文章编号：1002－2694(2011)06－0498－04

湖北省随州市羊携带嗜吞噬细胞无形体的调查*

李　静[1]，张令要[1]，邓　蕖[1]，詹发先[1]，岳金亮[1]，谭梁飞[1]，程均福[1]，尹华超[2]，王本银[2]

摘　要：目的　调查湖北省随州市羊携带嗜吞噬细胞无形体的状况。**方法**　运用聚合酶链反应方法对湖北随州市采集的羊血标本进行嗜吞噬细胞无形体16S rRNA基因片段进行扩增和序列分析，将扩增序列与GenBank相应基因序列进行同源性比较和进化分析。**结果**　共检测羊血标本29份，阳性标本25份，嗜吞噬细胞无形体阳性感染率为86.2%；所检出的嗜吞噬细胞无形体16S rRNA基因(1 442 bp)与GenBank中收录的部分嗜吞噬细胞无形体16s rRNA基因序列的同源性高达97.1%～99.8%，进化分析显示与嗜吞噬细胞无形体同在一个分支上。**结论**　湖北随州地区山羊存在嗜吞噬细胞无形体的感染。

关键词：山羊；嗜吞噬细胞无形体；16S rRNA基因

中图分类号：R376　**文献标识码：**A

Investigation on the goats infected with *Anaplasma phagocytophilum* in Suizhou，China

LI Jing，ZHANG Ling-yao，DENG Qu，ZHAN Fa-xian，YUE Jin-Liang，TAN Liang-fei，CHENG Jun-fu，YIN Hua-chao，WANG Ben-yin

(*Hubei Centre for Diseases Control and Prevention*，*Wuhan* 430079，*China*)

ABSTRACT：To investigate the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in goats from Suizhou，the DNA of 16S rRNA of *A. phagocytophilum* from blood samples from goats were amplified with PCR. The products of PCR were further analyzed by sequencing and nucleotide alignments. A total of 29 whole blood samples were tested，and the 25 samples were positive. The similarities of the nucleotide sequences (1 442 bp) with those deposited in GenBank were 97.1% to 99.8%%. Compared with the other corresponding genera such as *Anaplasma bovis*，*Anaplasma marginale*，*Ehrlichia*，*Ehrlichia chaffeensis*，*et al.*，the strains in this study were located in different clades while in the same clade as *A. phagocytophilum* in the phylogenetic tree. It is concluded that the infection of *A. phagocytophilum* is existed in goats from Suizhou，China.

KEY WORDS：goats；*Anaplasma phagocytophilum*；16S rRNA

人粒细胞无形体病(HGA)是由对人类致病的嗜吞噬细胞无形体引起的，主要侵犯人末梢血中性粒细胞，临床表现以发热，伴白细胞和血小板减少，以及多器官功能衰竭为特征。2006年，我国首次在安徽省发现人嗜吞噬细胞无形体病病例，该病临床症状与某些病毒性疾病相似，容易发生误诊，严重者可导致死亡，近年来我国的安徽、山东等地也相继发现人嗜吞噬细胞无形体病病例[1]。2006年以来，湖北随州、黄冈、武汉等地不断有疑似人粒细胞无形体病病例报告，然而在湖北省的疑似人粒细胞无形体病病例中一直未发现嗜吞噬细胞无形体的存在，但在随州一病人所在自然村采集的蜱中检测出嗜吞噬细胞无形体核酸，为进一步查找病原体，我们在随州市开展羊携带嗜吞噬细胞无形体的调查。

1　材料与方法

1.1　地理概况　随州市地处湖北省中部，东经112°43′～113°46′，北纬31°19′～32°26′。人口157万。属于低山丘陵地区，总面积6 989平方公里，其中山地面积占61.3%，丘陵面积占30%。气候温暖湿润，属于北亚热带季风气候，四季分明，光照充足，雨量充沛，年平均降雨量865～1 040 mm，年平均气温15.5 ℃，无霜期220～240 d。

1.2　标本来源　2010年5月和8月，选择随州市殷店镇新报告一例疑似人粒细胞无形体病病例所居

*2008—2010年湖北省卫生厅青年科技人才基金项目
通讯作者：詹发先，Email：zhanfx@163.com
作者单位：1.湖北省疾病预防控制中心，武汉　430079；
2.随州市疾病预防控制中心，随州　441300

