

# 伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 和 *ospA* 基因 在浙江省鼠标本检测中的应用

姜理平<sup>1</sup>, 韦亦成<sup>2</sup>, 张磊<sup>1</sup>, 应凯满<sup>2</sup>, 占利<sup>1</sup>, 陆群英<sup>1</sup>

1 浙江省疾病预防控制中心病原微生物所, 杭州 310051; 2 磐安县疾病预防控制中心

**摘要:** 目的 探索 5S~23S rRNA 和 *ospA* 基因序列在伯氏疏螺旋体检测中的应用, 了解浙江省鼠中感染伯氏疏螺旋体状况。方法 用 PCR 方法, 检测磐安县 100 只鼠标本中 5S~23S rRNA 和 *ospA* 基因特异片段。对检测到的阳性结果进行测序。结果 检测 100 只鼠标本, 其中 3 只鼠标本伯氏疏螺旋体的 5S~23S rRNA 基因片段为阳性, 5 只鼠标本伯氏疏螺旋体的 *ospA* 基因片段为阳性, 与参考核酸序列基本一致。结论 利用 *ospA* 和 5S~23S rRNA 基因能从标本中检测到伯氏疏螺旋体。

**关键词:** 伯氏疏螺旋体; *ospA* 基因; 5S~23S rRNA 基因; 聚合酶链反应

中图分类号: R377; S443 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)03-0249-05

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.03.015

## Application of 5S-23S rRNA and *ospA* genes in PCR-based detection of *Borrelia burgdorferi* in rodent samples of Zhejiang province, China

JIANG Li-ping<sup>1</sup>, WEI Yi-cheng<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, YING Kai-man<sup>2</sup>, ZHAN Li<sup>1</sup>, LU Qun-ying<sup>1</sup>

1 Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, Zhejiang Province, China;

2 Pan'an Center for Disease Control and Prevention

**Abstract: Objective** To evaluate the application of 5S-23S rRNA and outer *ospA* genes in PCR-based detection of *Borrelia burgdorferi* and to investigate the infection with *B. burgdorferi* in rodents of Zhejiang province, China. **Methods** PCR was used to amplify 5S-23S rRNA and *ospA* gene fragments from 100 mice collected from different areas of Pan'an county. PCR products were purified and sequenced. **Results** Of the 100 mice investigated, 3 were positive for 5S-23S rRNA gene of *B. burgdorferi* and 5 for *ospA* gene of *B. burgdorferi*. The sequences of PCR products were found with high homology to the reference genes.

**Conclusion** *B. burgdorferi* can be detected from rodent samples by PCR amplification of 5S-23S rRNA and *ospA* genes.

**Key words:** *Borrelia burgdorferi*; *ospA* gene; 5S-23S rRNA gene; Polymerase chain reaction

我国于 1985 年首次证实黑龙江省林区有莱姆病, 之后在吉林、内蒙古、新疆、青海及福建省(自治区)均有病例发现<sup>[1]</sup>。陆续报道的病原有狭义伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi sensu stricto*)、伽氏疏螺旋体(*B. garinii*)、阿氏疏螺旋体(*B. afzelii*)和法雷斯疏螺旋体(*B. valaisianci*), 共 4 个基因型。已证实莱姆病在我国分布相当广泛, 临床表现复杂多样, 每年新发病例高达上万例, 对居民健康危害严重。早在 1987 年就在浙江省丽水市发现 1 例莱姆病病例<sup>[2]</sup>, 但未做莱姆病系统调查。浙江省 2005 年开展野生动物莱姆病感染调查以来, 针对 5S~23S rRNA 间隔区域设计的引物分别从蜱和鼠中检出伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*) DNA 片段。外膜蛋白 A(OspA)存在于 90% 伯氏疏螺旋体株,

作者简介: 姜理平, 男, 主任技师, 从事自然疫源性疾病预防研究。

Email: jlp1964@126.com

人感染伯氏疏螺旋体 2~4 周后, 体内可出现抗 OspA 特异性抗体, 持续数月至数年, 且 OspA 与其他种属微生物如梅毒螺旋体、赫氏疏螺旋体和钩端螺旋体等交叉反应性较低。为了解浙江省伯氏疏螺旋体在鼠中的感染状况, 于 2012 年夏季在浙江省磐安县九和乡开展调查, 现将结果报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 TaKaRa DNA 提取试剂盒、PCR 扩增反应体系(水、dNTP、10×buffer Taq DNA 聚合酶引物、DNA 模板)、100 bp Ladder Marker、琼脂糖、TAE 溶液等, 均由宝生物工程(大连)有限公司提供。

