

· 实验室研究 ·

TaqMan-探针实时荧光定量 PCR 同时检测立克次体目中 7 种重要病原菌

靳晓晶¹ 滕中秋² 徐佩星² 孙向荣³ 王文² 覃新程² 秦天^{1,2}

¹山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室,太原 030001;²中国疾病预防控制中心传染病预防控制所/传染病预防控制国家重点实验室,北京 102206;³南昌市疾病预防控制中心,南昌 330038

通信作者:秦天,Email:qintian@icdc.cn

【摘要】 目的 建立及优化检测立克次体目中 7 种重要病原菌的 TaqMan-探针实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法,可同步检测并明确感染类型。方法 根据普氏立克次体、莫氏立克次体和斑点热群立克次体 *ompB* 基因、恙虫病东方体 *groEL* 基因、查非埃立克体 16S rRNA 基因、嗜吞噬细胞无形体 *gltA* 基因和贝氏柯克斯体 *com1* 基因序列合成引物和探针,优化反应体系及反应程序至同一方案,对该方法灵敏度、特异性和重复性等进行评价,并使用该方法对模拟样本和实际样本进行检测。结果 7 种病原菌标准曲线的 *Ct* 值与模板拷贝数均呈良好的线性关系(均 $R^2 > 0.990$),所建立方法最低检测限均为 1×10^3 拷贝数/ μl 且具有良好的特异性。96 份蜱虫核酸提取物样本中,1 份样本检出贝氏柯克斯体,3 份样本检出斑点热群立克次体;80 份不明原因发热患者血标本 DNA 中,1 份样本检出恙虫病东方体,2 份样本检出斑点热群立克次体。结论 本研究基于 TaqMan-探针 qPCR 方法,将 7 种病原菌反应体系及反应程序优化至同一方案,克服目前不同立克次体目病原菌采用不同的反应体系和反应程序的缺点,可将临床样本中立克次体目的 7 种重要病原菌精确定位检测至种,明确感染病原菌类型并缩短检测时间,有助于对患者的精准诊治。

【关键词】 立克次体目; 实时荧光定量聚合酶链式反应; TaqMan-探针

基金项目: 传染病预防控制国家重点实验室科学基金(2019SKLID403); 国家卫生健康委员会公共卫生服务能力提升项目(2100409031)

Simultaneous detection of 7 important Rickettsiales pathogens by TaqMan-probe quantitative real-time PCR

Jin Xiaojing¹, Teng Zhongqiu², Xu Peixing², Sun Xiangrong³, Wang Wen², Qin Xincheng², Qin Tian^{1,2}

¹Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention/State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China; ³Nanchang Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330038, China
Corresponding author: Qin Tian, Email: qintian@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To establish and optimize a TaqMan-probe quantitative real-time PCR (qPCR) assay for the detection of 7 important Rickettsiales pathogens and simultaneous identification of the infection types. **Methods** Based on the *ompB* gene of *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia mooseri* and spotted fever group rickettsiae, the *groEL* gene of *Orientia tsutsugamushi*, the 16S rRNA of *Ehrlichia chaffeensis*, the *gltA* gene of *Anaplasma phagocytophilum* and the *com1* gene of *Coxiella burnetii*, we synthesized primers and TaqMan-probes and optimized the reaction system and reaction process to same solution. The sensitivity, specificity and reproducibility of this assay were evaluated and the assay was used for the detection of simulated and actual samples. **Results**

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20221011-00875

收稿日期 2022-10-11 本文编辑 斗智

引用格式: 靳晓晶, 滕中秋, 徐佩星, 等. TaqMan-探针实时荧光定量 PCR 同时检测立克次体目中 7 种重要病原菌[J]. 中华流行病学杂志, 2023, 44(5): 816-822. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20221011-00875.

Jin XJ, Teng ZQ, Xu PX, et al. Simultaneous detection of 7 important Rickettsiales pathogens by TaqMan-probe quantitative real-time PCR[J]. Chin J Epidemiol, 2023, 44(5):816-822. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20221011-00875.



The Ct value of the standard curves of the 7 pathogens showed a good linear relationship with the number of DNA copies (all $R^2 > 0.990$), the minimum detection limit was 10 copies/ μl , showing good specificity. In the 96 tick nucleic acid extracts, *Coxiella burnetii* was detected in 1 sample and spotted fever group Rickettsiae was detected in 3 samples. In the 80 blood samples from patients with undefined febrile illness, *Orientia tsutsugamushi* was detected in 1 sample and spotted fever group rickettsiae was detected in 2 samples. **Conclusions** In this study, based on the established TaqMan-probe qPCR assay, the reaction system and reaction condition of the 7 important pathogens of Rickettsiales were optimized to the same solution. This method overcomes the shortcomings of using different reaction systems and reaction conditions for different pathogens, which can precisely identify the species of 7 important pathogens of Rickettsiales in clinical sample detections and is important for the infection type identification and laboratory detection time reduction to facilitate precise treatment of the patients.

