

中国嗜吞噬细胞无形体分离株 多间隔序列分型分析

程雪琴 张丽娟

【摘要】目的 对我国嗜吞噬细胞无形体分离株进行多间隔序列分型(MST)分型。**方法** 根据 GenBank 收录的 4 株无形体全基因组序列,利用 Mauve 2.3.1 软件行种内基因组比对,选择具有变异间隔区进行引物设计,通过引物特异性及扩增效率等预实验筛选引物,并对实验菌株进行 PCR 扩增,分析单核苷酸多态性(SNPs)。将每株菌间隔序列拼接后进行分型分析并构建进化树,分析不同地区、不同动物种类来源菌株遗传变异关系。**结果** 共筛选出 22 对引物,用于我国 11 株无形体分离株 MST 分型,SNPs 分析显示,碱基转换发生率最高(60.2%, 251/417),其中 A-G 转换居首(18.9%, 79/417),颠换占 23.0%(96/417),插入及缺失发生率占 16.7%(70/417)。11 株菌 22 条间隔序列拼接后(约 11 047 bp)均为独立变异型。进化分析发现山东省莱州地区重症患者分离株(LZ-H1、H2、H3、H4、H5)及当地长角血蜱分离株 LZ-T1 与美国 Webster 株及 HZ 株聚为一簇,而北京分离株 BJ-H1 与新疆分离株 XJ-H1 和 XJ-H3 聚为一类。莱州地区另一蜱分离株 LZ-T2 与新疆另外一人源分离株聚为一类,与莱州重症患者分离株遗传关系密切。**结论** 我国无形体分离株间隔序列存在明显的遗传多态性,MST 分型技术可用于无形体疫情暴发时的快速诊断和疫情追踪。

【关键词】 嗜吞噬细胞无形体;多间隔序列分型

Multispacer typing of Chinese *Anaplasma phagocytophilum* isolates Cheng Xueqin, Zhang Lijuan. Department of Anaplasma, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: Zhang Lijuan, Email: zhanglijuan@icdc.cn
The work was supported by grants from the National Key Science and Technology Projects of China (No. 2008ZX10004-008, No. 2012ZX10004215) and National Basic Research Program of China (973 Program)(No. 2010CB530206).

【Abstract】 Objective To type the Chinese *Anaplasma phagocytophilum* isolates by Multispacer typing (MST). **Methods** Based on the genomes of the 4 published *Anaplasma* strains, 4 genomic sequences were analyzed by Mauve 2.3.1 software and variable spacer sequences were selected for designing primers with the bio-software Primer Premier 5.0. A total of 11 Chinese *A. phagocytophilum* isolates, obtained from different areas of China during 2009–2012 were assayed by the MST. Twenty two intergenic sequences for each isolate tested and the reference *A. phagocytophilum* strain Webster and *A. phagocytophilum* strain HZ were concatenated in the order of HGA-mst 1F/1R-mst 2F/2R, HGA-mst 22F/22R. **Results** Twenty two pairs of primers were successfully used for typing the Human granulocytic anaplasmosis (HGA) strains in the study. Those 22 intergenic sequences exhibited a great diversity among the strains tested and each of the strain tested was identified as unique genotype, according to the alignment analysis of the 22 concatenated intergenic sequences. Of these single nucleotide polymorphism (SNPs) identified in the study, the nucleotide transitions shared the highest percentage(60.2%, 251/417) and then the nucleotide transversion, accounted for 23.0%(96/417) and the indel events (insertion/deletion) were observed of 16.7% (70/417) SNPs. Phylogenetic analysis indicated that the 5 strains from patients (LZ-H1, LZ-H2, LZ-H3, LZ-H4, LZ-H5) from Laizhou areas, Shandong province and 1 tick strain (LZ-T1) from *Haemaphysalis longicornis* collected from the same areas where the patients lived were grouped in the same clan with the reference *A. phagocytophilum* strain Webster and strain HZ. Beijing isolates (BJ-H1) grouped with Xinjiang isolates (XJ-H1 and XJ-H3) while another tick isolates from Laizhou areas (LZ-T2) and another Xinjiang human isolate (XJ-H2) were in the same clan, which was closely related to the isolates from severe patients in Laizhou. **Conclusion** Chinese HGA isolates exhibited a great diversity of intergenic regions. MST seemed a valuable tool for the detection and tracing for any endemic strains of *Anaplasma* during the outbreak investigations in the public health events.

