

多聚酶链反应技术在斑点热群立克次体流行病学调查中的应用

张健之¹ 范明远¹ 毕德增¹ 孙福祥² 程昭祥²
兰福春³ 崔文富⁴ 孙秀英⁵ 只相国⁶ 林碧瑚⁷

摘要 作者首次用来自立氏立克次体 (*R. rickettsii*, Rr) 190KDa 蛋白抗原基因序列设计的一对引物扩增从黑龙江、河北、海南、北京采集的蜱、蜱卵、幼蜱、蜱粪及啮齿动物脏器中斑点热群立克次体 DNA。结果从上述标本中均检测出了斑点热群立克次体特异的532bp 大小的 DNA 片段, 该结果部分与同期进行的病原分离结果一致。故认为, PCR 技术是一种快速、敏感、特异的斑点热群立克次体流行病学调查方法。

关键词 多聚酶链反应 (PCR) 斑点热群立克次体 蜱 啮齿动物

The Application of PCR to Epidemiological Study on Spotted Fever Group Rickettsiae Zhang Jian-zhi, Fan Ming-yuan, Bi De-zeng, et al. Department of Rickettsiology, Institute of Epidemiology & Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, 102206

It was the first time that a primer pairs derived from the 190KDa protein antigen gene of *R. rickettsii* were used to amplify SFGR DNA in ticks, tick ova, larva, tick faeces and rodent organs which were collected in Hebei, Heilongjiang, Hainan and Beijing. A 532bp fragment was respectively amplified from above samples. The results were partially in concordance with data obtained through rickettsiae isolation. It was suggested that PCR is a rapid, specific, sensitive and practical method for detection of SFGR in endemic foci.

Key words Polymerase Chain reaction (PCR) Spotted fever group rickettsiae (SFGR) Tick Rodent

斑点热群立克次体 (SFGR) 是立克次体目中最复杂的一群, 分布于世界各地。由于其为专性细胞内寄生菌, 分离培养甚为困难, 极大地限制了对该群立克次体的研究。30多年来, 我国仅在少数几个省市自治区分离出数十株 SFGR。为了加强对该群立克次体的研究并为其流行病学调查提供可行的科学新方法, 我们将 PCR 技术引入了节肢动物等传病媒介中 SFGR 的检测, 现将结果报告如下。

材料和方法

一、标本的收集: 嗜群血蜱、全钩硬蜱、森林革蜱系我们1993年4~5月间从黑龙江省虎林县、饶河县、绥芬河市等地的苔草地、阔叶林带及农田混合地缘处采集, 共计732只;

中华革蜱系我们1993年间从北京市昌平区收集, 共3只; 长角血蜱系1993年5月从河北省涞水县野三坡旅游点自外籍游人身上采集, 共1只; 微小牛蜱系1986年海南医学院送检标本, 来源于海南省阳江农场的黄牛身上, 共1只。野鼠系笔者1993年从黑龙江省虎林县、

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
102206 北京

2 黑龙江省虎林县卫生防疫站

3 饶河县卫生防疫站

4 绥芬河卫生检疫局

5 绥芬河市卫生防疫站

6 黑龙江省卫生防疫站

7 海南医学院

本研究为国家自然科学基金、卫生部科研基金资助课题。

饶河县、密山市及绥芬河市郊等处捕获，现场解剖，取肝、脾冷藏保存，共27份。种类有：黑线姬鼠、小家鼠、东方田鼠、棕背鼠、红背鼠、花鼠、大仓鼠和黑线仓鼠。

二、蜱的处理：采集的蜱经分类后，按采集地区及蜱种分组，死蜱置 -70°C 冰箱保存，活蜱分别喂兔血，在蜱吸血过程中分别收集蜱粪，一部分蜱粪置室温保存，一部分置 -70°C 冰箱备用。待蜱吸饱血后先做蜱血淋巴试验，血淋巴试验阴性的蜱用作阴性蜱对照，血淋巴试验阳性或可疑阳性的蜱一部分用于病原体分离，一部分置 -70°C 准备用作PCR检测，另一部分置室温并保持一定的湿度待其产卵。蜱产卵后分别收集蜱卵，一部分用于病原体分离，一部分置 -70°C 用作PCR检测，另一部分置室温待其孵化成幼蜱收集幼蜱置 -70°C 用作PCR检测。

