

DOI:10.13350/j.cjpb.220309

• 论著 •

鼠类不同组织巴尔通体的分离培养及其遗传多态性分析*

刘海鑫¹, 王加熊², 刘维俊², 刘菁², 徐国英², 郑奎城^{1,2**}, 肖方震^{1,2***}

(1. 福建省疾病预防控制中心, 福建省人兽共患病重点实验室, 福建福州 350001; 2. 福建医科大学公共卫生学院)

【摘要】 目的 分析鼠类不同组织巴尔通体的分离率及培养时间, 了解福建省巴尔通体分离株的遗传多态性。方法 采用笼日法捕获家栖鼠和野栖鼠, 现场鉴定鼠种, 无菌条件下采集血液、脾、肝、肾和肺等组织进行巴尔通体分离培养, 挑选疑似菌落进行分子生物学鉴定, 分析不同组织巴尔通体分离率及培养时间; PCR扩增巴尔通体的 *gltA* 基因, 测序后进行系统发育分析和遗传多态性分析。结果 在78只鼠中, 巴尔通体感染率为56.41%。血、脾、肝、肾和肺组织分离率分别为50.00%, 44.87%, 44.87%, 48.72%和26.92%, 不同组织巴尔通体分离率不同($\chi^2=11.042, P<0.05$), 肺组织分离率较低。肾和血液分离率结果具有一致性(Kappa=0.821, $P<0.01$)。阳性菌落最早长出时间为2 d, 多数在1周内生长, 不同组织巴尔通体分离时间差异有统计学意义($\chi^2=14.169, P<0.01$), 肝组织中巴尔通体分离培养所需时间最长。不同巴尔通体的菌落长出时间的差异有统计学意义($\chi^2=21.249, P<0.01$), 昆州巴尔通体的菌落长出所需时间最长。遗传多样性分析显示, 福建巴尔通体分离株单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性指数(π)的值分别为 $Hd=0.747\pm 0.054, \pi=0.04166\pm 0.00611$ 。结论 巴尔通体具有多组织嗜性, 血液和肾脏可作为巴尔通体分离培养的首选。不同组织和不同种型分离巴尔通体, 其菌落长出时间不同。福建巴尔通体分离株遗传多样性丰富。

【关键词】 巴尔通体; 鼠类; 不同组织; 分离时间; 遗传多样性

【中图分类号】 R37

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)03-0293-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):293-297,302.]

Isolation of *Bartonella* in different tissues of rodents and analysis of its genetic diversity

LIU Hai-xin¹, WANG Jia-xiong², LIU Wei-jun², LIU Jing², XU Guo-ying², ZHENG Kui-cheng^{1,2}, XIAO Fang-zhen^{1,2} (1. Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis Research, Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China 2. School of Public Health, Fujian Medical University) ***

【Abstract】 **Objective** To analyse the isolation rate and isolation time of *Bartonella* in different tissues of rodents and understand the genetic diversity of *Bartonella* species in Fujian Province. **Methods** Rodents were captured using live-capture traps. Traps were pre-baited with corns and set before sundown and then collected before sunrise. After the trapped rodent were morphologically examined, the blood, spleen, liver, kidney and lung were collected under sterile conditions for isolation and culture of *Bartonella*. The like-*Bartonella* colonies were selected for molecular identification. The isolation rate and culture time of *Bartonella* from different tissues were analyzed. The *gltA* gene fragment was amplified using PCR. After positive PCR products were sequenced, the phylogenetic tree was created and the genetic diversity of *Bartonella* was analyzed. **Results** A total of 78 rodents were captured, the prevalence of *Bartonella* in rodents was 56.41%. The isolation rates of blood, spleen, liver, kidney and lung tissues were 50.00%, 44.87%, 44.87%, 48.72% and 26.92%, respectively. The isolation rate of *Bartonella* was different in different tissues of rodent ($\chi^2=11.042, P<0.05$), and the isolation rate of lung tissue was low. The result of kidney and blood isolation rate were highly consistent (Kappa=0.821, $P<0.01$). The typically observed visible *Bartonella* colonies from primary isolations can be obtained as soon as 2 days, most of them grow within 1 week. The incubation time of colonies in different tissues ($\chi^2=14.169, P<0.01$) and different *Bartonella* species ($\chi^2=21.249, P<0.01$) was different, and the isolation of *Bartonella* in liver tissues required a longer time than other tissues, and the incubation time of *B. queenslandensis* was longest. Genetic diversity analysis showed that the values of haplotype diversity (Hd) was 0.747 ± 0.054 and nucleotide diversity index (π) was 0.04166 ± 0.00611 . **Conclusion** *Bartonella* can invade various tissues. Blood and kidney can be the first choice for *Bartonella* isolation and culture. The incubation time of *Bartonella* colonies isolated from different tissues and different species was different. *Bartonella* isolates from Fujian Province show genetic diversity.

