

## · 实验室研究 ·

# 北京市农村人群及家畜嗜吞噬无形体和查菲埃立克体感染状况调查

张秀春 张立霞 李伟红 王誓闻 孙玉兰 王圆圆 关增智 刘秀军  
杨育松 张曙光 禹惠兰 张丽娟

**【摘要】** 目的 调查北京市农村人群及家畜新发查菲埃立克体和嗜吞噬无形体感染状况。方法 按地理位置选择北京市西北(延庆)、东北(密云)及东南(通州)地区 3 个植被率较高的旅游县(区)。按在册户籍随机以家庭为单位,调查并采集 562 人及 90 只山羊、71 头牛和 2 只家犬血液标本,按 WHO 推荐间接免疫荧光方法(mIFA)检测血清 IgG 抗体。动物血球提取 DNA 扩增无形体 16S rRNA 基因并测序分析。结果 人群查菲埃立克体和嗜吞噬无形体抗体阳性率分别为 16.5% 和 14.0%;山羊和牛嗜吞噬无形体抗体阳性率分别为 2.3% 和 0;2 只家犬未检测到相应抗体。山羊、牛无形体 16S rRNA 扩增阳性率分别为 48.9% 和 23.9%。16S rRNA 序列(228 bp)分析显示,3 类优势流行株无明显地理分布特征。结论 北京市农村人群存在查菲埃立克体和嗜吞噬无形体感染,调查地区家畜存在无形体感染。

**【关键词】** 查菲埃立克体;嗜吞噬无形体;血清流行病学;间接免疫荧光方法

**Investigation on *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* infection among farmers and domestic animals in rural areas of Beijing, China** ZHANG Xiu-chun<sup>1</sup>, ZHANG Li-xia<sup>2</sup>, LI Wei-hong<sup>1</sup>, WANG Shi-wen<sup>2</sup>, SUN Yu-lan<sup>1</sup>, WANG Yuan-yuan<sup>2</sup>, GUAN Zeng-zhi<sup>1</sup>, LIU Xiu-jun<sup>3</sup>, YANG Yu-song<sup>4</sup>, ZHANG Shu-guang<sup>5</sup>, YU Hui-lan<sup>2</sup>, ZHANG Li-juan<sup>2</sup>. 1 Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China; 2 National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Tongzhou District Center for Disease Control and Prevention, Beijing; 4 Miyun County Center for Disease Control and Prevention, Beijing; 5 Yanqing County Center for Disease Control and Prevention, Beijing  
Corresponding author: ZHANG Li-juan, Email: zhanglijuan@icdc.cn  
This work was supported by grants from the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB530200/2010CB530206) and National Key Science and Technology Projects of China (No. 2008ZX10004-008, 2009ZX10004-203).

**【Abstract】** Objective To investigate the status of *Ehrlichia (E.) chaffeensis* and *Anaplasma (A.) phagocytophilum* infection among farming populations and domestic animals in the rural area of Beijing, China. Methods Blood samples from 562 farmers and 163 blood samples including 90 goats, 71 ox and 2 dogs, were collected. Specificity of IgG antibodies against *E. chaffeensis* and *A. phagocytophilum* were tested by micro-indirect immunofluorescent assay (mIFA). 16S rRNA genes of *A. phagocytophilum* were amplified from the domestic animal blood samples and products were sequenced and analyzed by nested PCR. Results The positive rates of *E. chaffeensis* and *A. phagocytophilum* antibody were 16.5% and 14.0% respectively for farmers. The total positive rates of *A. phagocytophilum* were 2.3% and 0 for both goats and oxen respectively. No antibody was found for the 2 tested dogs. The PCR positive rates were 48.9% and 23.9% for goats and oxen respectively. Three dominant varieties of *A. phagocytophilum* were demonstrated in goats and oxen. Conclusion The prevalence rates of *E. chaffeensis* and *A. phagocytophilum* were identified in the rural areas of Beijing.

