

DOI:10.13350/j.cjpb.230405

• 论著 •

# 2021年贵州省环境致病性钩端螺旋体 分离培养及基因种分析\*

营夏<sup>1,2</sup>, 刘英<sup>2</sup>, 姚光海<sup>2</sup>, 周敬祝<sup>2</sup>, 王丹<sup>2</sup>, 谭勤琴<sup>1,2</sup>, 杨幸贵<sup>2</sup>, 胡勇<sup>1</sup>, 张翠彩<sup>3\*\*</sup>, 李世军<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州贵阳 550025;

2. 贵州省疾病预防控制中心; 3. 中国疾病预防控制中心传染病控制所)

**【摘要】** 目的 对贵州省2021年钩端螺旋体(钩体)病疫区环境标本进行致病性钩体分离培养, 了解其基因种特征, 为钩体病防控提供科学依据。方法 采集钩体病疫情发生地环境水和土壤样品, 采用EMJH培养基进行钩体分离培养。提取疑似钩体生长培养物基因组DNA, 采用致病性钩体特异性PCR进行检测, 同时采用16S rRNA序列分析法对其进行基因种鉴定, 并应用MEGA 7.0软件构建系统发育树, 分析菌株间进化关系。结果 从112份环境样品中分离出50株疑似钩体菌株, 致病性钩体特异性PCR检测显示其中3株为致病性钩体, 包含环境水样分离出的2株和土壤样品中分离出的1株。16S rRNA序列比对分析显示, 经PCR检测为致病性钩体的3株菌株属于钩体致病性基因种, 其中2株为*Leptospira noguchii*基因种, 1株为*Leptospira borgpetersenii*基因种; 另外47株菌株中5株菌株属于钩体中间种, 42株菌株属于钩体非致病性基因种。系统发育树显示, 致病性钩体菌株与其基因种代表性菌株进化关系较近。

**结论** 贵州省钩体病疫区环境钩体基因种复杂, 同时存在致病性基因种和非致病性基因种, 本次检出的2种致病性钩体基因种为贵州省尚未报道的基因种, 可为贵州省钩体病疫情防控提供科学依据。

**【关键词】** 钩端螺旋体; 环境; PCR; 16S rRNA; 基因种

**【中图分类号】** R377.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)04-0395-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Apr;18(4):395-399.]

## Culture and genospecies analysis of pathogenic *Leptospira* in leptospirosis epidemic areas in Guizhou Province in 2021

YING Xia<sup>1,2</sup>, LIU Ying<sup>2</sup>, YAO Guang-hai<sup>2</sup>, ZHOU Jing-zhu<sup>2</sup>, WANG Dan<sup>2</sup>, TAN Qin-qin<sup>1,2</sup>, YANG Xing-gui<sup>2</sup>, HU Yong<sup>1</sup>, ZHANG Cui-cai<sup>3</sup>, LI Shi-jun<sup>1,2</sup> (1. School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou provincial Center for Disease Control and Prevention; 3. National Institute for Communicable, Center for Disease Control and Prevention of China) \*\*

**【Abstract】** **Objective** In order to provide scientific basis for the control and prevention of leptospirosis, the *Leptospira* in the environment in leptospirosis epidemic area of Guizhou province in 2021 was investigated. **Methods** Water and soil samples that may be contaminated with *Leptospira* were collected from leptospirosis epidemic areas and culture-biotechnical assays were performed by applying EMJH medium containing 5-fluorouracil. Genomic DNA of the suspected *Leptospira* growth cultures was extracted and detected by pathogenic leptospirosis specific PCR, and then nearly full length of 16S rRNA gene of the cultures were amplified with PCR and subsequently sequenced. Phylogenetic tree were constructed by MEGA 7.0 software to demonstrate the evolutionary relationship between the isolates and the representative strains of *Leptospira* genospecies. **Results** A total of 50 suspected strains of *Leptospira* isolated from 112 samples, of which 3 strains were identified as pathogenic *Leptospira*, and the rate of isolating pathogenic *Leptospira* from environmental samples was 2.68%. The 3 pathogenic *Leptospira* strains isolated include 2 strains isolated from the environmental water samples and 1 strain isolated from the soil samples. Three strains of pathogenic *Leptospira* were identified as pathogenic genospecies *Leptospira*, with 2 strains being *Leptospira noguchii* genospecies and 1 strain being *Leptospira borgpetersenii* genospecies by the 16S rRNA gene assay. Among the other 47 strains, 5 strains belonged to the intermediate genospecies of *Leptospira*, and 42 strains belonged to the non-pathogenic genospecies of *Leptospira*. The clustering relationship between most of isolates and their genospecies representative strains was close. **Conclusion** The

