌一样^[9],巴尔通体 16S~23S rRNA ITS 具有高度变异性,而且较其他细菌都长;该基因序列包括 5 个区域,即 5'-端高变区,77 bp tRNA^{Leu} 基因编码区, tRNA 基因间隔高变区, 76 bp tRNA^{Ala} 基因编码区和 3'-端高变区^[7]。两个 tRNA 编码区在巴尔通体属内具有完全保守性, tRNA 基因间隔区核苷酸序列长度及组成在种水平上具有大量变异,因而本研究选择在 tRNA 基因间隔区设计引物,旨在这段序列的扩增产物能够通过片段大小区别不同种巴尔通体。已知汉赛、五日热、伊丽莎白等 13 种巴尔通体 16S~23S rRNA ITS 基因序列全长之间的同源性在 40.5%~82.5%之间^[6]。我们进一步将这 13 种巴尔通体的 T11e. 455p-TAla. 885n 引物之间的序列作比较,同源性在 58.5%~92.6%。这段序列如此大的变异程度,正是我们在设计引物、试图寻找较为理想的用于巴尔通体分类鉴定的特异基因序列的初衷。但是,我们也发现同样长度的扩增片段,核苷酸序列可以不同,而这在电泳图上是无法识别的。也就是说根据产物片段的大小只能作出部分结论:从电泳图上看,不同长度扩增带是不同种、基因型或者分离株巴尔通体,相同长度的扩增带不能肯定是同一种巴尔通体。目前,就此段基因序列而言,在种水平还是进一步具有分型或是鉴别不同菌株的意义,鉴于目前巴尔通体此段基因序列数目较少,所能提供的信息有限,我们还不能得出结论,这方面研究工作还在进行中。那么对于那些长度相同的片段,可以通过所扩增模板来源(宿主动物、媒介生物、临床患者等)、临床诊断及样本种类(血液、病灶组织、穿刺液等)等因素初步作出判断。因为巴尔通体的种类与以上因素密切相关。不易鉴别的样本还可以最终通过测序及序列分析技术解决。随着测序技术的不断成熟,及一些生物公司准确、快捷、相对低廉的测序服务,在临床实验室检测中,应用 PCR 产物直接测序的方法鉴定病原体,将

是一个发展方向及可应用手段。

对于巴尔通体这种难培养病原菌,本研究应用分子生物学方法从患者血液中检测到其基因片段,结合临床表现及流行病学史可确诊为巴尔通体感染,在分子细菌学水平上证实我国存在人类巴尔通体感染。测序及序列分析方法证实了本研究设计引物 T11e. 455p-TAla. 885n 的特异性和敏感性,在未能培养出病原体的情况下,可以通过直接采血样进行 PCR,并扩增出巴尔通体特异性基因片段,PCR 方法快速、简便,可用于临床诊断及分子流行病学调查。此外,从序列分析看,这例北京患者感染的巴尔通体与中国云南省鼠类宿主中分离出的巴尔通体是同一种,虽然这种巴尔通体尚未定种,但为这种致病巴尔通体在中国北方、南方的分布,及不同宿主动物(猫、鼠)的携带提供了病原学线索,为进一步对巴尔通体流行病学、病原学、致病机理及相关研究奠定了基础。

(对中国疾病预防控制中心传染病预防控制所景怀琦、邵祝军、蒋秀高、尹焱、郑汉、殷继明、陈凯及云南省地方病防治所王鹏等老师和同学提供的帮助,一并致谢)

参 考 文 献

- 1 Magui AC, Gotuzzo E. Bartonellosis; new and old. Infect Dis Clin North Am, 2000, 14 : 1-21.
- 2 Anderson B, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev, 1997, 10 : 203-219.
- 3 Slater LN, Welch DF, Hensel D, et al. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as cause of fever and bacteremia. N Engl J Med, 1990, 323 : 1587-1593.
- 4 Brenner DJ, Connor SPO, Winkler HH, et al. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family bartonellaceae from the order *Rickettsiales*. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43 : 777-786.
- 5 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.
- 6 Houpiquin P, Raoult D. 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. J Clin Microbiol, 2001, 39 : 2768-2778.
- 7 Roux V, Raoult D. The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Bartonella (Rochalimaea)* species is longer than usually described in other bacteria. Gene, 1995, 156 : 107-111.
- 8 Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, et al. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. J Clin Microbiol, 2000, 38 : 1717-1722.
- 9 Gurtler V, Mayall BC. rDNA rearrangements and concerted evolution. Microbiology, 1999, 145 : 2-3.

(收稿日期: 2003-04-17)

(本文编辑: 尹廉)