【Key words】 Rickettsiales; Quantitative real-time PCR; TaqMan-probe

Fund programs: Science Foundation of the State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (2019SKLID403); Public Health Service Capability Improvement Project of the National Health Commission (2100409031)

立克次体目(Rickettsiales)病原菌是一类严格细胞内寄生的原核细胞型微生物,大小介于细菌和病毒之间,天然寄生于多种吸血节肢动物体内^[1-2]。当机体与立克次体感染的吸血节肢动物接触后可引发立克次体病,该类疾病是一类人兽共患的自然疫源性疾病。对人类致病的立克次体主要有立克次体科中的立克次体属、东方体属,无形体科中的无形体属、埃立克体属以及柯克斯体科柯克斯体属的贝氏柯克斯体。贝氏柯克斯体虽已归类到军团菌目,但传统上贝氏柯克斯体所导致的疾病Q热仍被归类到立克次体病范畴^[3]。立克次体病在全世界范围流行,我国流行的主要疾病种类包括Q热、斑点热、流行性斑疹伤寒、地方性斑疹伤寒、恙虫病、埃立克体病和人粒细胞无形体病等^[4]。

由于立克次体病主要的临床症状为高热、全身酸痛、头痛等,缺乏特异性。临床上容易出现漏诊及误诊,因而延误治疗导致病情严重,出现多种并发症,甚至造成死亡^[5-6]。常用的血清学诊断在发病后的0~12 d才开始出现阳性,不能满足早期诊断的要求,并且由于立克次体之间存在广泛的抗原交叉,血清学检测只能用于分群诊断^[7]。实时荧光定量PCR(qPCR)技术是一种灵敏度、特异性较高的核酸检测方法,被广泛应用于病毒、细菌的实验室快速检测^[8]。本研究对立克次体目中7种重要病原菌的反应体系及反应程序进行优化验证,建立可同时检测立克次体目中7种重要病原菌的TaqMan-探针qPCR方法。

材料与方法

1. 菌株与DNA: 普氏立克次体、莫氏立克次

体、恙虫病东方体、斑点热群立克次体中的日本立克次体、查菲埃立克体、嗜吞噬细胞无形体、边缘无形体、牛无形体、山羊无形体、扁平无形体、犬埃立克体和贝氏柯克斯体;其他细菌DNA[嗜肺军团菌(ATCC33152)、肺炎链球菌(ATCC49619)、卡他莫拉菌(ATCC25238)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、流感嗜血杆菌、羊种布鲁氏菌、大肠埃希菌(ATCC25922)、百日咳杆菌和白喉棒状杆菌],每种病原菌DNA各2个,菌株及核酸样品为本研究室库存及相关科室赠予。

2. 仪器和试剂: Line-Gene K 荧光定量PCR仪(中国杭州博日科技股份有限公司)、LabCycler PCR仪(德国SensoQuest公司)、QIAamp DNA Mini Kit [德国凯杰(QIAGEN)生物公司]、Premix Taq™ Version 2.0 plus dye 和 Premix Ex Taq™ Probe qPCR(日本TaKaRa公司),引物、探针及质粒均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

3. 引物和探针序列: 利用美国国家生物技术信息中心网站的在线引物设计工具Primer-BLAST评估引物和探针的特异性,使用Primer premier 5.0软件评估引物和探针环状发卡结构等情况(表1)。

4. 标准品的制备及标准曲线绘制: 委托生工生物工程(上海)股份有限公司将目的基因序列插入PUC57载体构建重组阳性质粒,将该质粒作为标准DNA模板,进行qPCR方法灵敏度、特异性和重复性的验证。标准DNA模板拷贝数的计算公式: 质粒拷贝数(拷贝数/ μl) = 质粒样品浓度($\text{ng}/\mu\text{l}$) $\times 10^{-9} \times 6.023 \times 10^{23} / (660 \times \text{碱基数})$, 其中660是每个碱基的平均相对分子质量, 6.023×10^{23} 为阿伏伽德罗常数。得出阳性质粒的浓度,并将其稀释至 1×10^8 拷贝数/ μl , 以此作为初始模板,进行10倍梯度稀释,将上述模