【Key words】 *Bartonella*; rodents; different tissues; isolation time; genetic diversity

* **【基金项目】** 国家科技重大专项课题项目(No. 2017ZX10103008); 福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(No. 2019-ZQN-27); 福建省科技创新平台建设项目(No. 2019Y2001)。

** **【通讯作者】** 肖方震, E-mail: 18642028@qq.com, 郑奎城, E-mail: kingdadi9909@126.com

【作者简介】 刘海鑫(1996-), 男, 福建永春人, 在读硕士研究生, 主要从事自然疫源性疾病预防研究。E-mail: 373680284@qq.com

巴尔通体病(*Bartonellosis*)作为我国近年 14 种新发传染病之一^[1],是由巴尔通体病原菌感染引起的一种人兽共患病。巴尔通体(*Bartonella*)是一类革兰染色阴性杆菌,兼性细胞内寄生菌,属于变形菌纲、根瘤菌目、巴尔通体科、巴尔通体属^[2]。近年来,巴尔通体物种的数量迅速增加,目前已命名的巴尔通体多达 45 种,有些物种包含一个及以上的亚种^[3]。啮齿动物是巴尔通体最大的储存宿主,目前已从至少 7 科的 98 种啮齿动物中分离出 22 种巴尔通体及其亚种^[4],其中部分鼠传巴尔通体可导致人类疾病,如伊丽莎白巴尔通体(*Bartonella elizabethae*),格拉汉姆巴尔通体(*Bartonella grahamii*),罗莎利马巴尔通体(*Bartonella rochalimae*),特利波契巴尔通体(*Bartonella tirbocorum*)和文森巴尔通体阿鲁潘亚种(*Bartonella vinsonii subsp. arupensis*)等^[5]。

目前,分离培养、分子生物学检测和血清学检测是实验室诊断巴尔通体的主要方法^[1]。分离培养作为传统微生物的鉴定方法,是病原学诊断的金标准。巴尔通体在宿主体内主要寄生于红细胞^[6],血液是分离培养巴尔通体的首选^[7-8],但是采集动物血液存在一定困难,其他脏器组织作为血液的替代性尚不明确。Peterson 等^[9-10]的研究选择脾脏作为分离的靶器官,李雪云等^[11]选择肝脏。Gutiérrez 等^[12-13]研究表明原代培养巴尔通体菌落长出时间最短为 3~5 d,最长可达 5-6 周,其分离培养时间与组织的选择和不同种类的巴尔通体的相关性鲜有报道。

为探索福建省鼠类不同组织巴尔通体的分离培养情况及遗传多态性,本研究采集自然状态下鼠类血、肝、脾、肺和肾等组织进行巴尔通体的分离培养,记录各组织初次分离培养长出菌落时间,以分析不同组织巴尔通体的分离率及阳性菌落长出时间差异,并通过遗传进化分析以了解福建省巴尔通体分离株的遗传多样性。

材料与方法

1 材料

Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,梯度 PCR 仪购自美国 ABI 公司,高通量组织研磨器购自于法国 Bertin 公司,CO-170 型 CO₂ 培养箱购自美国 NBS 公司,TSA 血平板和脑心浸液(BHD)培养基为美国 BD 公司产品;两性霉素 B 溶液为上海生工生物科技公司产品;细菌基因 DNA 提取试剂盒为广州美基生物科技有限公司产品。

2 方法

2.1 标本采集 本研究于 2021 年 5 月在福建省莆田

市荔城区(东经 119°00'48'',北纬 25°26'01'')和永安市(东经 117°21'54'',北纬 25°56'28'')开展现场捕鼠工作。捕捉以笼日法进行,以玉米作为诱饵放置在鼠笼中,晚放晨收。对现场捕获的鼠类依据体型、尾部,毛色等外形特征进行鉴定,依序进行编号,不明确的鼠种带回中心实验室进行 DNA 条形码鉴定。鼠类经乙醚麻醉后解剖,用无菌注射器采集心血并无菌采集肝、脾、肺和肾等脏器组织,同时对应鼠种编号将标本置于 2.0 ml 灭菌液氮低温保存。

