

我国耕牛钩端螺旋体带菌和排菌状况调查

时曼华¹ 梁中兴¹ WJ Terpstra⁶ 李春好¹ 张承峰² 李文斌³ 聂一新¹ 张立新⁴
李俊华⁴ 傅桂明⁵ RA Hartskeerl⁶ VDK Herman⁶

摘要 来源不同地区的牛尿经聚合酶链反应(PCR)检测和分离培养,PCR产物凝胶电泳阳性率11%,PCR产物Southern-blot阳性率13%,分离培养阳性率3.1%。不同地区牛尿标本PCR检测结果差异明显。结果表明,我国某些地区的耕牛钩端螺旋体排菌率非常高,其中以七日热和澳洲群为主。说明耕牛是这些地区钩体病的主要传染源。PCR和培养分离结果的比较显示,PCR是钩体病传染源调查的一种灵敏、特异、快速和简便的方法。

关键词 聚合酶链反应 钩端螺旋体病

Investigation on the Rate of Urinary Excretion of Leptospire among Cattle Naturally Infected with *Leptospira interrogans* Shi Man-hua*, Liang Zhong-xing, WJ Terpstra, et al.* Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Abstract Urine samples of Leptospire from cattle were detected by polymerase chain reaction (PCR) and isolation. Positive rates by Southern-blot and agarose gel electrophoresis of PCR amplification productions were 13% and 11% respectively. Positive rate of isolation was 3.1%. Various positive rates by PCR for cattle urine from different areas were discovered. Average rate of urinary excretion of Leptospire among cattle that naturally infected with *Leptospira interrogans* was 13.2%. Data showed that cattle was a major source of infection of Leptospirosis in some parts of China. According to the comparison of results between PCR and isolation, we believe that PCR is a sensitive, rapid and simple method for the investigation on source of infection of Leptospirosis.

Key words Polymerase chain reaction Leptospirosis

钩端螺旋体(以下简称钩体)病是一种人兽共患病。到目前为止,我国已发现65种钩体宿主动物(传染源)。其中耕牛是我国重要的家畜之一,它们作为传染源的意义究竟多大迄今尚不明了。本研究主要应用聚合酶链反应(PCR)检测牛尿中的钩体DNA,以了解我国耕牛排出钩体情况,现报告如下。

材料和方法

一、标本收集及样品DNA准备:接取中段牛尿约40ml,离心取约0.5ml沉淀,用Boom法^[1]准备PCR扩增样品。

二、聚合酶链反应及PCR产物Southern杂交:10μl样品于50μl反应体积中,在引物G₁、G₂和B_{64-I}、B_{64-II}^[2]的引导下,用PCR扩增仪(Parmacia公司)扩增。94℃变性2分钟,55℃退火1分钟,72℃延伸2分钟,35个循环。扩增产物于2%琼脂糖凝胶电泳。同时进行Southern杂交。杂交探针为G₁₉₅₋₂₈和B₈₈₋₂₉^[3],杂交方法按地高辛试剂盒(Boehringer公司)产品说明书。

