

海南省澄迈县斑点热群立克次体分离株 多间隔序列分型

程雪琴¹, 金玉明², 老世军², 黄昌和², 黄芳², 贾鹏本², 张丽娟¹

1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所无形体室, 北京 102206; 2 海南省疾病预防控制中心, 海口 570203

摘要: 目的 采用多间隔序列分型(MST)对从海南省澄迈县发热患者及野鼠分离的 62 株斑点热群立克次体进行分型研究。方法 根据文献检索, 应用 9 对成功用于斑点热群立克次体 MST 分型引物, 对实验 62 株菌进行 PCR 扩增及测序。校正后序列进行 Blast 分析。同时, 对序列进行 Megalign 比对分析单核苷酸多态性(SNPs)。将每株细菌成功测序的 6 段间隔序列按一定顺序拼接并构建进化树。结果 使用 6 对间隔序列引物扩增实验菌株, 结果显示每对引物扩增序列均显示较大的变异性, 共获得 48 个变异型, 以 h3 为代表的主要变异型占 21.7% (13/60), 剩余的 47 个变异型为独立型, 分别占 1.6%。进化树分析结果显示 48 个变异型均归为一簇。同其他参考菌株比较发现, 黑龙江立克次体与上述菌株关系密切。SNPs 分析发现位点变异主要以 T-C 转换及 A-G 转换为主。结论 海南地区斑点热群立克次体分离株非编码间隔序列呈高度变异性。MST 分型较传统的血清表型分型以及 MLST 分型更具有鉴别能力, 对未来立克次体暴发流行可提供快速有效的流行株追踪。

关键词: 斑点热群立克次体; 多间隔序列分型; 海南省澄迈县

中图分类号: R376 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)04-0289-05

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.04.001

Multispacer typing of spotted fever group rickettsiae isolated from Chengmai county of Hainan province, China

CHENG Xue-qin¹, JIN Yu-ming², LAO Shi-jun², HUANG Chang-he², HUANG Fang², JIA Peng-ben², ZHANG Li-juan¹

1 Department of Anaplasma, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Hainan Center for Disease Control and Prevention, Haikou 570203, Hainan Province, China

Corresponding author: ZHANG Li-juan, Email: zhanglijuan@icdc.cn

Supported by the National Key Science and Technology Projects of China (No. 2008ZX10004-008, 2012ZX10004215) and the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB530206)

Abstract: Objective Spotted fever caused by spotted fever group rickettsiae (SFGR) is found throughout China. During 2007-2008, 28 human SFGR isolates and 34 rat SFGR isolates (including 15 isolates from *Rattus fulvescens*, 5 isolates from *R. edwardsi*, 7 isolates from *Callosciurus erythraeus roberti*, and 7 isolates from *Dremomys rufigenis*) were gathered by 1929 cell culture. Previous research indicated that these isolates shared identical sequences of 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *groEL*, and 17×10³ protein gene with each other, and were of the same serophenotype. This project aims to study the 62 SFGR isolates from fever patients and wild rodents in Chengmai county of Hainan province, China by multispacer typing (MST). **Methods** Nine pairs of primers which had been previously reported in MST of SFGR were used in amplification and sequencing of the 62 isolates in this study. Sequences were subjected to Blast analysis after data correction. Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed with Megalign. Six spaced sequences that were successfully sequenced from each isolate were spliced and applied in the construction of phylogenetic tree. **Results** There were great variations among the 62 isolates. A total of 48 mutant genotypes were identified. The predominant genotype, h3, accounted for 21.7% (13/60) of all the isolates tested, and the remaining 47 genotypes were all unique, each accounting for 1.6% (1/60) of all isolates. Phylogenetic analysis showed that all these 48 genotypes were classified in the same cluster. Among all reference strains included in this study, *R. heilongjiangensis* was genetically closest to these isolates. Thymine-to-cytosine transitions had the highest percentage (52/114, 45.6%) among all SNPs, followed by adenine-to-guanine transitions (37/114, 32.5%). **Conclusion** The non-coding spaced sequences of SFGR prevailing in Chengmai county of Hainan province are highly heterologous. The selected primers for MST of SFGR are capable of detecting rickettsial pathogens. MST can be used in the rapid and effective tracing of endemic strains in outbreak of rickettsiae.