2.2 分离培养与鉴定

2.2.1 血液原代培养 血液与加入两性霉素 B 溶液的 BHI 液体培养基按照约 1:8 的比例稀释混匀后,吸取 100 μL 接种于 TSA 血平板中,倒放置于潮湿的 37 °C,5%的 CO₂ 培养箱培养。

2.2.2 组织原代培养 无菌剪取肝、脾、肾和肺组织约 20 mg 置于 2 ml 无菌圆底离心管,加入 300 μL 含两性霉素 B 溶液的 BHI 液体培养基,用高通量组织研磨器研碎后,混匀,后续步骤同上。

2.2.3 菌株观察 每天同一时间观察其生长情况并记录菌落长出时间,最长培养达 42 d。

2.2.4 菌株鉴定与保存 依据巴尔通体菌落形态,挑取单菌落进行 1~3 次纯化分离,纯菌培养物煮沸法提取 DNA,经种属特异性的引物 *ssrA* 基因^[14]实时荧光定量 PCR 反应,引物序列为 *ssrA*-F: 5'-GCTATGG-TAATAAATGGACAATGAAATAA-3', *ssrA*-R: 5'-GCTTCTGTTGCCAGGTG-3', *ssrA*-Probe: FAM-ACCCCGCTTAAACCTGCGACG-BHQ1,反应体系包含上、下游引物各 0.4 μL(10 μmol/L),探针 0.2 μL(10 μmol/L),Premix Ex Taq(Probe qPCR)酶 10 μL,DNA 模板 3 μL,加无菌去离子水至总体积 20 μL。反应程序为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 45 s,共 45 个循环;若 CT 值 ≤ 35,则判定为阳性。采集适量阳性纯菌培养物置于含 1 ml、25%甘油-BHI 保存液的 2 ml 无菌冻存管中,冻存于 -80 °C 冰箱。

2.3 核酸提取 使用细菌基因 DNA 提取试剂盒提取 DNA,操作严格按照说明书进行。DNA 样品-20 °C 冰箱保存,用于后续序列分析。

2.4 PCR 扩增 采用属水平特异性引物 BhCS.781p-BhCS.1137n 对枸橼酸合酶基因(*gltA*)379 bp 片段进行扩增^[15],引物序列、反应体系和扩增条件参考文献^[16],反应均设有阳性和阴性对照。

2.5 琼脂糖凝胶电泳及产物检测 取 5 μL 反应产物进行 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,经 90 V,40 min 电泳,使用凝胶成像系统观察结果,阳性 PCR 产物由上海生工生物技术公司进行纯化测序。

2.6 序列分析及遗传进化分析 应用 SeqMan 程序 (DNA star) 对 *gltA* 序列进行手工校正和拼接, 并利用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站进行 BLAST 比对。应用 Mega 6 软件对序列进行比对并计算最低 BIC 分值 (Bayesian Information Criterion), 选择最佳核苷酸替代模型, 采用最大似然法构建系统发育树。采用 DnaSPv6.12 软件对巴尔通体的 *gltA* 序列进行遗传多态性分析。

2.7 统计分析 采用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学分析, 率的比较采用 χ^2 检验, 定性资料分析采用 Kappa 一致性检验。非参数检验采用 Friedman M 检验和 Kruskal-Wallis H 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 鼠种构成

本研究共捕获褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)、黄毛鼠 (*Rattus losea*)、针毛鼠 (*Niviventer fulvescens*)、黄胸鼠 (*Rattus tanezumi*) 和白腹巨鼠 (*Niviventer coninga*) 等 5 种鼠, 共计 78 只。其中家鼠捕获 35 只, 黄毛鼠 23 只, 针毛鼠 13 只, 黄胸鼠 5 只, 白腹巨鼠 2 只。

2 各组织巴尔通体分离培养结果

在 78 只鼠中, 共 44 只分离出巴尔通体, 总感染率为 56.41%, 39 (88.64%) 只鼠在至少 3 种组织中分离到巴尔通体, 13 只 (29.55%) 在 5 种组织中均有分离, 其中血、脾、肝、肾和肺的分离率分别为 50.00%, 44.87%, 44.87%, 48.72% 和 26.92% (表 1), 不同组织巴尔通体的分离率的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.042, P < 0.05$), 肺组织巴尔通体分离率较低。

