

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(4):429-437; 4 April 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

中国家猫克氏巴尔通体分离株生物学及分子特征分析

栗冬梅¹, 刘起勇¹, 宋秀平¹, 张建中¹, 许传彬², 杨晓冉³

(¹中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206)

(²山东省烟台市经济技术开发区疾病预防控制中心, 烟台 264006)

(³北京市公共卫生信息中心, 北京 100050)

摘要 【目的】分析中国家猫中分离的巴尔通体菌株 M9HN-SHQ 生物学性状和分子特征。【方法】应用含 5% 羊血的胰酶大豆琼脂培养基在 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 6~7 d, 革兰氏和吉姆尼茨染色镜下观察形态; 应用 VITEK ANI 厌氧菌鉴定卡进行生化反应鉴定; 气相色谱分析方法获取菌体脂肪酸成份组成 (CFA); Etest 药敏试条测定对 10 种抗生素的敏感性; 分别应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 技术对目标菌株和其他国际标准菌株等绘制 DNA 指纹图谱; 对 16S rRNA, *gltA*, *groEL*, *ftsZ*, *rpoB*, *ribC* 基因和 16S~23S rRNA ITS 测序并根据序列进行系统发育分析。【结果】菌株 M9HN-SHQ 的菌落呈圆形、灰白色, 较小; 镜下观察为革兰染色阴性、细小、微弯曲的杆状菌体。生化反应不活跃, 氧化酶等阴性; CFA 主成份组成与克氏巴尔通体一致; 体外培养对头孢噻肟钠、利福平等多种抗生素敏感; RAPD 和 PFGE 指纹图能够很好的与汉赛巴尔通体等 4 种国际标准菌株区别, 具有独特带型; 16S rRNA 等多个基因序列与克氏巴尔通体同源性为 100%。【结论】综合生物学性状和分子特征分析, 菌株 M9HN-SHQ 是克氏巴尔通体, 这是我国首次从宿主动物中分离到该病原菌, 证明在中国家猫中存在这种能够引起人猫抓病的病原菌。

关键词: 巴尔通体; 生化鉴定; 分子鉴定; 猫抓病

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0429-09

猫抓病 (cat-scratch disease, CSD) 主要是由汉赛巴尔通体^[1-2] (*Bartonella henselae*) 引起的人类新发人兽共患病。猫是这种巴尔通体的自然宿主, 通过抓或咬伤将它们传染给人, 人感染这些细菌后在伤口处会出现红斑丘疹或化脓性丘疱疹, 继而发生以局部淋巴结炎为典型症状的 CSD, 少数患者还可并发心内膜炎、骨髓炎和脑膜炎等全身性疾病。猫可以长期健康带菌, 成为传染源。克氏巴尔通体^[3] (*B. clarridgeiae*) 是继汉赛巴尔通体后又新发现的一种能够引起人 CSD 的猫传巴尔通体。克氏巴尔通体最早报道在欧美, 近年日本^[4]、印度尼西亚^[5]和中国台湾^[6]也有分离到这种巴尔通体的报道。我国虽然已有关于猫感染汉赛巴尔通体报道^[7-8], 尚未见

克氏巴尔通体相关报道。从河南家猫血液中分离到菌株 M9HN-SHQ 是不同于汉赛巴尔通体的新菌株, 本研究通过对这株菌的形态、生化、药敏和随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 基因型等生物学和分子特征进行分析, 为我国临床或其他实验室鉴定此类病原菌奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 胰酶大豆琼脂培养基 (Tryptic Soy Agar) 购自美国 BD 公司; VITEK ANI 厌

氧菌鉴定卡购自生物梅里埃中国有限公司;Etest 试条购自瑞典 AB BIODISK 公司;DNeasy[®] Tissue Kit 和 Fast Cycling PCR Kit 购自德国 QIAGEN 公司;引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成;BioNumerics 4.6 Version 软件购自比利时 Applied Maths 公司;MyCycler[™] Thermal Cycler PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司。

表 1 PCR 反应引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for PCR

Target gene	Primer	Primer sequence (5'→3')	Product length/bp
<i>gltA</i>	BhCS.781p ^[10]	GGGGACCAGTCATGGTGG	379
<i>gltA</i>	BhCS.1137r ^[10]	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA	379
16S rRNA	rDf ^[11]	AGAGTTTGATCTGGCTCAG	1400 ~ 1500
16S rRNA	rDf ^[11]	AAGGAGGTGATCCAGCC	1400 ~ 1500
16S ~ 23S rRNA ITS	16SF ^[12]	AGAGGCAGGCAACCACGGTA	900 ~ 2000
16S ~ 23S rRNA ITS	23Sf ^[12]	GCCAAGGCATCCACC	900 ~ 2000
<i>ftsZ</i>	Bfp1 ^[13]	ATTAATCTGCAYCGGCCAGA	896
<i>ftsZ</i>	Bfp2 ^[13]	ACVGADACAGGAATAACACC	896
<i>groEL</i>	HSPF1f ^[14]	GAAGTNGAAGATAAGTTNGAA	1500
<i>groEL</i>	BbHS1630.r ^[14]	AATCCATTCCGCCATTTC	1500
<i>rpoB</i>	1400F ^[15]	CGCATTGGCTTACTTCGTATG	866
<i>rpoB</i>	2300R ^[15]	GTAGACTGATTAACCGCTG	866
<i>ribC</i>	BARTON-1 ^[16]	TAACCGATATTGGTTGTGTGAAG	585
<i>ribC</i>	BARTON-2 ^[16]	TAAAGCTAGAAAGTCTGGCAACATAACG	585

The number in the square brackets represents references.