【Key words】 *Anaplasma phagocytophilum*; Multispacer typing

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.026

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX10004-008, 2012ZX10004215); 国家基础研究项目—“973 计划”(2010CB530206)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所无形体室

通信作者: 张丽娟, Email: zhanglijuan@icdc.cn

2006 年安徽省某医院发生无形体院内感染事件,这是我国首次证实无形体病,也是首次证实该病可以人传人^[1]。2009—2011 年,本课题组联合国内多家临床感染科室收集可疑病例进行无形体的分离、鉴定及分子流行病学研究。目前从全国各地共获得 12 株无形体分离株,不同地区分离株的致病毒力基因 *mst2*、*ankA* 及 16S rRNA 序列存在差异,但同地区分离株则高度保守。为进一步探索菌株间差异,本研究对这些菌株进行多间隔序列分型(MST)研究。

材料与方法

1. 实验菌株:12 株无形体分离株信息见表 1。参考菌株 *Anaplasma (A.) phagocytophilum* Webster 为美国霍普斯金大学 Dumler 教授惠赠。引物特异性检测菌株为 27 株立克次体: *Rickettsia (R.) prowazekii*; *R. typhi*; *Orientia tsutsugamushi* Karp, Kato, Gilliam; *R. sibirica*; *R. conorii*; *R. marmionii*; *R. akari*; *R. rickettsii*; *R. africa*; *R. parkeri*; *R. japonica*; *R. slovaca*; *R. aeschlimannii*; *R. montanensis*; *R. helvetica*; *R. felis*; *R. australis*; *R. canadensis*; *R. bellii*; *R. heilongjiangensis*; *Anaplasma phagocytophilum* Webster, MRK, Slovienie, MD; *Ehrlichia chaffeensis* 和 16 株临床常见致病菌: *Bartonella henselae*; *Bartonella quintana*; *Coxiella burnetii*; *Borrelia burgdorferi*; *Escherichia coli*; *Vibrio cholerae*; *Bacillus anthracis*; *Haemophilus influenzae*; *Listeria spp.*; *Legionella spp.*;

表 1 实验菌株信息

序号	名称	来源	分离时间/地区
1	LZ-h1	急性发热蜱咬患者	2010/山东莱州
2	LZ-h1	急性发热蜱咬患者	2010/山东莱州
3	LZ-h3	急性发热蜱咬患者	2011/山东莱州
4	LZ-h4	急性发热蜱咬患者	2011/山东莱州
5	LZ-h5	急性发热蜱咬患者	2011/山东莱州
6	LZ-T1	饱血长角血蜱	2010/山东莱州
7	LZ-T2	饱血长角血蜱	2010/山东莱州
8	BJ-H1	急性发热蜱咬患者	2010/北京远郊
9	CZ-H1	急性发热蜱咬患者	2011/河北沧州
10	XJ-H1	急性发热蜱咬患者	2010/新疆
11	XJ-H2	急性发热蜱咬患者	2011/新疆
12	XJ-H3	急性发热蜱咬患者	2011/新疆

Yersinia pestis; *Shigella dysenteriae*; *Neisseria meningitidis*; *Leptospira spp.*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Klebsiella pneumonia* (上述菌株为中国疾病预防控制中心传染病预防控制所相应科室惠赠)。

2. 引物设计及特异性检测:下载 GenBank 收录的 4 株无形体 [*Anaplasma marginale* subsp. Centrale (CP001759)、*A. phagocytophilum* HZ (CP000235)、*Anaplasma marginale* str. Florida (CP001079)、*A. marginale* str. St. Maries (CP000030)] 基因组序列,使用 Mauve 2.3.1 软件进行种内基因组比对。通过查找保守基因间隔区域,筛选 > 100 bp 且有一定变异的间隔区,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,见表 2。引物用于 27 株立克次体、16 株临床常见致病菌及正常人、犬、猫、牛、山羊、绵羊、马、鼠及媒介蜱等 DNA 进行 PCR 扩增以检测特异性。

