

· 实验研究 ·

东北林区鼠类粒细胞埃立克体感染的调查

詹琳 何静 萨仁高娃 吴晓明 王剑波 赵秋敏 张泮河 黄海楠 蒋宝贵
江佳富 张晶波 褚宸一 高燕 杨红 曹务春

【摘要】 目的 了解东北林区啮齿动物感染粒细胞埃立克体病原体的情况。方法 运用聚合酶链反应方法对吉林、黑龙江、内蒙古林区采集的啮齿动物标本粒细胞埃立克体的 16S rRNA 和 *gltA* 基因片段进行检测并测序,将所测序列与 GenBank 中注册的基因序列进行比较分析。结果 共检测鼠标本 276 份,其中吉林长白山林区 102 份,黑龙江小兴安岭林区 61 份,内蒙古大兴安岭林区 113 份,阳性率分别为 8.82%、1.64% 及 0.00%。体表有寄生蜱的鼠感染危险性是体表无寄生蜱鼠的 11.30 倍($P=0.002$)。吉林、黑龙江林区鼠标本及其寄生蜱标本 16S rRNA 基因序列完全相同,与美国、瑞典、日本等国家检出的粒细胞埃立克体对应序列的同源性为 97%~99%。*gltA* 基因核苷酸序列与 GenBank 注册的相应片段比较相似性为 87%~97%,推导的氨基酸序列相似性为 84%~99%。结论 吉林及黑龙江林区存在粒细胞埃立克体宿主动物感染。

【关键词】 粒细胞埃立克体; 宿主动物; 16S rRNA 基因; *gltA* 基因

Investigation on *Anaplasma phagocytophilum* infection in rodents from forest areas in northeastern China

ZHAN Lin*, HE Jing, SAREN Gao-wa, WU Xiao-ming, WANG Jian-bo, ZHAO Qiu-min, ZHANG Pan-he, HUANG Hai-nan, JIANG Bao-gui, JIANG Jia-fu, ZHANG Jing-bo, CHU Chen-yi, GAO Yan, YANG Hong, CAO Wu-chun. *State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Corresponding author: CAO Wu-chun, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from forest areas in northeastern China. **Methods** PCR amplification, followed by sequence analysis was carried out. The sequences of 16S rRNA and *gltA* gene fragment amplified from rodent specimens were compared with corresponding part of the sequences deposited in GenBank. **Results** A total number of 276 rodents were tested, including 102 in Jilin province, 61 in Heilongjiang province and 113 in Inner Mongolia autonomous region. The positive rates were 8.82%, 1.64% and 0.00%, respectively. The infection rate in rodents infected by ticks was 11.30 times higher than that in rodents without ticks ($P=0.002$). The *A. phagocytophilum* 16S rRNA sequences from rodents in Jilin and Heilongjiang were identical and differed in 3-5 bases compared with the corresponding parts of *A. phagocytophilum* from America, Sweden and Japan. Compared with the sequences registered in GenBank, the nucleotide sequence of *gltA* varied from 87%-97% and its deduced amino acid sequence changed from 84%-99%. **Conclusion** *A. phagocytophilum* infection was presented in rodents from Jilin and Heilongjiang province.

【Key words】 *Anaplasma phagocytophilum*; Rodent; 16S rRNA gene; *gltA* gene

人粒细胞埃立克体病 (human granulocytic anaplasmosis, HGA) 是一种经蜱传播的自然疫源性疾病。该病由粒细胞埃立克体 (*Anaplasma phagocytophilum*, *A. p*) 引起, 无特异临床症状, 治疗不及时可以引起中枢神经损伤, 免疫抑制, 肾功能

紊乱, 呼吸衰竭甚至死亡^[1,2]。因其只能通过镜检、血清学检查和 PCR 等实验室方法才能确诊, 因此探索疫源地、发现宿主动物对于早期诊断、防止疾病传播有重要的流行病学意义。我国部分地区已有蜱感染 *A. p* 的证据^[3-7], 也从大兴安岭地区人血清中检测出 *A. p* 抗体^[8], 但是迄今为止尚无宿主动物感染 *A. p* 的相关报道。本文对东北林区鼠类 *A. p* 的感染情况进行了调查, 结果报告如下。