三、立克次体菌株：斑点热群立克次体国际标准株为西伯利亚立克次体 (*R. sibirica* 246株)、康氏立克次体 (*R. conorii* Malish 7株、India株)、立氏立克次体 (*R. rickettsii* R株)、派氏立克次体 (*R. parkeri*)、普氏立克次体 (*R. prowazeki* Breinl株)、莫氏立克次体 (*R. mooseri* Wilmington株)、恙虫病立克次体 (*R. tsutsugamushi* Karp株)和Q热立克次体 (*R. burneti*, Grita株)。国内参考株为BJ-90株 (*D. sinicus*)和内蒙古Ha-91株 (*H. asiaticum*)。

四、DNA引物：本实验用的引物见文献^[1]，根据已发表的立氏立克次体190KDa蛋白基因序列^[2]设计，由中国科学院微生物研究所合成。

五、立克次体的培养、纯化及DNA的提取：立克次体的培养、纯化和DNA的提取分别参照Stoenner^[3]、Hanson^[4]及Silhavy^[5]的方法进行。

六、现场标本DNA模板的制备：1. 蜱标本：参照Furuya方法^[6]进行，将蜱用无菌盐水洗3次，放入75%的酒精中浸泡30min，再用无菌盐水洗三次，吸血蜱1或5只为一组，

未吸血蜱20只为一组用研磨器研碎，用0.3ml TE液悬浮，将悬液吸至1.5ml的ep-endorf管中，加10%的SDS至终浓度为1%， 4°C 冰箱过夜，加溶菌酶至终浓度为2mg/ml，冰浴30min，加蛋白酶K至终浓度为0.2mg/ml， 55°C 水浴1h，用等体积饱和酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)反复抽提，其余步骤同立克次体DNA的提取。取20只血淋巴检验阴性的蜱按上述方法处理作阴性对照。取0.5ml兔血经上述处理后作兔血对照。

2. 蜱卵标本：取蜱卵0.25g用上述方法处理。

3. 幼蜱标本：取幼蜱0.25g用上述方法处理。

4. 蜱粪标本：取蜱粪0.5g用上法处理。

5. 野鼠脏器标本：取野鼠肝和脾经抗生素溶液洗涤后(青、链霉素各500U/ml)用研磨器研碎，然后用上述方法处理。取正常小鼠肝、脾经上述处理后作鼠脏器阴性对照。

七、PCR方法：加样：纯化的立克次体DNA $1\mu\text{l}$ (10ng/ μl)或现场标本DNA $10\mu\text{l}$ ， $10\times$ PCR缓冲液 $5\mu\text{l}$ ，2mmol/L dNTP $4\mu\text{l}$ ，引物1和引物2各50ng，补足双蒸水至终体积为 $49\mu\text{l}$ ，加石蜡油 $50\mu\text{l}$ 封顶。 95°C 变性10min，冷却至复性温度时加入 $1\mu\text{l}$ (含1.5U) Tag DNA多聚酶。循环：将加完样的ependorf管置扩增仪上扩增，程序为： 95°C 变性40s， 48°C 退火40s， 66°C 延伸80s，共30人循环，最后一个循环于 66°C 延伸5min。结果判定：取 $10\mu\text{l}$ PCR产物，用1.5%琼脂糖—溴化乙锭(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)电泳，紫外灯下凡见532bp片段扩增者为阳性，反之为阴性。