表 1 实时荧光定量 PCR 引物和探针序列

病原菌	引物/探针	序列(5'~3')	靶基因	参考文献
普氏立克次体	R.pr-F	AGG ACA ACA AAT GCA GCA GCT A	<i>ompB</i>	[9]
	R.pr-R	AGC ACC AGC AGC TTG ATC AA		
	R.pr-P	FAM-AAC CTT TGA TGG TAT AGG C-MGB		
莫氏立克次体	R.mo-F	TGT TGA TGG TGC AGG ATT TGA	<i>ompB</i>	[10]
	R.mo-R	CGA ATT TGT AGC GAC AGG AAG A		
	R.mo-P	FAM-CAA ACT GGC GCT GGT GT-MGB		
斑点热群立克次体	SFG-F	TGA CGT TGG TAC AGA CGG TAC T	<i>ompB</i>	[11]
	SFG-R	TTG AGT TTT GGG TTA TTG CAA CTT TAG AA		
	SFG-P	FAM-CTG CCT TTA AAA CAG C-MGB		
恙虫病东方体	Ot-F	AAT GAT ACA TCT AAG TTA GGA ACT GCA AA	<i>groEL</i>	[12]
	Ot-R	AAG TTG TAT CTT TAA TTG CYT CAC GAA		
	Ot-P	FAM-AAA GTT AAT TCT CGT TGT GAA CAG-BHQ1		
查菲埃立克体	E.cha-F	AGC CTA ACA CAT GCA AGT CGA A	16S rRNA	[13]
	E.cha-R	CCC GTC TGC CAC TAA CAA TTA TT		
	E.cha-P	FAM-CAA TTG CTT ATA ACC TTT TG-MGB		
嗜吞噬细胞无形体	AP-F	CCA CGC AAG TCG CAT TGA T	<i>gltA</i>	[14]
	AP-R	GCC GGG TAC TTT CGC AAT T		
	AP-P	FAM-CTT ACA GGT GCT ATC ATC-MGB		
贝氏柯克斯体	Cb-F	AAA ACC TCC GCG TTG TCT TCA	<i>com1</i>	[15]
	Cb-R	GCT AAT GAT ACT TTG GCA GCG TAT TG		
	Cb-P	FAM-AGA ACT GCC CAT TTT TGG CGG CCA-BHQ1		

板进行 qPCR 扩增反应,根据所得的 C_t 值与对应的标准质粒浓度,绘制标准曲线,计算决定系数(R^2)、扩增效率。扩增效率= $10^{(-1/s)}-1$,其中 s 为标准曲线线性方程的斜率。

5. 反应体系和反应程序的优化:按照试剂 Premix Ex Taq™(Probe qPCR)所推荐的引物终浓度进行实验,实验采用 10 倍系列稀释标准品,每个稀释度平行 3 个复孔,评估灵敏度、扩增效率及 R^2 等指标。使用梯度法对退火温度进行优化,选择 56~61 °C,6 个梯度,每个温度梯度重复 3 次。选择最优退火温度时,应尽量满足 C_t 值靠前且荧光强度较强,同样的 C_t 值选择较高的退火温度,以避免引物二聚体和非特异性扩增。综合对比 7 种病原菌的最优退火温度,确定统一的退火温度。根据实验结果确定对 7 种病原菌的扩增效果均较优的反应体系及退火温度。

6. 灵敏度分析:10 倍梯度稀释标准品,7 个连续稀释度,拷贝数分别为 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^7$ 拷贝数/ μl ,将其分别加到反应体系中作为 qPCR 反应的模板,每个稀释度平行设置 3 个复孔。收集并分析每个稀释度的实验结果并建立标准曲线,获得标本可检出的最低稀释度。同时使用 M13 通用引物对不同稀释度($1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^7$ 拷贝数/ μl)样品进行普通 PCR 扩增,反应体系:Premix Taq 酶 15 μl ,正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μl ,模板 2 μl ,双蒸水(ddH₂O)补足

至 30 μl ,反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,50 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 50 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min,扩增后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,比较 qPCR 方法与普通 PCR 方法的灵敏度。

7. 特异性分析:为验证本实验中每种病原菌的特异性,分别以目标病原菌、非目标立克次体目病原菌及其他细菌的 DNA 为模板,设置 ddH₂O 阴性对照,验证方法的特异性。

8. 重复性分析:①批内重复:分别以 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 和 1×10^6 拷贝数/ μl 为模板,在同一反应条件下,每个模板做 3 个重复孔,进行重复性试验,计算变异系数;②批间重复:以上述 5 个不同浓度的标准品,在不同时间重复检测 3 次,计算变异系数。

9. 样本的检测:

(1)模拟样本的检测:从 qPCR 方法检测 7 种病原菌均为阴性的 24 名健康人血样中提取 DNA 各 9 μl ,分别加入 7 种病原菌(普氏立克次体、莫氏立克次体、恙虫病东方体、日本立克次体、查菲埃立克体、嗜吞噬细胞无形体和贝氏柯克斯体)提取的 DNA 各 1 μl ,同时在 6 名健康人血样提取的 DNA 各 9 μl 中分别加入 1 μl ddH₂O。以 ddH₂O 为阴性对照,以 1×10^5 拷贝数/ μl 目标病原菌的标准品为阳性对照,评估模拟样品的检出率。

