

用多聚酶链反应技术检测实验感染恙虫病立克次体的恙螨

陈添胜¹ 黎家灿² 倪宏² 冯慧敏²

摘要 作者首次采用多聚酶链反应技术检测感染恙虫病立克次体的媒介恙螨, 包括成虫和幼虫。证实PCR是一可用于恙虫病流行病学调查的新的敏感方法。

关键词 多聚酶链反应 恙虫病立克次体 恙螨

恙螨是恙虫病的传播媒介。为了建立感染恙虫病立克次体的恙螨模型, 洪氏及黎氏^[1]等首创成虫腹内人工接种立克次体的方法, 成虫感染率为41.2%。笔者认为该方法是可取的, 但成虫感染率是否真的只有41.2%这么低呢? 笔者用敏感性更高的多聚酶链反应技术(PCR)对此作了重新评估, 并就PCR用于恙虫病流行病学调查的可行性作了初步探讨。

材料和方法

一、恙虫病立克次体: 纯化的Karp株, 由中山医科大学微生物学与免疫学教研室保存。

二、恙螨: 地里纤恙螨, 由中山医科大学寄生虫学教研室于1980年从广州郊区孳生地查获, 经实验室纯化证实无立克次体感染, 并连续传代30代以上。

三、小鼠: 纯系Balb/c小鼠, 由中山医科大学实验动物中心提供。

四、DNA引物: 笔者自己设计合成, 序列见参考文献^[2]。

五、DNA分子量标记: pBR 322/BstNI, 质粒pBR322 BstNI酶切片段, 协和医科大学友谊医学科技公司产品。

六、PCR试剂盒: 购自复旦大学科技发展有限公司。

七、标本制备: 成虫标本: 参见文献^[1]。幼虫标本: 待接种恙虫病立克次体的小鼠发病

后, 将恙螨幼虫置病鼠耳朵叮咬, 两天后取出。

八、标本DNA提取: 参考Furuya方法^[3]。将成虫1只或幼虫5只用研磨器加100 μ l TE(10 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)磨碎, 吸至塑料离心管, 加10% SDS至终浓度为1%, 4 $^{\circ}$ C冰箱过夜, 加溶菌酶至终浓度2 mg/ml, 冰浴半小时, 加蛋白酶K至终浓度0.2 mg/ml, 55 $^{\circ}$ C水浴1小时, 补TE至200 μ l, 再用酚抽提, 乙醇沉淀、抽干, 溶于适量双蒸水。恙螨对照取10只成虫。

九、多聚酶链反应: 参考试剂盒说明书。

加样: 标本DNA, 5 \times PCR缓冲液10 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ l, 引物1, 2各25 pmol, 补双蒸水至49 μ l。93 $^{\circ}$ C水浴7分钟, 加2u FD DNA多聚酶, 混匀, 加50 μ l石蜡油覆盖防止水分蒸发。

循环: 如用水浴箱手动操作, 93 $^{\circ}$ C变性30秒; 55 $^{\circ}$ C退火55秒; 70 $^{\circ}$ C延伸2分钟; 共35个循环。如用FR-300型DNA扩增仪(上海复旦实验技术研究所科技公司), 93 $^{\circ}$ C变性45秒; 55 $^{\circ}$ C退火45秒; 70 $^{\circ}$ C延伸90秒, 共35个循环。

结果判定: 循环结束后, 取10 μ l PCR产物用1%琼脂糖-溴乙锭(0.5 μ g/ml)电泳, 紫外灯下凡见1 kb (Kilobase pairs) 片段扩增者

1. 广东省流行病防治研究所 510300 广州市

2. 中山医科大学

即阳性(附图), 反之则阴性。

结 果

一、用PCR检测恙螨成虫: 恙螨成虫人工腹内接种恙虫病立克次体后培养10天, 取单个螨提DNA, 两批共14只, 另取10只未接种恙虫病立克次体的成虫提DNA作对照。PCR检测结果: 恙螨对照为阴性, 14只接种过立克次体的成虫中13只为阳性, 1只为阴性, 阳性率为92.9%。成虫阳性结果及恙螨对照见附图中D E。

二、用PCR检测叮咬病鼠的恙螨幼虫: 将叮咬病鼠后2天及9天两组幼虫各5只分别提DNA, PCR检测结果均阳性, 见附图A, B。



附图 PCR结果

- A. 叮咬病鼠后2天幼虫
- B. 叮咬病鼠后9天幼虫
- C. pBR322/BstNI: 1857bp, 1060bp, 929bp, 383bp
- D. 感染立克次体的成虫
- E. 10只恙螨对照

讨 论

用PCR方法检测实验感染恙虫病立克次体的恙螨, 成虫感染率为92.9%, 远较洪氏等报告的41.2%〔1〕为高。这与洪氏等采用的检测方法: 病原体分离、免疫荧光、免疫金银染色及

电镜检测, 其敏感性不及PCR有关。因此, 笔者认为: 采用人工腹内接种恙虫病立克次体的方法, 只要接种方法正确, 恙螨成虫感染率几乎达100%, 是建立恙虫病立克次体阳性恙螨模型的理想方法。