住自然村及其周围村庄进行山羊血标本采集，采集的羊血标本置入液氮罐中带回实验室进行检测。

1.3　标本处理及模板制备　每个羊血标本取黄豆大小的血凝块，取样时严格消毒，防止不同样品相互间污染。用 Qiagen DNA Kit 提取核酸，按试剂盒操作说明进行，提取的核酸保存于 −20 ℃备用。

1.4　引物设计　无形体属及埃立克体属通用外引物 Eh-outl 和 Eh-out2、通用内引物 Eh-gsl 和 Eh-gs2 、嗜吞噬细胞无形体特异分型引物 HGAl 和 HGA2、查非埃立克体特异分型引物 HME1 和 HME2 见参考文献[1-2]，嗜吞噬细胞无形体特异引物 GE9f/GE10r 见参考文献[3]，引物 Ehr521 见参考文献[4-5]，引物 3-17 见参考文献[6]，引物合成(上海生工)。

1.5　16S rRNA PCR 扩增　采用巢氏 PCR 扩增无形体属及埃立克体属 16s rRNA 基因，第 1 轮 PCR 采用通用外引物 Eh-outl 和 Eh-out2，第 2 轮 PCR 采用 3 套不同引物(Eh-gsl 和 Eh-gs2，HGA1 和 HGA2，HME1 和 HME2)。第 1 轮扩增反应体系如下：2.5 μL 10×PCR buffer，0.8μL10 mmol/L dNTP mix，0.4 μL 上游引物(25 μmol/mL)和下游引物(25 μmol/mL)，0.2 μL Taq DNA Polymerase，DNA 模板 3 μL，加入无菌去离子水至总体积 25 μL。PCR 反应条件为 94℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环，最后 72 ℃，7 min。第 2 轮扩增，条件同上。阳性 HGA1/HGA2 PCR 扩增产物(目的片段 389 bp)直接测序。

为进一步验证，选取 12 个 HGA 阳性的羊全血标本，以引物(Ge9f/Ge10r)进行嗜吞噬细胞无形体特异性 16S rRNA 基因片段(919 bp)进行 PCR 扩增，PCR 反应条件同上。阳性(GE9f/GE10r)PCR 扩增产物直接测序。

为避免标本污染引起假阳性反应，标本的制备、反应体系的配置、PCR 扩增和 PCR 产物的电泳均在不同房间进行，试验不设阳性对照。

1.6　序列测定和分析　选择 4 个标本的阳性(HGA1/HGA2) PCR 扩增产物，3 个标本阳性(GE9f/GE10r) PCR 扩增产物和相应 3 个(Ehr521/3-17) PCR 扩增产物(目的片段 946 bp)，通过 1%琼脂糖凝胶电泳回收后克隆测序。克隆时取 3.5 μL 胶回收产物与 0.5 μL pGEM T-easy 载体混合，添加 5 μL 2×Ligation buffer，1 μL T4 DNA 连接酶，4 ℃连接过夜。将 10 μL 连接产物转化入 100 μL DH5a 感受态细胞中。筛选重组质粒，利用 PCR 鉴定重组质粒，质粒纯化后以 pGEM T-easy 载体通用引物 M13 作为序列测定引物。序列测定由北京六合华大基因科技有限公司武汉分公司完成。

2　结　果

2.1　16S rRNA 基因(HGA1/HGA2)扩增结果　本次调查共采集 29 只山羊的全血标本，从 25 份羊血标本中扩增出 389 bp 特异性嗜吞噬细胞无形体 16S rRNA 基因(HGA1/HGA2)片段，阳性率 86.2%。将 PCR 扩增测序结果经 mega 分析比对显示：所有特异性片段基因序列(HGA1/HGA2)基本一致。将克隆测定的 DNA 序列(HQ171975)进行 Blast，与作者前期从长角血蜱中检测的相对应序列(HM641751)的同源性 100%，与韩国、朝鲜、日本、捷克、西班牙、英国等注册的嗜吞噬细胞无形体 16S rRNA 基因相对性序列的同源性为 96%～98%。

2.2　16S rRNA 基因(Ge9f/Ge10r)扩增结果　选取的 12 个 16S rRNA 基因(HGA1/HGA2)阳性的羊血标本，用引物(Ge9f/Ge10r)经 PCR 扩增均获得嗜吞噬细胞无形体特异性 16S rRNA 基因片段(919 bp)，经 PCR 测序，将测序结果经 DNAstar 拼接后进行 Blast，显示所有 12 个基因序列与吉林(DQ449948、DQ449947、DQ449946、DQ449945)、美国(AB196721、AB196720)、俄罗斯(号 HM366590、HM366589、HM366588、HM366587、HM366586)等多个嗜吞噬细胞无形体相对应片段同源性达 97%～99%。