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81960622); 贵州省传染病人才培养基地建设项目子项目(No. RCJD2102)。

\*\* **【通讯作者】** 李世军, E-mail: zjmedjun@163.com; 张翠彩, E-mail: zhangguicai@163.com

**【作者简介】** 营夏(1994-), 男, 安徽宿州人, 在读硕士, 公共卫生, 主要从事病原微生物研究。E-mail: 569759997@qq.com

genospecies of *Leptospira* in environmental leptospirosis epidemic areas in Guizhou Province are complex, with both pathogenic genospecies and non-pathogenic genospecies. The 2 pathogenic *Leptospira* genospecies detected are unreported gene species in Guizhou Province, which can provide scientific basis for the prevention and control of leptospirosis epidemic in Guizhou Province.

**【Key words】** *Leptospira*; environment; PCR; 16S rRNA; genospecies

钩端螺旋体(简称钩体)分为致病性钩体和非致病性钩体两大类,由致病性钩体感染引起的钩体病是全球主要的人畜共患病之一,该疾病对人类健康危害的严重程度甚至超过革登热和狂犬病等<sup>[1]</sup>。据统计,全球每年约有100万钩体病人,其中约6万病人死于该疾病,我国也是钩体病流行主要疫区之一<sup>[2-3]</sup>。钩体病患者通常表现为一种以肌痛和头痛为特征的非特异性的急性发热症状;部分病例症状较重,出现肺出血综合征,死亡率高达50%以上<sup>[4]</sup>。除人类宿主外,致病性钩体还可感染多种动物,包括家养哺乳动物(家畜)和野生动物,特别是啮齿动物<sup>[5-7]</sup>。致病性钩体栖息在宿主的肾小管中,可随尿液排出到环境中,人类可通过直接接触受感染动物尿液或受感染动物尿液污染的水和土壤而被感染<sup>[5,8]</sup>。越来越多的研究表明,钩体能够在潮湿的土壤和淡水中存活数周<sup>[9]</sup>,气候和环境等因素对钩体病的传播有重要影响<sup>[8,10]</sup>,环境介导的钩体病感染被认为是该病传播给人类的主要来源<sup>[11]</sup>。

近十年来,虽然贵州省钩体病的发病率有所降低,但散发和局部暴发疫情及死亡病例时有发生,特别是钩体病高发季节,发病率高于全国平均水平,在一定程度上威胁着当地居民的健康<sup>[12-13]</sup>。本研究选择2021年有钩体病例报告的江口县、松桃县、锦屏县、黎平县和天柱县作为采样点,采集钩体病疫情发生地的水和土壤样本进行钩体分离培养,并对培养物进行16S rRNA分型,初步探讨贵州省钩体病疫情发生地环境中致病性钩体基因种特征,为贵州省钩体病的预防和控制提供科学依据。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 主要仪器** 低温恒温恒湿培养箱为德国 Binder 公司产品;生物安全柜为美国 Thermo 公司产品;7500 Fast 实时荧光定量 PCR 系统为美国 Applied Biosystems 公司产品;PCR 扩增仪为德国 Biometra 公司产品;电泳仪和凝胶成像仪为美国 BIO-RAD 公司产品;台式高速冷冻离心机为德国 SiGma 公司产品。

**1.2 主要试剂** 细菌基因组 DNA 提取试剂盒为北京索莱宝公司产品;EMJH 培养基为美国 BD 公司产品;Premix Taq 和 2 000 bp DNA Marker 为日本

TAKARA 公司产品。PCR 引物由天一辉远生物科技有限公司合成。

### 2 方法

**2.1 样品采集与钩体的分离培养** 选取贵州省近两年钩体病高发地区钩体宿主动物活跃区域为采样点,按照参考文献<sup>[14]</sup>的方法采集可能被宿主动物尿液污染的稻田、河流、池塘等水样标本 50 mL,采用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤 2 mL 水样接种于 8 mL 含浓度为 100 μg/mL 五氟尿嘧啶的 EMJH 培养基中,每份水样接种 2 管培养基,置 28 °C 培养。每隔 5~7 d 置于暗视野显微镜下观察有无疑似钩体生长;若有生长,转接新的 EMJH 培养基,培养 5~7 d,用于鉴定;若未见生长,需继续培养,60 d 后仍不见钩体生长为阴性。