表 2 无形体 MST 用引物

引物	序列(5' ~ 3')	退火温度 (°C)	片段长度 (bp)
HGA-mst1F/1R	TCCCTGGTCTTGGTTCTAATG/AAAGCGGATTTGGTTCCTGTA	55	464
HGA-mst2F/2R	CCTACGACGCTCCACAAC/CGGACTTAGACCTCGGACA	55	1 169
HGA-mst3F/3R	CGTGGGTTGCTCAGCCAATAA/AAGCGTTACTCAGAACAGCAGAA	55	477
HGA-mst4F/4R	GTTGTTAGCGATGATGGG/ACGAGATAGCGATTTCTTGTA	52	192
HGA-mst5F/5R	ATTGACACTCCGATGTTCTCC/AGTTTACTGGATGGCTCTGC	52	643
HGA-mst6F/6R	AGGGTTCTTTGCGTCGTG/CGCTGTCCTGGATTTCTTTA	52	422
HGA-mst7F/7R	CCTCAGGAAGGCGTAATGG/TCTTGGCACGATGGACACT	55	472
HGA-mst8F/8R	AGCAGACGGAATGGACAGG/AATCAAAGAAACATCGGAAGC	52	574
HGA-mst9F/9R	GGAGGGTATTGAGTCCGTAA/AGCCTAGCAAGCGTGAAA	52	1 008
HGA-mst10F/10R	ACGATGCGGCTTATTTATG/TTTATCCCTCGTTCCTTGG	52	253
HGA-mst11F/11R	GGGCAACTACTTATATCGC/GGATTTGCTGCTTATGTAGGGT	52	717
HGA-mst12F/12R	AGTTCTGGTGCCTGACA/CTTTTCGCTACCTTCCCTTTA	52	240
HGA-mst13F/13R	ATGCCATTGTTTCGATTTTCAG/GATGTTTCATGTCGCGGTTT	52	1 039
HGA-mst14F/14R	CGGCAAAATCTCGCTCAG/TGTTCAATAACCAACATCCCT	52	704
HGA-mst15F/15R	CGGTGCTTTCTGCTGCTA/CCACGGGCTGTATTGTATG	52	633
HGA-mst16F/16R	TGGCTGTGCTTATACCGA/CTACTCTGCTGACTTGTGGC	52	784
HGA-mst17F/17R	TCCCTGCTCTAATTTCTATGA/CGTAACGATGTAACCTCTAT	52	665
HGA-mst18F/18R	AGCGTATCACAGGTTCCAG/CAGTCCGTCATTTCCCTTCTAT	55	1 148
HGA-mst19F/19R	CCGTATCACTCACGAACAA/CAAACCAGCCTTTAACCTAT	50	224
HGA-mst20F/20R	TTTACACCCTCTACCACTACTCAC/CTTTCTACGAACATTTCCCTTTATC	55	694
HGA-mst21F/21R	GGCGTAAATGCCATCGTAA/CTAGTATTGGGTGTTCCATAAAGTG	52	615
HGA-mst22F/22R	ACACCTCACATAATGGCAC/AGCGATGAACATAACACTCTGG	52	349

注:HGA 为嗜吞噬细胞无形体

3. DNA 提取及 PCR 扩增: 利用德国 Qiagen 公司 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 操作按说明书进行。PCR 扩增采用北京赛百盛生物技术有限公司试剂盒, 总体积为 25 μ l, 按试剂盒说明书进行。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 退火 30 s (具体引物退火温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。A. phagocytophilum Webster 株 DNA 为阳性对照, 正常人血 DNA、蜱 DNA (本室保存) 及无菌去离子水为阴性对照。PCR 产物利用北京赛百盛生物技术有限公司回收试剂盒进行回收、纯化, 然后按北京全式金生物技术有限公司 peasy-T1 克隆试剂盒进行克隆, 阳性克隆送北京擎科新业生物技术有限公司及生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序。序列经 BLAST 进行同源性比较, 利用 Lasergen 7.1 Megalign 软件分析 SNPs。

4. 拼接序列及进化分析: 为探讨不同地区、不同来源分离株遗传进化关系, 22 对引物扩增产物经拼接后, 利用 Mega 5.0 软件进行 Clustal W 分析。采用邻接法构建进化树。

结 果

1. 引物筛选: 共设计 29 对引物进行筛选, 筛选出 22 对。对 12 株无形体分离株扩增后, PCR 产物大小与预期结果基本一致。与无形体遗传关系密切的 27 株立克次体, 16 株临床常见致病菌及正常人血 DNA、犬、猫、牛、山羊、绵羊、马、鼠及媒介蜱等 DNA 均无非特异扩增。