结 果

一、Rr190.70p和Rr190.602n引物的特异性：用Rr190.70p和Rr190.602n这对引物分别扩增斑点热群、斑疹伤寒群、恙虫病群、Q热立克次体，结果仅从斑点热群立克次体的DNA中扩增出了532bp大小的DNA片段，其余均未见阳性扩增带。

二、用 PCR 检测蜱标本：用 Rr190. 70p 和 Rr190. 602n 这对引物分别扩增来自黑龙江、北京、河北、海南的吸血蜱标本10份。结果分别从北京的中华革蜱、黑龙江、绥芬河的嗜群血蜱、虎林县的森林革蜱、饶河县的森林革蜱、海南省的微小牛蜱、河北省的长角血蜱7份标本中扩增出了特异 DNA 片段，对照组扩增均为阴性。

三、用 PCR 检测蜱卵：用 PCR 法检测4份蜱卵标本，分别从绥芬河的嗜群血蜱、虎林县的嗜群血蜱、森林革蜱的蜱卵中扩增出了特异的 DNA 片段。对照组未见特异扩增产物（图1）。

四、用 PCR 检测幼蜱标本：用 PCR 法检测了2份来自绥芬河的嗜群血蜱和森林革蜱的幼蜱，结果从绥芬河的嗜群血蜱中扩增出了阳性片段，对照组未见阳性扩增带。

五、用 PCR 检测蜱粪标本：用 PCR 法检测了7份蜱粪标本，其中4份标本出现阳性扩增带，这4份标本分别是来自绥芬河的嗜群血蜱、饶河县的森林革蜱、虎林县的嗜群血蜱、森林革蜱的冷藏标本，而室温保存的绥芬河市和虎林县的森林革蜱的粪便标本未见特异扩增带。

六、用 PCR 检测野鼠脏器标本：用 PCR 检测了27份野鼠脏器标本，结果从其中的2份标本中扩增出了阳性片段。它们分别是来自虎林县的东方田鼠和小家鼠的内脏标本。对照组阴性（图2）。

讨 论

PCR 用于斑点热群立克次体研究领域国内外均有报道^[8]，但是将 PCR 技术应用于流行病学调查、检测现场啮齿动物、节肢动物及其粪便、卵中的斑点热群立克次体国内外尚未见报道。我们应用来自立氏立克次体 190KDa 蛋白抗原基因序列合成的一对引物 Rr190. 70p 和 Rr190. 602n，用 PCR 技术检测现场采集的蜱、蜱卵、幼蜱、蜱粪及啮齿动物脏器，结果均获得了 SFGR 特异的 DNA

