

· 论 著 ·

用 PCR/RFLP 技术对黑龙江沿岸蜱类和鼠类中北亚蜱传斑点热的检测

陈 敏¹ 范明远¹ 徐国民¹ 张健之¹ 毕德增¹ 王乾海²
侯建林³ 范志杰³ 徐金祥⁴

摘要 为了解黑龙江沿岸部分地区斑点热自然疫源地存在情况,作者用 PCR/RFLP 的方法检测该地区蜱类及鼠类中的斑点热群(spotted fever group, SFG)立克次体。结果从该地区的森林革蜱、嗜群血蜱、黑线姬鼠、东方田鼠、麝鼠及棕背鼯中均扩增出了斑点热群立克次体的特异片段,而对斑疹伤寒立克次体、恙虫病立克次体、Q 热立克次体则为阴性。PCR 产物经 Pst I 及 Rsa I 酶切后发现它们的酶切图谱与西伯利亚立克次体完全相同,而有别于其它斑点热群立克次体标准株。作者认为黑龙江沿岸调查点可能存在北亚蜱传斑点热的自然疫源地。

关键词 北亚蜱传斑点热 PCR/RFLP

Detection of North - Asia Tick - Borne Spotted Fever in Ticks and Rodents along the Heilongjiang River-side by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR Products Chen Min*, Fan Ming-yuan, Xu Guo-min, et al.* Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Abstract In order to elucidate the natural foci of North - Asia tick - borne spotted fever along the bank of Heilongjiang river, we used PCR/RFLP to detect spotted fever group rickettsiae in ticks and rodents. The results showed that the wild samples of Dermacentor silvarum, Haemaphysalis concinna and Apodemus agrarius, Microtus fortis, Clethrionomys rufocanus and Ondatra zibethica were all positive with amplification, but typhus rickettsiae, tsutsugamushi fever rickettsiae and Q fever rickettsiae were all negative. Further RFLP analysis of amplified products with PstI and RsaI demonstrated that their restriction endonuclease profiles were identical to Rickettsia sibirica, but were different from the other prototype strains of SFG rickettsiae, suggesting the possible existence of natural foci of North - Asia tick borne spotted fever in these areas.

Key words North Asia tick borne spotted fever PCR/RFLP

国外近年有数篇论文报道用聚合酶链反应(PCR)对蜱类的 SFG 立克次体进行检测^[1-3]。国内我室 1995 年报告用 PCR 在黑龙江省乌苏里江沿岸的饶河、虎林、密山及绥

芬河 4 县市不仅对采集的媒介蜱,同时也对宿主动物的鼠类进行 SFG 立克次体 PCR 检测获得成功^[4]。我们对黑龙江中段沿岸地区的蜱和鼠先用 PCR 进行 SFG 立克次体的检测,再进一步用 RFLP 作了分类鉴定,结果表明,被检测的蜱类和鼠类标本 PCR 产物的酶切图谱与斑点热群中的西伯利亚立克次体相同,认为黑龙江沿岸可能存在着北亚蜱传斑点热的自然疫源地。

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
北京 102206

2 黑龙江省卫生防疫站

3 黑河市卫生防疫站

4 逊克县卫生防疫站

本课题为卫生部科学研究基金资助项目

材料和方法

一、现场情况：黑河市位于黑龙江省北部，地处北纬 47°42' ~ 51°03'，东经 124°45' ~ 129°18' 之间，该地野生啮齿类动物有黑线姬鼠、东方田鼠、棕背鼯、大林姬鼠等，黑线姬鼠为优势鼠种。蜱类有森林革蜱、嗜群血蜱及全沟硬蜱等蜱种分布。调查点选自以黑河市为中心沿江上游延伸至上马场和张地营子两个乡；下游延伸至瑗瑄镇及逊克县的奇克镇两地。

二、野鼠和蜱类标本收集：按实验室常规进行。

三、立克次体国际标准株：西伯利亚立克次体 (*Rickettsia sibirica* 246 株)、康氏立克次体 (*R. conorii* Malish 7 株)、立氏立克次体 (*R. rickettsii* R 株)、派氏立克次体 (*R. parkerii*)、普氏立克次体 (*R. prowazeki* Breinl 株)、莫氏立克次体 (*R. mooserii* Wilmington 株)、恙虫病立克次体 (*R. tsutsugamushi* Karp 株)、Q 热立克次体 (*Coxiella burnetii* Grita 株)。

四、PCR 模板的制备：参照 Gage^[5] 和 Silhavy^[6] 的方法。

五、PCR/RFLP 方法：引物来自文献^[7]。PCR 程序参见文献^[4]。RFLP 分析：将 PCR 产物用等体积的氯仿抽提一次，取 10μl 分别加入 10X 限制性内切酶缓冲液 1.5μl，限制性内切酶 (PstI 或 RsaI) 3 ~ 5U，三蒸水补足至 15μl，37℃ 水浴 3 小时。取 5μl 酶切产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，120V 2 小时。结果做银染分析并照相。