表 1 鼠类不同组织巴尔通体的分布情况

组织 Tissue	褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>		黄胸鼠 <i>R. tanezumi</i>		黄毛鼠 <i>R. losea</i>		针毛鼠 <i>N. fulvescens</i>		白腹巨鼠 <i>N. coninga</i>		总计 Total	
	(+)	n (%)	(+)	n (%)	(+)	n (%)	(+)	n (%)	(+)	n (%)	(+)	n (%)
血	14	35 40.00	2	5 40.00	15	23 65.22	8	13 61.54	0	2 0	39	78 50.00
脾	15	35 42.86	2	5 40.00	14	23 60.87	4	13 30.77	0	2 0	35	78 44.87
肝	15	35 42.86	2	5 40.00	13	23 56.52	5	13 38.46	0	2 0	35	78 44.87
肾	14	35 40.00	2	5 40.00	15	23 65.22	7	13 53.85	0	2 0	38	78 48.72
肺	10	35 28.57	1	5 20.00	3	23 13.04	7	13 53.85	0	2 0	21	78 26.92

3 脾、肝、肾和肺的分离培养结果与血液结果的一致性比较

以血液分离培养巴尔通体的结果作为标准, 经 Kappa 一致性检验, 结果显示, 肾组织分离培养巴尔通体的结果与血液的结果具有一致性较高, 脾、肝组织和血的分离结果一致性次之, 而肺组织结果只具有中度一致性 (表 2)。

表 2 不同组织分离培养的对比结果

组织 Tissue	血液 Blood		合计 Total	Kappa 值 Kappa value	
	(+)	(-)			
脾	(+)	33	2	35	0.795, $P < 0.01$
	(-)	6	37	43	
	合计	39	39	78	
肝	(+)	30	5	35	0.641, $P < 0.01$
	(-)	9	34	43	
	合计	39	39	78	
肾	(+)	35	3	38	0.821, $P < 0.01$
	(-)	4	36	40	
	合计	39	39	78	
肺	(+)	19	2	21	0.436, $P < 0.01$
	(-)	20	37	57	
	合计	39	39	78	

4 各组织中巴尔通体的菌落长出时间

阳性菌落最早长出时间为 2 d, 最迟为 22 d, 血、脾、肝、肾和肺中分别有 79.49%, 77.14%, 74.29%, 76.32% 和 61.90% 的巴尔通体阳性菌落在 1 周内生长 (表 3)。26 只鼠在血、脾、肝和肾组织中均分离出巴尔通体, 对其菌落长出时间进行分析, 结果显示, 不同组织巴尔通体分离时间有差别 ($\chi^2 = 14.169, P < 0.01$) (图 1), 进一步两两比较得, 肝组织初次分离培养长出菌落时间与血比较有差异 ($P < 0.05$), 肝组织中巴尔通体菌落生长速度较血慢。

5 序列分析及系统发育树构建

对巴尔通体分离株 *gltA* 序列进行分析, 序列进行 BLAST 比对, 并采用最大似然法, 选择 Tamura 3-parameter+G(T92+G) 最佳核酸替代模型构建系统发育树。44 株巴尔通体共分为 9 个不同的分支。分支 1 和分支 2 共 25 条序列与特立波窃巴尔通体 (*B. tribocorum*) 聚为一簇, 同源率为 99.7%。分支 3、分支 4 和分支 5 共 8 条序列与昆州巴尔通体 (*B. queenslandensis*) 聚为一簇, 同源率均为 96.4%-96.7%。分支 6 和分支 7 共 9 条序列与伊丽莎白巴尔通体 (*B. elizabethae*) 聚为一簇, 同源率为 96.7%-100%。分支 8 和分支 9 各 1 条序列分别与菲西巴尔通体 (*B. phoenicensis*) 和库珀巴尔通体 (*B. coopersplainsensis*) 聚为一簇, 同源率分别为 93.9% 和 99.4% (图 2)。此外, 本研究从家栖鼠中分离到伊丽莎白巴尔通体, 从针毛鼠中分离到昆州巴尔通体, 而特立波窃巴尔通体在黄毛鼠、黄胸鼠和褐家鼠中均有分离 (表 4)。

6 不同巴尔通体的菌落长出时间

特立波窃、昆州和伊丽莎白巴尔通体菌落长出时间的中位数分别为 4 d、8 d 和 3 d。3 种巴尔通体菌落长出时间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 21.249, P < 0.01$), 两两比较结果显示, 昆州巴尔通体的菌落长出时间比特立波窃巴尔通体和伊丽莎白巴尔通体要长 (均 $P <$