(2) 蝗虫样本及临床血标本检测: ① 蝗虫样本: 96 只游离蝗(长角血蝗 76 只, 微小扇头蝗 20 只)来源于 2021–2022 年安徽省六安市金寨县。经无水乙醇和 ddH₂O 清洗后, 在 1.5 ml 的离心管加入 200 μl 磷酸盐缓冲液进行震荡研磨, 按照 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒说明书方法进行核酸提取。采用 qPCR 方法检测蝗虫 7 种病原菌携带情况。② 临床血标本: 2021 年安徽省和贵州省定点医院收集的不明原因发热患者 DNA 样本 80 份。采用 qPCR 方法检测患者的 7 种病原菌。③ 采用巢式 PCR 验证 qPCR 阳性结果。引物参考文献[16-19]。第一轮扩增反应体系: Premix Taq 酶 15 μl, 正反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, 模板 2 μl, ddH₂O 补足至 30 μl, 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。第二轮扩增反应体系: Premix Taq 酶 15 μl, 正反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, 第一轮 PCR 产物 2 μl, ddH₂O 补足至 30 μl, PCR 扩增产物取 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像系统观察电泳结果, 鉴定目的片段的大小。产物送北京天一辉远生物科技有限公司进行测序鉴定。使用美国国家生物技术信息中心的 BLAST 界面, 将扩增序列与 GenBank 参考序列进行同源性比对。

结 果

1. 优化的反应体系及反应程序: 经优化后的反应体系: Primer Ex Taq (Probe qPCR) (2×) 10 μl; 正向引物 (10 μmol/L) 0.4 μl; 反向引物 (10 μmol/L) 0.4 μl; 探针 (10 μmol/L) 0.8 μl; DNA 模板 2 μl; ddH₂O 补足 20 μl。经优化后的反应程序: 95 °C 预变性 30 s 后, 95 °C 变性 5 s 和 59 °C 退火及延伸 35 s (收集荧光信号), 循环 45 次。

2. 标准曲线的建立及灵敏度分析: 从循环阈值 (C_t 值) 与模板拷贝数建立的 7 种病原菌的标准曲线可以看出 (表 2), C_t 值与模板拷贝数之间呈现良好的线性关系 (均 R² > 0.990 0), 7 种病原菌扩增效率在 94.21%~101.00% 之间, 表明建立的 qPCR 具有较高的扩增效率, 可以依据标准曲线公式和 C_t 值较准确地计算出样本中目的基因的拷贝数。以查菲埃立克体的扩增曲线和标准曲线为例, 从扩增曲线可以看出, 不同稀释度标准品对应 C_t 值距离基本相等, 表明 qPCR 扩增稳定 (图 1)。

10 倍梯度稀释标准品, 以 1×10⁷ 拷贝数/μl 为初

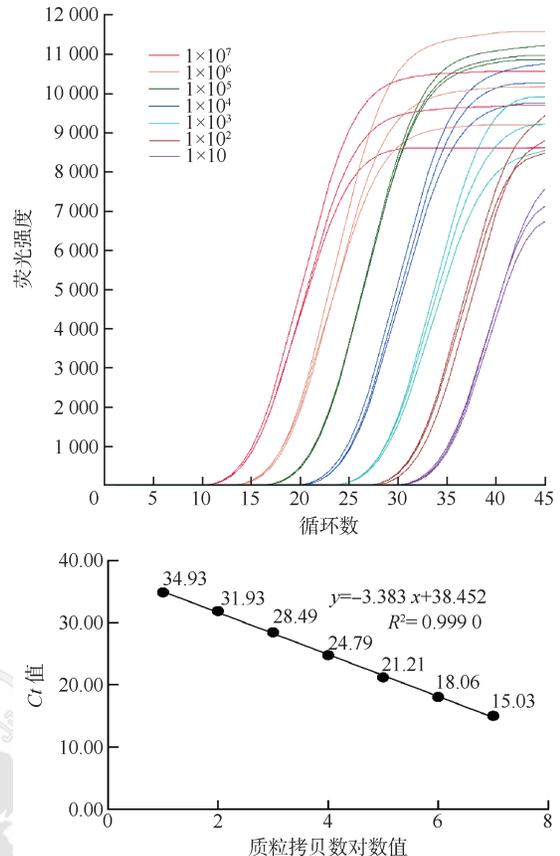


图1 查菲埃立克体标准品扩增曲线和标准曲线

始浓度的灵敏度试验结果显示, 7 种病原菌最低检测限均为 1×10 拷贝数/μl (表 2)。而在普通 PCR 中, 普氏立克次体和莫氏立克次体的最低检测限为 1×10³ 拷贝数/μl, qPCR 方法的灵敏度比普通 PCR 高 100 倍, 其余 5 种病原菌的最低检测限为 1×10² 拷贝数/μl, qPCR 方法的灵敏度比普通 PCR 高 10 倍 (表 2)。