1.1.3 菌株和培养条件:所用标准菌株和本实验室分离菌株见表 2。所有菌株应用含 5% 羊血的胰酶大豆琼脂培养基,37℃,5% CO₂ 潮湿环境中培养 6 ~ 7 d。

表 2 实验菌株来源背景资料

Table 2 Sources of the *Bartonella* strains examined in the study

Species	Strain	Source(animals)
<i>B. henselae</i>	Houston-1	ATCC 4988X (human)
<i>B. elizabethae</i>	F9251	ATCC 4992X (human)
<i>B. grahamii</i>	NCTC 12860	ATCC 700132 (Bank vole)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	NCSU 93-CO1	ATCC 5167X (dog)
<i>B. henselae</i>	M13BJ	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	M9BJ	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	M22BJ	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	M7SHD	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	M45SHD	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	M20SHD	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	H62SHD	China CDC ICDC (human)
<i>B. henselae</i>	M9HN	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	M207HN	China CDC ICDC (cat)
<i>B. henselae</i>	M246HN	China CDC ICDC (cat)
target strain	M9HN-SHQ	China CDC ICDC (cat)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Q52SHD	China CDC ICDC (dog)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Q64SHD	China CDC ICDC (dog)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Q132SHD	China CDC ICDC (dog)

1.1.2 引物:随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 基因分型应用引物为 M13^[9] (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') 和 3S (S15:5'-GGAGG GTGTT-3'; S18:5'-CCACAGCACT-3'; S103:5'-AGAG GTCCAC-3') 核苷酸序列同源性比较及系统发育分析应用文献中报道的 7 对引物 (表 1) 进行 PCR 扩增。

1.2 生化反应

应用 VITEK ANI 厌氧菌鉴定卡按照操作手册进行生化分析:取培养第 6 天的菌株,用 0.45% NaCl 溶液配制成浓度为麦氏浊度 3.0 的悬浮溶液,充填鉴定卡后置于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 4 ~ 5 h 观察结果。

1.3 细胞脂肪酸分析 (whole-cell fatty acid, CFA)

用灭菌棉拭子轻刮取 5 块平板上培养第 6 天的菌苔于灭菌水中混悬,置于 60℃ 温浴 30 min,然后 1844 × g 离心 5 min,弃去上清液,保存于 -20℃ 待检。样品在军事医学科学院微生物流行病学研究所分析微生物室,采用 Sherlock 全自动细菌鉴定系统进行菌体脂肪酸成份分析。

1.4 抗生素敏感性实验

应用 Etest 法测定头孢菌素、头孢他啶、头孢噻肟钠、利福平、环丙沙星、盐酸克林霉素、妥布霉素、亚安培南、多粘菌素 B、甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑的 MIC,用灭菌 PBS 悬浮菌落,调整麦氏浊度至 1.0,用无菌棉拭子蘸取菌液均匀涂布于 4 mm 厚、直径 150 mm 的血平板上,不同方向涂布 3 次后贴 Etest 试条 1 ~ 3 条,经 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 7 d 后,判读 MIC 结果。

1.5 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA ,RAPD)

应用引物 M13 和 3S 对各菌株进行 RAPD 基因分型。反应体系应用 Fast Cycling PCR Kit 配制，模板量约 10 ~ 100 ng，引物 10 pmol/ μ L 加 1 μ L，扩增反应按以下参数 94 $^{\circ}$ C 5 min 94 $^{\circ}$ C 40 s 40 $^{\circ}$ C 40 s 72 $^{\circ}$ C 1 min 35 个循环 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物电泳并照相记录，应用 BioNumerics 4.6 Version 软件，选择 Dice coefficient 和 UPGMA 方法进行 DNA 指纹图谱分析并构建聚类图。

1.6 脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis ,PFGE)

应用许传彬等^[17]报道的方法，用 *Sma* I 酶切。应用 BioNumerics version 4.6 软件，选择 Dice coefficient 和 UPGMA 方法，对 PFGE 图谱进行处理和聚类分析。

1.7 核苷酸序列同源性比较及系统发育分析

取菌液 600 μ L 约含 2×10^9 个细菌，使用 DNeasy[®] Tissue Kit，按照操作手册提取 DNA。应用文献中报道的 7 对引物(表 1)进行 PCR 扩增。将 *gltA*、16S rRNA、16S ~ 23S rRNA ITS、*ftsZ*、*groEL*、*rpoB*、*ribC* 基因的扩增产物交由宝生物工程(大连)有限公司直接测序。采用 BankIt 程序在线将序列提交 GenBank。GenBank 登记号分别为 EU770616 (*gltA*)，EU571939(16S rRNA)，EU589237(16S ~ 23S rRNA ITS)，EU571941(*groEL*)，EU571942(*ftsZ*)，EU571943(*ribC*)，EU836703(*rpoB*)。

网上利用核酸序列比对程序 BLASTN programs (美国国家生物技术信息中心，www.ncbi.nlm.nih.gov)进行核酸序列同源性搜索，用 DNASTAR5 进行序列同源性分析。将 17 种巴尔通体和菌株 M9HN-SHQ 的 6 个来自染色体组不同区域、具有不同进化速度的基因/核酸序列用 MEGA4 软件中 Clustal W 程序分别进行序列比对，所有序列末端对齐，按 *gltA* (276 bp)-16S rRNA(1364 bp)-16S ~ 23S rRNA ITS(1182 bp)-*ftsZ*(788 bp)-*groEL*(1105 bp)-*rpoB*(792 bp)-*ribC*(550 bp)顺序连接为多位点序列，用 MEGA4 软件中邻接法(neighbor-joining, NJ)基于核苷酸 Kimura 2-parameter 模型构建系统发育树，选择与巴尔通体近缘的布氏杆菌 (*Brucella abortus*) 作为外群。

2 结果

2.1 菌落及菌体形态观察

菌落呈圆形、直径约 1.0 mm ~ 3.0 mm、灰白色、

半透明、边缘光滑，传代培养后生长速度明显加快，最早第 3 天即可见到微小菌落形成(图 1-A)。传代培养过程中未见溶血现象。光镜下观察为革兰染色阴性，吉姆尼茨(Gimenez)染色菌体呈紫色、细小、微弯曲的杆状(图 1-B)。