**【Key words】** *Ehrlichia chaffeensis*; *Anaplasma phagocytophilum*; Seroprevalence; Micro-indirect immunofluorescent assay

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.05.016

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2010CB530200, 2010CB530206); 传染病防治科技重大专项-细菌性传染病病原谱流行规律与变异研究(2009ZX10004-203)及病原体实验室网络化监测技术研究(2008ZX10004-008)

作者单位:100013 北京市疾病预防控制中心(张秀春、李伟红、孙玉兰、关增智); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(张立霞、王誓闻、王圆圆、禹惠兰、张丽娟); 北京市通州区疾病预防控制中心(刘秀军); 密云县疾病预防控制中心(杨育松); 延庆县疾病预防控制中心(张曙光)

张秀春、张立霞同为第一作者

通信作者:张丽娟, Email: zhanglijuan@icdc.cn

人单核细胞埃立克体病(Ehrlichiosis)和人粒细胞无形体病(Anaplasmosis)分别由查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)和嗜吞噬无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)引起的蜱传立克次体病<sup>[1]</sup>。2006年安徽省某医院发生无形体院内感染事件<sup>[2]</sup>。随后天津地区农业高危人群血清抗体调查阳性率为8.8%,并有逐年上升趋势<sup>[3]</sup>。大量数据证实我国及周边国家如日本、韩国等存在该病<sup>[4-6]</sup>。我国学者已经从啮齿动物及蜱中分离到嗜吞噬无形体<sup>[7]</sup>,新近有研究在山东省胶州半岛发热患者中分离到该病原体。以往资料显示北京市昌平地区从病原学上证实有蜱传斑疹热<sup>[8,9]</sup>。因蜱传立克次体病缺乏典型临床表现,易误诊,造成多器官受累,甚至死亡。为进一步调查北京市农业地区是否存在新发蜱传埃立克体病及无形体病,于2009年3—4月对延庆、密云和通州区(县)进行人群及家畜感染状况调查。

### 材料与方 法

1. 调查地区及标本采集:本次调查按地理位置选择高植被率的延庆、密云及通州区(县),再按地理位置选择3个自然乡镇。为使性别及年龄均衡,调查设计以家庭为单位,按在册户籍,随机单双号抽取,每调查点预计调查男、女各100人。调查对象资料收集包括职业、性别、年龄、近1年内是否有发热、皮疹等健康史以及蜱、螨、蚤等媒介叮咬史等。调查点预计采集羊、牛及犬标本各50份。按调查户是否饲养家畜及每户饲养不同种类家畜的数量,随机采集5只羊、2头牛及1只犬。在兽医部门配合下,采集家畜动物血液,分离血清用于抗体检测,血球提取DNA检测无形体16S rRNA基因。标本当地-20℃保存,后送中国疾病预防控制中心传染病预防控制所无形体室检测。

2. 血清抗体检测:按WHO推荐的微量间接免疫荧光(mIFA)方法。查菲埃立克体抗原(Arkansas)由美国疾病预防控制中心提供,嗜吞噬无形体抗原(Webster)为美国Johns Hopkins大学医学院JS. Dumler实验室惠赠。阳性血清为传染病预防控制所无形体室使用标准菌株免疫家兔制备。

3. 无形体16S rRNA基因扩增:动物血球DNA提取采用Qiagen试剂盒按说明书进行。正常人血DNA及无菌水按同样操作提取,作为阴性对照。嗜吞噬无形体细胞培养物提取DNA作阳性对照。巢式PCR扩增无形体16S rRNA基因<sup>[10]</sup>。简述:一轮PCR用外引物1(5'-TTG AGA GTT TGA TCC

TGG CTC AGA ACG-3')和2(5'-CAC CTC TAC ACT AGG AAT TCC GCT ATC-3')各1μl,DNA模板10μl,其他试剂按常规进行。反应条件为94℃预变性5min,40个循环包括94℃变性45s,55℃退火50s,72℃延伸1min,最后72℃总延伸5min。二轮PCR用无形体特异引物HGA1(5'-GTC GAA CGG ATT ATT CTT TAT AGC TTG-3')和HGA2(5'-TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAC-3'),一轮产物1μl,条件同一轮反应,反应产物用EB凝胶电泳观察并拍照。PCR产物直接送生物工程(上海)有限公司测序。