3. 特异性分析: 实验结果显示 7 种目标病原菌有明显的阳性扩增信号, 扩增结果为阳性, 其他非目标立克次体病原菌及其他细菌均未检出荧光信号, 扩增结果为阴性, 表明该方法中的引物和探针具有很高的特异性。

4. 重复性分析: 5 份不同稀释浓度质粒标准品的批内和批间重复试验结果显示, 不同稀释度下变异系数均 ≤ 3.23%, 说明该方法具有良好的重复性 (表 3)。

5. 样本检测:

(1) 模拟样本检测: 针对 7 种病原菌的模拟阳性样本的检测中, 普氏立克次体、莫氏立克次体、恙虫病东方体、查菲埃立克体、嗜吞噬细胞无形体和贝氏柯克斯体模拟样品的检测结果均为阳性 (100.0%, 24/24), 斑点热群立克次体的检测结果为

表 2 实时荧光定量 PCR 与普通 PCR 检测灵敏度比较

病原菌	目的基因	实时荧光定量 PCR				普通 PCR
		标准曲线 ^a	R ² 值	扩增效率 (%)	最低检测限 (拷贝数/μl)	最低检测限 (拷贝数/μl) ^b
普氏立克次体	<i>ompB</i>	$y=-3.291x+41.145$	0.994 5	101.00	1×10	1×10 ³
莫氏立克次体	<i>ompB</i>	$y=-3.299x+40.862$	0.996 8	101.00	1×10	1×10 ³
斑点热群立克次体	<i>ompB</i>	$y=-3.360x+41.408$	0.999 7	98.41	1×10	1×10 ²
恙虫病东方体	<i>groEL</i>	$y=-3.307x+40.265$	0.997 9	100.60	1×10	1×10 ²
查菲埃立克体	16S rRNA	$y=-3.383x+38.452$	0.999 0	97.50	1×10	1×10 ²
嗜吞噬细胞无形体	<i>gltA</i>	$y=-3.446x+41.046$	0.995 0	95.05	1×10	1×10 ²
贝氏柯克斯体	<i>com1</i>	$y=-3.468x+40.374$	0.999 0	94.21	1×10	1×10 ²

注:^ay:Ct值, x:质粒拷贝数对数值;^b普通 PCR 仅有最低检测限

表 3 实时荧光定量 PCR 法批内和批间重复性实验比较(变异系数,%)

菌株标准品 (拷贝数/μl)	普氏立克次体		莫氏立克次体		斑点热群立克次体		恙虫病东方体		查菲埃立克体		嗜吞噬细胞无形体		贝氏柯克斯体	
	批内	批间	批内	批间	批内	批间	批内	批间	批内	批间	批内	批间	批内	批间
1×10 ²	3.23	1.10	1.91	1.38	0.06	2.86	0.31	0.02	1.04	0.09	0.64	2.50	0.64	0.95
1×10 ³	0.79	1.79	0.37	0.98	0.27	1.73	0.06	0.11	0.43	1.38	0.58	1.27	0.46	1.88
1×10 ⁴	0.74	1.83	0.42	0.42	0.17	1.86	0.36	1.20	0.91	1.64	0.31	1.42	1.02	2.46
1×10 ⁵	0.68	1.03	0.19	0.50	0.27	2.45	0.24	0.78	0.34	1.94	0.40	2.74	0.63	2.52
1×10 ⁶	0.75	2.66	0.76	1.81	0.12	1.55	0.15	0.31	0.69	2.39	0.48	2.66	0.35	2.15

95.8%(23/24)。针对 7 种病原菌的模拟阴性样本的检测中,检测结果均为阴性(100.0%,6/6)。

(2)实际样本检测:使用 qPCR 对 96 份蜱核酸进行检测,发现 1 份样本出现贝氏柯克斯体阳性扩增,3 份样本出现斑点热群立克次体阳性扩增(图 2),并依据标准曲线公式和 Ct 值较准确地计算出样本中目的基因的拷贝数(表 4)。使用巢式 PCR 验证 qPCR 阳性结果,将巢式 PCR 扩增的 1 份贝氏柯克斯体 *groEL* 基因片段(560 bp)测序结果显示,与已知贝氏柯克斯体 *groEL* 基因同源率为 99.82%。将巢式 PCR 扩增的 3 份斑点热群立克次体 16S rRNA 基因片段(1 024 bp)测序结果显示,3 份样本测得的基因序列一致,与日本立克次体的同源率为 100%。使用 qPCR 方法检测 80 份血标本 DNA 发现,1 份样本出现恙虫病东方体阳性扩增,2 份样本出现斑点热群立克次体阳性扩增。使用巢式 PCR 验证 qPCR 阳性结果。将巢式 PCR 扩增的 1 份恙虫病东方体 *TSA 56* 基因片段(411 bp)测序结果显示,与恙虫病东方体同源率为 100%。将巢式 PCR 扩增的 2 份斑点热群立克次体 *ompA* 基因片段(467 bp)测序的结果显示,2 份样本测得的基因序列一致,与日本立克次体的同源率为 100%。