Key words: Spotted fever group rickettsiae; Multispacer typing; Chengmai county of Hainan province

基金项目:“十二五”传染病重大专项课题(2008ZX10004-008, 2012ZX10004215); 国家基础研究项目(973计划)(2010CB530206)

作者简介:程雪琴,女,在读硕士,主要从事无形体及立克次体病研究,Email: cxq1cg@163.com; 金玉明,男,研究员,主要从事传染病防控工作,Email: jym1030@126.com

通讯作者:张丽娟,Email: zhanglijuan@icdc.cn

程雪琴、金玉明同为第一作者。

斑点热是由一类严格胞内寄生菌——斑点热群立克次体(spotted fever group rickettsiae, SFGR)引起的急性发热性立克次体病^[1]。该病呈世界性分布,且传播媒介复杂,主要是蜱、螨及蚤。目前,世界范围内发现 10 余种致病菌。我国病原学证实的种类有黑龙江立克次体^[2]、西伯利亚立克次体内蒙古亚种、西伯利亚立克次体西伯利亚亚种^[3]。同其他病毒类疾病相似,该类疾病缺乏典型临床表现和快速实验室诊断方法,易发生误诊,甚至死亡。2007 年 12 月我们通过病原学确诊了 1 例先后误诊为阑尾炎、猫抓病、淋巴瘤的斑点热儿童。随后,进行了 3 次现场流行病学调查。通过 L929 细胞培养,从发热皮疹患者中共分离出 28 株立克次体(20 株来自成年人,8 株来自儿童)^[4]。从当地采集的野鼠血液标本中分离到 34 株立克次体。通过分子生物学鉴定分析发现这些菌株的 16S rRNA(830 bp)、*gltA*(850 bp)、*ompA*(634 bp)、*groEL*(588 bp)等基因序列不仅彼此间 100%同源,且与黑龙江立克次体 100%同源,但 17×10^3 蛋白基因与黑龙江立克次体 99%同源。同样,鼠血清表型分型证实这些菌株相似,但与黑龙江立克次体明显不同^[5]。为进一步分析上述 SFGR 分离株分子流行病学特点,我们对上述 62 株斑点热群立克次体做了基于 6 对引物的多间隔序列分型(MST)。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 来自 2007 年 12 月至 2008 年 2 月海南省澄迈县 10 个村 SFGR 现场调查。62 株 SFGR,8 株来自发热儿童,20 株来自发热成年人,15 株来自针毛鼠(*Rattus fulvescens*),5 株来自白腹巨鼠(*R. edwardsi*),7 株来自赤腹巨鼠(*Callosciurus erythraeus roberti*),7 株来自红颊松鼠(*Dremomys rufigenis*),并通过 L929 细胞分离培养获得。

1.2 实验用引物 根据国际 SFGR MST 分型成功引物,共使用了 9 对引物。引物名称、序列等背景信息及参考文献见表 1。

1.3 DNA 提取及 PCR 扩增 菌株 DNA 提取按照德国 DNA 提取试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)说明书进行。采用 Sensoquest Labcycler PCR 扩增仪扩增间隔序列。PCR 扩增使用 Taq DNA 聚合酶及 dNTP 等试剂(购自北京赛百盛生物技术有限公司)。反应体系:总体积为 25 μ l,去离子水 12 μ l, $10 \times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, Dye 染液 2.5 μ l, 10 mmol/L 的 dNTP 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l, 10 mmol/L 上下游引物各 1 μ l, 模板 DNA 5 μ l; PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 退火时间 30 s(不同引物退火温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产

物 2 μ l, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪观察结果。黑龙江立克次体及普氏立克次体(*R. prowazakii* E 株)DNA(本室保存)为阳性对照, 正常人血 DNA、L929 细胞 DNA(本室保存)及水为阴性对照。