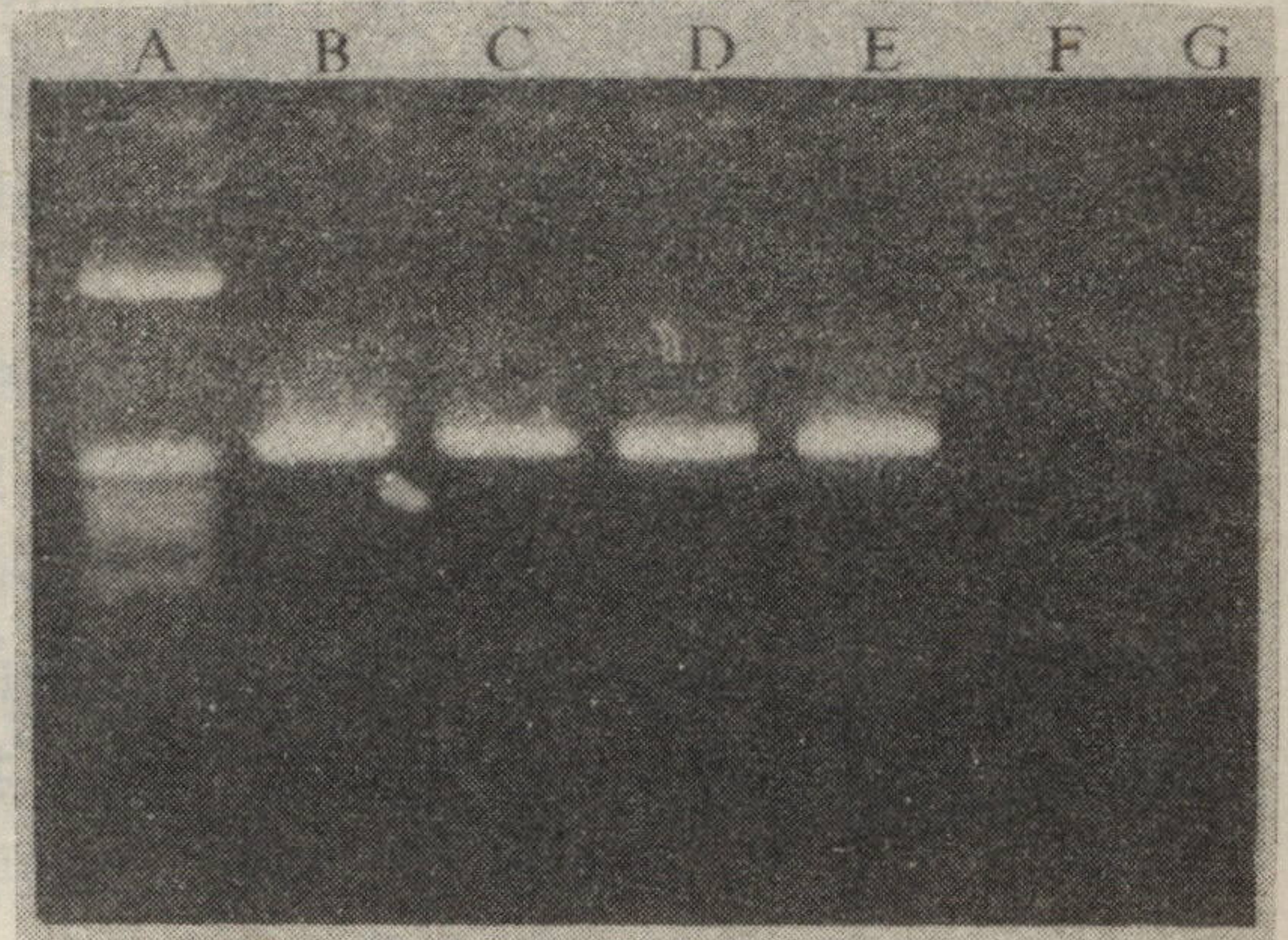


图1 引物 Rr190. 70p 和 Rr190. 602n 扩增蜱卵的结果

- A. PBR322/Hinf I Marker (1631、517、506、396、344)
- B. 嗜群血蜱卵 (绥芬河市)
- C. 嗜群血蜱卵 (虎林县)
- D. 森林革蜱卵 (虎林县)
- E. 阳性对照
- F. 阴性对照
- G. 空白对照