结 果

一、立克次体属及斑点热群立克次体 PCR 检测：用 Rr190.70p、Rr190.60Zn 这对引物进行扩增，在立克次体属中除斑点热群立克次体的代表株立氏立克次体扩增出了 532bp 大小的 DNA 片段外，普氏立克次体、莫氏立克次体、恙虫病立克次体及 Q 热立克

次体均为阴性。在斑点热群立克次体中除小蛛立克次体及澳大利亚立克次体扩增为阴性外，其余都为阳性，空白对照成立。

三、蜱标本 PCR 检测：用 PCR 检测蜱标本，结果嗜群血蜱、森林革蜱均扩增出了 532bp 大小的片段，阳性对照 (*R. rickettsii*) 及空白对照成立。

三、野鼠脏器 PCR 检测：用 PCR 法分别检测奇克镇麝鼠 1 只、棕背鼯 2 只 (混合)，张地营子乡黑线姬鼠 6 只 (混合)、东方田鼠 1 只；结果均扩增阳性。正常小鼠脏器对照及空白对照未见阳性扩增带。阳性对照成立。

四、PCR/RFLP：上述国际标准株及被检鼠和蜱标本 PCR 产物分别经 PstI 和 RsaI 酶切后作银染分析发现：PstI 酶切后均被切成 3 条带，其中蜱和野鼠脏器 PCR 产物酶切带型与西伯利亚立克次体、派氏立克次体相同 (278、141、85bp)，康氏立克次体与立氏立克次体带型相同 (278、220、85bp)，见图 1。RsaI 酶切后呈现三种图谱，6 份检测标本 PCR 产物酶切图谱与立氏立克次体、西伯利亚立克次体相同 [223 (双带)、107bp]，派氏立克次体被切成二条 (328、223bp)，康氏立克次体被切成二条 (334、228bp)，见图 2。综上所述可见 6 份检测标本 PCR 产物的 PstI 和 RsaI 图谱与西伯利亚立克次体完全相同。

讨 论

斑点热群立克次体系专性细胞内寄生。传统的病原体分离及检测方法手续繁杂，一般实验室难以做到且分离成功率极低。PCR 技术具有快速简便，对原始材料要求不高的特点，为直接在蜱和鼠中进行立克次体的快速分类鉴定提供了有力的手段。我们选用的引物是斑点热群立克次体的特异引物，它扩增的是立氏立克次体 190KD 蛋白基因开放读码框架起始部分 532bp 大小片段，该片段在斑点热群立克次体内具有一定的保守性，同时不同种又各具特殊的酶切位点，因此，该