1.1.2 主要仪器 Thermo Forma Class II 生物安全柜, Thermo 电子公司, 型号: 1285USA; PMC-880 小型离心

机, TOMY 公司; 0.2~2、2~20、10~100、20~200、100~1000  $\mu\text{l}$  加样器, 德国 Eppendorf 公司; 超低温冰箱 -40  $^{\circ}\text{C}$ , Sanyo 公司; PL1502 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Mode 1 Mastercycler gradient PCR 扩增仪, Eppendorf 公司, 型号: AG 22339; 恒压恒流水电泳仪, 杭州博日生物技术公司; DKB-501A 型超级恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; 全自动紫外与可见分析装置, 型号 FR-200A, 上海复日科技有限公司; 高速离心机, 型号: Allegra™ X-22R, BECKMAN 公司。

1.1.3 标本来源 鼠肝、脾标本, 取样于浙江省金华市磐安县。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 2012 年 9 月 6—10 日在浙江省金华市磐安县九和乡采用夹夜法捕获鼠类, 每样点 100 $\times$ 2 夹次, 按 5 m 距离布放鼠夹, 晚放晨收, 捕鼠 100 只。现场鉴定鼠种后, 将捕获鼠放入塑料桶内, 用乙醚麻醉, 在无菌环境下操作, 取鼠肝、脾, 于 -40  $^{\circ}\text{C}$  保存待用。

1.2.2 鼠标本中 DNA 的提取 将鼠肝、脾取出放入事先预冷的研磨器中, 按照 TaKaRa DNA 提取试剂盒, 进行 DNA 的提取。提取后置 -40  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 利用针对 *ospA* 和 5S~23S rRNA 基因的引物进行 PCR 扩增, 每次扩增均设立空白(水)对照。引物序列及其相应扩增条件见表 1。

表 1 2 种引物及其反应条件  
Table 1 Two sets of primers and reaction conditions

目的片段	序列(5'~3')	PCR 反应条件					
		产物大小 (bp)	变性 ( $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ )	退火 ( $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ )	延伸 ( $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ )	循环数 (次)	延伸 ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
<i>ospA</i>	外 1: TTGGAATAGTCTAATATTAGC	201	95/15	52/30	72/90	50	72/7
	2: TTTAAAACCTCTTTAGCTTTTCC						
5S~23S rRNA	内 1: CGTTTCAGTAGATTTACCTGG	245	94/30	59/30	72/30	35	72/7
	2: ACTAATGTTTTGCCATCTTCT						
5S~23S rRNA	外 1: CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC	245	94/30	55/30	72/30	35	72/7
	2: TAAGCTGACTAATACTAATTACCC						
	内 1: TCCTAGGCATTCACCATA						
	2: CTGCGAGTTCGCGGGAGA						

*ospA*: 第 1 轮反应体系, 10 $\times$  buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ , dNTPs(各 2.5 mmol/L) 2.0  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , 引物外 1(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 引物外 2(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 模板 6  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{l}$ , 总体积 25  $\mu\text{l}$ 。第 2 轮反应体系, 10 $\times$  buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ , dNTPs(各 2.5 mmol/L) 2.0  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , 引物内 1 (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 引物内 2(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 模板 3  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 13.5  $\mu\text{l}$ , 总体积 25  $\mu\text{l}$ 。

5S~23S rRNA: 第 1 轮反应体系, 10 $\times$  buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ , dNTPs(各 2.5 mmol/L) 2.0  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , 引物外 1(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 引物外 2(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 模板 6  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{l}$ , 总体积 25  $\mu\text{l}$ 。第 2 轮反应体系, 10 $\times$  buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ , dNTPs(各 2.5 mmol/L) 2.0  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , 引物内 1(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 引物内 2(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 模板 3  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 13.5  $\mu\text{l}$ , 总体积 25  $\mu\text{l}$ 。

体系配制好后充分离心, 然后在各自相应的条件下(表 1)用 Eppendorf AG PCR 仪进行 PCR 扩增。

1.2.4 琼脂糖凝胶制备 称取 0.75 g 琼脂糖置于锥形瓶中, 加入 50 ml 1 $\times$ TAE, 放入微波炉中加热至琼脂糖全部融化成透明状, 摇匀, 即成 1.5% 琼脂糖凝胶液。