1.4 PCR 产物克隆、测序及分析 根据参考文献扩增间隔序列的大小, 为保证足够的序列信息, 对阳性 PCR 产物进行了克隆测序。实验简述: PCR 产物按 PCR 产物回收试剂盒(北京赛百盛生物技术有限公司)说明书进行回收、纯化。纯化后产物按 peasy-T1 克隆试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明书进行克隆。PCR 鉴定阳性克隆子送北京擎科新业生物技术有限公司双向测序。对有单核苷酸多态性(SNPs)变异菌进行人工校正核实并重新扩增后送另外一独立商业测序公司进行重复测序。应用 NCBI 网站 Blast 平台, 将所测序列与 GenBank 中注册的立克次体序列进行同源比较, 并在 Lasergen 7.1 的 Megalign 软件中进行比对。每株菌每种间隔序列取相同大小片段按一定顺序拼接(*cspA-ksgA*、*dksA-xerC*、*RR0155-rpmB*、*RR0345-tolC*、*RR1240-tlc5b*、*spo0J-abcT1*)。拼接后序列用 Mega 5.0 软件做进化树。除本研究菌株外, GenBank 注册的 4 个 SFGR 即 *R. montanensis* (CP003340)、*R. philipii* (CP003308)、*R. rickettsii* (CP000053)、*R. japonic* (AP011533) 相应间隔序列采用同样方式拼接后作为参考序列进行进化分析。

2 结果

本研究共使用了 9 对引物, 其中 *mppA-purC*、*rpmE-tRNA*、*RR1372-RR1373* 三对引物未扩增出产物。除 *RR0345-tolC* 引物扩增大小片段与文献一致外, 其他 5 对引物扩增片段大小与文献均不同(表 1)。使用 *spo0J-abcT1* 引物对, 1 株人源(h2)及 1 株鼠源(m5)未扩增出产物。*cspA-ksgA* 引物对扩增, m5 扩增产物太弱测序未成功。

2.1 *dksA-xerC* 间隔区扩增结果 *dksA-xerC* 间隔区域的 7 个位点发生了碱基替换, 5 个位点是 C 替换 T, 2 个位点是 G 替换 A, 还有一个位点缺失碱基 T。这 8 个位点的差异将 62 株立克次体分为 8 个变异型, 其中以 h3 为代表的变异型占 88.7%, 另外的 7 个变异型分别占 1.6%。

2.2 *spo0J-abcT1* 间隔区扩增结果 *spo0J-abcT1* 间隔区扩增共发现 11 个位点碱基替换(6 个 C 替换 T, 4 个 G 替换 A, 1 个 T 替换 C), 1 个位点缺失碱基 A, 另 1 个位点缺失碱基 T。这 13 个位点差异将 60 株立克次体分为 13 个变异型, 其中以 h3 为代表的型别占 80.8%, 另

表 1 实验引物信息及菌株扩增 SNPs 改变
Table 1 The PCR primers used in MST and the SNPs of 62 SFGR isolates