片段的 PCR/RFLP 分析已被用作斑点热群立克次体的分类鉴定^[8]。根据上述检测结果,我们认为黑龙江沿岸可能存在着北亚热的自然疫源地。

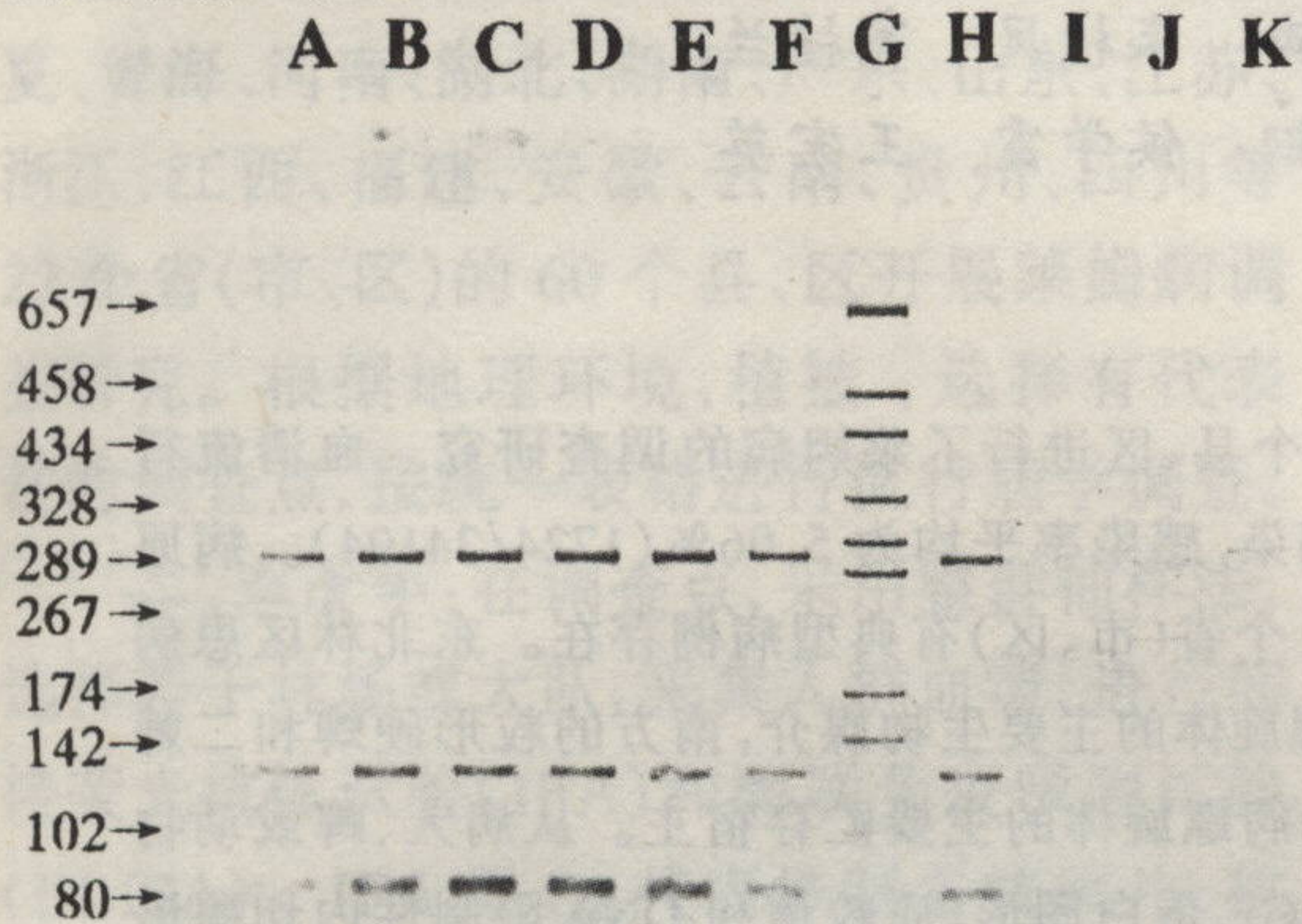


图 1 PstI 内切酶作用于各检测标本及国际标准株 SFGR PCR/RFLP 银染结果

A 嗜群血蜱 B 森林革蜱 C 黑线姬鼠 D 麝鼠 E 东方田鼠 F 棕背髭 G pGEM-7Zf(+)/Hae III Markers (657、458、434、328、289、267、174、142、102、80bp)

H *R. sibirica* 246 株 I *R. conorii* M7 株 J *R. rickettsii* R 株 K *R. parkerii*



图 2 RsaI 内切酶作用于各检测标本及国际标准株 SFGR PCR/RFLP 银染结果

A 嗜群血蜱 B 森林革蜱 C 黑线姬鼠 D 麝鼠 E 东方田鼠 F 棕背髭 G pGEM-7Zf(+)/Hae III Markers (657、458、434、328、289、267、174、142、102、80bp)

H *R. sibirica* 246 株 I *R. conorii* M7 株 J *R. rickettsii* R 株 K *R. parkerii*

斑点热属于人兽共患病,我国自 1958 年在内蒙古人群首次发现北亚热抗体以来,已从新疆、内蒙古、北京^[9]及黑龙江^[10]等北方广大地区内从病人、媒介蜱及宿主动物鼠中获得了病原学证据。最近在福建省亦分离到

北亚热的病原体^[11]。表明该病自然疫源地在我国有广泛的分布。蜱在斑点热感染循环中起着重要作用,它不仅与啮齿类动物间水平传播,而且还可经卵垂直传播该立克次体。蜱的种群基本上固定在一定的生境中,感染蜱及啮齿类动物在自然疫源地中的活动可对人类构成威胁。因此用 PCR/RFLP 技术检测蜱和鼠类中的斑点热,具有重要生态学及流行病学意义,同时可避免病原分离的盲目性。

参 考 文 献

- 1 Uchida T, Yan YS, Kitaoka S. Detection of *Rickettsia japonica* in *Haemaphysalis longicornis* ticks by restriction fragment length polymorphism of PCR product. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(4): 824.
- 2 Dupont HT, Cornet JP, Rault D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the central Africa Republic using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Hyg*, 1994, 50: 373.
- 3 Beati L, Kelly PJ, Matthewman LA. Prevalence of *Rickettsia*-like organism and spotted fever group rickettsia in ticks (Acari: Ixodidae) from Zimbabwe. *J Med Entomol*, 1995, 32: 787.
- 4 Zhang JZ, Fan MY, Bi DZ. Detection of spotted fever group rickettsia in ticks and rodents by polymerase chain reaction technique in People's Republic of China. *Acta Virologica*, 1995, 39: 263.
- 5 Gage KL, Schrupf ME, Karstens RH, et al. DNA typing of *Rickettsiae* in naturally infected ticks using a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 50: 247.
- 6 Silhavy TJ, Benson SA, Emr SD. Experiments with gene fusion molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- 7 Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*. 1991, 173: 1576.
- 8 Eremeeva M, Yu XJ, Raoult D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 803.
- 9 范明远, 于学杰, 毕德增, 等. 中国北亚蜱传斑点热分子流行病学研究. *中国公共卫生学报*, 1992, 11: 67.
- 10 Zhang JZ, Fan MY, Bi DZ. Genotypic identification of three strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. *Acta Virologica*, 1996, 40: 215.
- 11 毕德增, 陈振光, 陈敏, 等. 从福建首次分离出斑点热群立克次体. *疾病监测*, 1996, 11: 10.

(收稿: 1996-08-14 修回: 1996-09-07)