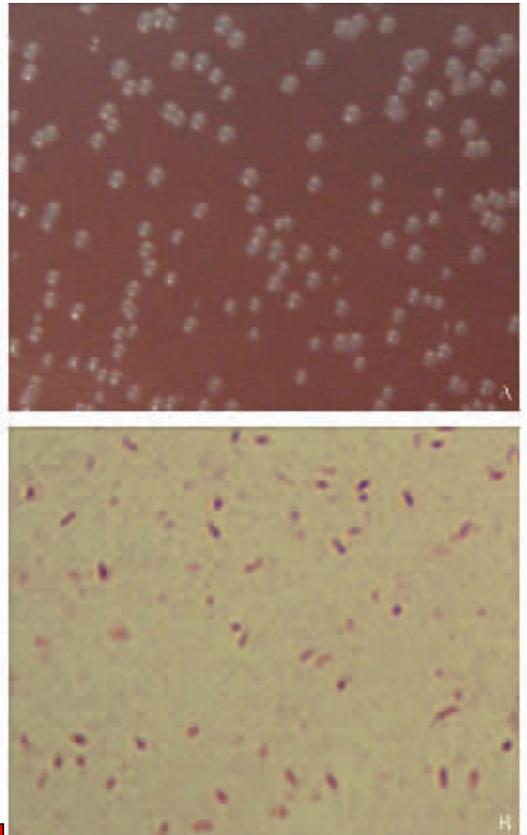


图 1 菌株 M9HN-SHQ 在 5% 羊血胰酶大豆琼脂培养基上培养第 4 天第 5 代的菌落形态(A)和吉姆尼茨染色(B)

Fig. 1 Morphological features of strain M9HN-SHQ. A : Colony of fifth subculture strain M9HN-SHQ on blood agar for 4 d incubation ; B : Gimenez-stained smear , Magnification , $\times 1000$.

2.2 生化反应

氧化酶、触酶、尿素酶阴性 糖类发酵产酸阴性，不能水解磷酸酯，能够分解亮氨酸、丙氨酸和赖氨酸，详见表 3。

表 3 菌株 M9HN-SHQ 生化特征

Table 3 Biochemical characteristics of strain M9HN-SHQ			
Characteristics	Results	Characteristics	Results
Oxidase	-	Lysine	+
Catalase	-	Arginine	-
Urease	-	Acid from carbohydrates :	
Phosphatase	-	Mannose	-
Galactosidase	-	Fucose	-
γ -glutamyl transferase	-	Galactose	-
Triphenyl tetrazolium	-	Glucose	-
Hydrolysis of :		Trehalose	-
Leucine	+	Arabinose	-
Proline	-	Raffinose	-
Alanine	+	Xylose	-

2.3 细胞脂肪酸分析 (whole-cell fatty acid, CFA)

菌株 M9HN-SHQ 的 CFA 主要成分为 18:1 ω 7c (57.52%) λ 18:0 (22.60%) λ 16:0 (12.30%) λ 17:0 (2.62%) λ 18:1 ω 9c (1.44%), 前 3 者占脂肪酸总量的 90% 以上; 其他还测出 12:0 3OH、17:1 ω 6c、16:0 3OH、18:1 ω 5c、19:0、20:1 ω 7c 和 20:0, 占脂肪酸总量不到 2.72%。

2.4 抗生素敏感性实验

菌株 M9HN-SHQ 对头孢噻肟钠、利福平、环丙沙星等 7 种抗生素敏感, 对头孢菌素的敏感性较弱, 对盐酸克林霉素处于中介水平, 对甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑耐药 (表 4)。

2.5 16S ~ 23S rRNA ITS 扩增图谱和 RAPD

2.5.1 16S ~ 23S rRNA ITS 扩增图谱: 汉赛巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体、格拉汉姆巴尔通体和文森巴尔通体伯格霍夫亚种标准菌株及本实验室分离菌株 M9HN、H62SHD 和 M9HN-SHQ 的扩增带型各不相同, 其中菌株 M9HN 和 H62SHD 是汉赛巴尔通体, 带型与标准菌株 ATCC 49882 一致, 菌株 M9HN-SHQ 与以上 4 种标准菌株均不一样。

表 4 菌株 M9HN-SHQ 对 10 种抗生素的 Etest 法药敏结果

Table 4 MICs of strain M9HN-SHQ determined by Etest strip with Tryptic soy agar containing 5% sheep blood

Antibiotics	MIC/ (μ g/mL)	Concentration Range(μ g/mL)	Interpretive Criteria (S \leq)
Cephalothin	4	0.016-256	8
Ceftazidime	0.47	0.016-256	2
Cefotaxime	0.006	0.002-32	8
Rifampicin	0.003	0.002-32	1
Ciprofloxacin	0.047	0.002-32	1
Clindamycin	0.5	0.016-256	0.5
Tobramycin	0.16	0.016-256	4
Imipenem	0.047	0.002-32	4
Polymyxin B	0.38	0.064-1024	2
Trimethoprim sulfamethoxazole	8	0.002-32	2

2.5.2 RAPD: 由 16S ~ 23S rRNA ITS 的扩增产物电泳结果可知菌株 M9HN-SHQ 与 4 种标准菌株不同, 进一步由 2 组引物的 RAPD 分析结果显示菌株 M9HN-SHQ 不同于标准菌株和其他分离菌株 (图 2); 引物 M13 和 3S 所得指纹图谱基本一致; 所有本实验室猫分离株 (已鉴定为汉赛巴尔通体) 与汉赛巴尔通体标准菌株带型一致, 成为一组; 犬分离株是文森巴尔通体伯格霍夫亚种, 3S 扩增带型与标准菌株完全一致, M13 扩增带型与标准菌株虽略有差异, 在图中亦聚合在一组; 伊丽莎白和格拉汉姆巴尔通体

带型有部分差异, 聚类符合近缘的鼠传巴尔通体生物特性; 菌株 M9HN-SHQ 的带型与标准菌株及本实验室分离株均不一样, A 图中距离伊丽莎白和格拉汉姆巴尔通体较近, B 图中差异较为明显, 独立出来自成一组。