2.3　序列分析　将进行克隆的 3 个标本基因(GE9f/GE10r)序列(919 bp)或者基因(Ehr521/3-17)序列(964 bp)经 mega 分析比对后，将同一标本获得的两个基因序列经 DNAstar 进行拼接获得嗜吞噬细胞无形体 16S rRNA 基因片段(1442 bp)[7]，然后分别将获得的 3 个阳性标本(Sample16，Sample17，Sample18)基因片段进行 Blast，与吉林(DQ449948、DQ449947、DQ449946、DQ449945、DQ342324)、浙江(DQ458808、DQ458807、DQ458805)、美国 *A. phagocytophilum* HZ (CP000235)等多个嗜吞噬细胞无形体相对应片段同源性达 99%。用 DNAStar 与 GenBank 中收录的相应的嗜吞噬细胞无形体的序列进行同源性比较，3 个基因片段均与我国浙江、吉林、以及韩国、美国、俄罗斯等地发现的嗜吞噬细胞无形体 16s rRNA 基因序列的同源性高达 97.1%～99.8%，尤其是与我国发现的嗜吞噬细胞无形体同源性最高，这可能说明

嗜吞噬细胞无形体的同源性存在一定地域差异,见图 1。目前这 3 个阳性标本 16S rRNA 基因片段的核苷酸序列已被 GenBank 收录(HQ872463,HQ872464,HQ872465)。

进化分析显示这 3 个基因片段与嗜吞噬细胞无形体同在一个分支上,而与牛无形体(*Anaplasma bovis*)、边缘无形体(*Anaplasma marginale*)、埃立克体(*Ehrlichia*)、查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)、犬埃里克体(*Ehrlichia canis*)、扁平无形体(*Anaplasma platys*)分别位于不同的分支上,见图 2。根据同源性比较,以及系统发育分析,可以看出这 3 个阳性标本的病原隶属于嗜吞噬细胞无形体。

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
1		99.6	99.4	99.6	99.7	97.1	97.1	99.6	99.6	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.1	99.6	99.6	1	sample18
2	0.4		99.7	99.9	99.7	97.1	97.1	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.0	99.9	99.9	2	sample16
3	0.6	0.3		99.8	99.5	96.9	96.9	99.7	99.7	99.5	99.5	99.5	99.7	99.7	98.8	99.8	99.8	3	sample17
4	0.4	0.1	0.2		99.7	99.7	99.7	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	98.7	100.0	100.0	4	HM366589 Kh-lp144
5	0.3	0.3	0.5	0.3		100.0	100.0	99.7	99.7	99.4	99.4	99.4	99.6	99.6	100.0	99.7	99.7	5	AY055469 ap USA
6	0.4	0.4	0.5	0.3	0.0		100.0	97.1	97.1	96.8	96.8	96.8	97.1	97.1	100.0	99.7	99.7	6	AY527213 Susy
7	0.4	0.4	0.5	0.3	0.0	0.0		97.1	97.1	96.8	96.8	96.8	97.1	97.1	100.0	99.7	99.7	7	AY527214 Strong 16S
8	0.4	0.1	0.3	0.1	0.3	0.4	0.4		100.0	99.7	99.7	99.7	99.9	99.9	99.1	99.9	99.9	8	DQ449945 Jilin 2 16S
9	0.4	0.1	0.3	0.1	0.3	0.4	0.4	0.0		99.7	99.7	99.7	99.9	99.9	99.1	99.9	99.9	9	DQ449947 Jilin 4 16S
10	0.5	0.2	0.5	0.2	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3		100.0	100.0	99.6	99.6	98.9	99.8	99.8	10	DQ458805 ZJ-HGA
11	0.5	0.2	0.5	0.2	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3	0.0		100.0	99.6	99.6	98.9	99.8	99.8	11	DQ458805 ZJ-HGA-16S-2
12	0.5	0.2	0.5	0.2	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3	0.0	0.0		99.6	99.6	98.9	99.8	99.8	12	DQ458808 ZJ-HGA-16S-3
13	0.4	0.1	0.3	0.1	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.4	0.4	0.4		100.0	99.1	99.9	99.9	13	GQ412338 China-C-Y
14	0.4	0.1	0.3	0.1	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.4	0.4	0.4	0.0		99.1	99.9	99.9	14	GQ412339 China-C-Tl
15	0.4	0.5	0.8	0.4	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.7	0.7	0.7	0.5	0.5		98.7	98.7	15	GU556624 Korea
16	0.4	0.1	0.2	0.0	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.4		100.0	16	HM366581 Nov-lp364
17	0.4	0.1	0.2	0.0	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.4	0.0		17	HM366587 Kh-lp7
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		