0.01)(图3)。

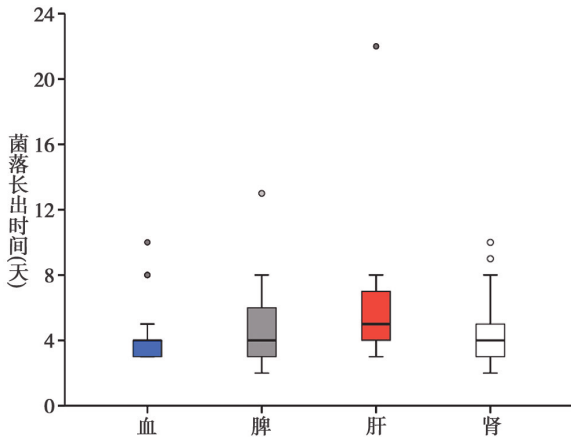


图1 血、脾、肝和肾巴尔通体分离时间对比

Fig. 1 Comparison of isolation time of *Bartonella* in different tissues

表3 不同组织中巴尔通体的菌落长出时间

Table 3 Isolation time of *Bartonella* in different tissues

组织 Tissue	阳性数 Positive	菌落长出时间/天 Time/day				
		<3	3-7	8-12	12-16	>16
血	39	0	31	6	2	0
脾	35	1	26	6	2	0
肝	35	0	26	8	0	1
肾	38	2	27	9	0	0
肺	21	0	13	5	2	1

表4 啮齿动物感染巴尔通体的种类

Table 4 *Bartonella* species detected in rodents

巴尔通体种类 <i>Bartonella</i> species	阳性数(只) Positive(number)					合计 Total
	褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	黄胸鼠 <i>R. tanezumii</i>	黄毛鼠 <i>R. losea</i>	针毛鼠 <i>N. fulvescens</i>	白腹巨鼠 <i>N. coninga</i>	
特立波窃巴尔通体	9	2	14	0	0	25
伊丽莎白巴尔通体	8	1	0	0	0	9
昆州巴尔通体	0	0	0	8	0	8
菲西巴尔通体	0	0	0	1	0	1
库珀巴尔通体	0	0	0	1	0	1
合计	17	3	14	10	0	44

7 巴尔通体的遗传多样性

对44株巴尔通体的 *gltA* 序列进行单倍型和核酸多样性分析。多态位点 S 为 70, 单一多态位点 26 个, 简约信息位点 44 个, 产生的单倍型个数 H 为 9 个, 单倍型多样性 Hd = 0.747 ± 0.054, 平均核苷酸差异指数 K 为 13.707, 核苷酸多样性指数(π) = 0.04166 ± 0.00611, 对 *gltA* 序列进行中性检验, Tajima's D = -0.84442 (P > 0.1)。

讨论

巴尔通体作为新发传染病病原体, 可侵入人体引起多组织器官的病变, 鼠类作为巴尔通体的储存宿主, 对巴尔通体的流行传播和储存起重要作用。本研究对家栖鼠和野栖鼠的血、脾、肝、肾和肺等组织进行巴尔

通体病原菌分离, 研究结果显示, 鼠类中巴尔通体的总感染率为 56.41%, 远高于肖方震等^[16] 在福建省调查的感染率, 说明福建省局部地区存在巴尔通体高感染率的现象。在动物实验中已发现巴尔通体可以侵袭宿主体内的多种组织^[17-18], 本研究在自然状态下的鼠类的血、脾、肝、肾和肺等 5 种组织器官中均分离出巴尔通体, 提示巴尔通体存在多组织嗜性, 这与栗冬梅等^[19] 的研究一致, 但其在肺组织中的分离率较低, 具体原因与鼠种和巴尔通体种类差异性目前尚不清楚。

