

研究报告

多方法组合调查新疆阿勒泰地区 6 种常见鼠传致病菌流行状况

李瑞晓^{1,2}, 陈燕芳³, 穆龙³, 徐爱玲², 刘蓬勃², 王君², 马伟^{*1}, 栗冬梅^{*2}

1 山东大学齐鲁医学院公共卫生学院, 山东 济南 250012

2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

3 新疆生产建设兵团第十师农业科学研究所, 新疆 北屯 836099

李瑞晓, 陈燕芳, 穆龙, 徐爱玲, 刘蓬勃, 王君, 马伟, 栗冬梅. 多方法组合调查新疆阿勒泰地区 6 种常见鼠传致病菌流行状况[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4109-4124.

LI Ruixiao, CHEN Yanfang, MU Long, XU Ailing, LIU Pengbo, WANG Jun, MA Wei, LI Dongmei. Prevalence of 6 common rodent-borne pathogens identified using multiple methods in Xinjiang Altay prefecture, China[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4109-4124.

摘要:【背景】鼠传疾病是对人类危害较大的一种人兽共患病, 全球化使得鼠传疾病流行区域不断扩大, 出现了多种新发鼠传疾病的发生及旧传染病的复燃。【目的】调查新疆阿勒泰地区常见的鼠传致病菌在啮齿动物中的流行状况, 为当地自然疫源性疾病防控提供科学依据。【方法】采用夹夜法捕获啮齿动物, 无菌收集其脾脏和肾脏组织, 提取基因组 DNA。应用 TaqMan 探针法的荧光定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)检测巴尔通体(*Bartonella* spp.)、问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)、恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)、莫氏立克次体(*Rickettsia mooseri*)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)和土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*) 6 种常见的鼠传致病菌。采用 16S rRNA 基因的通用引物进行常规 PCR 扩增后, 应用 Illumina 测序和 Nanopore 测序进一步检测致病菌, 同时对脾脏组织进行巴尔通体体外分离培养。比较 qPCR、16S rRNA 基因测序和分离培养的结果。【结果】共捕获啮齿动物 8 种 66 只, 其中, 乌拉尔姬鼠(*Apodemus uralensis*) 31 只, 占捕获总数的 46.97%, 其余为褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小家鼠(*Mus musculus*)等。qPCR 检测常见的鼠传致病菌感染率为巴尔通体 31.80% (21/66)、问号钩端螺旋体 1.50% (1/66)、恙虫病东方体 1.50% (2/66)、莫氏立克次体 3.00% (1/66)和土拉弗朗西斯菌 13.60% (9/66), 未检出嗜吞噬细胞无形体。16S rRNA 基因 Illumina 测序分析通过质控的 23 份样品

资助项目: 传染病预防控制国家重点实验室面上项目(2022SKLID202); 国家科技重大专项(2017ZX10303404); 国家自然科学基金面上项目(31970005)

This work was supported by the Project of State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (2022SKLID202), the National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10303404), and the National Natural Science Foundation of China (31970005).

*Corresponding authors. E-mail: LI Dongmei, lidongmei@icdc.cn; MA Wei, weima@sdu.edu.cn

Received: 2022-12-11; Accepted: 2023-01-20; Published online: 2023-02-20

检测出致病菌,以巴尔通体为主;16S rRNA 基因 Nanopore 测序分析通过质控的 11 份样品检测出巴尔通体,其他 5 种常见的鼠传致病菌未检出。有 11 份脾脏组织分离培养出巴尔通体,感染率为 16.67% (11/66)。【结论】新疆阿勒泰地区的啮齿动物可携带巴尔通体等多种鼠传致病菌,应关注并加强该地区相关传染病的防治工作。qPCR、细菌分离培养、16S rRNA 基因测序 3 种检测方法可互相补充,更全面地了解当地啮齿动物携带致病菌的状况。

关键词:啮齿动物;鼠传致病菌;定量聚合酶链式反应;16S rRNA 基因测序;Illumina 测序;Nanopore 测序

Prevalence of 6 common rodent-borne pathogens identified using multiple methods in Xinjiang Altay prefecture, China

LI Ruixiao^{1,2}, CHEN Yanfang³, MU Long³, XU Ailing², LIU Pengbo², WANG Jun², MA Wei^{*1}, LI Dongmei^{*2}

1 School of Public Health, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Department of Vector Biology and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

3 Institute for Agricultural Sciences of 10th Division of Xinjiang Production and Construction Corps, Beitun 836099, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Rodent-borne diseases are a class of zoonoses harmful to humans. The epidemic areas of rodent-borne diseases keep expanding with the progress in globalization, and a variety of new rodent-borne diseases emerge while the old infectious diseases reoccur. **[Objective]** To investigate the prevalence of common rodent-borne pathogens in rodents in Altay prefecture of Xinjiang, and to provide a scientific basis for the prevention and control of local natural focus diseases. **[Methods]** The spleen and kidney tissue samples were collected aseptically from the rodents captured by night trapping method, and the genome DNA was extracted. Six common rodent-borne pathogens including *Bartonella* spp., *Leptospira interrogans*, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia mooseri*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Francisella tularensis* were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with TaqMan probe. Illumina sequencing and Nanopore sequencing after routine PCR amplification with universal primers for the 16S rRNA gene were employed to further detect the pathogens. Meanwhile, the spleen tissue was used for the isolation and culture of *Bartonella* *in vitro*. The results of qPCR, 16S rRNA gene sequencing, and bacterial isolation and culture were compared. **[Results]** A total of 66 rodents of 8 species were captured, of which 31 (46.97%) rodents were *Apodemus uralensis*, and the rest were *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, etc. The infection rates of common rodent-borne pathogens detected by qPCR were as follows: *Bartonella* 31.80% (21/66), *L. interrogans* 1.50% (1/66), *O. tsutsugamushi* 1.50% (2/66), *R. mooseri* 3.00% (1/66), and *F. tularensis* 13.60% (9/66). *A. phagocytophilum* was not detected. The Illumina sequencing of 16S rRNA gene detected pathogens (mainly *Bartonella*) in the 23 samples

passing the quality control. The Nanopore sequencing of 16S rRNA gene detected *Bartonella* in 11 samples passing the quality control, and did not detect the other 5 common rodent-borne pathogens. *Bartonella* was isolated from 11 spleen tissue samples, with the infection rate of 16.67% (11/66). **[Conclusion]** Rodents in the Altay prefecture of Xinjiang can carry a variety of rodent-borne pathogens such as *Bartonella*. We should pay attention to and strengthen the prevention and control of related infectious diseases in this region. Quantitative polymerase chain reaction, bacterial isolation and culture, and 16S rRNA gene sequencing can complement with each other to provide a comprehensive understanding of the local rodents carrying pathogens.