采集可能被宿主动物尿液污染的稻田、鼠穴周边等环境土壤 50 g,取 25 g 加 PBS 混匀,静置后取上清液 2 mL,采用 0.22 μm 滤膜过滤接种于 8 mL 含浓度为 100 μg/mL 五氟尿嘧啶的 EMJH 培养基中,置 28 °C 培养。每隔 5~7 d 置于暗视野显微镜下观察有无疑似钩体生长;若有生长,转接新的 EMJH 培养基,培养 5~7 d,用于鉴定;若未见生长,需继续培养,60 d 后仍不见钩体生长为阴性。

**2.2 基因组 DNA 提取** 参照 DNA 提取试剂盒说明书,对培养物进行基因组 DNA 制备,置-20 °C 保存。

**2.3 致病性钩体特异性 PCR 检测** 选用参考文献<sup>[15]</sup>使用的引物对提取的培养物核酸进行 PCR 扩增,引物序列信息见表 1。PCR 反应体系(20 μL):Premix EX Taq 10 μL,ROX Reference Dye(50×)0.4 μL,上、下游引物各 0.4 μL,探针 0.8 μL,DNA 模板 2 μL,补无酶无菌水至 20 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火和延伸 1 min,在延伸阶段进行单点荧光检测,扩增 40 个循环。每次扩增设置致病性钩体标准株核酸为阳性对照,超纯水为阴性对照。引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物  
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
Lep-F	CCCGCGTCCGATTAG
Lep-R	TCCATTGTGGCCGRACAC
Lep-P	FAM-CTCACCAAGCGACGATCGGTAGC-BHQ1
16S-fd1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S-rp2	CCCGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT

**2.4 基因种鉴定** 选用参考文献[16]使用的引物对提取的分离株核酸进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。PCR 反应体系(50  $\mu$ L):PreMix Taq 25  $\mu$ L,上、下游引物各 2  $\mu$ L,DNA 模板 2  $\mu$ L,补无酶无菌水至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 15 s,50  $^{\circ}$ C 退火 5 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,扩增 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行验证(110 V,30 min),经 DNA green 染色后于凝胶成像系统观察检测结果。PCR 产物送天一辉远生物科技有限公司双向测序,测序结果输入 NCBI 网站(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行同源性分析,确定各分离株基因种。

**2.5 序列分析** 应用 MEGA 7.0 软件对各钩体分离株 16S rRNA 基因序列以及从 NCBI 数据库下载的钩体各基因种代表性菌株 16S rRNA 基因序列<sup>[17]</sup> 进行聚类分析,以邻接法构建系统发育树,分析菌株间的进化关系。

## 结 果

### 1 钩体的分离培养与致病性钩体特异性 PCR 鉴定

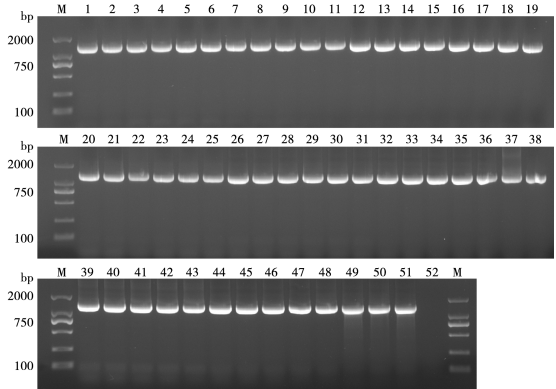
共采集环境水样 59 份,环境土壤样本 53 份,经 60 d 分离培养,共分离出 50 株钩体菌株,分离阳性率 44.64%。其中水样分离培养出 34 株,分离阳性率 57.63%;土壤样品分离培养出 16 株,分离阳性率 30.19%。经鉴定共分离培养出 3 株致病性钩体,致病性钩体分离阳性率为 2.68%。其中,水样分离出 2 株(21JK17、21JK18),致病性钩体分离阳性率为 3.39%;土壤样品分离培养出 1 株(21ST40),致病性钩体分离阳性率为 1.89%(表 2)。

表 2 贵州省钩体病疫区环境样分离培养结果  
Table 2 Culture results of environmental samples from leptospirosis epidemic areas in Guizhou Province