材料与方法

1. 标本采集: 于 2005 年 4-7 月从吉林 (E130°

基金项目: 国家科技攻关计划课题资助项目 (2003BA712 A05-01)

作者单位: 100071 北京, 军事医学科学院微生物流行病学研究所 流行病学研究室 病原微生物安全国家重点实验室 (詹琳、何静、吴晓明、赵秋敏、张泮河、黄海楠、蒋宝贵、江佳富、张晶波、褚宸一、高燕、杨红、曹务春); 内蒙古大兴安岭林业中心卫生防疫站 (萨仁高娃、王剑波)

通讯作者: 曹务春, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

35', N42°85')、黑龙江(E130°22', N46°49')及内蒙古(E120°41', N49°17')林区捕鼠。现场进行鼠种鉴定,并从所捕获的鼠体表检出寄生虫,分类计数。鼠消毒后,无菌操作,取脏器冻存。带回实验室后短期存放于-20℃冰箱备用。

2. 标本处理及 DNA 提取:以无菌操作取野鼠脾脏3 mm×3 mm小块,用研磨器研碎,加蛋白酶 K 消化液 300 μl, 55℃ 水浴 3 h, 用等体积酚、酚:氯仿(1:1)、氯仿:异戊醇(24:1)抽提,2 倍体积无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,沉淀干燥后,加 50 μl TE 溶解,-20℃贮存备用^[6]。

3. PCR 扩增方法:

(1) 16S rRNA 基因序列:引物 GE9f, GE10r, Ehr521, GE2 见参考文献 [3,4], 此外设计引物 Anp1-R 及 3-17. 扩增条件同 GE9f~GE2 (表 1)。

表1 粒细胞埃立克体 16S rRNA 基因序列扩增引物

外引物	内引物	产物大小 (bp)	扩增片段位置 (bp)
GE9f~GE10r		918	49~967
	Ehr521~GE10r	440	527~967
	GE9f~GE2	545	49~594
Anp1-R~3-17		547	943~1490

PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察结果。为避免标本污染所造成的假阳性反应,DNA 模板提取、PCR 反应体系配制、加样、扩增、电泳及纯化均在不同的房间进行。配样移液器与加样移液器也避免混用。

(2) *gltA* 基因 PCR 扩增:采用巢式 PCR,外引物为 W1(5'-TGT TTT GGA GTG TGG AGA C-3') 和 W2(5'-GGT GAA CCA ATC TCA GCA A-3'),内引物为 N1(5'-ATA TAG AAA ATC TGA TCG G-3') 和 N2(5'-CTC TAA GTT TGC GTC AGC-3'),扩增产物目的片段大小为 357 bp。反应体系:94℃ 预变性 5 min 后,94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 扩增 25 个循环;最后延伸 7 min。取第 1 轮产物 1 μl 为模板进行第 2 轮扩增,条件同上。

4. 序列测定与分析:PCR 产物用 TaKaRa 公司提供的纯化试剂盒 (DNA Fragment Purification Kit, Code DV807A) 纯化后,3730XL 自动测序仪进行序列测定。登陆美国国家生物技术信息中心网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 将测序结果与 GenBank 中注册的序列进行比较。*gltA* 基因核苷酸序列用 DNASTar 生物软件转化成氨基酸后进行序列比较。用 Phylip 软件及 Tree View 做 *gltA* 基

因核苷酸序列遗传发育树。

结 果

1. 鼠类感染情况:共捕获野鼠 276 只。用 16S rRNA 特异引物检测。从吉林林区捕获的 102 只鼠中,大林姬鼠 43 只,阳性率 6.98%;黑线姬鼠 24 只,阳性率 20.83%;小花鼠 3 只,1 只阳性。此外还有棕背鼯 23 只,仓鼠、小家鼠各 4 只以及褐家鼠 1 只,均为阴性。