Keywords: rodent; rodent-borne pathogens; quantitative PCR; 16S rRNA gene sequencing; Illumina sequencing; Nanopore sequencing

人兽共患病(zoonoses)是指在脊椎动物与人类之间自然传播、由共同的病原体引起、流行病学上又有关联的一类疾病。鼠类为很多人类与家畜传染病的宿主和传播媒介,人兽共患病中对人类危害较大的是鼠传疾病(rodent-borne disease)。我国主要的鼠传疾病有肾综合征出血热、钩端螺旋体病、鼠疫、血吸虫病等。随着世界经济文化交流的日益紧密,鼠传疾病流行区域不断扩大,出现了多种新发鼠传疾病的发生及旧传染病的复燃,如问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)引起的钩端螺旋体病、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)引起的人粒细胞无形体病、巴尔通体(*Bartonella* spp.)引起的猫抓病、恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)引起的恙虫病、莫氏立克次体(*Rickettsia mooseri*)引起的地方性斑疹伤寒和土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)引起的土拉热等。这些传染病具有传播速度快,对人类危害性大的特点。除钩端螺旋体经疫水传播,其余多经过蚤、蜱、螨等吸血节肢动物传播,所致传染病在我国均有报道^[1]。

我国新疆地处亚欧大陆腹地,地域辽阔,野生动植物资源较为丰富。该地陆地边境线漫长,周边与俄罗斯等八国接壤,作为“一带一路”核心区,需要安全的公共卫生环境,因

此,调查新疆鼠传致病菌的流行情况对于防控鼠传疾病及推进“健康中国”建设等方面具有重要的现实意义^[2]。阿勒泰地区位于新疆北端,地貌类型复杂多样,啮齿动物物种丰富。该地区是新疆丰水区之一,有优质的天然牧场,人群放牧行为和畜牧动物携带的病原体会传染给当地牧民。该地区是丝绸之路经济带北通道和新疆参与中蒙俄经济走廊建设的重要节点城市,拥有 3 个国家类陆路口岸。“一带一路”倡议使得贸易繁荣,国内外人员往来密切,也为传染病的远距离传播和蔓延提供了便捷渠道。目前,阿勒泰地区鼠传致病菌相关宿主、传播媒介及人群流行病学研究报道较少,我们选此地区调查鼠传致病菌在新疆的流行情况。

定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)为我国鼠传病原监测的主要方法,可以针对特定某种或几种致病菌进行检测。细菌的分离培养与鉴定是细菌感染性疾病诊断的“金标准”,常采用抗凝血和肝脾组织进行体外培养,阳性率较高^[3]。16S rRNA 基因高通量测序方法能检测啮齿动物体内外环境中细菌群落^[4-5],16S rRNA 基因作为揭示生物物种的特征核酸序列,被认为是最适于细菌系统发育和分类鉴定的指标,通常选择某个或某几个变异区域,利用保守区设计通用引物进行 PCR 扩

增, 然后对高变区进行测序分析和菌种鉴定^[6]。

本研究选取具有代表性的鼠传致病菌作为调查对象, 应用 TaqMan 探针法的荧光定量聚合酶链式反应、巴尔通体体外分离培养、16S rRNA 基因测序(包括 Illumina 测序和 Nanopore 测序)对新疆阿勒泰地区啮齿动物及其携带细菌开展调查研究, 探索实施相关鼠传疾病综合监测可行的检测技术方法, 并对不同检测方法进行评估和比较。

1 材料与方法

1.1 材料

动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, 西安天隆科技有限公司; TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit, Illumina 公司; 16S 条码试剂盒(16S Barcoding Kit SQK-RAB204),

Oxford Nanopore Technologies 公司; 配套试剂盒(Qubit dsDNA HS Assay Kit), Invitrogen 公司; LongAmp[®] Taq 2×Master Mix 和 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, New England Biolabs 公司; HR qPCR Master Mix, 上海辉睿生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; 236950 胰酶大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)和 237500 脑心浸液肉汤(brain-heart infusion broth, BHI)培养基, BD 公司; 无菌脱纤维羊血, 北京三牧畜牧养殖场; 引物和探针(表 1)由北京擎科生物有限公司合成。

核酸提取仪, 西安天隆科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; NovaSeq6000 测序仪, Illumina 公司; 纳米孔 MinION 测序仪, Oxford Nanopore Technologies 公司; NanoDrop-1000

表 1 检测病原体所用引物和探针序列

Table 1 Sequences of primers and TaqMan probes used for pathogens detection

病原体 Pathogen	引物和探针名称 Primer and TaqMan probe name	序列和探针标记 Sequence and probe labeling (5'→3')
莫氏立克次体 <i>Rickettsia mooseri</i>	Pr47F Pr110R mo-T	TGTTGATGGTGCAGGATTGA CGAATTTGTAGCGACAGGAAGA FAM-CAAACTGGCGCTGGTGT-MGB
嗜吞噬细胞无形体 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	wu-FP wu-RP wu-T	CCACGCAAGTCGCATTGAT GCCGGGTACTTTTCGCAATT FAM-CTTACAGGTGCTATCATC-MGB
恙虫病东方体 <i>Orientia tsutsugamushi</i>	Ot56 kD-F Ot56 kD-R Taqman-Ot	CGCCAGTRATMATTCTCCRA TTTYWGCTAGTGCRATAGAATTRG FAM-TAAGGACCACACTCTAATC-MGB
土拉弗朗西斯菌 <i>Francisella tularensis</i>	AKR-F AKR-R AKR-T	GCAGGGCGAGCACCATT ATCTTGCATGGTCACCACTTGA FAM-CGATATTTGCCTGTTAGCACTCCT-BHQ
巴尔通体 <i>Bartonella</i> spp.	ssrA-F ssrA-R ssrA-T	GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATAA GCTTCTGTTGCCAGGTG FAM-ACCCCGCTTAAACCTGCGACG-BHQ1
问号钩端螺旋体 <i>Leptospira interrogans</i>	Lepto F Lepto R Lepto P	CCCGCGTCCGATTAG TCCATTGTGGCCGR(A/G)ACAC FAM-CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC-BHQ

核酸蛋白测定仪, Thermo 公司; Qubit4 荧光计, Invitrogen 公司。

1.2 样品采集

2018 年 6 月, 在新疆北部阿勒泰地区, 以北屯市为中心, 按照方位和生境分别选择南北方向 3 个点和东西方向 2 个点, 共 5 个调查点进行采样。分别为阿勒泰市 X400 (47.57°N, 87.84°E) 边的半荒漠铃铛刺和农田草地, 北屯市 (47.35°N, 87.81°E) 的居民区, 北屯市龙兴东街 (47.29°N, 87.83°E) 边的农田沙枣林, 福海县乌伦古湖 (47.35°N, 87.53°E) 边的红柳林, 北屯市 X406 (47.27°N, 87.97°E) 边的农田防护林 (表 2), 采用夹夜法捕获啮齿动物 (中国疾病预防控制中心传染病预防控制所实验动物福利伦理委员会审查通过, 标准文号为 2022-018), 编号登记, 鉴定种属, 无菌解剖, 采集其脾脏和肾脏组织, -80 °C 冻存待检。