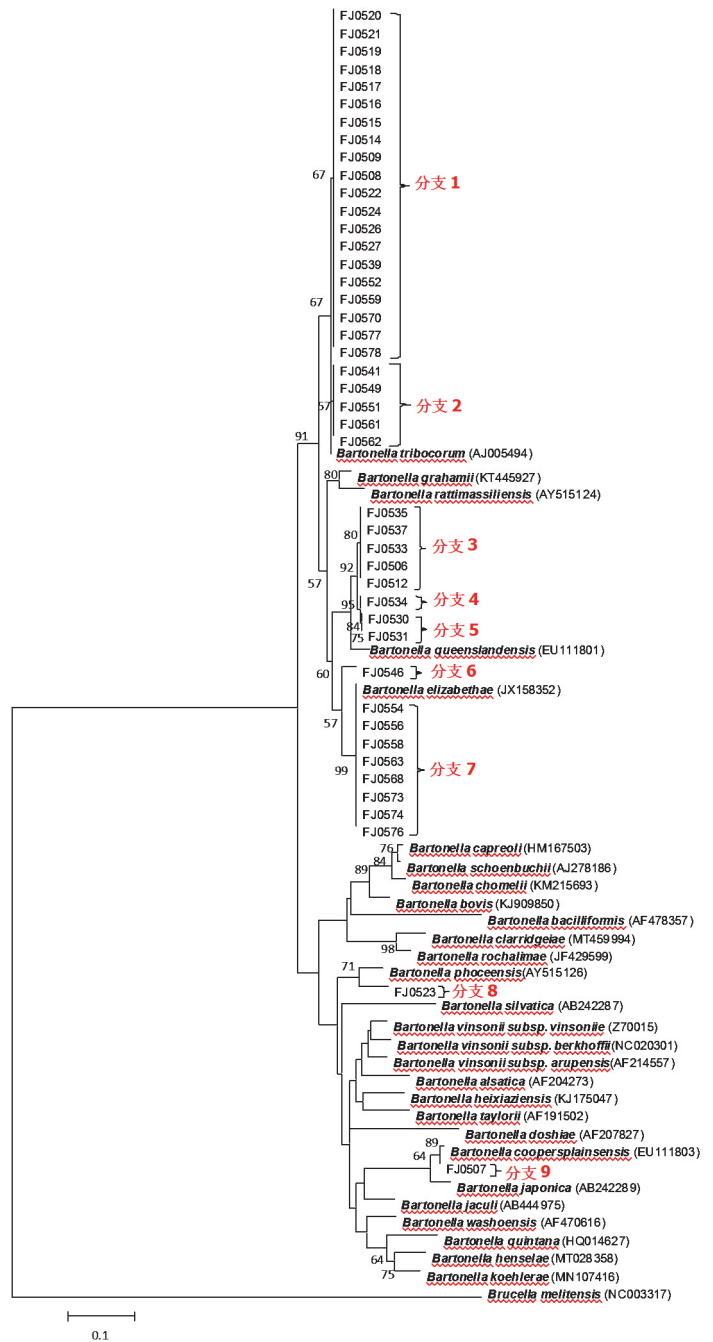


图2 巴尔通体分离株的 *gltA* (329bp) 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Bartonella* isolates based on the *gltA* gene

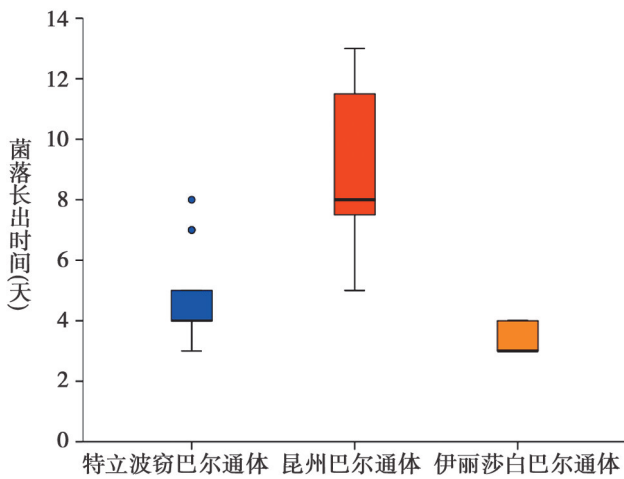


图3 不同巴尔通体菌落长出时间对比

Fig. 3 Comparison of the growth time of different *Bartonella* species

本次研究对5种组织分离培养结果与血液的结果一致性进行比较发现肾组织的分离率与血液的具有极高的一致性,脾脏和肝脏的分离率与血液的一致性略低于肾脏,提示若由于动物死亡等原因无法采集血液时,肾脏可能比脾脏和肝脏更适合作为首选的靶器官。