三、牛尿培养钩体及血清学鉴定:稀释法

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
北京 102206

2 江西省卫生防疫站

3 上高县卫生防疫站

4 湖南省卫生防疫站

5 浙江省卫生防疫站

6 荷兰热带病研究院

本文为欧共体和中华人民共和国卫生部科研基金资助

接种 3 管 5ml 柯索夫培养管,此后定期观察培养物直至 3 个月后。分离的钩体用我国 15 群 15 型代表株免疫血清分群鉴定。

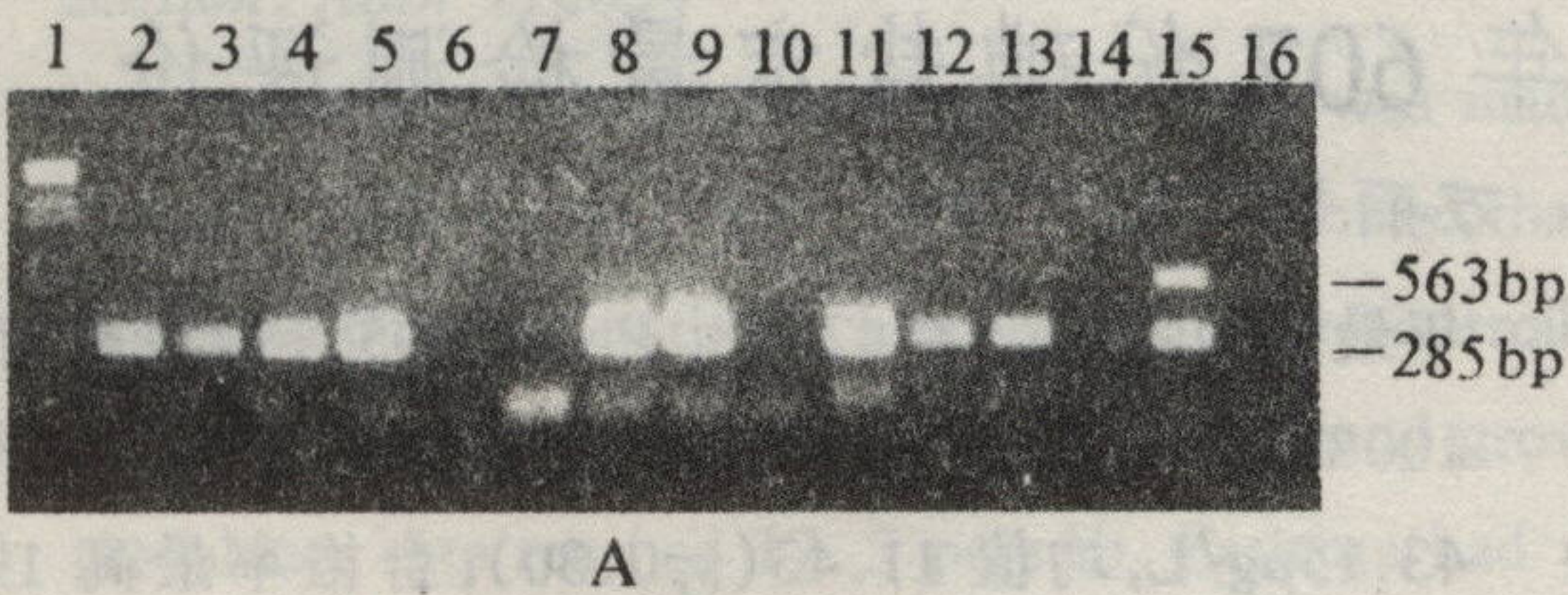
结 果

一、PCR 阳性率较高:PCR 产物琼脂糖

表 1 PCR 和培养检测牛尿标本中的钩端螺旋体

标本来源	凝胶电泳		Southern 杂交		分离培养	
	标本数	阳性率(%)	标本数	阳性率(%)	标本数	阳性率(%)
江西	222	14.0	222	15.8	255	5.5
湖南	43	9.3	43	14.0	171	0.6
浙江	52	0	52	0	52	0
合计	317	11.0	317	13.0	478	3.1

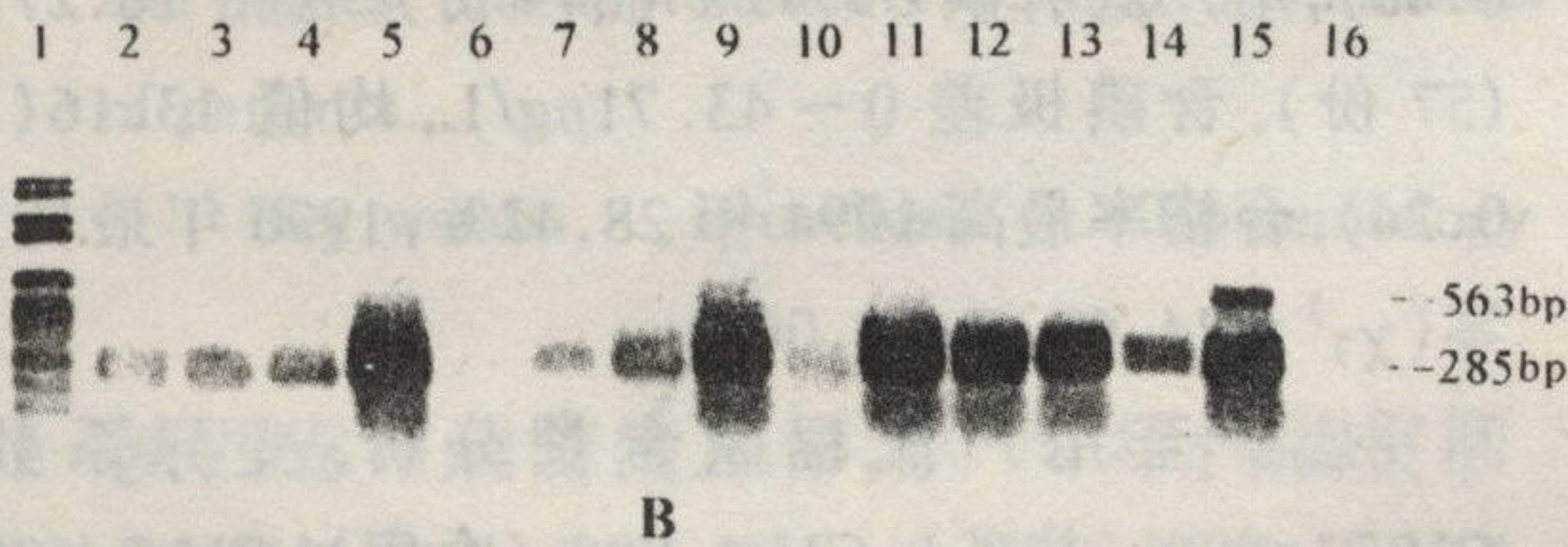
凝胶电泳阳性率 11.0%,Southern 杂交阳性率 13.0%。不同地区阳性率差异有显著性(表 1)。阳性片段均是引物 G₁、G₂ 的目的片段 285bp,未见引物 B_{64-I}、B_{64-II} 的目的片段(附图)。