1.3 巴尔通体体外分离培养

在生物安全柜中操作, 剪取鼠脾脏组织 5–10 mg 于研磨管中, 加入 100 μ L BHI 和适量氧化锆研磨珠, 用组织研磨仪匀浆后接种在含有 5% 脱纤维羊血的 TSA 上, 置于含 5% CO₂ 培养箱中, 潮湿环境中 37 °C 培养 21 d。挑取单个巴尔通体疑似菌落, 放置于 100 μ L 的 ddH₂O 中, 100 °C 加热 30 min, 6 000 \times g 离心

5 min, 取上清液作为 DNA 模板。应用引物 (BhCS.781p-BhCS.1137n) 扩增巴尔通体属的特异性基因枸橼酸合成酶基因 (citrate synthase gene, *gltA*)^[7]。用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增产物, 其长度为 379 bp。将阳性 PCR 产物送至北京擎科生物科技有限公司双向测序。序列使用美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的局部序列排比检索基本工具 (basic local alignment search tool, BLAST) 与 GenBank 中的参考序列进行比对分析。

1.4 动物组织核酸提取

无菌条件下剪取 5–10 mg 脾脏和肾脏组织于研磨管中, 加入适量 PBS 缓冲液及若干研磨珠。组织研磨仪匀浆后, 使用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (磁珠法) 和全自动核酸提取仪对 66 份样品的基因组 DNA 进行提取, 用 NanoDrop-1000 测定浓度, -80 °C 保存备用。

1.5 TaqMan 探针法的荧光定量聚合酶链式反应检测致病菌

选用《全国病媒生物病原体学监测方案 (试行)》[中疾控传发 2020 (13 号)] 中报道的引物和探针检测莫氏立克次体、嗜吞噬细胞无形体、恙虫病东方体、土拉弗朗西斯菌、巴尔通体和问号钩端螺旋体。按试剂盒说明书配制反应体

表 2 新疆阿勒泰地区啮齿动物采样点分布

Table 2 Distribution of rodent sampling sites in Altay prefecture of Xinjiang

采样地点	经纬度	采样环境
Sampling location	Longitude and latitude	Sampling environment
北屯市龙兴东街 Longxing East Street, Beitun City	47.29°N, 87.83°E	农田沙枣林 Farmland jujube forest
阿勒泰市 X400 X400, Altay City	47.57°N, 87.84°E	半荒漠铃铛刺、农田草地 Half desert bell thorn, field grassland
福海县乌伦古湖 Ulungur Lake in Fuhai County	47.35°N, 87.53°E	红柳林 Red willow forest
北屯市 X406 X406, Beitun City	47.27°N, 87.97°E	农田防护林 Farmland shelter forest
北屯市 Beitun City	47.35°N, 87.81°E	居民区 Residential area

系进行 qPCR 扩增, 设置反应参数和阳性、空白对照, 根据扩增曲线是否呈 S 型及 C_q 值大小, 判定阳性和阴性。阳性对照模板为各致病菌的靶标序列质粒标准品, 由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.6 16S rRNA 基因测序和生物信息学分析

1.6.1 Illumina 文库构建、测序和数据处理

选择 Illumina NovaSeq6000 测序平台, 测序区域为 16S rRNA 基因的 V3–V4 可变区。采用带 barcode 的特异引物(341F: 5'-CCTAYGGG RBGCASCAG-3'和 806R: 5'-GGACTACHVGG GTWTCTAAT-3'), 使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 进行文库的构建, 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测, 质控合格后, 委托诺禾致源医药生物信息科技有限公司用 NovaSeq6000 进行上机测序。

测序得到的原始数据(raw data)存在一定比例的干扰数据(dirty data), 为了使信息分析的结果更加准确、可靠, 首先对原始数据进行拼接、过滤, 得到有效数据(clean data)。对所有样品的有效数据以 97%的一致性(identity)进行 OTU 聚类, 然后对 OTU 的序列进行物种注释, 生成特征表, 与 Silva 数据库比对得到注释结果。

1.6.2 Nanopore 文库构建、测序和数据处理

在本实验室进行 16S rRNA 基因 Nanopore 测序, 应用 16S 条码试剂盒, 使用含有条形码(有 12 个测序样品标识 barcode primer, BC01–12)和 5'末端标签的特异性 16S 引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'^[8]和 1492R: 5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3'^[9])对组织 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经磁珠纯化, 70%乙醇溶液清洗, 晾干后加入 Tris-HCl (pH 8.0, 含 50 mmol/L NaCl)重悬磁珠, 上清液即为纯化后的 DNA。等体积吸取所有样品管中 DNA, 混

匀后加入 RAP 接头, 室温孵育 5 min 后加入 sequencing buffer (SQB)、loading beads (LB), 制备成测序文库。将制备的测序缓冲液(priming mix)从 priming port 加入到测序芯片(flow cell)中, 然后将 DNA 文库从 SpotON sample port 加入到芯片中, 关闭 SpotON sample port 和 priming port, 将芯片装载到 MinION 测序仪上进行测序。

测序软件为 MinKNOW (MinION Release 22.08.04), 应用 Albacore 软件实时识别碱基(basecalling), 运行 24 h, 输出 fast5 和 fastq 文件。运行 EPI2ME 客户端(epi2me-agent-3.5.6-8640361), 选择 16S 流程(FASTQ 16S 2022.01.07)用于数据质控(basecalling 1D, v3.3.1)和分类(16S classification, v3.3.1), 选择检测 barcode 16S RAB204, 检测文件为*.fastq 格式。进入 EPI2ME 网站(<https://epi2me.nanoporetech.com>)实时查看结果报告^[10]。

1.7 数据整理和统计学分析

利用 Excel 2019 软件进行数据整理、计算和绘制图表, 应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 感染率的比较采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法, 一致性采用 Kappa 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 动物捕获情况

2018 年 6 月采集了新疆阿勒泰地区 5 个调查点的 66 只啮齿动物样品, 其中 31 只乌拉尔姬鼠(*Apodemus uralensis*)、10 只褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、9 只小家鼠(*Mus musculus*)、7 只怪柳沙鼠(*Meriones tamariscinus*)、5 只灰仓鼠(*Cricetulus migratorius*)、2 只子午沙鼠(*Meriones meridianus*)、1 只林睡鼠(*Dryomys nitedula*)和 1 只狭颅田鼠(*Microtus gregalis*)。

乌拉尔姬鼠为优势种[Berger-Parker 优势度指数 (D)= N_{\max}/N , $D=0.470$], 占捕获动物的 46.97% (31/66)。