用幼虫分离恙虫病立克次体, 通常要取100到200只幼虫接种, 小鼠才会发病。用PCR方法, 5只幼虫即可获得满意结果。作者曾用一只感染立克次体的成虫提DNA, 取其1/20量做PCR, 也可获得阳性结果。据国外文献报道〔4〕, PCR可检测到1~10个贝氏柯克斯体。以上资料说明, PCR的敏感性远较传统的立克次体检测方法高。

作者用PCR方法从叮咬病鼠的幼虫中检出恙虫病立克次体; 倪氏及黎氏再用该批饱食幼虫培养繁殖至子代幼虫, 用此未食幼虫叮咬正常小鼠, 取小鼠血用PCR检测, 能检测到立克次体DNA(待发表), 证实恙螨能传播恙虫病立克次体。

如果怀疑某地有恙虫病流行, 可用疑似患者血液、野鼠血液及恙螨进行PCR检测。如均阳性即证实患者、宿主及媒介中均有恙虫病立克次体存在。还可回收PCR扩增带, 用限制性片段长度多态性分析(RFLP)比较其同源性〔5〕, 如相同, 则说明其为同一株恙虫病立克次体。此外, 还可用同样方法比较不同地区媒介中恙虫病立克次体之间的同源性, 以分析它们之间的遗传相关性。总之, PCR结合RFLP分析可用于恙虫病分子流行病学研究。

Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from Chiggers by Polymerase Chain Reaction Chen Tiansheng, et al., Guangdong Provincial Institute of Epidemic Diseases Prevention and Control, Guangzhou 510300

Polymerase chain reaction was employed to detect *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from chiggers for the first time. Both adults and larvae were tested. The positive rate of expe-

rimentally infected adults was 92.9%. It suggests that PCR is a rapid and sensitive assay for epidemiological study of scrub typhus.

Key words Polymerase chain reaction (PCR) *Rickettsia tsutsugamushi* *Leptotrombidium deliense*

参 考 文 献

1. 洪菲, 黎家灿, 徐秉银. 恙虫病立克次体实验感染地里纤恙螨经卵传递的研究. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7(4)2.
2. 陈添胜, 涂裕英, 冯慧敏. 用多聚酶链反应技术扩增恙虫病立克次体Sta58主要抗原基因的部分片段. 中山医科大

学学报, 1992, 13(4): 77.

3. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, et al. Specific Amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from Clinical Specimens by Polymerase chain Reaction. J Clin Microbiol, 1991, 29(11): 2628.
4. Mallavia LP, et al. Rickettsiology: Current Issues and Perspectives. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990, 590: 572.
5. Spruill CL, et al. Rickettsiology: Current Issues and Perspectives. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990, 590: 483.

(收稿: 1993-01-28 修回: 1993-04-28)

供输入前血制品HBV-M检测结果的报告

孟 践¹ 杨庆丰² 王玉新² 邴桂梅¹ 刘桂勤³ 曲玉莲⁴ 王桂香⁵

1985~1991年, 我们以ELISA法对173份供输入前血制品(鲜血浆51份, 冻干血浆79份、白蛋白43份)进行了乙型肝炎病毒感染标志物(HBV-M)的检测。项目包括HBsAg、HBeAg、抗-HBs、抗-HBe、

抗-HBc。现报道如下。

一、结果: 173份血制品HBV-M中一项或多项阳性者共62份, 总感染率为35.8%, 其中鲜血浆51.0%, 冻干血浆26.6%, 白蛋白20.9%, 见附表。

附表 173份血制品HBV-M阳性结果

	鲜血浆(51份)		冻干血浆(79份)		白蛋白(43份)		合 计	
	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%
HBsAg	13	25.5	9	11.4	7	16.3	29	16.8
HBeAg	5	9.8	3	3.8	1	2.3	9	5.2
抗-HBs	3	5.9	2	2.5	1	2.3	6	3.5
抗-HBe	3	5.9	2	2.5			5	2.5
抗-HBc	26	51.0	21	26.6	9	20.9	56	32.5

二、讨论: 输入未经严格筛选和处理的血液及其血制品是引起输血后肝炎(PTH)的主要传播途径。有报道我国PTH仍以乙型肝炎病毒感染为主。国内有关供血员及供输入血液HBV-M的总感染率为11.2%~65.0%, 但供输入血制品HBV-M的检测尚未见到。本文结果提示原视为安全可供输入的血制品有50%~20%已被乙型肝炎病毒感染, 误输后, 可使受血者发生显性或隐性的PTH、B。认为对供输入血制品的血源和制备, 必须严格筛选和无害化处理。建立以敏感的ELISA法或RIA法的检测方法, 取缔来自多人血源的

血制品。临床应严格选择适应症, 不盲目输用血制品, 提倡成分输血。有条件时, 在输入前可复检S-ALT及HBV-M, 阳性者必须摒弃。对必需输入或需要多次输入者, 可在输入前或及时注射乙型肝炎疫苗或/及高效价乙型肝炎免疫球蛋白进行免疫预防。通过上述措施, 将能最大限度的降低PTH、B的发生率。

(收稿: 1992-02-13 修回: 1993-05-04)

1. 吉林市肝病研治中心 132002 2. 吉林市第五医院 3. 吉林市第二〇一医院 4. 吉林市第五七〇四医院 5. 吉林市第五二四医院