将制胶板洗净, 晾干, 放入制胶槽, 并在固定位置放好梳子。将琼脂糖胶液冷却到 65  $^{\circ}\text{C}$  左右后加入浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溴化乙锭 7  $\mu\text{l}$ , 混匀, 小心地倒入内槽玻璃板上, 使胶液缓慢展开, 直至整个玻璃板表面形成均匀胶层。室温下静置直至凝胶完全凝固, 垂直轻拔梳子, 取下胶带, 将凝胶及内槽放入电泳槽中, 添加 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液至没过胶板为止。

1.2.5 电泳 6  $\mu\text{l}$  PCR 产物加 2  $\mu\text{l}$  6 $\times$  loading buffer 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。电压: 100 V。电泳缓冲液: 0.5 $\times$ TBE [44.5 mmol/L Tris borate, 1 mmol/L EDTA (pH 值 8.3)]。Marker: 100 bp Ladder Marker。电泳完成后, 用紫外凝胶成像仪摄像。

1.2.6 核酸序列测定 每个扩增到可疑片段的样本, 送终产物 50  $\mu\text{l}$ 、内外引物各 20  $\mu\text{l}$  至上海生工生物工程股份有限公司, 运用 Applied Biosystems 3730 型测序仪进行序列测定。*ospA* 基因检测出的阳性样本号为 3、41、42、44、48; 5S~23S rRNA 基因检测出的阳性样本号为 3、41、42。

1.2.7 序列分析 采用 Chromas 2 软件对所测序列进行拼接, 将测序所得结果与 GenBank 中注册的伯氏疏螺旋体相应基因片段进行比较, 筛选出相应地域和相

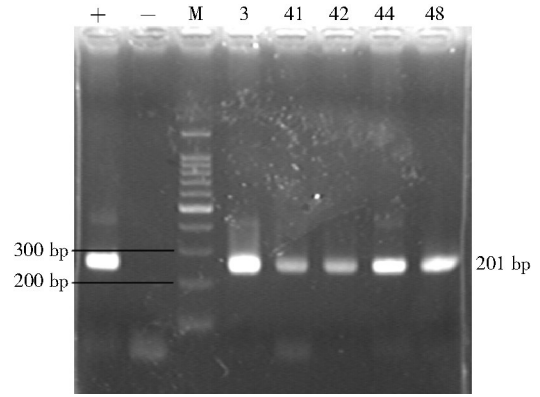
似的基因片段,最后用Mega 4.0软件构建进化树。

## 2 结果

2.1 鼠分类情况 捕获的100只鼠中,其中黄毛鼠(*Rattus losea*)5只,黄胸鼠(*R. tanezumi*)11只,北社鼠(*Niviventer confucianus*)18只,针毛鼠(*N. fulvescens*)2只,青毛鼠(*R. bowersi*)16只,褐家鼠(*R. norvegicus*)15只,白腹巨鼠(*R. edwardsi*)33只,分别占捕获总数的5.0%、11.0%、18.0%、2.0%、16.0%、15.0%和33.0%,白腹巨鼠为优势鼠种。

2.2 莱姆病检测 在无菌环境下取100只鼠肝和脾, TaKaRa DNA提取试剂盒提取鼠肝、脾DNA后,用PCR方法对鼠标本的*ospA*和5S~23S rRNA基因片段进行检测和电泳鉴定。5只鼠标本伯氏疏螺旋体的*ospA*基因片段为阳性(图1),其中北社鼠检出阳性3只,黄胸鼠和白腹巨鼠各1只;5S~23S rRNA间隔基因片段检出阳性3只(图2),其中北社鼠检出阳性2只,黄胸鼠检出1只。经 $\chi^2$ 检验,二者差异无统计学意义( $\chi^2=0.130, P>0.05$ )。

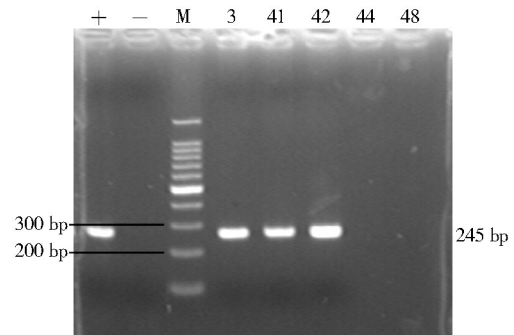
2.3 阳性标本核苷酸序列比对 *ospA*基因阳性序列片段比对结果见图3。从5份(标本序号分别为3、41、42、44、48)鼠肝、脾标本中扩增到的伯氏疏螺旋体*ospA*基因片段序列,分别命名为China-zhejiang1、China-zhejiang2、China-zhejiang3、China-zhejiang4、China-zhejiang5。