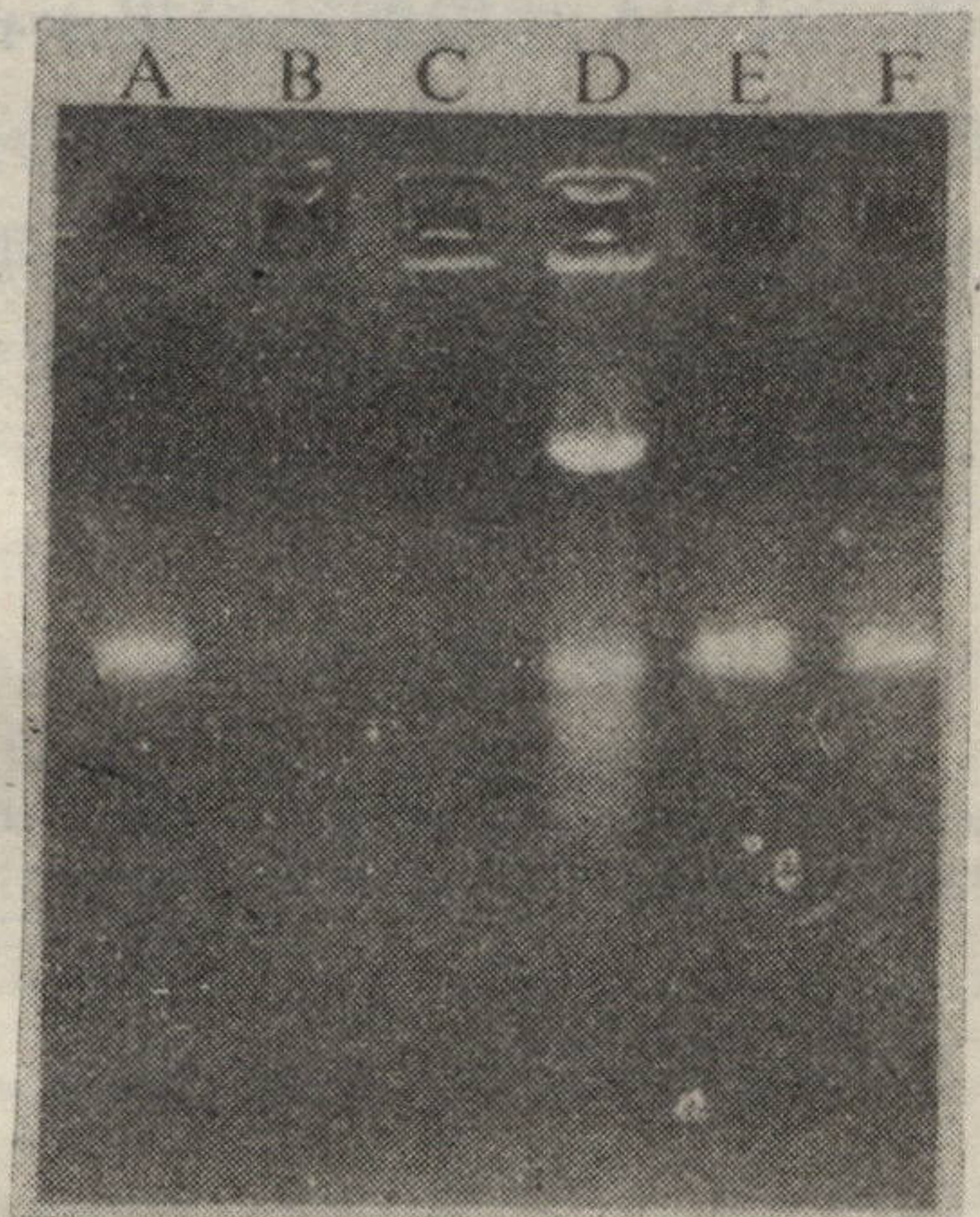


图2 引物 Rr190. 70p 和 Rr190. 602n 扩增野鼠脏器结果

- A. 阳性对照
- B. 正常小鼠脏器对照
- C. 空白对照
- D. PBR322/Hinf I; Marker (1631、517、506、396、344)
- E. 东方田鼠脏器 (虎林县)
- F. 小家鼠脏器 (虎林县)

片段，其中有些标本与同时进行的病原分离结果完全吻合，从而证实了 PCR 技术用于 SFGR 流行病学调查的可能性。

本文结果显示：Rr190. 70p 和 Rr190. 602n 这对引物仅能从 SFGR 中扩增出特异

性片段，而从其它群立克次体中扩增不出特异片段，因此，可以认为 Rr190. 70p 和 Rr190. 602n 这对引物用于 SFGR 检测是具有明显特异性的。

从本文吸血蜱标本检测结果看，10份蜱标本中有7份扩增阳性，其中2份标本仅有1只蜱，相比之下，8份吸血蜱标本病原分离阳性者仅2份。另外，从来自绥芬河的嗜群血蜱的吸血蜱、蜱卵、蜱粪、幼蜱中均扩增出了特异性 DNA 片段，而在病原分离中从上述吸血蜱和蜱卵中均未分离出立克次体。由此可见，PCR 技术应用于流行病学调查具有快速、灵敏、特异等特点。

