

1~11岁)经母婴传播途径感染的儿童BED-CEIA检测阳性,但从理论上言其检测结果应为阴性,是否为假阳性还有待进一步观察。

参考文献

- [1] Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002, 18: 295-307.
- [2] Wang JB, Yang YC, Duan S, et al. Proportions and correlates of recent HIV infections among newly reported HIV/AIDS cases from 2005 through 2009 in Dehong prefecture, Yunnan province. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31(11): 1210-1214. (in Chinese)

王继武,杨跃斌,段松,等.云南省德宏州2005—2009年新报告HIV-1感染者中新近感染比例及其影响因素分析. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(11): 1210-1214.

- [3] Jiang Y, Wang M, Ni M, et al. HIV-1 incidence estimates using IgG-capture BED-enzyme immunoassay from surveillance sites of injection drug users in three cities of China. *AIDS*, 2007, 21(Suppl 8): S47-51.
- [4] Duan S, Sheng S, Bulterys M, et al. Estimation of HIV-1 incidence among five focal populations in Dehong, Yunnan: a hard hit area along a major trafficking route. *BMC Public Health*, 2010, 10(1): 180.

(收稿日期:2012-04-27)

(本文编辑:张林东)

浙江省动物米库尔新埃立克体及其16S rRNA基因分析

陆群英 程苏云 彭伟龙 赵江灵 姜理平 葛君华

【关键词】 米库尔新埃立克体;核糖体RNA

Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* infection on animals and related 16S rRNA gene analysis in Zhejiang province LU Qun-ying¹, CHENG Su-yun¹, PENG Wei-long², ZHAO Jiang-ling¹, JIANG Li-ping¹, GE Jun-hua¹. 1 Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China; 2 Tiantai County Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: LU Qun-ying, Email: lqydc@163.com

【Key words】 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*; Ribosomal ribonucleic acid

2003年Kawahara等^[1]从日本Mikura岛野生褐家鼠中分离得到新埃立克体。在此之前,已有研究在荷兰鼯子硬梗和中国广州褐家鼠中检测到相似的16S rRNA^[2,3]。2010年,瑞士首次报道在1例患淋巴细胞白血病的发热患者血中检测到米库尔新埃立克体16S rRNA基因^[4],之后德国2例严重发热患者被确诊为米库尔新埃立克体感染^[5]。2008年在中国浙江野生啮齿动物中也检测到米库尔新埃立克体16S rRNA基因(GenBank登录号:HM439431)。本研究对浙江省动物米库尔新埃立克体的自然感染状况及分子生物学特性进行分析。

1. 材料与方法:

(1)调查地点及动物标本采集:2008年在天台县丘陵低

山田野捕获野鼠26只,其中黄毛鼠11只、社鼠2只、黑线姬鼠11只、褐家鼠2只。无菌取1 cm×1.5 cm肝、脾标本;2009年在天台县低山区农户采集放养牛尾静脉血标本31份、放养羊股静脉血标本13份;肝、脾和牛羊血标本均采用-198℃液氮保存、运输。

(2)16S rRNA基因PCR检测:采用大连宝生物公司Universal Genomic DNA提取试剂盒提取肝、脾匀浆、牛羊血液标本中的DNA,引物EC9:5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3'和EC12A:5'-TGA TCC TGG CTC AGA ACG AAC G-3'作为巢式PCR反应的第一轮引物;Eh-out1:5'-TTG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG-3'和Eh-out2:5'-AGC GGA ATT CCT AGT GTA GAG GTG-3', N.mF536:5'-AAG GGC ATG TAG GCG GTT TA-3'和A.R1495:5'-CCC AAC CTT AAA TGG CTG CC-3'分别为第二轮引物。采用宝生物公司PCR试剂,扩增程序为:第一轮PCR反应,94℃4 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃90 s,40个循环。第二轮PCR反应,94℃4 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃40 s,40个循环。PCR扩增产物送上海美季生物技术有限公司测序。

(3)统计学分析:序列通过GenBank BLAST比较分析,并采用Mega 4.0软件与GenBank已登录的国内外其他地区的米库尔新埃立克体序列进行比对,采用邻接(NJ)法构建系统进化树。

2. 结果:

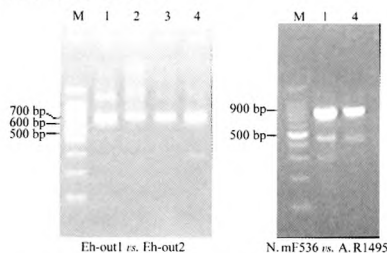
(1)米库尔新埃立克体16S rRNA阳性率:26只野鼠中4只检测到米库尔新埃立克体16S rDNA,总阳性率为15.38%。其中黄毛鼠和黑线姬鼠各检出2只,阳性率为18.2%(2/11),社鼠和褐家鼠未检出。牛羊血标本中均未检出。4份阳性标本经Eh-out1 vs. Eh-out2引物进行PCR扩增,