黑龙江林区捕获的 61 只鼠中,棕背鼯 34 只,大林姬鼠和黑线姬鼠各 13 只,褐家鼠 1 只,除棕背鼯有 1 只阳性外,其余均为阴性。

内蒙古林区共捕获野鼠 113 只,其中黑线姬鼠 35 只,莫氏田鼠 35 只,红背鼯 13 只,褐家鼠 11 只,黑线仓鼠 6 只,花鼠 6 只,大林姬鼠 5 只,棕背鼯 2 只,均为阴性(表 2)。

表2 不同地区鼠脾脏粒细胞埃立克体 16S rRNA 检测结果

采集地	检测只数	阳性只数	阳性率(%)
吉林省	102	9	8.82
黑龙江省	61	1	1.64
内蒙古自治区	113	0	0.00
合计	276	10	3.62

2. 寄生蜱感染情况:吉林林区共检测鼠体表寄生蜱 69 只,其中 *A. p* 检测阳性的鼠体表寄生蜱 14 只,1 只阳性(7.14%),阴性鼠体表寄生蜱 55 只,1 只阳性(1.82%),2 只阳性蜱分别从黑线姬鼠和大林姬鼠体表检获。吉林 *A. p* 检测阳性的 9 只鼠中,7 只鼠体表有寄生蜱,携带率 77.78%;93 只埃立克体阴性鼠,22 只携带寄生蜱,携带率 23.66%。体表携带寄生蜱的鼠感染 *A. p* 可能性比不携带的高 11.30 倍,Fisher 精确检验 $P=0.002$ 。*A. p* 阳性与阴性鼠的体表寄生蜱的阳性率比较,用 Fisher 精确检验, $P=0.367$,二者差异无统计学意义(表 3)。

表3 吉林林区鼠体表寄生蜱粒细胞埃立克体感染率比较

蜱的存在状况	检测只数	阳性只数	阳性率(%)
阳性鼠寄生蜱	14	1	7.14
阴性鼠寄生蜱	55	1	1.82
合计	69	2	2.89

注:经 Fisher 精确检验,阳性鼠寄生蜱与阴性鼠寄生蜱粒细胞埃立克体感染率差异无统计学意义($P=0.367$)

3. 测序分析:

(1) 16S rRNA 测序:黑龙江、吉林林区动物样品核苷酸序列(1442 bp)与吉林寄生蜱标本一样,命名为 Jilin-16S 株。登陆 GenBank 注册,注册号

DQ342324。同 GenBank 注册的 *A. p* 核苷酸序列比较,与已报道的从内蒙古及黑龙江蜱中扩增的序列(GenBank 序列号 AJ205140)完全一致^[3]。与我国另一株 AY079425 及美国、瑞典、日本国家报道的 *A. p* 对应序列有 3~5 个碱基不同,碱基差异主要发生在 76~85 bp 位置及 1083 bp 位置(以 U02521 为参照),相似性 97%~99%。

(2) *gltA* 基因测序:将扩增产物纯化后测序,目的片段为 357 bp (GenBank 注册号 DQ160228),与 GenBank 注册序列比较,发现其与俄罗斯远东株 (AY339602) 的 *gltA* 基因核苷酸序列最接近,仅相差 2 个碱基,相似性为 99%;与美国 1602 株 (AF304138) 相差 7 个碱基,与美国其他株相差 7~8 个碱基;与俄罗斯未定种的 KhabIx 株碱基差异较大,有 42 个碱基不同,相似性仅为 87%,进化树分析如图 1。

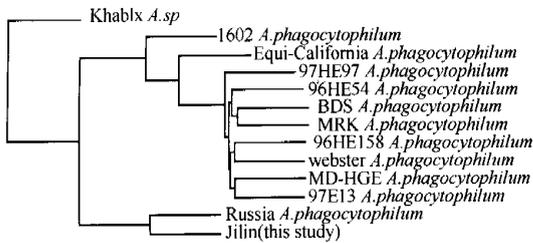


图1 吉林林区粒细胞埃立克体 *gltA* 基因核苷酸序列进化树分析

将 *gltA* 基因核苷酸序列用 DNASTar 生物软件翻译成氨基酸序列,通过 BLAST 与 GenBank 注册的不同种埃立克体氨基酸序列比较,相似性最近的是由俄罗斯远东地区全沟硬蜱检测到的 *A. p* (AAP94123), 113 个氨基酸中有 1 个不同,相似性为 99%;与已报道的 *A. p* 相似性在 84%~99% 之间,与俄罗斯远东未定种的 KhabIx 株氨基酸相似性为 85%。