注:“+”阳性对照;“-”阴性对照;M. 100 bp Ladder Marker。

图1 *ospA*基因PCR结果(201 bp)

Figure 1 PCR results of *ospA* gene amplification (201 bp)



注:“+”阳性对照;“-”阴性对照;M. 100 bp Ladder Marker。

图2 5S~23S rRNA基因PCR结果(245 bp)

Figure 2 PCR results of 5S~23S rRNA gene amplification (245 bp)

Domain=Data property=Coding CodonStart=1;

China-zhejiang1	TTG	AAA	GTT	TCA	AAT	GTG	GTT	TTG	TTT	AGA	TCA	TCA	GAA	ATT	GTT	AAT	TTT	ACT	TTA	CTT
China-zhejiang2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang4	...	...	...	...	---	---	...	...	C.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang5	...	...	...	...	...	...	...	...	C.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang1	TTG	TCA	TCT	TTC	ACG	CCT	TCA	AGC	ATT	CCA	GAT	CCA	TTG	TTT	TTA	TCA	GAA	GTT	CCT	TTA
China-zhejiang2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang1	AGC	TCA	ACT	TTG	TCT	ACT	GTT	GCC	ATT	AGA	CTG	TAT	TTA	CCG	TCT	TTA	TCT	TTT	TCT	TTG
China-zhejiang2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	--C
China-zhejiang3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	--C
China-zhejiang4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A	...	...	...	...	...
China-zhejiang5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A	...	...	...	...	--C
China-zhejiang1	CTT	ACA	AGA	ACT	TTC	ATT	TCG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang2	..-	...	...	...	...	...	..K.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang3	..-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
China-zhejiang5	..-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

*ospA*基因阳性序列片段比对结果

```

Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
China-zhejiang1 GAC TCT TAT TAT TTG CCA TAT TTT TAT CTT C-A TCT CTA TTT TGC CAA TTT GTT TAT ACA
China-zhejiang2 ... ..C ..T GAC ... ..C.
China-zhejiang3 ... ..A.. ..C.

China-zhejiang1 ACA TAA AAT AAT ATA TAT CTT TGT TCA ATC CAT GTC AAT ATC TAT TTT ATT TTT TAC ATT
China-zhejiang2 ... ..
China-zhejiang3 ... ..

China-zhejiang1 ATT TGA ATT AAA TAT TCA AAA ACA TGA ATA TTT AAA AAA CAT AAA AAA TAA ATT AAG GTT
China-zhejiang2 ... ..
China-zhejiang3 ... ..

China-zhejiang1 GAA GTA CAA A-T AAA AAC CCT GGC AAT AAC TTA C
China-zhejiang2 ... ..A. ... TGC --- -.
China-zhejiang3 ... ..A. ... .

```

5S~23S rRNA 基因阳性序列片段比对结果

图3 阳性结果序列比对分析

Figure 3 Sequence alignment analysis of positive results

*ospA* 基因片段阳性序列比对,以 China-zhejiang1 为标准,在第 11、16、17、18 个碱基处 China-zhejiang4 的碱基缺失;在第 25 个碱基处 China-zhejiang4、China-zhejiang5 把 T 替换成了 C;在第 40 个碱基处 China-zhejiang4 碱基缺失;在第 162 个碱基处 China-zhejiang4、China-zhejiang5 把 G 替换成了 A;在第 174 个碱基处 China-zhejiang5 碱基缺失;在第 175、176 个碱基处,China-zhejiang2、China-zhejiang3、China-zhejiang5 碱基缺失;在第 177 个碱基处 China-zhejiang2、China-zhejiang3、China-zhejiang5 把 T 替换成了 C;在第 183 个碱基处,China-zhejiang2、China-zhejiang3、China-zhejiang5 碱基缺失。在第 194 个碱基处 China-zhejiang2 把 T 替换成了 K(K 为简并碱基)。