2.2 qPCR 检测结果

2.2.1 致病菌检出率

对 66 只啮齿动物进行了 6 种致病菌检测, 其中脾脏样品检测 66 份, 肾脏样品检测 66 份 (仅检测问号钩端螺旋体), 任一组织阳性判定为阳性。共 28 只啮齿动物感染了鼠传致病菌, 总感染率为 42.40%。常见的鼠传致病菌检出率为巴尔通体(31.80%)、问号钩端螺旋体(1.50%)、恙虫病东方体(1.50%)、莫氏立克次体(3.00%)和土拉弗朗西斯菌(13.60%), 嗜吞噬细胞无形体未检出。脾脏组织检出一份问号钩端螺旋体, 肾脏组织未检出。不同采样点致病菌检出率差异有统计学意义($\chi^2=48.661$, $P<0.01$) (表 3)。

2.2.2 致病菌在采样环境中的分布情况

农田沙枣林、半荒漠铃铛刺和红柳林分别有 14 只、1 只和 6 只鼠检出巴尔通体, 不同采

样环境的巴尔通体检出率差异无统计学意义 (Fisher 确切概率法, $P=0.163$)。问号钩端螺旋体、莫氏立克次体、恙虫病东方体在农田沙枣林均有检出。土拉弗朗西斯菌的检出率在农田沙枣林最高(12.80%), 不同采样环境的土拉弗朗西斯菌检出率差异无统计学意义 (Fisher 确切概率法, $P=0.448$) (表 4)。

2.2.3 致病菌在不同鼠种中的分布情况

捕获的林睡鼠和狭颅田鼠各 1 只, 未检出致病菌, 其余 6 种啮齿动物均检出致病菌, 同一鼠种各致病菌感染率不同。乌拉尔姬鼠检出 4 种致病菌, 巴尔通体、问号钩端螺旋体、莫氏立克次体和土拉弗朗西斯菌感染率分别为 48.40%、3.20%、6.50%和 12.90%, 差异有统计学意义($\chi^2=27.629$, $P<0.01$)。其中巴尔通体感染率高于问号钩端螺旋体的感染率, 而且差异有统计学意义($\chi^2=16.511$, $P<0.01$)。柞柳沙鼠检出 2 种致病菌, 巴尔通体(42.90%)和土拉弗朗西斯菌(28.60%), 感染率差异无统计学意义($P>0.05$)。有 2 只子午沙鼠感染巴尔通体

表 3 新疆阿勒泰地区各采样点致病菌 qPCR 检测结果

Table 3 qPCR detection of pathogens in Altay prefecture of Xinjiang

采样地点 Sampling location	捕鼠数量 Number of rodents caught	致病菌阳性数(感染率) The positive number of pathogenic bacteria (infection rate, %)				
		巴尔通体 <i>Bartonella</i> spp.	问号钩端螺旋体 <i>Leptospira interrogans</i>	莫氏立克次体 <i>Rickettsia mooseri</i>	恙虫病东方体 <i>Orientia tsutsugamushi</i>	土拉弗朗西斯菌 <i>Francisella tularensis</i>
北屯市龙兴东街 Longxing East Street, Beitun City	34	14 (35.90)	1 (2.60)	2 (5.10)	1 (2.60)	5 (12.80)
阿勒泰市 X400 X400, Altay City	9	1 (11.10)	0	0	0	2 (22.20)
福海县乌伦古湖 Ulungur Lake in Fuhai County	9	6 (66.70)	0	0	0	0
北屯市 X406 X406, Beitun City	5	0	0	0	0	0
北屯市 Beitun City	9	0	0	0	0	2 (22.20)
合计 Total	66	21 (31.80)	1 (1.50)	2 (3.00)	1 (1.50)	9 (13.60)

表 4 新疆阿勒泰地区不同采样环境鼠种携带致病菌的情况

Table 4 Pathogenic bacteria carried by rodent species in different sampling environments in Altay prefecture of Xinjiang

采样环境 Sampling environment	鼠种 Rodent species	捕鼠数量 Number of rodents caught	致病菌阳性数(感染率) The positive number of pathogenic bacteria (infection rate, %)				
			巴尔通体 <i>Bartonella</i> spp.	问号钩端 螺旋体 <i>Leptospira</i> <i>interrogans</i>	莫氏 立克次体 <i>Rickettsia</i> <i>mooseri</i>	恙虫病 东方体 <i>Orientia</i> <i>tsutsugamushi</i>	土拉弗朗 西斯菌 <i>Francisella</i> <i>tularensis</i>
农田沙枣林 Farmland jujube forest	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	22	13 (48.00)	1 (3.70)	2 (7.40)	0	4 (14.80)
	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	5	0	0	0	1 (20.00)	0
	灰仓鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	4	1 (25.00)	0	0	0	0
	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	1	0	0	0	0	1 (100.00)
	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	1	0	0	0	0	0
	狭颅田鼠 <i>Microtus gregalis</i>	1	0	0	0	0	0
	小计 Subtotal	34	14 (35.90)	1 (2.60)	2 (5.10)	1 (2.60)	5 (12.80)
农田防护林 Farmland shelter forest	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	3	0	0	0	0	0
	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	1	0	0	0	0	0
	灰仓鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	1	0	0	0	0	0
	小计 Subtotal	5	0	0	0	0	0
半荒漠 铃铛刺 Half desert bell thorn	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	3	0	0	0	0	2 (66.70)
	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	2	1 (33.30)	0	0	0	0
	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	1	0	0	0	0	0
	小计 Subtotal	6	1 (33.30)	0	0	0	2 (66.70)
农田草地 Field grassland	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	1	0	0	0	0	0
	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	1	0	0	0	0	0
	林睡鼠 <i>Dryomys nitedula</i>	1	0	0	0	0	0
	小计 Subtotal	3	0	0	0	0	0
红柳林 Red willow forest	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	3	1 (33.3)	0	0	0	0
	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	3	3 (100.00)	0	0	0	0
	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	2	2 (100.00)	0	0	0	0
	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	1	0	0	0	0	0
	小计 Subtotal	9	6 (66.70)	0	0	0	0
居民区 Residential area	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	9	0	0	0	0	2 (22.20)
	小计 Subtotal	9	0	0	0	0	2 (22.20)
	合计 Total	66	21 (31.80)	1 (1.50)	2 (3.00)	1 (1.50)	9 (13.60)

(100.00%), 1 只灰仓鼠感染巴尔通体(20.00%), 1 只小家鼠感染恙虫病东方体(11.10%), 3 只褐家鼠感染土拉弗朗西斯菌(30.00%)。

乌拉尔姬鼠、灰仓鼠、怪柳沙鼠和子午沙鼠的巴尔通体感染率分别为 48.40%、20.00%、42.90%和 100.00% ($\chi^2=3.329$, $P=0.339$); 乌拉尔姬鼠、褐家鼠和怪柳沙鼠的土拉弗朗西斯菌感染率分别为 12.90%、30.00%、28.60% ($\chi^2=2.380$, $P=0.355$)。不同鼠种同一致病菌的感染率差异均无统计学意义(表 5)。