图 1 嗜吞噬细胞无形体 16s rRNA 序列的同源性比较

Fig. 1 The similarities of 16s rRNA (1 442 bp) in this study with those deposited in GenBank

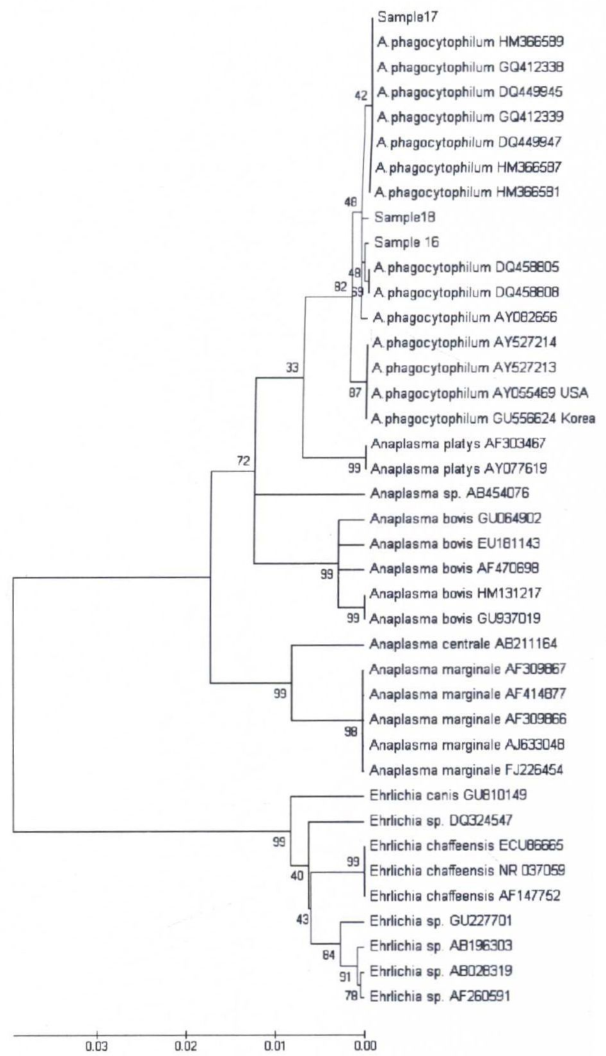

图 2 嗜吞噬细胞无形体 16s rRNA 序列的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic tree based on partial 16s rRNA sequences of *A. phagocytophilum*

3 讨 论

人粒细胞无形体病是由嗜吞噬细胞无形体引起的一种经蜱传播的新发自然疫源性疾病,嗜吞噬细胞无形体的传播媒介主要为全沟硬蜱群,宿主主要是野鼠、牛、鹿、马、狗、羊等[7-10],动物宿主持续感染是病原体维持自然循环的基本条件。不同地区地理气候条件不同,宿主种类也存在差异,牛、羊、马等家畜携带嗜吞噬细胞无形体状况也各不相同。Torina 等应用血清流行病学调查发现在意大利某一地区绵羊中嗜吞噬细胞无形体 IgG 抗体的阳性率为 11.5%[11]。Gokce 等在土耳其黑海中部和东部地区应用血清流行病学和 PCR 方法调查发现:牛和绵羊中嗜吞噬细胞无形体 IgG 抗体的阳性率分别为 15.27%和 14.86%,PCR 检测血标本中嗜吞噬细胞无形体特异基因发现牛和绵羊的阳性率分别为 14.75%和 12.35%[12]。Teglas 等在美国某一地区应用 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体特异基因发现牛和马的阳性率为 27.6%[13]。国内詹琳等在吉林长白山地区应用荧光定量 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体特异基因发现绵羊和山羊的阳性率分别为 7.1%和 5.7%[14],而张丽娟等在山东沂源县调查发现 10 份黑山羊血清标本中 9 份嗜吞噬细胞无形体 IgG 阳性[15]。本研究应用巢氏 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体特异基因发现随州地区山羊的阳性率高达 86.2%。说明山羊是该地区嗜吞噬细胞无形体的重要宿主动物,下一步我们将开展羊群血清流行病学调查进一步证实。