5S~23S rRNA 基因阳性序列片段比对结果见图 3。从 3 份(标本序号分别为 3、41、42)鼠肝、脾标本中扩增到的伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 基因片段序列,分别命名为 China-zhejiang1、China-zhejiang2、China-zhejiang3。5S~23S rRNA 基因片段阳性序列比对,以 China-zhejiang1 为标准,在第 12 个碱基处,China-zhejiang2 把 T 替换成了 C;在第 15 个碱基处,China-zhejiang2 把 G 替换成了 T;在第 16 个碱基处,China-zhejiang2 把 C 替换成了 G,China-zhejiang3 把 C 替换成了 A;在第 17 个碱基处,China-zhejiang2 把 C 替换成了 A;在第 18 个碱基处,China-zhejiang2 把 A 替换成了 C;在第 32 个碱基处,China-zhejiang2、China-zhejiang3 把缺失碱基替换成了 C;在第 191 个碱基处,China-zhejiang2、China-zhejiang3 把缺失碱基替换成了 A;在第 199~201 个碱基处,China-zhejiang2 把 CCT 替换成了 TGC,第 202~205 个碱基缺失。

2.4 核苷酸序列分析 采用 Mega 4.0 软件对所获得

的 *ospA* 序列片段和 5S~23S rRNA 序列片段进行比对及进化分析。基于 *ospA* 序列片段比对,平均遗传距离为 0.02(图 4)。5S~23S rRNA 序列片段比对,平均遗传距离为 0.01。序列保守存在于各伯氏疏螺旋体菌株中(图 4)。

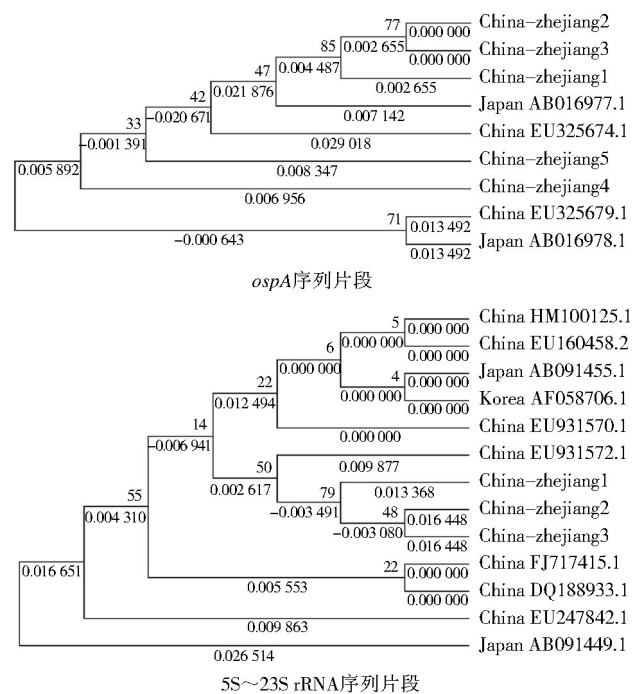


图4 阳性结果进化关系分析

Figure 4 Phylogenetic analysis of positive results

所获得的 5 条 *ospA* 基因阳性序列片段与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行同源性比较,China-zhejiang1、China-zhejiang2、China-zhejiang3 均与 Masuzawa 等<sup>[3]</sup>发现的 Japan AB016977.1 高度相似。所获得的 3 条 5S~23S rRNA 基因阳性序列片段与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行同源性比较,3 条序列均与 China EU931572.1 高度相似<sup>[4]</sup>。China EU931572.1 根据限制