4. 统计学分析及遗传进化分析:采用Excel软件进行人及动物血清抗体结果数据录入分析。SAS 9.1软件统计分析阳性率。运用 $\chi^2$ 检验确定阳性率差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。无形体16S rRNA序列分析采用进化分析软件MEGA 4.0完成。

### 结 果

1. 调查点概况:本次调查点均为北京市重点旅游区县,其中延庆、密云县均是三面环山,森林覆盖率均达50%以上,水源充足,适合媒介蜱孳生。共调查562人,年龄30~60岁。其中男性273人,平均年龄50岁;女性289人,平均年龄49岁。调查对象均为农村地区人群,主要从事农作物或果树种植及家畜养殖业。在春夏蜱孳生高峰季节,日出家畜野外自由放养,家畜体表多携带蜱虫。本次调查共采集90只山羊、71头牛和2只家犬血液标本。

2. 人及家畜血清抗体检测:延庆、通州和密云3个调查点人群嗜吞噬无形体血清抗体阳性率依次为22.8%、17.5%和1.6%,平均为14.0%。各点间比较(密云与延庆、密云与通州)阳性率差异有统计学意义(均 $P<0.001$ ),而性别比较差异无统计学意义。山羊血清抗体阳性率为2.3%,牛和犬未检测到相应抗体。3个调查点人群查菲埃立克体抗体阳性率分别为4.6%、12.6%和32.5%,平均16.5%。各点间比较(延庆与密云、通州与密云)阳性率差异有统计学意义(均 $P<0.001$ ),而性别比较差异无统计学意义。

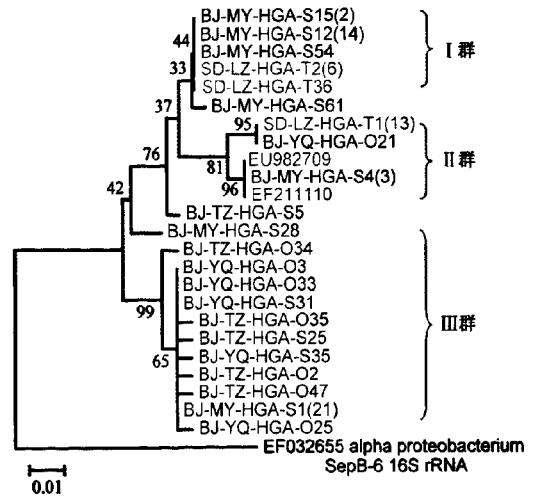
3. 病原体地理分布特征:本次调查人群查菲埃立克体与嗜吞噬无形体抗体阳性率存在明显地理分布特征。2种病原体在延庆和密云县人群血清流行率的差异有统计学意义(均 $P<0.001$ )。延庆县人群嗜吞噬无形体感染率明显高于密云县,而密云县人群查菲埃立克体感染明显高于延庆县,通州区2种

病原体阳性率的差异无统计学意义( $P=0.117$ )。

4. 16S rRNA 基因扩增及序列分析:本次调查山羊、牛及家犬无形体 16S rRNA 基因 PCR 阳性率分别为 48.9%(44/90)、23.9%(17/71)和 0(0/2)。对测序成功的 63 条 16S rRNA 基因部分序列(228 bp)递交 GenBank,并将本研究检出序列与我国其他地区检出序列及 GenBank 中世界各地无形体相应序列进行同源比较及聚类分析,发现本调查的嗜吞噬无形体 16S rRNA 基因存在较大变异性,主要分为 3 群变异株(图 1)。I 群以密云县山羊 BJ-MY-HGA-S12 株为代表,检出率为 21.5%,山东省胶州半岛长角血蜱检出的序列 SD-LZ-HGA-T2 和 SD-LZ-HGA-T36 与该群归为一类。目前还未检测到 100%同源序列,而与浙江省山羊检出序列(HM595732)、中国西南地区牛(FJ169957)、山羊(FJ389577)及韩国 Jeju 岛长角血蜱检出序列 99%同源。II 群以 BJ-MY-HGA-S4 为代表,检出率为 4.8%。该序列与我国 2006 年安徽省某医院无形体院内感染患者检出序列(EF211110)以及 2007 年山东省沂源地区发热无形体患者检出序列(EU982709)100%同源。虽然检出率不高,但在我国周边国家如日本野鹿(AB454076)、南非犬(AY570540)及韩国长角血蜱(AF470699)均检测到 100%同源序列。III 群为本次调查检出率最高(52.4%),在调查的 3 个区县的牛及山羊中均有分布。我国东南地区(浙江省)山羊(HM439432)、西南地区山羊(FJ389576、EU709493)中均有较高检出率。此外,在日本野鹿(AB454075、AB211164)中也有较高检出率。除了上述 3 种优势群外,本实验还检出 22 个相对独立变异株。