样品类型 Sample type	样品来源 Source of sample	样品量/份 Sample size	分离菌株数/份 Number of the isolates	分离率 (%) Separation rate	致病性钩体菌株数/份 Number of pathogenic <i>Leptospira</i>	致病性钩体分离率 (%) Separation rate of pathogenic <i>Leptospira</i>
水样	江口	17	14	82.35	2	11.76
	松桃	12	9	75.00	0	0.00
	锦屏	10	0	0.00	0	0.00
	黎平	15	8	53.33	0	0.00
	榕江	5	3	60.00	0	0.00
	小计	59	34	57.63	2	3.39
土壤	江口	17	6	35.29	0	0.00
	松桃	10	3	30.00	1	10.00
	锦屏	6	2	33.33	0	0.00
	黎平	15	4	26.67	0	0.00
	榕江	5	1	20.00	0	0.00
	小计	53	16	30.19	1	1.89
合计 Total	112	50	44.64	3	2.68	

### 2 基因种鉴定

经 PCR 扩增和凝胶电泳检测,50 株分离株均扩增出目的片段(约 1 492 bp)(图 1)。经测序,共获得 50 株分离株的 16S rRNA 基因序列。经过 NCBI 数据库比对,3 株属于致病性钩体基因种,其中 2 株为 *Leptospira noguchii* 基因种,1 株为 *Leptospira borgpetersenii* 基因种;42 株属于非致病性钩体基因种,其中 29 株为 *Leptospira yanagawae* 基因种,13 株为 *Leptospira wolbachii* 基因种;5 株属于中间种,其中 4 株为 *Leptospira licerasiae* 基因种,1 株为 *Leptospira inadai* 基因种。*Leptospira yanagawae* 为环境中钩体优势基因种。



M DNA 标志物(DL2000) 1~50 1~50 号菌株 51 阳性对照 52 阴性对照

图 1 钩体分离株 16S rRNA PCR 扩增  
M DL2000DNA marker 1-50 Strain number 51 Positive control 52 Negative control

Fig. 1 16S rRNA results of *Leptospira* isolates

### 3 序列分析

构建的钩体 16S rRNA 基因序列的系统发育树见图 2。致病性钩体 21ST40 和 21JK18 菌株与其基因种代表性菌株 *Leptospira noguchii* (AY631886) 进化关系最近,致病性钩体 21JK17 菌株与其基因种代表性菌株 *Leptospira borgpetersenii* (AY887899) 进化关系最近,3 株菌株均属于钩体致病性基因种。除 *Leptospira yanagawae* 基因种中的 21JK37 和 21JP30 菌株外,其他菌株也均与其基因种代表性菌株进化关系较近。

## 讨 论

贵州省地处我国西南腹地,地理环境复杂,全省均位于副热带东亚大陆的季风区内,属中国亚热带高原季风湿润气候类型,水汽条件比较丰富,雨量充沛,洪涝灾害频发<sup>[18]</sup>,导致很多地区的自然条件适合钩体的生长与繁殖,所以贵州省一直是钩体病疫区之一。贵州省近年来已对钩体宿主动物分离株进行多项研究<sup>[19-20]</sup>,但环境污染致病性钩体情况尚不清楚,本研究

对水和土壤中钩体进行分析,有助于全面了解贵州省钩体流行现状,为钩体病疫情风险评估提供科学依据,减少当地居民从环境中感染致病性钩体的风险。

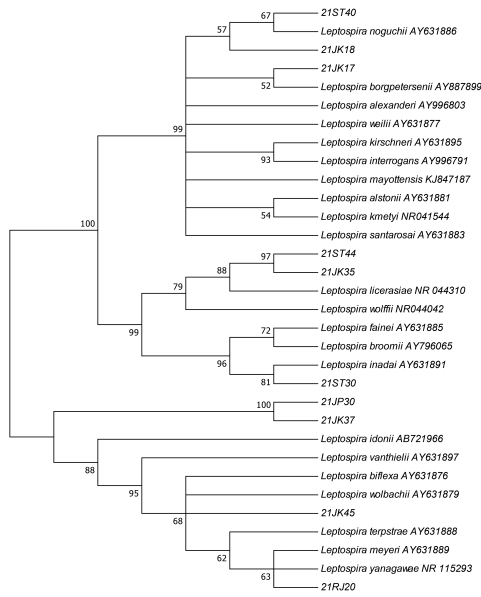


图 2 钩体 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Leptospira* of 16S rRNA gene sequences