引物名称	引物序列(5'~3')(F/R)	退火温度(°C)	预期长度(bp)	实际长度(bp)	参考文献	SNPs (位置)				
						T-C 转换	A-G 转换	G-A/C-T 转换	颠换	插入/缺失
<i>dksA-xerC</i>	TCCCATAGGTAATTTAGGTGTTTC/ TACTACCGCATATCCAATTA	54	416	225	[6]	m8(60) m28(126) h27(140) m2(179) m14(182)	m9(99) m30(191)			m30 T 缺失(199)
<i>spoJ-abcTl</i>	AAAGATTGGAAGAATTAGACTTGA T/TTTGCTTAAACCAACCATTTCA	50	320	254	[6-7]	m32(61) m7(132) m1(135) h7(174) h4(218) m30(190) m28(221)	m32(44) h13(90) m31(101) h4(218)	m18(C-T,50)		m22 A 缺失(15) m4 T 缺失(247)
<i>RR0155-rpmB</i>	TTTCTAGCAGCGGTTGTTTTATCC/ TTAGCCCATGTTGACAGGTTTACT	50	290	297	[7]	m7(25) h11(48) m11(95,175) h6(187) m12(214) h21(247)	h12(50) m9(260)	h6(C-T,81)	h22 (A-T, 232)	m29 G 缺失(16)
<i>RR0345-tolC</i>	AGAAGCTTCCGGATGTAATA/ AGCAAATAAAAACCCTAATAAC	50	238	238	[7]	m23(69) m14(81) h4(83) m5(100,192) h26(105) m8(119) h8(159) m34(172)	m7(53) h6(79) h8(111) m34(212)			m22 G 缺失(5) m27 T 缺失(173)
<i>cspA-ksgA</i>	CATCACTGCCTTCGCTTATTTTT/ ATTTCTTTTCTTCCTCTTCATCAA	50	405	410	[7]	m32(119) m31(126,198) h6(203) m12(260) m29(261) h1(268) h23(273) m20(367)	m3(29) h23(55) h8(69) m31(98) h2(140) m32(178,317) h6(217) m13(234) h18(236) m20(244,340) m26(340) m34(340) h20(355) h4(361) m18(361) h1(255)	m6(G-A,150) h24(G-A,239)	h27 (A-T, 298) h7 (A-T,98)	m8 A 缺失(405)
<i>RR1240-tlc5b</i>	CGGGATAACGCCGAGTAATA/ ATGCCGCTCTGAATTTGTTT	50	357	366	[6-7]	m5(31,211) m11(34) m1(42) h14(51) m28(55,204) h5(72,327) 27(103) h15(133) h6(178) m14(204) m20(220) m23(228) m3(315) h25(317)	h13(49) h25(57) h1(78) h7(83,280) h23(186) h6(208,273) m13(288) m7(312)	h1(C-T,248) m11(C-T,183)	m17 (T-A,20)	h6, m23 T 插入(301) h1, h5, h8, h23 T 插入(300) m2 G 插入(311)
<i>RR1372-RR1373</i>	TCCCGCGCCAGTATCCA/ CGGCGGCCAAAATGCTA	50	349	无扩增	[7]					
<i>mppA-purC</i>	GCAATTATGCCTCCGAATG/ TTTGATTTATTTGTCTCAAATTTCA	50	160	无扩增	[6]					
<i>rpmE-tRNA</i>	TTCCGAAATGTAGTAAATCAATC/ ATCCTTCTCCCTCCACCACT	50	144	无扩增	[6]					

外的 12 个变异型分别占 1.6%。

2.3 *RR0155-rpmB* 间隔区扩增结果 62 株细菌 *RR0155-rpmB* 间隔区扩增结果显示共有 11 个 SNPs 改变, 6 个 C 替换 T, 2 个 G 替换 A, 1 个 T 替换 C, 1 个 T 替换 A, 1 个位点缺失碱基 G。这 11 个位点的差异将 62 株立克次体分为 11 个变异型, 其中以 h3 为代表的型别占 83.9%, 另 10 个变异型分别占 1.6%。

2.4 *RR0345-tolC* 间隔区扩增结果 *RR0345-tolC* 引物扩增 62 株细菌, 结果发现 13 个位点出现了碱基替换 (9 个 C 替换 T, 4 个位点是 G 替换 A), 有 1 个位点缺失碱基 T, 1 个位点缺失 G。这 15 个位点差异将 62 株立克次体分为 13 个变异型, 其中以 h3 为代表的变异型占 80.8%, 另外 12 个变异型分别占 1.6%。