2.2.4 动物复合感染致病菌情况

在北屯市的农田沙枣林捕获的 3 只乌拉尔姬鼠存在多种致病菌复合感染的情况, 占所捕获啮齿动物的 4.50% (3/66), 占总带菌动物的 10.70% (3/28)。其中 1 只乌拉尔姬鼠同时感染巴尔通体、问号钩端螺旋体、莫氏立克次体和土拉弗朗西斯菌; 1 只乌拉尔姬鼠感染巴尔通体、莫氏立克次体和土拉弗朗西斯菌; 1 只乌拉尔姬鼠感染巴尔通体和土拉弗朗西斯菌(表 6)。

表 5 新疆阿勒泰地区不同鼠种的致病菌感染情况

Table 5 Pathogens infection of different species of rodents in Altay prefecture of Xinjiang

鼠种 Rodent species	捕鼠数量 Number of rodents caught	致病菌阳性数(感染率) The positive number of pathogenic bacteria (infection rate, %)				
		巴尔通体 <i>Bartonella</i> spp.	问号钩端螺旋体 <i>Leptospira interrogans</i>	莫氏立克次体 <i>Rickettsia mooseri</i>	恙虫病东方体 <i>Orientia tsutsugamushi</i>	土拉弗朗西斯菌 <i>Francisella tularensis</i>
乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	31	15 (48.40)	1 (3.20)	2 (6.50)	0	4 (12.90)
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	10	0	0	0	0	3 (30.00)
小家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	9	0	0	0	1 (11.10)	0
怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	7	3 (42.90)	0	0	0	2 (28.60)
灰仓鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	5	1 (20.00)	0	0	0	0
子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	2	2 (100.00)	0	0	0	0

表 6 乌拉尔姬鼠体内致病菌的复合感染情况

Table 6 Compound infection of pathogens in *Apodemus uralis*

样品编号 Sample No.	鼠种 Rodent species	致病菌组合 Combination of pathogenic bacteria
2	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	巴尔通体、土拉弗朗西斯菌 <i>Bartonella, Francisella tularensis</i>
3	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	巴尔通体、问号钩端螺旋体、莫氏立克次体、土拉弗朗西斯菌 <i>Bartonella, Leptospira interrogans, Rickettsia mooseri, Francisella tularensis</i>
5	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	巴尔通体、莫氏立克次体、土拉弗朗西斯菌 <i>Bartonella, Rickettsia mooseri, Francisella tularensis</i>

2.3 16S rRNA 基因测序结果

2.3.1 Illumina 测序结果

挑选出 23 份文库检测合格的样品上机测序, 获得 2 390 391 条高通量序列, 长度在 342–416 bp 之间。OTU 聚类结果表明, 所测数据片段可以聚类成 22 446 个 OTU, 分布于 59 个门 134 个纲 300 个目 446 个科 769 个属和 405 个种。属水平检出的前 5 种致病菌有巴尔通体属(*Bartonella*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、肠球菌属(*Enterococcus*)和罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)。OTU 绝对丰度表显示, 在 23 份样品中检出 21 份巴尔通体, 具体 reads 见表 7。有 3 份样品检出立克次体属, reads 数为 1–18。4 份样品检出不形体属, reads 数为 1–6。其他几种常见的鼠传致病菌未检出。

2.3.2 Nanopore 测序结果

全部样品核酸浓度在 3.24–570.00 ng/ μ L, 挑选出 11 份质控合格的样品进行 Nanopore 上机测序, 全部测序样品总数据量[total yield (bases)]为 488.4 Mb, reads 数量为 334 235 个, 序列长度集中在 1 200–1 600 bp, 以 1 500 bp 的 reads 为主。

每份样品用于分类分析的 reads 数为 312 636, 以巴尔通体检出为主, reads 数为 281 796 个。巴尔通体鉴定的平均准确率(average accuracy)为 90.2%。11 份样品均检出巴尔通体, 具体 reads 见表 7, 其他 5 种常见的鼠传致病菌未检出。此外还鉴定出布鲁氏菌(*Brucella* sp.)和其他一些细菌(图 1), reads 数量较多的为啮齿杆菌(*Rodentibacter* sp.)、草螺菌(*Herbaspirillum* sp.)、罗尔斯通菌(*Ralstonia* sp.)、乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)、嗜糖假单胞菌(*Pelomonas* sp.)等。

2.4 巴尔通体培养结果

经过测序鉴定, 66 只啮齿动物中有 11 只分

离出巴尔通体, 阳性率为 16.67%; qPCR 检测到巴尔通体阳性率为 31.80% (21/66), 有 10 份样品 qPCR 检出巴尔通体而分离培养结果为阴性, 见表 7。巴尔通体组织培养的阳性率与荧光定量 PCR 检测的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=4.125$, $P=0.067$)。对这 2 种检测方法进行 Kappa 检验, 2 种方法检验巴尔通体阳性结果有较高的一致性(Kappa=0.600, $P<0.001$)。

3 讨论与结论

本研究选取了巴尔通体、莫氏立克次体、恙虫病东方体、土拉弗朗西斯菌、问号钩端螺旋体和嗜吞噬细胞无形体 6 种具有代表性的鼠传致病菌, 对其在我国新疆阿勒泰地区啮齿动物中的带菌情况进行了调查, qPCR 结果显示前 5 种病原体在当地啮齿动物中均有检出, 不同采样点鼠传致病菌检出率差异有统计学意义, 应对感染率较高的地区重点进行病原监测。本次调查 5 个采样点的采样环境多为荒漠草地林地, 地广人稀, 野外的老鼠较少, 所以个别点捕鼠较少, 今后调查的过程中会注意再增加数据量。捕获的啮齿动物中, 乌拉尔姬鼠检出 4 种致病菌, 包括巴尔通体、问号钩端螺旋体、莫氏立克次体和土拉弗朗西斯菌, 不同致病菌感染率差异有统计学意义, 该鼠种带菌种类及感染率较高, 并出现多种细菌复合感染情况, 存在传播多种自然疫源性疾病的风险, 应加强捕鼠和鼠密度监测。对啮齿动物的检测可以识别当地的鼠传致病菌, 及时向公共卫生部门提供预测预警, 以便在当地人群感染之前实施适当的预防措施^[11]。

本次调查啮齿动物感染率最高的致病菌为巴尔通体, 多在野外的乌拉尔姬鼠鼠群中检出, 巴尔通体适应性较强, 以多种哺乳动物和吸血节肢动物为媒介, 可以引起全身多系统急

表 7 qPCR、16S rRNA 基因测序检测巴尔通体与巴尔通体组织培养结果比较

Table 7 Comparison of qPCR and 16S rRNA gene sequencing detection of *Bartonella* and *Bartonella* tissue culture results