### 讨 论

立克次体在分类上主要归属为传统的立克次体科,如恙虫病东方体属的恙虫病东方体、立克次体属中的斑点热群立克次体及斑疹伤寒群立克次体;另一大类是近年世界范围内新发的立克次体病原体如引起无形体病的嗜吞噬无形体及引起埃立克体病的查菲埃立克体等。目前美国疾病预防控制中心已经将这 3 种列为法定传染病,而在我国该疾病还未归类法定传染病管理,无论在临床上,还是公共卫生及民众对其仍缺乏认识。以往资料证实,北京地区存在西伯利亚立克次体引起的北亚蜱传斑点热<sup>[8]</sup>。本次是在北京市 3 个旅游区(县)首次开展的流行病学调查,结果证实农业人群普遍存在查菲埃立克体和嗜吞噬无形体感染,人群血清抗体阳性率分别为



注:蓝体字为本次调查检出序列;红体字为 2006 年安徽省院内感染患者序列(EF211110)及 2007 年山东省患者检出序列(EU982709);粉体字为山东省莱州地区蜱检出序列。序列组成分别为调查或城市拼音首字母缩写;调查地区拼音首字母缩写;病原体英文首字母缩写和调查动物英文首字母缩写+序列编号+(本次调查检出的 100%同源序列数量);EF032655 为构建进化树参考序列

图 1 北京市 3 个调查点家畜动物嗜吞噬无形体 16S rRNA 基因聚类分析

16.5%和 14.0%,其无形体感染率高于 2006 年天津地区调查结果(8.8%)<sup>[1]</sup>,而相对低于北美流行地区人群阳性率(15%~36%)<sup>[11,12]</sup>。

本调查发现 2 种病原体人群抗体阳性率存在地区分布差异,嗜吞噬无形体主要分布在延庆和通州地区,而查菲埃立克体主要分布在密云和通州地区。同一调查地区,人群感染 2 种病原体存在明显的负向分布特征。另值得注意的是作为人兽共患病,尽管人群嗜吞噬无形体 IgG 抗体阳性率明显存在(14.0%)以及山羊血液 DNA 无形体 16S rRNA 基因检出率平均高达 48.9%,但山羊抗体阳性率却很低(2.3%),而牛未检测到相应抗体。推测人群及家畜感染可能存在种属差异,或国外分离株与我国家畜动物抗原表型存在差异。

嗜吞噬无形体 16S rRNA 基因序列分析显示,该地区病原体存在明显变异性,共检出 25 种变异序列,聚类分析后发现 3 群,其中 BJ-MY-HGA-S1 为代表流行株,3 个地区动物中均有检出。同源分析比较发现这一优势群在我国东南地区、西南地区山羊中均有较高检出率,另在日本野鹿中也有较高检出率。本调查中以 BJ-MY-HGA-S4 为代表的山羊序列与我国安徽、山东省患者相应序列有 100%同源。因此,开展北京地区无形体病原学调查具有重要的

公共卫生意义。

本次调查表明北京地区人群及家畜存在查非埃立克体和嗜吞噬无形体感染。应进一步开展其生态学研究及媒介种类和宿主监测,尤其是嗜吞噬无形体人畜共患优势流行株病原学研究对于新发蜱传立克次体病防控具有重要指导意义。

(现场标本采集得到北京市通州区、延庆县和密云县疾病预防控制中心相关人员及调查点乡镇卫生院相关部门防保人员的大力支持与协助,深表感谢)

参 考 文 献

[1] Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(12):1828-1834.

[2] Zhang LJ, Liu Y, Ni DX, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA*, 2008, 300(19):2263-2270.