讨 论

A. p 病的动物宿主尚未定论,一些研究结果表明,野生鼠类、鹿和羊可能是人埃立克体病的主要动物宿主^[9,10]。作为储存宿主需要它能将病原体传给蜱,还能供相当比例的蜱吸食,以维持埃立克体在自然界中“蜱-宿主动物”的循环^[4]。本研究中吉林、黑龙江林区鼠标本与鼠体表蜱标本扩增的 *A. p* 16S rRNA 片段相似性为 100%,从分子流行病学的角度证实鼠是我国北方地区 *A. p* 的宿主动物。

gltA 基因是编码三羧酸循环的一种酶,是几乎所有生物体细胞中生成 ATP 的一个关键的调控因子。它能从“种”的水平区分埃立克体。据报道目前已成功的测出 13 个种埃立克体的 *gltA* 基因,不同种的埃立克体 *gltA* 基因核苷酸序列一致性差异较大,从 49.7%~99.8% 不等,而 16S rRNA 基因序列两两比较的一致性高达 83.5%~99.9%^[11]。因此 *gltA* 基因序列的测定可以为我国 *A. p* 进化树的构建提供有意义的信息。*A. p* 的 *gltA* 基因检测在我国尚无文献报道。本研究测定的鼠及蜱标本 *gltA* 基因核苷酸序列与俄罗斯远东株相似性最近,可能因为吉林与俄罗斯远东地理位置接近,气候条件、宿主动物相似。美国不同的几株 *A. p* 病原体的 *gltA* 基因序列未见差异,说明 *A. p* 病原体的存在可能有一定的地区聚集性。

我国北方三省蜱感染 *A. p* 已得到证实,内蒙古的大兴安岭地区从人血中扩增出 *A. p* 16S rRNA 基因^[8]。然而东北地区是否为 *A. p* 的疫源地还需要深入研究该地区人群感染的情况,以及同一地区蜱、动物、人群 *A. p* 感染的相关性。

参 考 文 献

- [1] Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, et al. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA, 1996, 275(3): 199-205.
- [2] 曹务春, 张习坦. 人埃立克体病的发现与研究进展. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(4): 57-60.
- [3] Cao WC, Zhao QM, Zhang PH, et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks from northeastern China. Am J Trop Med Hyg, 2003, 68(5): 547-550.
- [4] 高东旗, 曹务春, 张习坦, 等. 野外采集标本中人埃立克体 16S rRNA 基因扩增方法及应用. 寄生虫与医学昆虫学报, 2001, 8(3): 175-180.
- [5] 高东旗, 曹务春, 赵秋敏, 等. 我国北方蜱中人粒细胞埃立克体 16S rRNA 基因的检测. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, 7(2): 103-107.
- [6] 赵秋敏, 曹务春, 李建民, 等. 粒细胞埃立克体 444-Epank 基因的检测与序列分析. 中华流行病学杂志, 2002, 23(4): 286-288.
- [7] 高东旗, 张习坦. 人粒细胞埃立克体病——又一种蜱传病. 寄生虫与医学昆虫学报, 1999, 6(3): 185-192.
- [8] 高东旗, 曹务春, 张习坦, 等. 大兴安岭地区人群埃立克体感染的调查. 中华流行病学杂志, 2001, 22(2): 137-141.
- [9] Jennifer JW, Barbaara G, David FN, et al. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol, 1997, 35(4): 853-855.
- [10] Telford S, Dawson JE, Katavolos P, et al. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6209-6214.
- [11] Hisashi Inokuma, Philippe Brouquim, Michel Drancourt, et al. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and Identification of ehrlichia. J Clin Microbiol, 2001, 39(9): 3031-3039.

(收稿日期: 2006-07-26)

(本文编辑: 王多春)