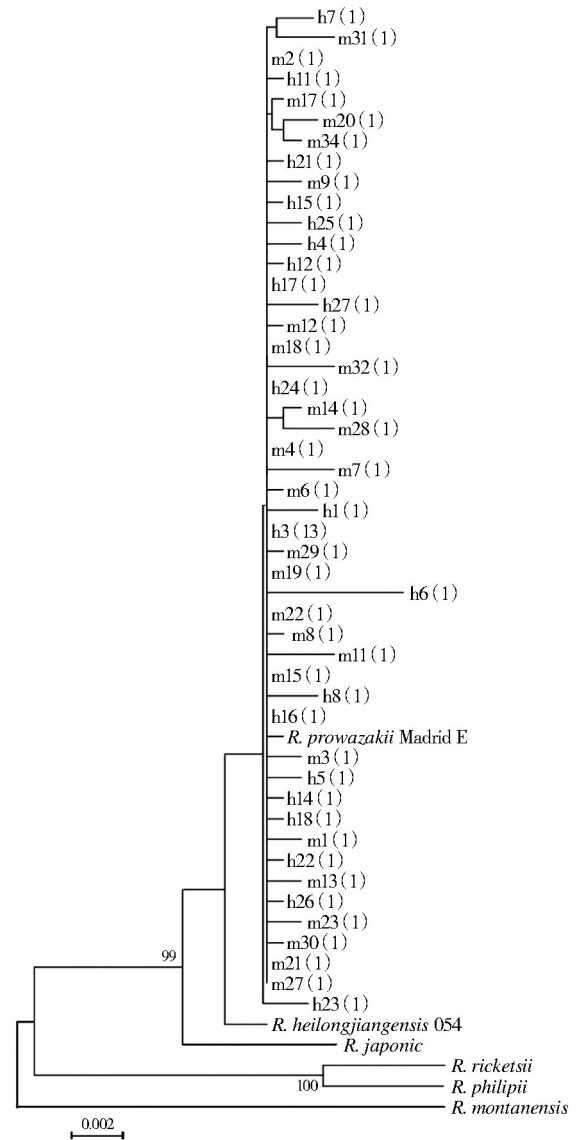
2.5 *cspA-ksgA* 间隔区扩增结果 62 株细菌 *cspA-ksgA* 间隔区扩增发现 28 个碱基替换 (9 个 C 替换 T, 15 个 G 替换 A, 2 个 T 替换 A, 2 个 A 替换 G), 1 个缺失 A。这 29 个位点差异将 61 株立克次体分为 23 个变异型, 其中以 h3 为代表的变异型占 60.1%, 以 h4 为代表型别占 3.2%, m26 为代表型别占 3.2%; 另外 19 个型别各占 1.6%。

2.6 *RR1240-tlc5b* 扩增结果 *RR1240-tlc5b* 扩增显示 30 个碱基替换 (17 个 C 替换 T, 10 个 G 替换 A, 2 个 T 替换 C, 1 个 A 替换 T), 2 个插入 T, 1 个插入 G。这 33 个位点差异将 62 株立克次体分为 25 个变异型, 其中以 h3 为代表型别占 50.0%, h8 为代表型别占 12.9%, 另外 23 个独立型各占 1.6%。

2.7 拼接序列及进化分析 将每株菌 6 个间隔序列串联起来, 通过 Megalign 比较分析, 结果显示主要变异型 (h3 为代表) 占 21.7% (13/60), 剩余 47 个变异型分别占 1.6%。SNPs 分析发现 T 转换为 C 占 45.6% (52/114), G 转换为 A 占 32.5% (37/114)。碱基缺失或插入占 13.8%。另外有 3 个 A 颠换为 T, 一个 T 颠换为 A。进化树构建结果显示所有 48 个型别及普氏立克次体归为同一簇, 而黑龙江立克次体遗传关系较近但不为一簇 (图 1)。另外 4 个参考细菌包括 *R. montanensis* (CP003340)、*R. philipii* (CP003308)、*R. rickettsii* (CP000053) 和 *R. japonic* (AP011533), 遗传关系相对较远。

3 讨论

立克次体分离株的鉴定与分类主要通过传统的表型即鼠血清型^[8]及现代分子生物学鉴定。16S rRNA、17×10³蛋白基因、*gltA*、*OmpA*、*OmpB* 及 120×10³蛋白等基因是最常见的分类鉴定基因^[9-12]。2003 年, Fournier 等^[2]提出了立克次体新种的鉴定分类标准, 基



注: 用最大似然法 (Maximum parsimony) 中的自举法 (Bootstrap) 1000 次重复构建系统树。

图 1 62 株实验菌间隔扩增序列拼接后进化树
Figure 1 Phylogenetic tree based on spliced amplicons of 62 SFGR isolates in this study

于 16S rRNA 基因和 4 个蛋白编码基因 *gltA*、*ompA*、*ompB*、*geneD*, 可以将立克次体分类鉴定到属、群、种的水平。然而, 这些表型分型和现代分子生物学分型方法无法鉴别到株的水平。因此, 在立克次体感染暴发流行调查中, 限制了流行株的追踪。近年来, 越来越多的文献报道了 MST 方法用于立克次体分型分析, 如对地中海斑点热病原体康氏立克次体分型^[6]; 西伯利亚立克次体分型^[3]、立氏立克次体分型^[7]和普氏立克次体^[12]分型。还有一些相关菌如五日热巴尔通体和贝纳柯克斯体等的分型研究。