2. SNPs: 12 株无形体分离株利用 22 对引物进行扩增, PCR 产物经 2 家公司进行独立测序, 结果一致。沧州分离株(CZ-H1)部分引物未扩出条带。因此对 11 株菌进行 SNPs 分析, 结果显示, 22 对引物扩增片段均显示一定碱基变异性, 碱基转换发生率最高(60.2%, 251/417), 其中 A-G 转换居首(18.9%, 79/417)。碱基颠换占 23.0%(96/417)。而碱基插入及缺失发生率较少, 占 16.7%(70/417)。

3. MST 分型及聚类分析: 11 株菌经 22 对引物扩增拼接后获得 11 047 bp 大小片段(因缺失和插入, 每株菌碱基数略不同)。Clustal W 类比分析发现每株菌均为独立变异型。进化树分析结果显示, 莱州地区重症患者分离株(LZ-H1、H2、H3、H4、H5)及当地长角血蜱分离株 LZ-T1 与美国 Webster 株及 HZ 株聚为 1 簇, 北京分离株 BJ-H1 与新疆分离株 XJ-H1 和 XJ-H3 聚为 1 簇(图 1)。莱州另一蜱分离株 LZ-T2 与新疆另一人源分离株聚为一类, 并与莱

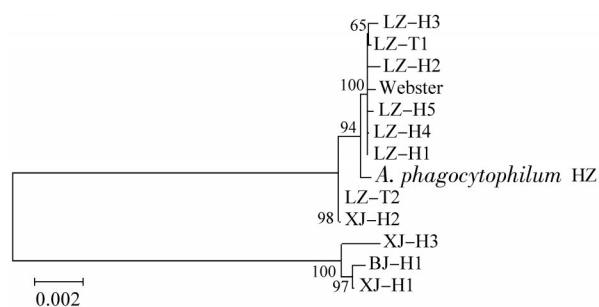


图 1 无形体 22 条间隔序列拼接后(约 11 047 bp)进化树州重症患者分离株遗传关系密切。

讨 论

MST 不仅在人工培养菌广泛应用, 在细胞培养菌如立克次体菌株分型中也得到成功应用。目前, 几乎所有立克次体种均可用该方法进行成功分型^[2]。

本研究采用 GenBank 收录的 4 株无形体菌株, 通过基因组比对, 选择高变间隔序列进行引物设计并优化 PCR 条件, 成功筛选 22 对无形体 MST 分型引物并用于 11 株无形体分离株分型, 结果显示, 我国无形体分离株间隔序列存在较大变异, 所有分离株均为独立变异株。以往研究结果显示, 我国无形体分离株关键毒力基因 *m*sp2 和 *ankA* 核酸及相应蛋白氨基酸序列存在地区分布特征, 如山东省莱州地区分离的 2 株人源无形体(LZ-H1、LZ-H2)及当地长角血蜱分离株(LZ-T1) *m*sp2 和 *ankA* 基因 100% 同源, 而北京分离株(BJ-H1)与河北省分离株(CZ-H1)上述基因 100% 同源^[3, 4]。同地区菌株间 100% 同源。本研究通过 MST 进一步分析上述菌株, 结果显示, 同地区分离株其间隔序列也存在明显遗传多态性。

MST 分型之所以在细菌分型鉴定中具有高分辨力, 其主要原因是同细菌保守基因不同, 非编码区因受自由选择压力, 结果造成菌株间高度变异, 这正是越来越多病原体选择这一分型技术的基础。本研究结果显示, MST 分型将是未来无形体及立克次体疫情暴发调查中重要的分子分型工具。

参 考 文 献

- [1] Zhang L, Liu Y, Ni D, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China [J]. JAMA, 2008, 300 (19): 2263-2270.
- [2] Fournier PE, Raoult D. Identification of rickettsial isolates at the species level using multi-spacer typing [J]. BMC Microbiol, 2007, 7: 72.
- [3] Zhang L, Wang G, Liu Q, et al. Molecular analysis of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from patients with febrile diseases of unknown etiology in China [J]. PLoS One, 2013, 8: e57155.
- [4] Wang Y, Chen CF, Zhang LJ. Molecular Characterization of *m*sp2/*p*44 of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from infected patients and *Haemaphysalis longicornis* in Laizhou Bay, Shandong province, China [J]. PLoS One, 2013, 8: e78189.

(收稿日期: 2013-12-31)

(本文编辑: 万玉立)