2.6 PFGE

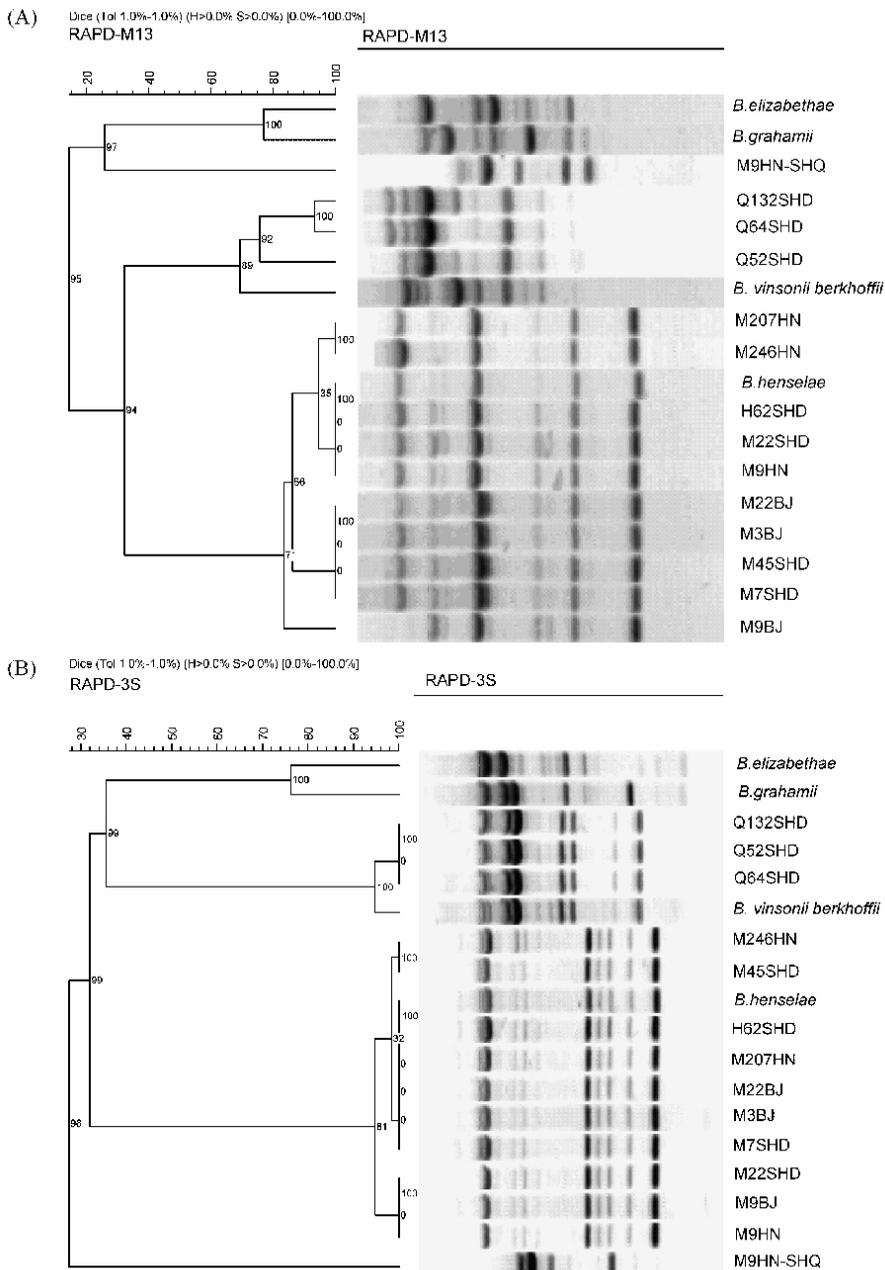
图 3 中示菌株 M9HN-SHQ 有 6 条电泳带, 带型与汉赛巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体、文森巴尔通体伯格霍夫亚种及格拉汉姆巴尔通体带型均不一样, 且这 4 种国际标准菌株带型各不相同; 所有本实验室的猫分离株与汉赛巴尔通体国际标准株带型基本相近, 聚成 1 个分枝。

2.7 核苷酸序列同源性比较及系统发育分析

BLAST 搜索结果示 *gluA* (318 bp) λ 16S rRNA (1386 bp) λ *groEL* (1045 bp) λ *ribA* (547 bp) λ *ftsZ* (865) λ *rpoB* (792 bp) 序列同克氏巴尔通体 (U84386、U64691、EU189217、AB292604、AF141018、AF165990) 完全一致; 16S ~ 23S rRNA ITS (1515 bp) 序列与克氏巴尔通体 (AF312498) 的序列相似性是 97.4%, 与其他汉赛巴尔通体、五日热巴尔通体等均在 50% 以下。从系统发育树上可以看出 (图 4), 菌株 M9HN-SHQ 和克氏巴尔通体合并在一起, 与杆菌样巴尔通体构成一个分枝, 其余巴尔通体形成 4 个较大的分枝, Bootstrap 验证系统树的各分枝都有很高的支持率: (i) 伊丽莎白巴尔通体等组成的鼠传巴尔通体分枝 (ii) 文森巴尔通体分枝 (iii) 汉赛巴尔通体和五日热巴尔通体分枝 (iv) 牛巴尔通体 (*B. bovis*) 和 *B. schoenbuchensis* 组成的反刍类巴尔通体分枝。

3 讨论

菌株 M9HN-SHQ 分离自河南省家猫全血中, 培养条件、菌落形态及生化反应符合巴尔通体属特征, 革兰染色阴性, 吉姆尼茨染色清晰可见为短小杆菌。巴尔通体是兼性细胞内寄生, 在宿主体内寄生于红细胞或血管内皮细胞内, 体外培养需要营养丰富的含血液培养基, 菌落生长缓慢, 呈灰白色半透明状, 由于其依赖于宿主细胞的特性, 生化反应很不活跃, 缺少糖酵解酶, 不能水解利用糖类, 需要 CO₂ 补充碳源, 菌株 M9HN-SHQ 能够分解亮氨酸、丙氨酸和赖氨酸, 其他巴尔通体还有能够分解脯氨酸、精氨酸、胰蛋白酶等^[18], 肽酶的活性因菌株不同而稍有差异。M9HN-SHQ 的 CFA 主要成分组成与文献 [19] 中描述的克氏巴尔通体 CFA 主成份相同, Kordick^[20] 报道 18:1 ω 7c、18:0、16:0 和 17:0 的总量占 97% 以