样品 编号 Sample No.	鼠种 Rodent species	采样环境 Sampling environment	巴尔通体 培养结果 Isolation and culture result of <i>Bartonella</i>	qPCR (Cq)	巴尔通体 reads 数量(个) Number of <i>Bartonella</i> reads	
					Illumina 测序 Illumina sequencing	Nanopore 测序 Nanopore sequencing
2	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	2 954	23
11	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	25.22	47 412	103 094
14	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	24.49	67 527	121 613
15	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	+	26.09	14 174	1 366
16	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	+	24.67	47 046	44 184
19	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	27.24	1 566	514
20	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	23.69	43 393	69
55	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	半荒漠铃铛刺 Half desert bell thorn	+	21.68	21 940	10 610
69	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	红柳林 Red willow forest	+	31.78	510	5
70	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	红柳林 Red willow forest	+	31.79	399	28
71	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	红柳林 Red willow forest	+	27.87	2 016	684
4	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	+	25.15	15 351	/
5	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	+	30.84	31 617	/
6	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	836	/
8	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	1 778	/
9	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	920	/
13	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	1 454	/
38	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	居民区 Residential area	—	—	1 708	/
39	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	居民区 Residential area	—	—	757	/
40	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	居民区 Residential area	—	—	0	/
42	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	居民区 Residential area	—	—	950	/
44	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	居民区 Residential area	—	—	0	/
65	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	农田防护林 Farmland shelter forest	—	—	14	/
3	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	32.3	/	/

(待续)

(续表 7)

样品 编号 Sample No.	鼠种 Rodent species	采样环境 Sampling environment	巴尔通体 培养结果 Isolation and culture result of <i>Bartonella</i>	qPCR (Cq)	巴尔通体 reads 数量(个) Number of <i>Bartonella</i> reads	
					Illumina 测序 Illumina sequencing	Nanopore 测序 Nanopore sequencing
17	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	27.8	/	/
18	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	+	26.87	/	/
22	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	28.19	/	/
26	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	28.72	/	/
31	灰仓鼠 <i>Cricetulus migratorius</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	+	29.27	/	/
72	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	红柳林 Red willow forest	—	28.41	/	/
73	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	红柳林 Red willow forest	+	29.63	/	/
76	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	红柳林 Red willow forest	—	26.18	/	/
1, 7, 10, 21, 25, 27	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	/	/
12, 23–24	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	/	/
28	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	/	/
29	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	/	/
30, 32–33	灰仓鼠 <i>Cricetulus migratorius</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	/	/
34	狭颅田鼠 <i>Microtus gregalis</i>	农田沙枣林 Farmland jujube forest	—	—	/	/
35–37, 45	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	居民区 Residential area	—	—	/	/
56	林睡鼠 <i>Dryomys nitedula</i>	农田草地 Field grassland	—	—	/	/
57	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	农田草地 Field grassland	—	—	/	/
58	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田草地 Field grassland	—	—	/	/
59	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	半荒漠铃铛刺 Half desert bell thorn	—	—	/	/
60–62	怪柳沙鼠 <i>Meriones tamariscinus</i>	半荒漠铃铛刺 Half desert bell thorn	—	—	/	/
63	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	半荒漠铃铛刺 Half desert bell thorn	—	—	/	/
64	灰仓鼠 <i>Cricetulus migratorius</i>	农田防护林 Farmland shelter forest	—	—	/	/
66–68	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	农田防护林 Farmland shelter forest	—	—	/	/
74	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	红柳林 Red willow forest	—	—	/	/
75, 77	乌拉尔姬鼠 <i>Apodemus uralensis</i>	红柳林 Red willow forest	—	—	/	/

+: 阳性; -: 阴性; /: 未检测

+: Positive; -: Negative; /: Not detected.

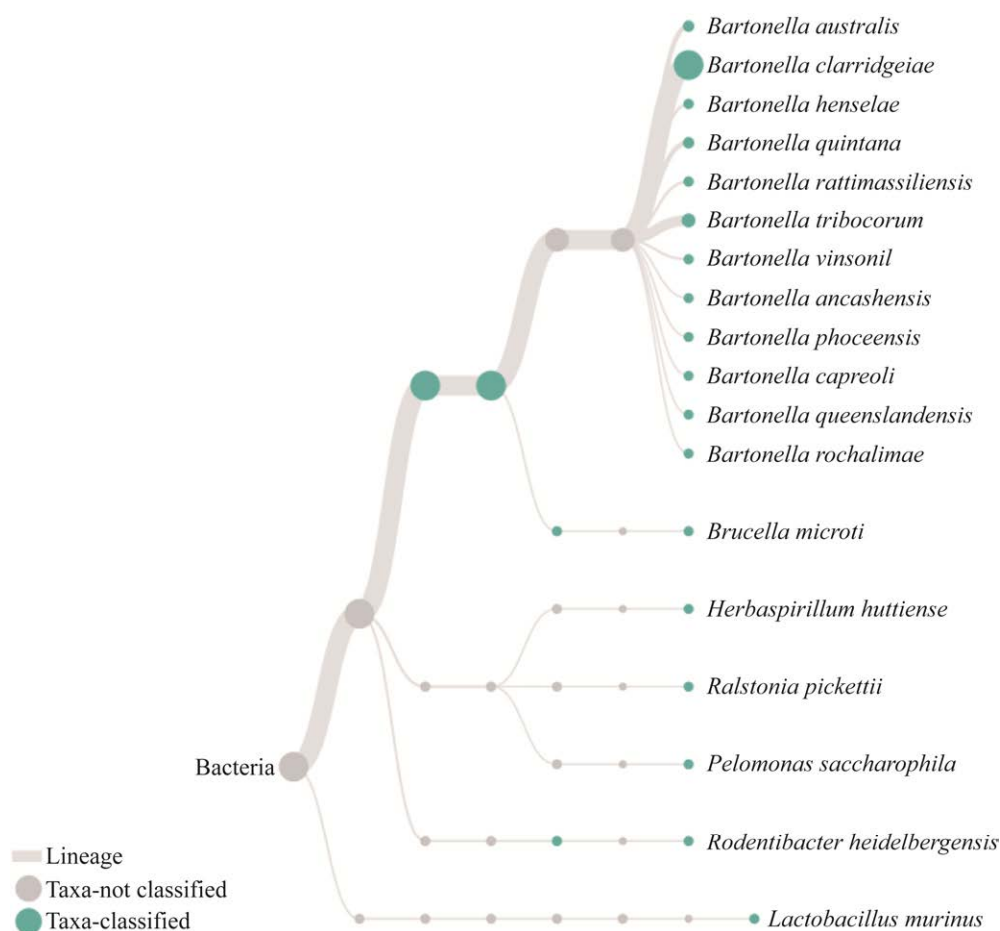


图 1 MinION 纳米孔测序结果分类 分类数据结果由 EPI2ME 中 16S classification (v.3.3.1)分析而得
Figure 1 Classification of MinION Nanopore sequencing results. The classification data results were analyzed by EPI2ME with 16S classification (v.3.3.1).