黄牛尿标本 PCR 产物凝胶电泳和 Southern 杂交阳性率分别为 10.7% 和 12.4%,水牛则分别为 12% 和 14.7%。水牛和黄牛尿标本 PCR 检测结果差异无显著性($P>0.05$)。

表 2 牛尿标本 PCR 产物 Southern 杂交与培养

分离培养	Southern 杂交		合计
	阳性	阴性	
阳性	12	1	13
阴性	29	275	304
合计	41	276	317



附图 部分牛尿标本 PCR 扩增产物
(A. 凝胶电泳,B. Southern - blot)

1. λ DNA EcoR I/HindⅢ, 2~14. 牛尿标本
15. 阳性对照 16. 阴性对照

二、牛尿分离钩体结果:478 份牛尿钩体分离阳性率 3.1%,其中 13 株经血清群鉴定,七日热群和澳洲群均为 6 株,黄疸出血群 1 株。不同地区牛尿钩体分离阳性率差异明显(表 1)。

三、PCR 与分离培养:PCR 产物 Southern 杂交阳性率显著高于分离培养($P<0.01$),见表 2。

四、黄牛和水牛尿标本 PCR 结果比较:

讨 论

耕牛是我国钩体宿主动物,感染率之高位位于所有宿主动物之首,高者达 69.39%。然而,从牛肾分离钩体阳性率(带菌率)非常低。国外报道^[4,5],牛是七日热和赛罗群钩体病的主要传染源。Ellis 等曾经从 200 份牛肾标本培养分离 57 株(28.5%)钩体,都属七日热群钩体,从鼠和獾肾中未分离到七日热钩体。由于牛是我国南方的主要耕作工具,农民不愿轻易宰杀自己的耕牛。因此,从牛肾分离钩体非常困难。我国耕牛的钩体带菌率和排菌率究竟如何,尚不完全清楚。本研究从另

一角度入手,应用 PCR 方法检测牛尿中的钩端螺旋体 DNA。其优点有三,一是收集标本简便易行;二是方法灵敏简便快速;三是牛尿 PCR 结果不但反映了带菌状况,更主要的是反映了排菌状况。结果表明,受检牛群尿标本 PCR 阳性率较高。也就是说其排菌率较高。能向外排出病原体的动物是传染源。因此,我们认为,耕牛是我国钩体病尤其是七日热钩体病的主要传染源。不同地区牛群的排菌率差异明显,江西上高县牛的钩体排菌率高达 15.8%。而且,从牛尿分离的钩体与从病人分离的菌株血清群相吻合。这进一步说明,耕牛是我国某些地区钩体病重要传染源。

参 考 文 献

1 Boom R, CZA Sol, MMM Salimans, et al. Rapid and simple

method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol, 1990, 28:495.