[3] Zhang LJ, Shan A, Mathew B, et al. Rickettsial seroepidemiology in farm workers, Tianjin, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(16):938-939.

[4] Zhan L, Cao WC, Jiang JF, et al. *Anaplasma phagocytophilum* in livestock and small rodents. *Vet Microbiol*, 2010, 144(3-4):405-408.

[5] Yoshimoto K, Matsuyama Y, Matsuda H, et al. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosus* in Hokkaido, Japan. *Vet Parasitol*,

2010, 168(1-2):170-172.

[6] Lee M, Yu D, Yoon J, et al. Natural co-infection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma bovis* in a deer in South Korea. *J Vet Med Sci*, 2009, 71(1):101-103.

[7] Zhan L, Cao WC, Chu CY, et al. Tick-borne agents in rodents, China, 2004-2006. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(12):1904-1908.

[8] Yu XJ, Jin Y, Fan MY, et al. Genotypic and antigenic identification of two new strains of spotted fever group *rickettsiae* isolated from China. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(1):83.

[9] Zhang JZ, Fan MY, Bi DZ, et al. Genotypic identification of three new strains of spotted fever group *rickettsiae* isolated in China. *Acta Virol*, 1996, 40(4):215-219.

[10] Wen B, Jian R, Zhang Y, et al. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(9):3286-3290.

[11] Bakken JS, Goellner P, van Etten M, et al. Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis among permanent residents of northwestern Wisconsin. *Clin Infect Dis*, 1998, 27(6):1491-1496.

[12] Ijdo JW, Meek JL, Cartter ML, et al. The emergence of another tickborne infection in the 12-town area around Lyme, Connecticut: human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis*, 2000, 181(4):1388-1393.

(收稿日期:2011-12-30)

(本文编辑:张林东)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会通讯编委名单

- |                     |                   |                        |
|---------------------|-------------------|------------------------|
| 陈 曦(湖南省疾病预防控制中心)    | 奚丰满(成都市疾病预防控制中心)  | 高 崁(北京市疾病预防控制中心)       |
| 姜宝法(山东大学公共卫生学院)     | 李 杰(北京大学医学部)      | 李十月(武汉大学公共卫生学院)        |
| 李秀央(浙江大学医学院公共卫生学院)  | 廖苏芬(中国医学科学院基础医学院) | 林 玫(广西壮族自治区疾病预防控制中心)   |
| 林 鹏(广东省疾病预防控制中心)    | 刘爱忠(中南大学公共卫生学院)   | 刘 刚(四川省疾病预防控制中心)       |
| 刘 静(北京安贞医院)         | 刘 莉(四川省疾病预防控制中心)  | 刘 玮(军事医学科学院微生物流行病学研究所) |
| 鲁凤民(北京大学医学部)        | 欧剑鸣(福建省疾病预防控制中心)  | 彭晓爻(北京市疾病预防控制中心)       |
| 邱洪斌(佳木斯大学)          | 蹇晓勇(解放军总医院)       | 苏 虹(安徽医科大学公共卫生学院)      |
| 汤 哲(首都医科大学附属宣武医院)   | 田庆宝(河北医科大学公共卫生学院) | 王 蓓(东南大学公共卫生学院)        |
| 王素萍(山西医科大学公共卫生学院)   | 王志萍(山东大学公共卫生学院)   | 谢 楠(天津医科大学公共卫生学院)      |
| 徐爱强(山东省疾病预防控制中心)    | 徐慧芳(广州市疾病预防控制中心)  | 严卫丽(新疆医科大学公共卫生学院)      |
| 阎丽静(中国乔治中心)         | 杨春霞(四川大学华西公共卫生学院) | 余运贤(浙江大学医学院公共卫生学院)     |
| 曾哲涛(北京安贞医院)         | 张 波(宁夏回族自治区卫生厅)   | 张宏伟(第二军医大学)            |
| 张茂俊(中国疾病预防控制中心传染病所) | 张卫东(郑州大学公共卫生学院)   | 赵亚双(哈尔滨医科大学公共卫生学院)     |
| 朱 谦(河南省疾病预防控制中心)    | 祖荣强(江苏省疾病预防控制中心)  |                        |