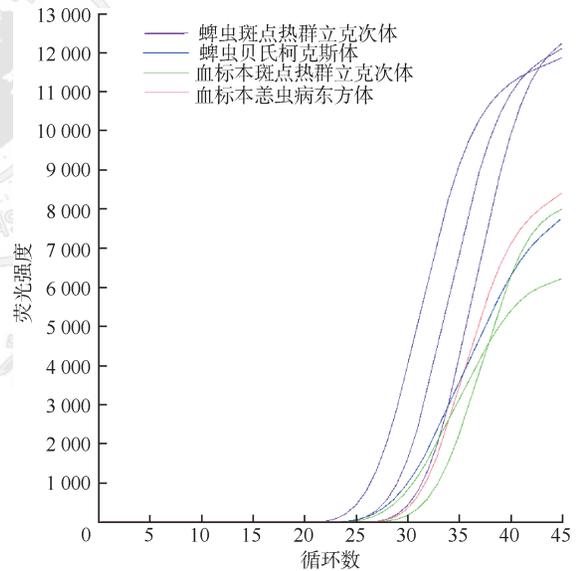


图 2 实时荧光定量 PCR 检测实际样本的阳性扩增结果

表 4 实时荧光定量 PCR 检测实际样本的阳性结果

样本类型	样本编号	阳性病原菌	Ct 值	拷贝数 (拷贝数/μl)
蜱虫	1	斑点热群立克次体	29.68	3.09×10 ³
	2	斑点热群立克次体	32.06	6.05×10 ²
	3	斑点热群立克次体	27.09	1.82×10 ⁴
	4	贝氏柯克斯体	31.70	3.17×10 ²
血标本	1	斑点热群立克次体	29.38	3.80×10 ³
	2	斑点热群立克次体	29.88	2.69×10 ³
	3	恙虫病东方体	31.80	3.62×10 ²

讨 论

立克次体病是一类重要的急性发热性人兽共

患自然疫源性疾病,随着社会的进步、器官移植的开展、免疫抑制药物的使用和全球气候变暖及旅游

业的发展,立克次体病在很多国家和地区蔓延,近年来的发病率呈逐年上升趋势^[20],已成为重要的公共卫生问题。立克次体病的诊断基于典型的临床症状和体征、全面的流行病学调查以及准确的实验室检测^[21],但由于早期症状较轻且缺乏特异性,患者被虱、蚤、蜱和螨叮咬处出现焦痂样皮损的创面小、部位隐秘且无明显痛觉,容易被忽略,增加了流行病学调查的难度^[22],因此实验室检测成为了确诊的依据。

现阶段,检测立克次体的方法多种多样,主要有病原学检测、血清学诊断以及分子生物学方法等,立克次体分离培养耗时较长、成本较高且对检测人员要求较高;血清学诊断特异性差,受限于患者血清抗体效价,不能满足早期诊断需要;普通 PCR 方法检测立克次体,其特异性和灵敏度均不高,改良的巢式 PCR 方法明显提高了检测灵敏度,但也存在假阳性率偏高问题^[22],qPCR 方法较好地解决这一问题,该技术融合了传统 PCR 的高灵敏度与高特异性、光谱技术的高灵敏度与精确定量的优点,直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化获得定量的结果。近年来,随着各项技术的日益发展成熟,qPCR 方法在立克次体病方面的应用越来越多,但由于所选择的目的基因、引物和探针不同,检测的灵敏度和特异性各有差异,因此,对于该类疾病系统的 qPCR 方法尚无统一的标准体系。本研究优化验证了立克次体目中 7 种重要病原菌,将 7 种病原菌反应体系及反应程序优化至同一方案,克服了目前不同病原菌采用不同的反应体系和反应程序的缺点,具有简便、高效和快捷的优势。相比于于永慧等^[23]建立的 qPCR 方法,检测的病原菌较为广泛。本研究中 7 种病原菌的标准曲线具有良好的线性关系和扩增效率,检测的稳定性较好。本研究最低检测限均为 1×10^3 拷贝数/ μl ,相比于吴捷等^[24]、Doyle 等^[25]和亚红祥和张丽娟^[26]建立的 qPCR 方法,具有更好的灵敏度。与普通 PCR 方法相比,最低检测限较低、检测时间较短且被污染的概率较低。该方法能对目标病原菌特异性扩增,对非目标病原菌均无扩增,表明该方法特异性较好。重复性分析进行组内和组间重复实验,7 种病原菌在不同稀释度下变异系数均 $\leq 3.23\%$,说明该方法有较好的重复性和结果的稳定可靠性。另外,本研究建立 qPCR 方法检测蜱虫样本和血标本携带病原体情况,采用巢式 PCR 方法验证 qPCR 检测结果为阳性的样本,测序结果均为所检测病原体,表明本研究建立的