另外，本研究结果进一步证实了有关的研究结果^[9]，SFGR 在蜱经卵传递，蜱既是传播媒介，又是保菌宿主，野生哺乳类动物参与另一感染循环。从蜱粪中扩增出特异 SFGR 阳性 DNA 片段的提示：SFGR 除了蜱叮咬的水平传播和经卵传递的垂直传播途径外，还可以通过感染蜱的粪便传播。

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 窦桂兰教授协助鉴定蜱类，特此感谢)

参 考 文 献

1 Regnery RL, Spruill GL, Plikaytis BD. Genotypic identi-

fication of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol, 1991, 173(5): 1578.

2 Anderson BE, McDonald G, Jones DC, et al. A protective protein antigen of rickettsia rickettsii has tandemly repeated, near-identical sequences. Infect Immun, 1990, 58: 276.

3 Stoenner HG, Lacman DB, Bell EJ. Factors affecting the growth of rickettsiae of the spotted fever group in fertile hen's eggs. J Infect Dis, 1962, 110: 121.

4 Hanson BA, Wisseman CL, Waddell A, et al. Some characteristics of heavy and light bands of Rickettsia prowazeki on renografin gradients. Infect Immun, 1981, 34: 596.

5 Silhavy TJ. Experiment with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 14.

6 Furuya Y. Specific amplification of Rickettsia tsutsugamushi DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 1991, 29(11): 2628.

7 Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detection of Rickettsia rickettsii DNA in clinical specimens by enzymatic amplification using polymerase chain reaction technology. Ann N Y Acad Sci, 1990, 590: 553.

8 李少娟, 范明远, 毕德增. 用 DNA 限制性核酸内切酶图谱和 PCR/RFLP 鉴定斑点热群立克次体中国分离株. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13(4): 255.

9 范明远. 新中国预防医学历史经验. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 161.

(收稿: 1994-06-01 修回: 1994-09-10)

15户流行性出血热家庭爆发的调查

王彦锁¹ 袁 萍² 张海红¹

石家庄地区1986~1991年发生数起流行性出血热家庭爆发,对其中有血清学、病原学依据的15户进行了调查。15户病家共87人,发生流行性出血热43例,家庭累计发病率为49.43%。患者最大年龄78岁,最小10岁。男性发病率(65.91%)高于女性(32.56%),两者有显著性差异($\chi^2 = 9.68, P < 0.01$)。轻、中、重型分别占病例总数的20.93%、20.93%和58.14%。临床表现多为重型、家中首末病例发病时间间隔均在两个月内,平均间隔30.11天。病死率为4.65%(2/43)。患者 EHFVIgG 抗体阳性率为100%,最高抗体滴度1:2560(第23病日),平均为1:246.72,有32例抗体滴度呈4倍增长。各村室内

鼠密度在12.36%~21%之间,优势鼠种为褐家鼠,占84.58%。褐家鼠 EHFV 抗原阳性率为12.64%,病家周围健康人群 EHFVIgG 阳性率为0.97%。

既往研究认为,流行性出血热以高度散发、局限性为特征,本调查结果与之不同;褐家鼠在传播本病中起着重要作用;43例患者中有39人病前两个月内曾吃被鼠污染的食物,食入带毒鼠污染的食物可能是引起家庭爆发的主要原因

(收稿: 1994-10-22)

1 石家庄市卫生防疫站 050011

2 石家庄市桥西区卫生防疫站