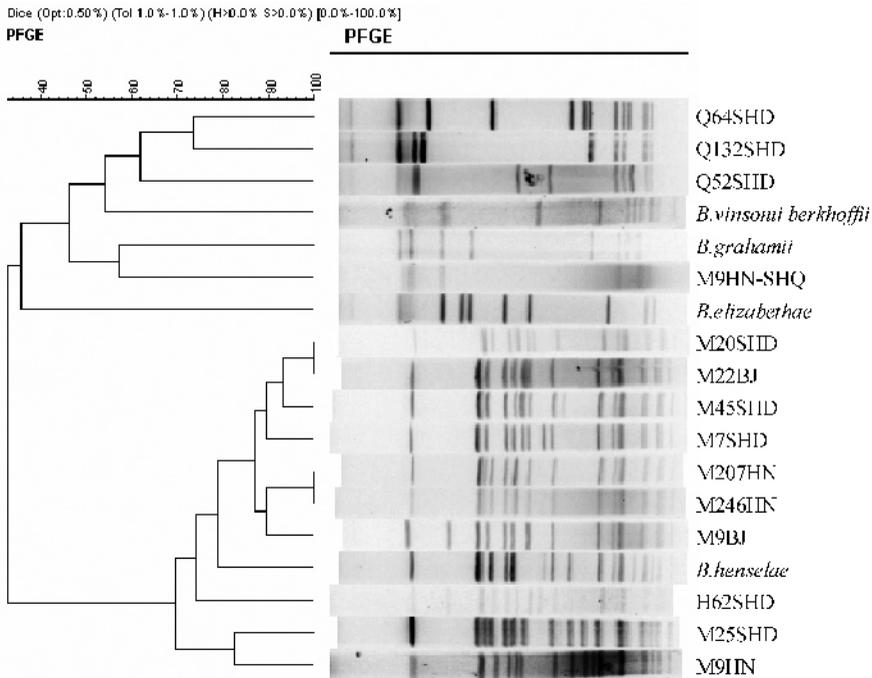
2 A、B 分别为引物 M13 和 3S 的 RAPD 指纹图谱及基于 Dice coefficient 计算的聚类图

Fig.2 DNA fingerprint analysis of the international reference strains and human and feline *Bartonella* isolates from China by Random amplified polymorphic DNA (A, using the primer M13 ; B, using the primers 3S) and dendrogram of fingerprints determined by the Dice coefficient. The isolate names were shown at right column. *B. elizabethae* ,ATCC 49927 ;*B. henselae* ,ATCC 49882 ;*B. grahamii* ,ATCC 700132 ;*B. vinsonii berkhoffii* ,ATCC 51672.

上,这株菌略低于此。目前巴尔通体尚无统一标准的抗生素敏感性实验方法,鉴于巴尔通体生长缓慢及参考国外文献^[21]和 Etest 方法适用于苛养菌,故选择此方法。与其他巴尔通体相似,菌株 M9HN-SHQ 对本研究中多数抗生素具有高度敏感性。Maurin^[22]曾应用琼脂稀释法做过 14 株巴尔通体(不包括克氏巴尔通体)对 28 种抗生素敏感性试验,结果体外培养的巴尔通体对 β 内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类和利福平都有较高的敏感性,但头孢菌

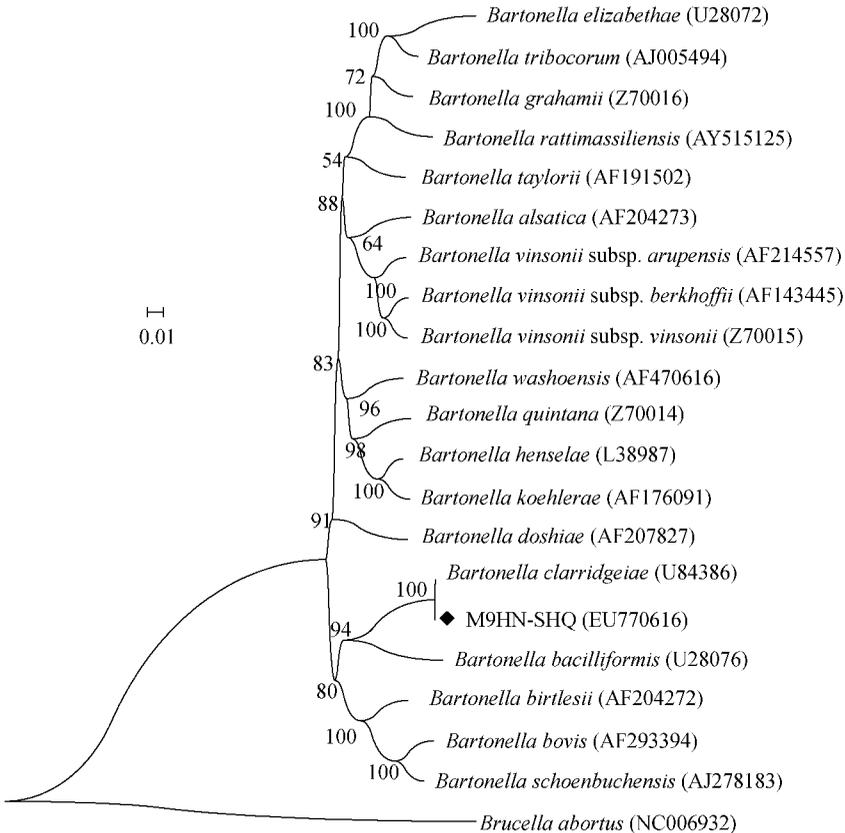
素和克林霉素抑制细菌生长的效果不明显,菌株 M9HN-SHQ 对后 2 种抗生素的反应是一致的。对于巴尔通体感染而言,抗生素较低的临床疗效往往与体外药敏试验结果不一致,在宿主细胞内寄生和患者的免疫状态很可能是原因之一。但情况较为复杂的是,往往 HIV 感染的菌血症、CSD 患者有较好的疗效,因此,本文报道的药敏结果不推荐指导临床用药。