qPCR 方法的准确性较高。

本研究存在局限性。收集发热患者的范围和样本量有限,为进一步评估 qPCR 方法,应收集较大规模的临床样本开展进一步研究。

综上所述,本研究建立的 qPCR 方法,具有良好的灵敏性、特异性及重复性,在临床应用及流行病学调查时,同步上机检测立克次体目 7 种重要病原菌,精确定位检测和明确感染病原菌的类型,减少延迟诊断的发生,提高对疑似患者的诊断或排除效率,为立克次体病的临床诊断和流行病学调查提供系统的检测方法。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 靳晓晶:查阅文献、设计实验、实验研究、论文撰写;滕中秋、徐佩星:数据整理;孙向荣、王文、覃新程:统计学分析、研究指导;秦天:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] 刘玮. 中国新发蜱媒病原体概况[J]. 传染病信息, 2017, 30(1):11-14. DOI:10.3969/j.issn.1007-8134.2017.01.005. Liu W. Emerging tick borne agents in China[J]. Infect Dis Inf, 2017, 30(1): 11-14. DOI: 10.3969/j. issn. 1007-8134. 2017.01.005.
- [2] Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(6):897-928. DOI:10.1086/319347.
- [3] 于永慧,王涛. 4 种立克次体病的疫苗研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(22): 3162-3164. DOI: 10.3969/j. issn.1673-4130.2016.22.026. Yu YH, Wang T. Progress in vaccine research of four Rickettsial diseases[J]. Int J Lab Med, 2016, 37(22): 3162-3164. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.026.
- [4] 赵清, 逮军, 潘翔. 人感染立克次体致病研究现状[J]. 中国热带医学, 2020, 20(6): 583-588. DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2020.06.21. Zhao Q, Lu J, Pan X. Research progress on the pathogenicity of human infection with *Rickettsia*[J]. China Trop Med, 2020, 20(6):583-588. DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2020.06.21.
- [5] Nilsson K, Wallménius K, Hartwig S, et al. Bell's palsy and sudden deafness associated with *Rickettsia* spp. infection in Sweden. A retrospective and prospective serological survey including PCR findings[J]. Eur J Neurol, 2014, 21(2):206-214. DOI:10.1111/ene.12218.
- [6] 张文良, 甘海忠, 吴飞. 恙虫病临床特征及并发器官损伤的危险因素分析[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(4):550-553. DOI:10.3969/j.issn.1672-3619.2020.04.030. Zhang WL, Gan HZ, Wu F. Epidemiological survey of tsutsugamushi disease and risk factors of organ injury in Danzhou city[J]. J Trop Med, 2020, 20(4):550-553. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2020.04.030.
- [7] Mahajan SK. Rickettsial diseases[J]. J Assoc Physicians India, 2012, 60(3):37-44.
- [8] Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, et al. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods[M]//Basu C. PCR primer design. New York: Humana Press, 2015: 31-56. DOI: 10.1007/978-1-4939-