慢性疾病,如猫抓病(cat-scratch disease, CSD)等,已知至少有 13 种巴尔通体对人类具有致病性^[12]。李博等^[13]研究表明新疆边境鼠疫自然疫源地野鼠体表寄生蚤携带有巴尔通体,乌苏市古尔图地区长尾黄鼠间存在巴尔通体自然感染,因此有必要加强阿勒泰地区巴尔通体媒介动物的调查和监测,并了解当地人群的感染情况。土拉弗朗西斯菌的感染率也较高,此菌具有高致病性,会引起急性传染病——土拉杆菌病(tularemia),又称野兔热,宿主动物主要是野兔和小型啮齿动物(黄鼠、旱獭等),可通过接触、消化道、呼吸道及虫媒叮咬而传播,临

床表现为突然起病、恶寒、高热、剧烈头痛、全身肌痛、夜间盗汗、肝脾肿痛等。我国的土拉杆菌病自然疫源地主要集中在西藏地区,新疆尚无相关疾病报道,应引起重视。此外,当地啮齿动物存在立克次体感染,检出 2 例莫氏立克次体,此菌会引起地方性斑疹伤寒(endemic typhus),主要通过鼠蚤传播;临床表现与流行性斑疹伤寒相似,但症状较轻,病程较短,病死率低;还检出 1 例恙虫病东方体,会引起恙虫病(tsutsugamushi disease),以鼠类为主要传染源,通过恙螨幼虫叮咬而传给人,临床上以发热、焦痂、淋巴结肿大及皮疹为特征;1994 年

在新疆通过血清流行病学调查,证明人群存在恙虫病东方体感染^[14]。徐琪毅等^[15]研究表明新疆伊犁地区农村居住儿童存在立克次体感染情况,人血清免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)抗体检测嗜吞噬细胞无形体、汉赛巴尔通体、莫氏立克次体及恙虫病东方体阳性,提示人们在进行野外活动时应注意这些致病菌的防范措施。本次调查未检测出嗜吞噬细胞无形体,李红雨等^[16]研究表明新疆部分地区的农林牧工作者中嗜吞噬细胞无形体特异性 IgG 抗体平均阳性率达 43.67%,刘莹莹等^[17]研究表明阿勒泰红山嘴口岸鼠类尤其是长尾黄鼠携带嗜吞噬细胞无形体,揭示了多种自然疫源性疾病在人和动物间传播的可能。

在对啮齿动物致病菌感染率的调查研究中,考虑到本次调查的常见鼠传致病菌侵袭器官包括脾脏和肾脏,因此选择脾脏和肾脏组织提取核酸进行检测。因问号钩端螺旋体一般在肾脏组织检出率较高。我们采用了脾脏和肾脏 2 种组织进行检测,肾脏未检出钩体而脾脏检出一例,组织特异性不明显。Deng 等^[18]实验研究显示巴尔通体在人工感染的小鼠脾脏组织中持续存在,所以选择脾脏组织进行巴尔通体体外培养,可以得到较高的阳性率。本研究采用巴尔通体分离培养作为一个指示方法,以此为对照去验证 qPCR 和 16S rRNA 基因测序结果的可行性和准确性。本研究共 11 只啮齿动物的脾脏组织体外培养出巴尔通体,对 11 份巴尔通体培养阳性的脾脏组织进行 qPCR 检测,结果均为巴尔通体阳性。66 份样品中 qPCR 检出巴尔通体阳性率(31.80%)高于巴尔通体分离培养的阳性率(16.67%)。巴尔通体生长缓慢,体外分离培养需要几天甚至数周时间,而 qPCR 有高灵敏度和高特异性,操作简便快速,相较于传统的细菌培养明显提高了检测时效。

本研究同时采用巴尔通体体外分离培养、qPCR 和 16S rRNA 基因测序(包括 Nanopore 测序与 Illumina 测序)多种检测方法,并比较这几种方法的灵敏度和特异性。3 种方法均检出巴尔通体,部分样品 16S rRNA 基因测序检出巴尔通体而 qPCR 检测为阴性。qPCR 检出 1 份恙虫病东方体和 2 份莫氏立克次体,未检出嗜吞噬细胞无形体,而 16S rRNA 基因 Illumina 测序检出 3 份立克次体属,4 份无形体属。表明 Illumina 测序是一种更敏感的致病菌检测方法,而 qPCR 存在只能检测特定的物种和对 DNA 拷贝数较低者可能无法检出的局限性。本研究中 Nanopore 测序与 Illumina 测序检测同样品得到的巴尔通体 reads 差异较大,与 Illumina 测序相比, Nanopore 测序片段长读长,并且可以将获得结果所需的时间减少到 24 h 以下,可用于啮齿动物脏器组织致病菌的直接、实时检出鉴定。Nanopore 测序还检测到了布鲁氏菌,该菌是布鲁氏菌病的致病菌,动物宿主多为牛、羊、猪和犬,啮齿动物带菌有研究报道但不多见^[19],应给予关注。此外,16S rRNA 基因测序分析比对出了大量菌群,包括很多环境微生物如根瘤菌属、草螺菌属等。如何判断其与样品的关系问题,以及众多背景细菌会干扰对结果的判断,需要结合样品的背景信息、临床、流行病学调查信息^[10]。

综上所述,qPCR 技术通过检测致病菌特异性基因片段来判断致病菌感染^[20],具有良好的灵敏度和特异度,操作简便、快速且污染少,但是受限于工作通量,只能进行一对一单病原体检测。细菌分离培养是诊断阳性动物感染的“金标准”,可作为对照方法验证 qPCR 技术的准确性。Illumina 测序技术是一种敏感、高通量的致病菌检测方法,可以获得接近实际情况的啮齿动物共生细菌类群^[21],其细菌 OTU 数远大

于应用荧光定量 PCR 检测的细菌种数,而且测序数据量还可以准确评估菌群的相对丰度,能够在参考综合数据库的情况下提供高分辨率的检测。纳米孔 MinION 测序仪便携、操作简单,实时数据的传输和分析可以为现场检测和病原监测工作提供便利^[10]。16S rRNA 基因测序也有其局限性,容易产生微生物污染影响测序结果^[22],数据量大,受限于参考数据库的准确性和全面性^[23],而且无法检测到种水平。在病原监测的实际应用中,16S rRNA 基因测序方法、qPCR 和细菌分离培养方法可互相补充,从而更全面地了解啮齿动物中鼠传致病菌携带情况。