本实验 62 株细菌通过前期的 16S rRNA、*gltA*、*ompA*、*groEL* 基因和 17×10³蛋白基因扩增及序列分析

以及传统的鼠血清型分型研究均无法区别。然而,本研究通过文献检索,进一步引用了 9 对 SFGR MST 分型引物^[6-7,11],成功地对上述 62 株 SFGR 进行了分型。除了 3 对引物(*RR1372-RR1373*、*mppA-purC*、*rpmE-tRNA*)无扩增外,其他 6 对引物(*dksA-xerC*、*spo0J-abcT1*、*RR1240-tlc5b*、*RR0155-rpmB*、*RR0345-tolC*、*cspA-ksgA*)扩增序列均显示高度的变异性。将每株菌 6 个间隔序列拼接,共产生 48 个不同的型别。以 h3 为代表的优势型占总检测菌株的 21.7%(13/60),其他 47 个型均为独立型。SNPs 分析结果发现 T-C 转换发生率最高(45.6%),其次是 G-A 转换(32.5%),插入与缺失占 13.8%;而 A-T 颠换(2.6%)及 T-A 颠换(0.9%)发生率较少。

进化分析结果发现 48 个型别菌株与普氏立克次体均归为一簇。根据实验菌株的来源分析发现,人源菌株、鼠源菌株以及不同鼠种分离株没有明显区别。本研究参考菌株黑龙江立克次体与上述菌株虽然关系密切,但处于不同簇(图 1)。另外,*R. montanensis* (CP003340)、*R. philipii* (CP003308)、*R. rickettsii* (CP000053)和 *R. japonic* (AP011533)参考菌与实验菌株树状分析关系较远(图 1)。

原核细菌基因组间隔序列因自由选择压力,存在较大的变异性,已经广泛应用于菌株的分子分型、传染病病原因子流行株追踪以及临床耐药菌株的甄别等。本研究进一步证实 MST 分型技术比传统的表型鉴定及 MLST 更有鉴别力,这种技术将在未来立克次体疫情暴发及突发公共卫生事件中发挥重要的快速甄别作用。

参考文献

- [1] Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(4): 657-702.
- [2] Fournier PE, Dumler JS, Greub G, et al. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5456-5465.
- [3] Zhang L, Jin J, Fu X, et al. Genetic differentiation of Chinese isolates of *Rickettsia sibirica* by partial *ompA* gene sequencing and multispacer typing [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2465-2467.
- [4] 金玉明, 张丽娟, 孙莲英, 等. 海南省澄迈县新发斑点热流行病学调查 [J]. 疾病监测, 2011, 26(1): 18-22.
- [5] Zhang LJ, Han J, Xu JG, et al. Identification of a new serotype of *Rickettsia heilongjiangensis* in wild rats from Guangdong province, China [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15 Suppl 2: S338-339.
- [6] Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, et al. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5757-5766.
- [7] Karpathy SE, Dasch GA, Eremeeva ME. Molecular typing of isolates of *Rickettsia rickettsii* by use of DNA sequencing of variable intergenic regions [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2545-2553.
- [8] Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W, et al. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence [J]. J Immunol, 1978, 121(5): 1961-1968.
- [9] Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA [J]. Int J Syst Bacteriol, 2008, 3(Pt 3): 839-849.
- [10] Pan L, Zhang L, Wang G, et al. Rapid, simple, and sensitive detection of the *ompB* gene of spotted fever group rickettsiae by loop-mediated isothermal amplification [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 254.
- [11] Kernif T, Messaoudene D, Ouahioune S, et al. Spotted fever group rickettsiae identified in *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks in Algeria [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2012, 3(5/6): 380-381.
- [12] Zhu Y, Fournier PE, Ogata H, et al. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4708-4712.

收稿日期: 2014-02-21

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎联系广告业务