性片段长度多态性分析和序列分析,属于法雷斯疏螺旋体,具体分类为*B. valaisiana*-related group。

### 3 讨论

3.1 可疑宿主分析 传播媒介的宿主动物较多,包括鼠、兔、狼、鹿、鸟、蜥蜴等野生脊椎动物及犬、马、牛等家畜,我国已从黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)、大林姬鼠(*A. speciosus*)、小林姬鼠(*A. sylvaticus*)、棕背鼯(*Clethrionomys rufocanus*)、花鼠(*Eutamias sibiricus*)、普通田鼠(*Microtus arvalis*)、白腹鼠、白腹巨鼠(*R. edwardsi*)、北社鼠、黄毛鼠、褐家鼠和华南兔(*Caprolagus sinensis*)等啮齿动物中分离到伯氏疏螺旋体,从自然种群数量和感染率分析,我国北方莱姆病主要贮存宿主可能是姬鼠类和*Clethrionomys*类,褐家鼠在城市中作为莱姆病贮存宿主的能力已引起重视。另外还从黑线姬鼠和白腹巨鼠胚胎中分离出莱姆病病原体,表明垂直传播是疫源地得以维持的重要方式之一。在南方,姬鼠可能是主要储存宿主。浙江省金华市金东区也分别在黄毛鼠、姬鼠、臭鼯中检出阳性12份,阳性率分别为7.50%、1.43%和25.00%<sup>[5]</sup>。本研究在磐安县捕鼠100只,白腹巨鼠为优势种,占捕获总数的33.00%。*ospA*基因PCR方法检测到黄胸鼠、白腹巨鼠各1只、北社鼠3只,有*OspA*核酸片段。5S~23S rRNA基因PCR方法检测到黄胸鼠1只、北社鼠2只,有5S~23S rRNA核酸片段,提示北社鼠、白腹巨鼠和黄胸鼠可能为浙江省中部莱姆病的宿主。

3.2 检测结果数据分析 在100份样本中*ospA*基因PCR方法检测到阳性5份,阳性率为5.0%;5S~23S rRNA基因PCR方法检测到阳性3份,阳性率为3.0%。2种基因片段检测伯氏疏螺旋体核酸片段差异无统计学意义,均可用于鼠类中伯氏疏螺旋体流行病学调查及基因分析。发现的5条*ospA*核苷酸序列片段中,China-zhejiang1、China-zhejiang2、China-zhejiang3阳性序列均与Japan AB016977.1高度相似,且China-zhejiang2、China-zhejiang3的序列完全一致;China-zhejiang4、China-zhejiang5与China EU325674.1最为相似。China EU325674.1通过使用多位点序列分析,5只啮齿类动物和扁虱中的伯氏疏螺旋体株均为*valaisiana*-related。最终浙江省西南部伯氏疏螺旋体菌株被分类为一个新的基因种伯氏疏螺旋体,而不是

*B. valaisiana*。这一发现解释了欧洲*B. valaisiana*和东亚*B. valaisiana*-related之间传播差异和表型差异<sup>[6]</sup>。5S~23S rRNA基因间隔区是高变区,积累了较多的型间变异,这一片段分析快速简便,已广泛用于伯氏疏螺旋体的基因分型<sup>[7]</sup>。China-zhejiang1、China-zhejiang2、China-zhejiang3样本用5S~23S rRNA PCR检测也获得核苷酸序列片段,但3条序列均与China EU931572.1高度相似。

3.3 采取的针对性预防措施 浙江省山地和丘陵占70.4%,动物宿主和媒介种类繁多。本次调查地区保持很好的原始地貌,森林茂密,尚未开发,外来人员很少。当地卫生院反映本地居民偶有类似莱姆病症状病例,但无相应的实验室确诊手段,应加强检测。该病的预防主要是进入森林、草地等疫区的人员要做好个人防护,防止硬蜱叮咬。若被蜱叮咬于24 h内给予预防性使用抗生素,可以防止感染。近年来重组外表脂蛋白A莱姆病疫苗对莱姆病流行区人群进行预防注射取得良好效果。最近开发的伯氏疏螺旋体N40多抗原疫苗在动物实验中得到针对多种抗原持久的免疫作用,有待应用于临床<sup>[8]</sup>。

### 参考文献

- [1] 全彩玲,李培英,周金林. 莱姆病诊断技术研究进展[J]. 中国动物传染病学报,2009,17(3):76.
- [2] 陈永金,张智德,叶楣进. 莱姆病例报告[J]. 浙江预防医学与疾病监测,1992,4(3):2.
- [3] Masuzawa T, Fukui T, Miyake M, et al. Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from *Ixodes nipponensis* in Korea as *Borrelia valaisiana* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1999 (4) : 1409-1415.
- [4] Chu CY, Liu W, Jiang BG, et al. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in Southwestern China [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9):3130-3133.
- [5] 姜理平,郑寿贵,莫世华,等. 浙江省在鼠形动物中检测到伯氏疏螺旋体[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2008,19(5):461-463.
- [6] Chu CY, Jiang BG, Qiu EC, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in sheep keds (*Melophagus ovinus*), Tibet, China [J]. J Vet Microbiol, 2011, 49(3):526-529.
- [7] 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 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(9):817-818.
- [8] 窦晓光. 传染病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:255-259.

收稿日期:2013-12-26