2 Gravekamp CH, VD Kemp, M Franzen, et al. Detection of seven species of pathogenic Leptopires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol, 1993, 139:1691.

3 Bal AE, CH Gravekamp, RA Hartskeerl, et al. Detection of Leptospire in urine by PCR for early diagnosis of Leptospire. J Clin Microbiol, 1994, 32:1894.

4 Ellis WA, JJ Obrien, J Cassells. Role of cattle in the maintenance of Leptospira interrogans serotype hardjo infection in Northern Ireland. Vet Rec, 1981, 108:555.

5 Leonard FC, PJ Quinn, WA Ellis, et al. Duration of urinary excretion of Leptospire by cattle naturally or experimentally infected with Leptospira interrogans serovar hardjo. Vet Rec, 1992, 131:435.

(收稿:1996-09-07 修回:1996-10-05)

云南曲靖地区 1988~1994 年 607 份碘盐定量检测评价

张敏之 祁桂英 万丽娟 张 靖

碘缺乏病(IDD)流行病学监测《全国防治方案》规定应包括碘盐监测与病情监测两部分。我区 1988~1994 年共抽 607 份食盐检测,结果有碘率($\bar{P}$) 99.18% (602), 其中 1994 年 100%, 1988 年 93.75% ($\chi_1^2 = 25.19, P < 0.005$)。有碘率逐年上升,非常正相关($r_1 = 0.0963, P < 0.0005$) (指数回归),碘盐管理工作逐年加强;合格率 21.58% (131 份),最高 1994 年 42.76%,最低 1992 年 11.11% ($\chi_2^2 = 66.02, P < 0.005$)。合格率逐年上升,高度正相关($r_2 = 0.746, P < 0.05$),指数回归,碘均值($\bar{G}$) 13.35 $\mu\text{g/L}$ (7.84~18.52) $s_x 0.26$ (0.20~0.48),含量较高的样品数逐年增多,碘盐质量正在逐渐提高。

盐矿出厂至用户流程,碘盐合格率逐渐下降 (89.36%~30.00%~16.29%~16.09%), $\chi_3^2 = 57.05, P < 0.005$,呈高度负相关($r_4 = -0.8701, P < 0.05$),指数回归 $\bar{y} = 100 - 9.731e^{0.637x}$ 。碘盐含碘量平均降低 5.41 $\mu\text{g/L}$ (损失率 29.13%)。食盐生产至食用各个环节碘易挥发损失,必须加强科学管理,方能保证质量。仓库盐有碘 97.65% (166 份),合格 30.0% (51 份),含碘极差 0~108.9 $\mu\text{g/L}$,均值 14.86 $\mu\text{g/L}$ ($s_x 0.28$),1994 年合格率 64.86%,1988

年最低为零 ($\chi_5^2 = 42.18, P < 0.005$);销售盐有碘 100% (87 份),合格 16.09% (14 份),含碘 0.53~43.15 $\mu\text{g/L}$,均值 11.43 ($s_x 0.30$),合格率最高 1994 年 84.62%,最低 1989 年为零 ($\chi_6^2 = 3.85, P < 0.05$);用户盐有碘 99.71% (349 份),合格 16.27% (57 份),含碘极差 0~43.71 $\mu\text{g/L}$,均值 13.16 ($s_x 0.24$),合格率最高 1994 年 28.42%,1990 年最低为零 ($\chi_7^2 = 24.68, P < 0.005$)。

盐矿至用户流程碘含量分析,变异系数: $CV_1 31.99\%$ (盐矿), $CV_2 1.88\%$ (仓库), $CV_3 2.63\%$ (销售), $CV_4 1.82\%$ (用户)。盐矿盐变异度最大,其次销售盐,仓库及用户较稳定;碘损失率:盐矿出厂时平均损失率 7.15%,合格率降低 10.64%。仓库损失率 19.98%,合格率降低 59.36%。销售盐损失率 23.08%,合格率降低 13.91%。用户盐损失率 11.44% 与销售盐差异有非常显著性 ($t_p = 4.8271, P < 0.01$);无碘盐:5 份样品检测无碘 (仓库 4 份、用户 1 份),占总样本数 0.824%。

碘盐含碘量相应地影响尿碘浓度,为导致 IDD 主要因素,故必须加强碘盐监督监测,实行严格管理,保证食盐加碘防治 IDD 的效果。

(收稿:1996-04-12 修回:1996-10-10)