DOI: 10.3760/ema.j.issn.0254-6450.2012.09.028

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心(陆群英、程苏云、赵江灵、姜理平);浙江省天台县疾病预防控制中心(彭伟龙、葛君华)

通信作者:陆群英, Email: lqydc@163.com

产物大约为 650 bp, 其中 2 份用 N. m. F536 vs. A. R1495 引物进行 PCR 扩增, 获得大约 900 bp 大小的片段, 大小与引物设计目标片段一致 (图 1)。



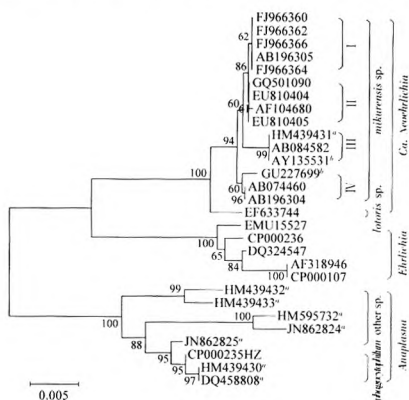
注: M: Marker; 1, 2 为黄毛鼠; 3, 4 为黑线姬鼠

图 1 4 份阳性标本米库尔新埃立克体 PCR 扩增

(2) 米库尔新埃立克体 16S rRNA 遗传变异分析: 4 份阳性标本 650 bp 和 2 份 900 bp 米库尔新埃立克体 16S rRNA 片段测序后拼接得到 1329 bp 接近完整的 16S rRNA 基因, 命名为 ZJ02/2008 株, NCBI 登录号为 HM439431。ZJ02/2008 株序列在 NCBI 进行 BLAST 比对表明, 与米库尔新埃立克体中国广州 Rattus 株和日本的 TK4456 株同源性为 100%。系统进化分析显示, 米库尔新埃立克体 16S rRNA 基因分为 4 个分支 (图 2)。4 份阳性标本检测到的米库尔新埃立克体属于分支 III。ZJ02/2008 株 16S rRNA 与浙江省以往检测到的 ZJ-HGA-3、ZJ01/2008、ZJ01/2009、ZJ02/2009、ZJ04/2009、ZJ05/2009、ZJ06/2009 株属于无形体科不同属。

3. 讨论: 米库尔新埃立克体的人类致病性最近才得到认识, 本研究证明国内野生啮齿动物中存在米库尔新埃立克体感染, 提示存在米库尔新埃立克体的自然疫源地, 野生啮齿类动物可能为米库尔新埃立克体的储存宿主。

立克次体核酸检测和基因序列测定是立克次体感染诊断和遗传变异研究的方法, 系统进化分析表明, 米库尔新埃立克体 16S rRNA 基因初步分为 4 个分支, 只有分支 II 已明确与人类疾病相关, 从进化历史来看, 分支 III 发生较晚。依据 16S rRNA 基因, 本研究检测到的米库尔新埃立克体株和广州发现的一样, 属于基因分支 III, 携带动物包括褐家鼠、黄毛鼠和黑线姬鼠, 目前在日本和中国都没有确诊的人感染病例发现。俄罗斯远东地区半岛硬蜱和啮齿动物中米库尔新埃立克体 16S rRNA 基因分布在分支 I, 与分支 II 距离较近。米库尔新埃立克体感染的潜在危害很大, 有必要了解我国米库尔新埃立克体的宿主范围、地区分布, 进行不明原因发热患者米库尔新埃立克体基因鉴定, 调查不明原因发热患



注: * 浙江种株; † 广州、云南种株

图 2 米库尔新埃立克体 16S rRNA 基因的系统进化树

者和正常人群的血清流行病学, 确定米库尔新埃立克体中国种株对人的致病性。

参 考 文 献

- [1] Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, et al. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neorhlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in Ixodes ornatus ticks. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54: 1837-1843.
- [2] Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, et al. Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks. J Clin Microbiol, 1999, 37: 2215-2222.
- [3] Pan H, Liu S, Ma Y, et al. Ehrlichia-like organism gene found in small mammals in the suburban district of Guangzhou of China. Ann N Y Acad Sci, 2003, 990: 107-111.
- [4] Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, et al. First case of human 'Candidatus Neorhlichia mikurensis' infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Microbiol, 2010, 48: 1956-1959.
- [5] von Loewenich FD, Geißdorfer W, Disque C, et al. Detection of 'Candidatus Neorhlichia mikurensis' in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. J Clin Microbiol, 2010, 48(7): 2630-2635.

(收稿日期: 2012-04-20)

(本文编辑: 王玉立)