本研究中水样致病性钩体分离阳性率(3.39%)高于土壤致病性钩体分离阳性率(1.89%),水样钩体分离阳性率(57.63%)高于土壤钩体分离阳性率(30.19%),这均有可能因为钩体在土壤中的生存时间比在水中的生存时间短<sup>[9]</sup>,即使土壤曾被钩体污染,也会因为钩体的死亡或裂解,钩体菌量降低而导致难以分离培养出钩体。又因为环境中同时存在致病性钩体和非致病性钩体<sup>[21]</sup>,而分离培养并不能对钩体进行特异性选择,会同时分离出致病性钩体和非致病性钩体,所以本研究中钩体分离阳性率高于致病性钩体分离阳性率。

钩体菌群菌型复杂,国际上对钩体分类方法主要分为两种,即血清学分类和基因分类<sup>[22]</sup>。16S rRNA 基因测序作为一种钩体基因分类方法有着分型流程简单,经济高效,可以鉴定传统方法可能无法发现的菌株等优点。自 20 世纪 90 年代起,16S rRNA 序列分析方法开始被用于对钩体进行分子分型的研究<sup>[23]</sup>。对水和土壤中钩体进行基因种鉴定,更好地了解钩体在自然环境中的分布及其优势基因种,以便于预防和控制钩体病传播。本研究中,50 株分离株经 16S rRNA 序列分析分为 6 个基因种,优势基因种为非致病性基因种 *Leptospira yanagawae*,同时也存在 *Leptospira borgpetersenii* 和 *Leptospira noguchii* 两种致病性基因种,与 Widiyanti<sup>[24]</sup>的研究结果(环境分离株以非致病性钩体为主)相同。另外,贵州省往年鼠类宿主动物钩体分离株 16S rRNA 序列分析研究中仅发现

*Leptospira interrogans* 基因种,未发现 *Leptospira borgpetersenii* 和 *Leptospira noguchii* 基因种,提示贵州省环境中致病性钩体的基因种与鼠类动物分离株基因种存在一定差异。查阅文献发现,鼠类动物和牛、羊等反刍动物曾检出 *Leptospira borgpetersenii* 基因种钩体<sup>[16,25-26]</sup>,牛、羊等反刍动物曾检出 *Leptospira noguchii* 基因种钩体<sup>[27-29]</sup>,提示贵州省环境中 *Leptospira borgpetersenii* 基因种菌株和 *Leptospira noguchii* 基因种菌株可能来源于牛、羊等反刍动物。

聚类分析显示,贵州省 3 株致病性钩体菌株与其基因种代表性菌株进化关系较近,不过同一基因种的不同菌株与其基因种代表性菌株进化距离也存在一定差异。例如,同一基因种的 21ST40 和 21JK18 菌株与 *Leptospira noguchii* (AY631886) 之间的进化距离不同,说明贵州省致病性钩体菌株间存在进化差异。*Leptospira yanagawae* 基因种中的 21JK37 菌株和 21JP30 菌株与同基因种其他菌株及其基因种代表性菌株进化关系较远,可能是因为非致病性基因种钩体在环境中的生存条件复杂,导致进化过程中某些基因片段发生较大变化。

此外,本研究采用致病性钩体 6 种常见血清群特异性引物<sup>[30]</sup>对 3 株致病性钩体分离株核酸进行 PCR 扩增,结果均为阴性,提示 3 株致病性钩体均不属于这 6 种血清群(黄疸出血群、秋季群、犬群、流感伤寒群、七日热群和赛罗群)。

综上所述,贵州省各钩体病疫区环境均存在钩体污染情况,其中江口和松桃地区环境存在致病性钩体污染情况。环境中钩体基因种复杂,同时存在致病性基因种和非致病性基因种,本研究中 2 种钩体致病性基因种为贵州省尚未报道过的基因种,其可能来源于牛、羊等反刍动物,因此应加强环境中钩体污染情况以及牛、羊等钩体宿主动物带菌情况的监测。贵州省环境污染致病性钩体情况不容忽视,本研究结果可为贵州省钩体病疫情防控提供科学依据。

【参考文献】

[1] Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, et al. Global burden of leptospirosis; estimated in terms of disability adjusted life years [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(10): e0004122.  
[2] Hu W, Lin X, Yan J. *Leptospira* and leptospirosis in China [J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(5): 432-436.  
[3] Costa F, Hagan JE, Calcagno J, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(9): e0003898.  
[4] Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2015(387): 65-97.  
[5] Dietrich M, M hldorfer K, Tortosa P, et al. *Leptospira* and bats: Story of an emerging friendship [J]. PLoS Pathog, 2015, 11