从阳性菌落长出时间来看,分离培养巴尔通体所需最短时间仅为2 d,早于 Gutierrez 等^[13,20]研究报道的3 d,多数巴尔通体在1周内生长,与 Ziedins 等^[21]报道的基本一致(3~7 d),但早于杨发莲等^[22]报道的1~2周。5个组织分离巴尔通体的菌落长出时间不同,肝组织分离培养巴尔通体所需时间较其他组织长,不同种类的鼠传巴尔通体菌落长出时间也存在差异,昆州巴尔通体的菌落长出时间比特立波窃巴尔通体和伊丽莎白巴尔通体要长,推测菌落长出所需时间可能与分离的组织选择和巴尔通体的种类有关。

通过对福建省44株巴尔通体进行遗传多样性分析,发现其单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性指数(π)的值等遗传多样性参数值较高,提示福建省鼠传巴尔通体分离株具有丰富的遗传多样性,而一个种群如果具有丰富的遗传多态性,表明其适应环境变化能力强,并且可能会演变成毒力和传染性更强亦或是具有耐药性的物种^[23]。Tajima's D值为负值,但统计差异不显著,暂时无法说明鼠传巴尔通体经历过种群扩张的历史^[24]。

伊丽莎白巴尔通体和特立波窃巴尔通体均能导致人类疾病,如伊丽莎白巴尔通体能导致心内膜炎^[25],特立波窃巴尔通体能引起发热、头痛、肌肉酸痛和疲劳等临床症状^[26-27],这两个种型的巴尔通体在福建省家栖鼠中的褐家鼠和黄胸鼠均有检出,且感染率较高,随着人类活动范围的不断扩大、生态环境的不断变化,人类与动物接触机会不断增多。一旦突破物种屏障传播

到人和家畜,就会造成新发传染病,对人类健康和生命安全带来严重威胁,因此,应高度重视并加强监测。

【参考文献】

- [1] 刘云彦,宋秀平,刘起勇,等.应用实时高分辨率熔解曲线技术检测巴尔通体[J].中国人兽共患病学报,2015,31(11):1027-1032.
- [2] Mogollon-Pasapera E, Jr LO, Giordano A, et al. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? [J]. Int J Infect Dis, 2009,13(1):3-8.
- [3] Okaro U, Addisu A, Casanas B, et al. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis [J]. Clin Microbiol Rev, 2017,30(3):709-746.
- [4] Gutierrez R, Krasnov B, Morick D, et al. *Bartonella* infection in rodents and their flea ectoparasites: an overview. [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2015,15(1):27-39.
- [5] Miller A, Gutierrez R, Seguel M, et al. Molecular survey of *Bartonella* spp. in rodents and fleas from Chile [J]. Acta Trop, 2020, 212:105672.
- [6] Krugel M, Pfeffer M, Krol N, et al. Rats as potential reservoirs for neglected zoonotic *Bartonella* species in Flanders, Belgium [J]. Parasite Vector, 2020,13(1):235.
- [7] Kosoy M, Regnery RL, Kosaya OI, et al. Experimental infection of cotton rats with three naturally occurring *Bartonella* species [J]. J Wildlife Dis, 1999,35(2):275-284.
- [8] Rubio AV, Avila-Flores R, Osikowicz LM, et al. Prevalence and Genetic Diversity of *Bartonella* Strains in Rodents from Northwestern Mexico [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2014,14(12):838-845.
- [9] Peterson AC, Ghersi BM, Alda F, et al. Rodent-Borne *Bartonella* Infection Varies According to Host Species Within and Among Cities [J]. Ecohealth, 2017,14(4):771-782.
- [10] Rao HX, Li SJ, Lu L, et al. Genetic diversity of *Bartonella* species in small mammals in the Qaidam Basin, western China [J]. Sci Rep, 2021,11(1):1735.
- [11] 李雪云,陈经雕,黎聪荣,等.广东省鼠形动物携带巴尔通体的调查和基因特征分析[J].中国人兽共患病学报,2018,34(5):482-486.
- [12] Brenner SA, Rooney JA, Manzwetsch P, et al. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: effects of methods of blood collection and handling [J]. J Clin Microbiol, 1997,35(3):544-547.
- [13] Gutierrez R, Muriel VT, Buffet JP, et al. Guidelines for the isolation, molecular detection, and characterization of *Bartonella* species [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2017,17(1):42-50.
- [14] Diaz M H, Bai Y, Malania L, et al. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes [J]. J Clin Microbiol, 2012,50(5):1645-1649.
- [15] 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]. J Clin Microbiol, 1995,33(7):1797-1803.
- [16] 肖方震,林代华,周淑娟,等.福建省鼠类感染巴尔通体调查及序列分析[J].中国人兽共患病学报,2017,33(7):607-612.