特异性 16S rRNA 基因(HGA1/HGA2)可以将嗜吞噬细胞无形体与其它无形体从种的水平区分开来。由于不同种无形体 16S rRNA 基因的一致性较高,特别是较短的基因片段,将本研究获得的嗜吞噬细胞无形体基因序列(HQ171975)(389 bp)Blast 发现与部分牛无形体的同源性达 97%~98%。因为本研究发现羊感染率较高,为进一步验证结果,我们用另一嗜吞噬细胞无形体 16S rRNA 基因特异引

物(Ge9f/Ge10r)进行扩增，将 PCR 扩增测定的序列进行 Blast 后获得的基本上全是嗜吞噬细胞无形体序列，且同源性达 97%～99%。而用引物(Ge9f/Ge10r)和(Ehr521/3-17)获得的 3 个阳性标本嗜吞噬细胞无形体 16S rRNA 基因序列(1442 bp)进行 Blast 和 DNAStar 序列比对结果表明：随州地区获得的基因序列(HQ872463 \ HQ872464 \ HQ872465)与我国吉林、浙江、以及美国 *A. phagocytophilum* HZ(CP000235)等多个嗜吞噬细胞无形体相对应片段同源性 99%，尤其是与我国发现的嗜吞噬细胞无形体的同源性最高，这可能说明嗜吞噬细胞无形体的同源性存在一定地域差异。根据立克次体目微生物的分类[16]，进化分析表明获得的 3 个基因序列(1 442 bp)与嗜吞噬细胞无形体同在一个分支上，而与牛无形体、边缘无形体、埃立克体、查菲埃立克体、犬埃里克体和扁平无形体分别位于不同的分支上。因此，根据同源性比较和系统发育分析说明这 3 个阳性标本的病原隶属于嗜吞噬细胞无形体。

(感谢湖北省卫生厅柳东如，湖北省疾控中心袁方玉、官旭华、江永忠、岳木生、霍细香、徐军强、詹建波、邢学森及随州市疾控中心何为华、金晓舟、朱建华的支持和帮助。)

参考文献：

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

[2]Wen BH, Jian R, Zhang YZ, 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]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(9): 3286-3290.

[3]Chen SM, Dumler JS, Bakken J S, et al. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32(3): 589-595.

[4]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 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报，2000，7(2)：103-108.

[5]Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, et al. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis[J]. J Infect Dis, 1995, 172(10): 1007-1012.

[6]詹琳，何静，吴晓明，等. 吉林省林区蜱嗜吞噬细胞无形体感染的调查[J]. 中国人兽共患病学报，2007，23(5)：438-440.

[7]Cao WC, Zhan L, He J, et al. Natural *Anaplasma Phagocytophila* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China [J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 75(4): 664-668.

[8]Amusategui I, Sainz A, Tesouro MA. Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1078: 487-490.

[9]M'ghirbi Y, Ghorbel A, Amouri M, et al. Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia[J]. Parasitol Res, 2009, 104(4): 767-774.

[10]Chochlakis D, Ioannou I, Sharif L, et al. Prevalence of *Anaplasma* sp. in goats and sheep in Cyprus [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2009, 9(5): 457-463.

[11]Torina A, Galindo RC, Vicente J, et al. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition[J]. Trop Anim Health Prod, 2010, 42(7): 1327-1331.

[12]Gokce HI, Genc O, Akca A, et al. Molecular and serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of farm animals in the Black Sea region of Turkey[J]. Acta Vet Hung, 2008, 56(3): 281-292.

[13]Teglas M, Matern E, Lein S, et al. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses[J]. Vet Parasitol, 2005, 131(1-2): 119-127.

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

[15]张丽娟，崔峰，王玲，等. 山东省沂源县无形体病实验室调查分析[J]. 传染病信息，2009，22(1)：21-25.

[16]宝富凯，柳爱华. 立克次体目微生物的系统分类进展[J]. 中国人兽共患病学报，2007，23(12)：1262-1264.

收稿日期：2011-01-11；**修回日期**：2011-03-11