- 2365-6.3.
- [9] 杨晓, 陈梅玲, 温博海, 等. 实时荧光定量 PCR 检测普氏立克次体[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(11):963-967. DOI: 10.3760/j.issn:0254-6450.2006.11.012.
Yang X, Chen ML, Wen BH, et al. Detection of *Rickettsia prowazekii* by quantitative real-time PCR[J]. Chin J Epidemiol, 2006, 27(11): 963-967. DOI: 10.3760/j.issn:0254-6450.2006.11.012.
- [10] 杨晓, 陈梅玲, 温博海, 等. 实时荧光定量 PCR 检测莫氏立克次体[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(10): 1054-1056. DOI:10.3321/j.issn:0577-7402.2007.10.016.
Yang X, Chen ML, Wen BH, et al. Detection of *Rickettsia mooseri* by real-time quantitative PCR[J]. Med J Chin People's Liberat Army, 2007, 32(10): 1054-1056. DOI: 10.3321/j.issn:0577-7402.2007.10.016.
- [11] 牛东升, 杨晓, 陈梅玲, 等. 实时荧光定量 PCR 检测斑点热立克次体的方法建立[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(11): 1297-1299. DOI:10.3321/j.issn:0577-7402.2008.11.006.
Niu DS, Yang X, Chen ML, et al. Rapid detection of spotted fever group rickettsiae with real-time quantitative PCR[J]. Med J Chin People's Liberat Army, 2008, 33(11): 1297-1299. DOI:10.3321/j.issn:0577-7402.2008.11.006.
- [12] 谈忠鸣, 李志峰, 吴斌, 等. 基于 GroEL 基因的实时荧光定量 PCR 检测恙虫病东方体方法的建立及评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(11): 1121-1124. DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.11.007.
Tan ZM, Li ZF, Wu B, et al. Establishment and evaluation of real-time PCR assay for detection of *Orientia tsutsugamushi* based on the GroEL gene[J]. Chin J Zoonoses, 2014, 30(11): 1121-1124. DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.11.007.
- [13] 张晶波, 温博海, 陈梅玲, 等. 荧光定量 PCR 检测查菲埃立克体[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2006, 13(4): 212-216. DOI:10.3969/j.issn.1005-0507.2006.04.005.
Zhang JB, Wen BH, Chen ML, et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Ehrlichia chaffeensis*[J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 2006, 13(4): 212-216. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0507.2006.04.005.
- [14] 张晶波, 温博海, 陈梅玲, 等. 荧光定量 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(4): 289-293. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2006.04.001.
Zhang JB, Wen BH, Chen ML, et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Anaplasma phagocytophila*[J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(4): 289-293. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2006.04.001.
- [15] Lockhart MG, Graves SR, Banazis MJ, et al. A comparison of methods for extracting DNA from *Coxiella burnetii* as measured by a duplex qPCR assay[J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 52(5): 514-520. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03034.x.
- [16] 卢志宇, 付梦姣, 熊进峰, 等. 湖北省东北部地区蜱携立克次体的调查[J]. 军事医学, 2021, 45(4): 262-266. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2021.04.005.
Lu ZY, Fu MJ, Xiong JF, et al. Investigation of rickettsiae in ticks from the northeast of Hubei Province[J]. Mil Med Sci, 2021, 45(4): 262-266. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2021.04.005.
- [17] 刁丹红, 王蒋丽, 郭文平, 等. 河北省野鼠立克次体感染调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(1): 84-88. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.168.
Diao DH, Wang JL, Guo WP, et al. Investigation of *Rickettsia* infections in wild rodents in Hebei Province[J]. Chin J Zoonoses, 2022, 38(1): 84-88. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.168.
- [18] Bora T, Khan SA, Jampa L, et al. Genetic diversity of *Orientia tsutsugamushi* strains circulating in Northeast India[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2018, 112(1): 22-30. DOI:10.1093/trstmh/try019.
- [19] Ishikura M, Ando S, Shinagawa Y, et al. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae based on *gltA*, *17-kDa*, and *rOmpA* genes amplified by nested PCR from ticks in Japan[J]. Microbiol Immunol, 2003, 47(11): 823-832. DOI:10.1111/j.1348-0421.2003.tb03448.x.
- [20] Wu XB, Na RH, Wei SS, et al. Distribution of tick-borne diseases in China[J]. Parasit Vectors, 2013, 6: 119. DOI: 10.1186/1756-3305-6-119.
- [21] Stephenson N, Blaney A, Clifford D, et al. Diversity of rickettsiae in a rural community in northern California[J]. Ticks Tick Borne Dis, 2017, 8(4): 526-531. DOI:10.1016/j.ttbdis.2017.02.014.
- [22] 张骁鹏, 李忻樞, 郑波, 等. 立克次体与立克次体病的检测与鉴定[J]. 微生物与感染, 2015, 10(3): 194-198. DOI:CNKI: SUN:WSWG.0.2015-03-015.
Zhang XP, Li XL, Zheng B, et al. Detection and identification of *Rickettsia* and rickettsial diseases[J]. J Microbes Infect, 2015, 10(3): 194-198. DOI: CNKI: SUN: WSWG.0.2015-03-015.
- [23] 于永慧, 焦俊, 付梦姣, 等. 实时荧光定量 PCR 同时快速检测 4 类致病性立克次体[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2019, 26(2): 110-117. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0507.2019.02.007.
Yu YH, Jiao J, Fu MJ, et al. Simultaneous and rapid detection of four kinds of pathogenic *rickettsia* by quantitative real-time PCR[J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 2019, 26(2): 110-117. DOI:10.3969/j.issn.1005-0507.2019.02.007.
- [24] 吴捷, 王少玲, 马焱, 等. 斑点热群立克次体实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 现代预防医学, 2015, 42(22): 4137-4139, 4146. DOI: CNKI: SUN:XDYF.0.2015-22-036.
Wu J, Wang SL, Ma Y, et al. Establishment and application of real-time fluorescence quantitative PCR in spotted fever group rickettsiae detection[J]. Mod Prev Med, 2015, 42(22): 4137-4139, 4146. DOI: CNKI: SUN:XDYF.0.2015-22-036.
- [25] Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, et al. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene[J]. J Mol Diagn, 2005, 7(4): 504-510. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60581-8.
- [26] 亚红祥, 张丽娟. 实时荧光定量 PCR 检测贝氏柯克斯体方法的建立[J]. 中国热带医学, 2011, 11(8): 916-917. DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2011.08.014.
Ya HX, Zhang LJ. Quantitative detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR[J]. China Trop Med, 2011, 11(8): 916-917. DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2011.08.014.