- (11):e1005176.
- [6] Altheimer K, Jongwattapanisan P, Luengyosluetchakul S, et al. *Leptospira* infection and shedding in dogs in Thailand[J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1):89.
- [7] Ospina-Pinto MC, Hernandez-Rodriguez P. Identification of *Leptospira spp.* in the animal-environment interface (swine-water) in pig production cycle[J]. Trop Anim Health Prod, 2021, 53(1):155.
- [8] Brito MM, Egidio de SI, Piteira M, et al. Leptospirosis, a re-emerging threat[J]. Cureus, 2021, 13(4):e14295.
- [9] Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder EA Jr, et al. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms[J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(13):e00507-18.
- [10] Picardeau M. *Leptospira* and leptospirosis[J]. Methods Mol Biol, 2020(2134):271-275.
- [11] Thibeaux R, Iraola G, Ferres I, et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence[J]. Microb Genom, 2018, 4(1):e000144.
- [12] 黄荷, 刘英, 姚光海, 等. 贵州省 2015~2019 年钩端螺旋体病流行特征及监测分析[J]. 微量元素与健康研究, 2021, 38(3):58-60.
- [13] 姚光海, 刘英, 黄荷, 等. 2009-2019 年贵州省人间钩端螺旋体病疫情流行特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(10):903-909.
- [14] Chaiwattananrungruengpaisan S, Suwanpakdee S, Sangkachai N, et al. Potentially pathogenic *Leptospira* species isolated from a waterfall in Thailand[J]. Jpn J Infect Dis, 2018, 71(1):65-67.
- [15] 张建明, 王凌冰, 黄野能, 等. Real-time PCR 方法在致病性钩端螺旋体检测中的应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2016, 39(3):186-190.
- [16] 徐国英, 潘敏楠, 刘维俊, 等. 福建省鼠感染钩端螺旋体调查和分离株基因种的鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(2):175-181.
- [17] Puche R, Ferres I, Caraballo L, et al. *Leptospira venezuelensis sp. nov.*, a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2018, 68(2):513-517.
- [18] 韩会庆, 周昌礼, 杨今晶, 等. 1961-2015 年贵州省气候破纪录事件时空变化[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2019, 33(4):347-352, 360.
- [19] 李世军, 王定明, 张翠彩, 等. 贵州省 2011 年黑线姬鼠钩端螺旋体分离株 16S rRNA 基因序列分析及基因种鉴定(英文)[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(11):1081-1087.
- [20] 刘英, 王铭, 李世军, 等. 2009-2015 年贵州省致病性钩端螺旋体分离株 PFGE 分型分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(2):186-189, 198.
- [21] 严杰, 戴保民, 于恩庶, 等. 钩端螺旋体病学[M]. 第 3 版, 2006.
- [22] 张金龙. 钩端螺旋体分子特性分析研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2015.
- [23] 李喆, 徐颖华, 辛晓芳. 我国钩端螺旋体分子分型研究进展[J]. 疾病监测, 2022, 37(04):512-516.
- [24] Widiyanti D, Djannatun T, Astuti IIP, et al. *Leptospira* detection in flood-prone environment of Jakarta, Indonesia[J]. Zoonoses Public Health, 2019, 66(6):597-602.
- [25] 张翠彩, 徐建民, 邱海燕, 等. 江西省致病性钩端螺旋体血清学和分子流行病学研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(12):1074-1078.
- [26] Wilson PR, Mannewald A, Collins-Emerson JM, et al. Serological study of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and *L. borgpetersenii* serovars Tarassovi and Ballum in beef cattle, sheep and deer in New Zealand[J]. N Z Vet J, 2021, 69(2):83-92.
- [27] Silva EF, Brod CS, Cerqueira GM, et al. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep[J]. Vet Microbiol, 2007, 121(1-2):144-149.
- [28] Martins G, Loureiro AP, Hamond C, et al. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups panama and autumnalis from cattle[J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(7):1538-1541.
- [29] Aymee L, Di Azevedo MIN, de Melo JDSL, et al. *Leptospira noguchii* associated to reproductive disease in ruminants[J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69(5):3103-3108.
- [30] Cai CS, Zhu YZ, Zhong Y, et al. Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of *Leptospira* in China[J]. BMC Microbiol, 2010(10):67.

【收稿日期】 2022-10-17 【修回日期】 2023-01-05