REFERENCES

- [1] 栗冬梅,徐兆楠,朱彩英,张政,康央,张洪江,宋秀平,唐承军,葛军旗.应用 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 法调查北京市部分城郊区鼠传病原体流行状况[J].中国媒介生物学及控制杂志,2019,30(1): 12-17.
- LI DM, XU ZN, ZHU CY, ZHANG Z, KANG Y, ZHANG HJ, SONG XP, TANG CJ, GE JQ. An epidemiologic investigation of rodent-borne pathogens in some suburban areas of Beijing, China[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2019, 30(1): 12-17 (in Chinese).
- [2] 贵有军,崔燕,古丽阿依·包开西,王启果,李博,雒涛,黎唯.丝绸之路经济带建设中新疆鼠疫风险及防控对策[J].中国媒介生物学及控制杂志,2019,30(5): 593-596.
- GUI YJ, CUI Y, GULIAYI B, WANG QG, LI B, LUO T, LI W. The risk of plague and its prevention and control strategies in Xinjiang during the development of the Silk Road Economic Belt[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2019, 30(5): 593-596 (in Chinese).
- [3] 栗冬梅,徐爱玲,宋秀平,李庆多,康央,刘起勇.巴尔通体在自然感染的啮齿动物组织中的分布[J].中国媒介生物学及控制杂志,2021,32(2): 181-187.
- LI DM, XU AL, SONG XP, LI QD, KANG Y, LIU QY. *Bartonella* distribution in naturally infected rodent tissues[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2021, 32(2): 181-187 (in Chinese).
- [4] SCHLABERG R, CHIU CY, MILLER S, PROCOP GW, WEINSTOCK G. Professional Practice Committee and Committee on Laboratory Practices of the American Society for Microbiology, Microbiology Resource Committee of the College of American Pathologists. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2017, 141(6): 776-786.
- [5] GU W, MILLER S, CHIU CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. Annual Review of Pathology, 2019, 14: 319-338.
- [6] YOUSSEF N, SHEIK CS, KRUMHOLZ LR, NAJAR FZ, ROE BA, ELSHAHED MS. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [7] NORMAN AF, REGNERY R, JAMESON P, GREENE C, KRAUSE DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(7): 1797-1803.
- [8] ZENG YH, KOBLÍŽEK M, LI YX, LIU YP, FENG FY, JI JD, JIAN JC, WU ZH. Long PCR-RFLP of 16S-ITS-23S rRNA genes: a high-resolution molecular tool for bacterial genotyping[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 433-447.
- [9] GUPTA R, SHAH ND, ROSS JS. Generic drugs in the United States: policies to address pricing and competition[J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2019, 105(2): 329-337.
- [10] 栗冬梅,周若冰,李寿江,鲁亮,饶华祥,宋秀平,李庆多,刘起勇.纳米孔测序实时检测鼠传巴尔通体[J].中国媒介生物学及控制杂志,2021,32(4): 390-397.
- LI DM, ZHOU RB, LI SJ, LU L, RAO HX, SONG XP, LI QD, LIU QY. Real-time detection of rodent-borne *Bartonella* by nanopore sequencing[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2021, 32(4): 390-397 (in Chinese).
- [11] LOWELL JL, EISEN RJ, SCHOTTHOEFER AM, LIANG XC, MONTENIERI JA, DALE TD, PAPE J, SCHRIEFER ME, ANTOLIN MF, GAGE KL. Colorado animal-based plague surveillance systems: relationships between targeted animal species and prediction efficacy of areas at risk for humans[J]. Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology, 2009, 34(1): 22-31.

- [12] CHAORATTANAKAWEE S, WOFFORD RN, TAKHAMPUNYA R, KATHERINE POOLE-SMITH B, BOLDBAATAR B, LKHAGVATSEREN S, ALTANTOGTOKH D, MUSIH E, NYMADAWA P, DAVIDSON S, HERTZ J, FIORENZANO J, GRAY GC, von FRICKEN ME. Tracking tick-borne diseases in Mongolian livestock using next generation sequencing (NGS)[J]. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2022, 13(1): 101845.
- [13] 李博, 卢珊, 雒涛, 阿布力克木·阿布都热西提, 郝琴, 王信惠, 张琳, 古丽阿依·包开西, 黎唯. 新疆古尔图地区长尾黄鼠感染病原体情况调查[J]. *疾病监测*, 2020, 35(7): 623-626.
- LI B, LU S, LUO T, ABULIKEMU A, HAO Q, WANG XH, ZHANG L, GULIAYA B, LI W. Infection status of pathogens in *Citellus undulatus* in Guertu, Xinjiang[J]. *Disease Surveillance*, 2020, 35(7): 623-626 (in Chinese).
- [14] 吴光华. 我国恙虫病流行病学研究现状与展望[J]. *中华传染病杂志*, 2000, 18(2): 142-144.
- WU GH. Current situation and prospect of epidemiological research on scrub typhus in China[J]. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, 2000, 18(2): 142-144 (in Chinese).
- [15] 徐琪毅, 李宏英, 李飞, 杨国锋, 张丽娟. 新疆伊犁州农村儿童媒介传播立克次体病血清流行病学调查[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2016, 27(1): 58-60.
- XU QY, LI HY, LI F, YANG GF, ZHANG LJ. Serological investigation of vector born rickettsioses in agrarian children in Yili prefecture, Xinjiang Uygur Autonomous Region[J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2016, 27(1): 58-60 (in Chinese).
- [16] 李红雨, 赵姗姗, 张璘, 张科, 陈创夫, 王远志. 新疆北疆地区寄生蜱无形体和疏螺旋体分子流行病学调查[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2017, 35(1): 108-112.
- LI HY, ZHAO SS, ZHANG L, ZHANG K, CHEN CF, WANG YZ. Molecular investigation on the genera of *Anaplasma* and *Borrelia* in north region of Xinjiang[J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science Edition)*, 2017, 35(1): 108-112 (in Chinese).
- [17] 刘莹莹, 张晓龙, 田峰, 曹晓梅, 施琦, 李颖, 慈颖. 红山嘴口岸鼠类无形体和埃立克体检测及序列分析[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2022, 45(6): 457-459.
- LIU YY, ZHANG XL, TIAN F, CAO XM, SHI Q, LI Y, CI Y. Detection and sequences analysis of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in rodents at Hongshanzui port[J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 2022, 45(6): 457-459 (in Chinese).
- [18] DENG HK, Le RHUN D, LECUELLE B, Le NAOUR E, VAYSSIER-TAUSSAT M. Role of the spleen in *Bartonella* spp. infection[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 64(1): 143-145.
- [19] 武少卿, 刘日宏, 杨哲宇. 啮齿动物布鲁杆菌病的自然疫源性研究进展[J]. *疾病监测与控制*, 2015, 9(4): 246-247.
- WU SQ, LIU RH, YANG ZY. The research progress of the natural focus brucellosis of rodent[J]. *Journal of Diseases Monitor & Control*, 2015, 9(4): 246-247 (in Chinese).
- [20] MAURIN M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2012, 12(7): 731-754.
- [21] GALAN M, RAZZAUTI M, BARD E, BERNARD M, BROUAT C, CHARBONNEL N, DEHNE-GARCIA A, LOISEAU A, TATARD C, TAMISIER L, VAYSSIER-TAUSSAT M, VIGNES H, COSSON JF. 16S rRNA amplicon sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife[J]. *mSystems*, 2016, 1(4): e00032-e00016.
- [22] SALTER SJ, COX MJ, TUREK EM, CALUS ST, COOKSON WO, MOFFATT MF, TURNER P, PARKHILL J, LOMAN NJ, WALKER AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses[J]. *BMC Biology*, 2014, 12: 87.
- [23] COUPER L, SWEI A. Tick microbiome characterization by next-generation 16S rRNA amplicon sequencing[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2018, 2018(138): 58239.