本研究扩增了菌株 M9HN-SHQ、4 种巴尔通体标准菌株及 2 株汉赛巴尔通体实验室分离株的 16S-



3 基于 Dice coefficient 计算的菌株 M9HN-SHQ 及其他巴尔通体 PFGE 聚类分析图

Fig.3 Pulsed field gel electrophoresis of *Sma* I-digested genomic from international reference strains and human and feline *Bartonella* isolates from China and dendrogram of fingerprints determined by the Dice coefficient (Optimization 0.5% , Position tolerance 1.0%). The isolate names were shown at right column. *B. elizabethae* , ATCC 49927 ; *B. henselae* , ATCC 49882 ; *B. grahamii* , ATCC 700132 ; *B. vinsonii berkhoffii* , ATCC 51672.



4 基于多基因序列 *gltA* (276 bp)-16S rRNA (1364 bp)-16S ~ 23S rRNA ITS (1182 bp)-*ftsZ* (788 bp)-*groEL* (1105 bp)-*rpoB* (792bp)-*ribC* (550 bp)用 NJ 方法构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree showing the positions of strain M9HN-SHQ among members of the genus *Bartonella* based on comparisons of concatenated sequences of the following seven genes : the citrate synthase gene *gltA* , the 16S rRNA gene , the 16S ~ 23S rRNA ITS , the cell division gene *ftsZ* , the RNA polymerase beta-subunit gene *rpoB* , the heat shock protein gene *groEL* , and riboflavin synthase alpha chain gene *ribC* . Using the MEGA4 software (Sinauer Associates , Inc. , Sunderland , Massachusetts , USA) . The distance matrix was calculated using the Kimura-2 parameter. The tree was obtained using the neighbor-joining method. The scale bar represents 5% divergence. The support of each branch was determined using 1000 bootstrap samples and is indicated by the value at the node. The position of new sequences generated in this study is indicated with a black diamond. The scale bar represents 1% sequence divergence.

23S rRNA ITS 序列, 发现 2 株实验室分离株与汉赛巴尔通体标准菌株相同, 而菌株 M9HN-SHQ 的扩增带型与其他巴尔通体不同, 说明菌株 M9HN-SHQ 不是汉赛巴尔通体、文森巴尔通体伯格霍夫亚种、伊丽莎白巴尔通体和格拉汉姆巴尔通体。RAPD 得到的指纹图经聚类分析, 实验室汉赛巴尔通体分离株与该种的标准菌株聚合在一起; 实验室犬分离株文森巴尔通体伯格霍夫亚种用 M13 引物与该种的标准菌株带型略有差异, 但亦形成一个分枝, 用 3S 引物作出的带型完全一致; 伊丽莎白和格拉汉姆巴尔通体 2 种近缘的鼠传巴尔通体聚在一起; 2 组引物所得图谱均显示菌株 M9HN-SHQ 的带型与其他巴尔通体很清晰的区分开来, 证实菌株 M9HN-SHQ 不是上述列出的巴尔通体。PFGE 图谱很好的区分开菌株 M9HN-SHQ 与其他巴尔通体菌株, 较少的酶切片段与 Ciervo 等^[9]报道的一致, 进一步证实上述的结论。最后经多基因测序证实菌株 M9HN-SHQ 是克氏巴尔通体。系统发育树为我们展示了克氏巴尔通体在巴尔通体属中的位置, 与杆菌样巴尔通体有较近的亲缘关系。各方面的证据都证实菌株 M9HN-SHQ 是克氏巴尔通体, 这是我国首次从宿主动物中分离到该病原菌。

克氏巴尔通体(菌株 Houston-2 cat)是 1995 年 Clarridge III 等^[19]从美洲一名有汉赛巴尔通体菌血症的艾滋病患者豢养的幼猫血液中分离到的, 1996 年 Lawson 和 Collins^[23]将其正式命名为“*Bartonella clarridgeiae*”。1997 年 Kordick 等^[31]首次报道这种巴尔通体可以引起人丘疹、发热和淋巴结病变的 CSD 症状。随后, 在法国^[24]、德国^[25]、西班牙^[26]、波兰^[27]欧洲等地及亚洲的日本、印度尼西亚和菲律宾^[28]的猫中都发现了克氏巴尔通体。其中一项对流浪猫的调查显示克氏巴尔通体带菌率 16%, 但归纳各地的调查, 仍以汉赛巴尔通体感染率(9.1% ~ 41.0%^[29-30])为高, 这可能与以下因素有关: ①汉赛巴尔通体在猫感染中占有优势, 克氏巴尔通体在猫中的感染率较低; ②汉赛巴尔通体和克氏巴尔通体可以同时感染猫^[4, 28, 31], 分离培养时由于菌落形态相似难以区分, 且克氏巴尔通体生长速度较汉赛巴尔通体慢, 菌落小可能被忽略; ③还可能与克氏巴尔通体原代分离培养时需要更严格的生长条件^[19], 否则难以与汉赛巴尔通体分离。虽然有上述这些可能的因素影响克氏巴尔通体的检出, 但近年世界各地仍然不断有这种微生物被发现的报道, 如 Henn 等^[32]从北美犬(3 株/182 只)和灰狐(22 株/42 只)分离到