(下转 302 页)

- [4] Young MR, Proctor HC, de Waard JR, et al. DNA barcodes expose unexpected diversity in Canadian mites [J]. *Mol Ecol*, 2019, 28(24):5347-5359.
- [5] Thaler DS, Stoeckle MY. Bridging two scholarly islands enriches both; COI DNA barcodes for species identification versus human mitochondrial variation for the study of migrations and pathologies [J]. *Ecol Evol*, 2016, 6(19):6824-6835.
- [6] Laopichienpong N, Muangmai N, Supikamolseini A, et al. Assessment of snake DNA barcodes based on mitochondrial COI and Cytb genes revealed multiple putative cryptic species in Thailand [J]. *Gene*, 2016, 594(2):238-247.
- [7] Jaakko LOP, Kahanpaa J, Mutanen M. DNA Barcodes for the Northern European Tachinid Flies (Diptera: Tachinidae) [J]. *Plos One*, 2016, 11(11):e0164933.
- [8] Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54(2):165-173.
- [9] Gasser R, Zhu X, McManus D. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda) [J]. *Int J Parasitol*, 2000, 29(12):1965-1970.
- [10] Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation [J]. *Mol Ecol*, 2011, 21(8):1864-1877.
- [11] Xia X. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6):1550-1552.
- [12] DeSalle R, Egan MG, Siddall M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1462):1905-1916.
- [13] Frzal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects [J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8(5):727-736.
- [14] Paul DNH, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(41):14812-14817.
- [15] Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, et al. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics [J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15(12):1719-1727.
- [16] Balech B, Sandionigi A, Manzari C, et al. Tackling critical parameters in metazoan meta-barcoding experiments: A preliminary study based on cox1 DNA barcode [J]. *Peer J*, 2018(6):e4845.
- [17] Coissac E, Hollingsworth PM, Lavergne S, et al. From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding [J]. *Mol Ecol*, 2016, 25(7):1423-1428.
- [18] Goldstein PZ, DeSalle R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays* [J]. *Bioessays*, 2011, 33(2):135-147.
- [19] Pennisi E. Taxonomy. Wanted: a barcode for plants [J]. *Science*, 2007, 318(5848):190-191.
- [20] Hawlitschek O, Morini re J, Dunz A, et al. Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany [J]. *Mol Ecol Resour*, 2016, 16(1):242-253.
- [21] Nakao M, Lavikainen A, Iwaki T, et al. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera Lamarck, 1816* and the creation of a new genus *Versteria* [J]. *Int J Parasitol*, 2013, 43(6):427-437.

【收稿日期】 2021-09-11 【修回日期】 2021-12-02

(上接 297 页)

- [17] Almeida A, Vieira-Damiani G, Silva M, et al. *Bartonella henselae* Infection in Sick Cell Disease Mice Is Associated with Hyperalgesia [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2019, 19(2):102-105.
- [18] Kordick DL, Brown TT, Shin KO, et al. Clinical and Pathologic Evaluation of Chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* Infection in Cats [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(5):1536-1547.
- [19] 栗冬梅, 徐爱玲, 宋秀平, 等. 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.
- [20] 栗冬梅, 俞东征, 刘起勇, 等. 云南省不同环境鼠形动物巴尔通体感染情况的研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(11):934-937.
- [21] Ziedins AC, Chomel BB, Kasten RW, et al. Molecular epidemiology of *Bartonella* species isolated from ground squirrels and other rodents in northern California [J]. *Epidemiol Infect*, 2016;1-8.
- [22] 杨发莲, 白鹤鸣, 杨慧, 等. 巴尔通体分离培养特性观察 [J]. *微生物学杂志*, 2006(1):10-13.
- [23] Read AF. The ecology of genetically diverse infections [J]. *Science*, 2001, 292(5519):1099-1102.
- [24] Konstantin VK, David BN. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in cold-hardiness- and wood quality-related candidate genes in Douglas fir [J]. *Genetics*, 2005, 171(4):2029-2041.
- [25] Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, et al. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. [J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(4):872-881.
- [26] Vayssierraussat M, Moutailler S, Femenia F, et al. Identification of novel zoonotic activity of *Bartonella* spp France [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(3):457-462.
- [27] Kosoy M, Bai Y, Sheff K, et al. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. [J]. *America J Trop Med Hyg*, 2010, 82(6):1140-1145.

【收稿日期】 2021-11-13 【修回日期】 2022-01-09