克氏巴尔通体, Gundi 等^[33]从中非加蓬 258 只犬血中分离出 5 株, Chomef^[34]从一只死于心内膜炎(伴有严重主动脉瓣膜病)的拳师犬血液中分离出菌体并从病变的瓣膜中扩增出相应 DNA。显然, 随着各地各种动物克氏巴尔通体分离报道的增多, 可以判断这种病原呈世界性分布且存在于多种动物宿主。如果能够不同寄主动物中生存, 它的传播者是谁? 经研究证实猫栉首蚤(*Ctenocephalides felis felis*)可以传播汉赛巴尔通体^[35], 那么是否可以推断猫蚤也是克氏巴尔通体的传播媒介之一? 研究者们从法国^[36]、德国^[37]、新西兰^[38]和美国^[39]等地区的猫蚤中扩增出这种巴尔通体的 DNA, 提供了一定的证据。此外, 还有从世界各地的蚤类中发现克氏巴尔通体相近基因型, 如: 中国云南的泸水栉眼蚤(*Ctenophthalmus lushuiensis*)^[40]、埃及的印鼠客蚤(*Xenopsylla cheopis*)^[41]、秘鲁^[42]的人体表蚤类和北美棉鼠(*Sigmodon hispidus*)的体表寄生蚤(*Polygenis gwyni*)^[43]。这些调查数据提示这些蚤类很可能导致克氏巴尔通体在不同宿主间的传播, 虽然到目前还没有从啮齿动物中分离出克氏巴尔通体, 但是鼠蚤中存在的间接证据表明鼠类中很可能存在这种巴尔通体或其近缘种群。

至今, 人们对克氏巴尔通体的致病性了解甚少, 是否如汉赛巴尔通体能够引起心内膜炎、杆菌性血管瘤也尚无报道, 特别是在中国包括各种动物宿主、潜在传播媒介以及人群的感染流行状况等问题更是一无所知, 有必要对这些情况做进一步的调查研究。

致谢 中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所崔志刚提供了 RAPD 和 PFGE 的聚类分析图, 闫笑梅在药敏试验过程中给予指导和帮助。感谢军事医学科学院微生物检验研究中心谭亚芳在细胞脂肪酸分析实验中给予的帮助。

参考文献

- [1] Dolan MJ, Wong MT, Regnery RL, et al. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Annals of Internal Medicine*, 1993, 118(5): 331-336.
- [2] Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, et al. Serological response to “*Rochalimaea henselae*” antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet*, 1992, 339(8807): 1443-1445.
- [3] Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, et al. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever and lymphadenopathy (cat scratch disease). *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(7): 1813-1818.

- [4] Maruyama S , Nakamura Y , Kabeya H , et al. Prevalence of *Bartonella henselae* , *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* ,2000 ,62(3) : 273 - 279 .
- [5] Marston EL , Finkel B , Regnery RL , et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban Indonesian cat population. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* ,1999 6(1) :41 - 44 .
- [6] Chang CC , Lee CC , Maruyama S , et al. Cat-scratch disease in veterinary-associated populations and in its cat reservoir in Taiwan. *Veterinary Research* 2006 37(4) :565 - 577 .
- [7] 栗冬梅 , 孟凤霞 , 秦增军 , 等 . 山东省家猫检出汉赛巴尔通体 . 中国媒介生物学及控制杂志 (*Chinese Journal of Vector Biology and Control*) 2005 ,16(6) :452 .
- [8] 杨小冉 , 刘起勇 , 崔步云 . 河南山东部分地区家猫汉赛巴尔通体感染情况调查 . 疾病监测 (*Disease Surveillance*) 2007 22(8) :544 - 546 .
- [9] Ciervo A , Petrucca A , Ciarocchi S , et al. Molecular characterization of first human *Bartonella* strain isolated in Italy. *Journal of Clinical Microbiology* ,2001 39(12) :4554 - 4557 .
- [10] Norman AF , Regnery R , Jameson P , et al. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology* ,1995 33(7) :1797 - 1803 .
- [11] Daly JS , Worthington MG , Brenner DJ , et al. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology* ,1993 31(4) :872 - 881 .
- [12] Houpikian P , Raoult D. 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis , identification , and subtyping of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2001 39(8) :2768 - 2778 .
- [13] Zeaiter Z , Liang Z , Raoult D. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2002 40(10) :3641 - 3647 .
- [14] Zeaiter Z , Fournier PE , Ogata H , et al. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002 52(Pt 1) :165 - 171 .
- [15] Renesto P , Gouvernet J , Drancourt M , et al. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology* ,2001 39(2) :430 - 437 .
- [16] Johnson G , Ayers M , McClure SC , et al. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). *Journal of Clinical Microbiology* ,2003 41(3) : 1069 - 1072 .
- [17] Chuanbin Xu , Qiyong Liu , Biao Kan , et al. Optimization of Pulse-Field Gel Electrophoresis for *Bartonella* Subtyping. *Journal of Microbiological Methods* 2009 76(1) :6 - 11 .
- [18] Kordick DL , Swaminathan B , Greene CE , et al. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov. , isolated from dogs ; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii* ; and emended description of *Bartonella vinsonii* . *International Journal of Systematic Bacteriology* ,1996 46(3) :704 - 709 .
- [19] Clarridge JE III , Raich TJ , Pirwani D , et al. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *Journal of Clinical Microbiology* ,1995 33(8) :2107 - 2113 .
- [20] Kordick DL , Wilson KH , Sexton DJ , et al. Prolonged *Bartonella bacteremia* in cats associated with cat-scratch disease patients. *Journal of Clinical Microbiology* ,1995 33(12) :3245 - 3251 .
- [21] Pendle S , Ginn A , Iredell J. Antimicrobial susceptibility of *Bartonella henselae* using Etest methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006 57(4) :761 - 763 .
- [22] Maurin M , Gasquet S , Ducco C , et al. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ,1995 39(11) :2387 - 2391 .
- [23] Lawson PA , and Collins MD. Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. *Medical Microbiology Letters* ,1996 5 :64 - 73 .
- [24] Heller R , Artois M , Xemar V , et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *Journal of Clinical Microbiology* ,1997 35(6) :1327 - 1331 .
- [25] Arvand M , Klose AJ , Schwartz-Porsche D , et al. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin , Germany and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *Journal of Clinical Microbiology* 2001 39(2) :743 - 746 .
- [26] Tabar MD , Altet L , Francino O , et al . Vector-borne infections in cats : molecular study in Barcelona area (Spain). *Veterinary Parasitology* ,2008 ,151(2-4) :332 - 336 .
- [27] Podsiadly E , Chmielewski T , Marczak R , et al. *Bartonella henselae* in the human environment in Poland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2007 39(11-12) :956 - 962 .
- [28] Chomel BB , Carlos ET , Kasten RW , et al. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* ,1999 60(4) :593 - 597 .
- [29] Maruyama S , Nogami S , Inoue I , et al. Isolation of *Bartonella henselae* from domestic cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* ,1996 58(1) :81 - 83 .
- [30] Koehler JE , Glaser CA , et al. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *Journal of the American Medical Association* ,1994 271(7) : 531 - 535 .
- [31] Gurfield AN , Boulouis HJ , Chomel BB , et al. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. *Journal of Clinical Microbiology* ,1997 35(8) :2120 - 2123 .

- [32] Henn JB , Gabriel MW , Kasten RW , et al. Gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) as a potential reservoir of a *Bartonella clarridgeiae*-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *Journal of Clinical Microbiology* 2007 45(8) :2411 – 2418.
- [33] Gundi VA , Bourry O , Davous B , et al. *Bartonella clarridgeiae* and *B. henselae* in dogs , Gabon. *Emerging Infectious Diseases* 2004 10(12) :2261 – 2262.
- [34] Chomel BB , Mac Donald KA , Kasten RW , et al. Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae* . *Journal of Clinical Microbiology* 2001 39(10) :3548 – 3554.
- [35] Chomel BB , Kasten RW , Floyd-Hawkins K , et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *Journal of Clinical Microbiology* 1996 34(8) :1952 – 1956.
- [36] Rolain JM , Franc M , Davoust B , et al. Molecular detection of *Bartonella quintana* , *B. koehlerae* , *B. henselae* , *B. clarridgeiae* , *Rickettsia felis* , and *Wolbachia pipiensis* in cat fleas France. *Emerging Infectious Diseases* 2003 9(3) :338 – 342.
- [37] Just FT , Gilles J , Pradel I , et al. Molecular evidence for *Bartonella* spp. in cat and dog fleas from Germany and France. *Zoonoses and Public Health* 2008 55(8-10) :514-520.
- [38] Kelly P , Rolain JM , Raoult D. Prevalence of human pathogens in cat and dog fleas in New Zealand. *The New Zealand Medical Journal* 2005 118(1226) :U1754.
- [39] Lappin MR , Griffin B , Brunt J , et al. Prevalence of *Bartonella* species , *Gimenez* species , *Ehrlichia* species , *Anaplasma phagocytophilum* , and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 2006 8(2) :85 – 90.
- [40] Li DM , Liu QY , Yu DZ , et al. Phylogenetic analysis of *Bartonella* detected in rodent fleas in Yunnan , China. *Journal of Wildlife Diseases* 2007 43(4) :609 – 617.
- [41] Loftis AD , Reeves WK , Szumlas DE , et al. Surveillance of Egyptian fleas for agents of public health significance : *Anaplasma* , *Bartonella* , *Coxiella* , *Ehrlichia* , *Rickettsia* , and *Yersinia pestis* . *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2006 75(1) :41 – 48.
- [42] Parola P , Shpynov S , Montoya M , et al. First molecular evidence of new *Bartonella* spp. in fleas and a tick from Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 2002 67(2) :135 – 136.
- [43] Abbot P , Aviles AE , Eller L , et al. Mixed infections , cryptic diversity , and vector-borne pathogens : evidence from Polygenis fleas and *Bartonella* species. *Applied and Environmental Microbiology* 2007 73(19) :6045 – 6052.

Biological and molecular characteristics of a cat-borne *Bartonella clarridgeiae*

Dongmei Li^{1*} , Qiyong Liu¹ , Xiuping Song¹ , Jianzhong Zhang¹ , Chuanbin Xu² , Xiaoran Yang³

(¹ National Institute for Communicable Disease Control and Prevention , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 102206 , China)

(² Disease Control and Prevention Center of Economic and Technological Development District , Yantai 264006 , China)

(³ Beijing Public Health Information Center , Beijing 100050 , China)

Abstract [Objective] To characterize a *Bartonella* strain M9HN-SHQ from a blood culture of cat from Henan Province , China.

[Methods] The organisms were subcultured in 5% CO₂ at 37°C on trypticase soy agar containing 5% sheep blood for 6 to 7 days. We analyzed the isolate using whole-cell fatty acid analysis , Etest for susceptibility testing , random amplified polymorphic DNA (RAPD) , pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and sequence analysis of 16S rRNA , *gltA* , *groEL* , *ftsZ* , *rpoB* , *ribC* and 16S ~ 23S rRNA intergenic spacer region. **[Results]** Isolate M9HN-SHQ stained faintly as a gram-negative rod but was easier to visualize when stained by the Gimenez technique. Most of the biochemical and cellular fatty acid properties of strain M9HN-SHQ were typical for bacteria of the *Bartonella* genus. The strain was susceptible to Cefotaxime sodium , Rifampin , Ciprofloxacin and other four antibiotics. Genotypic characterization of strain M9HN-SHQ , including RAPD , PFGE was distinguishable from the reference strains of *B. henselae* , *B. elizabethae* , *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *B. grahamii* . Sequence analysis of the genes from the seven chromosomal regions identified the strain M9HN-SHQ as *B. clarridgeiae* . **[Conclusion]** To our knowledge , this is the first report that documents *Bartonella clarridgeiae* infections of domestic cats in China.

Keywords : *Bartonella* ; biochemical identification ; molecular identification ; cat scratch disease

(本文责编 : 王晋芳)

* Corresponding author. Tel/Fax : + 86-10-61739450 ; E-mail : lidongmei@ icdc. cn

Received : 13 October 2008 / Revised : 13 December 2008