

# 中国内蒙古、新疆部分地区鼠类自然感染恙虫病东方体的调查

张倩 刘运喜 吴晓明 赵秋敏 张泮河 杨红 曹务春

**【摘要】目的** 了解中国内蒙古、新疆自治区部分地区鼠类自然感染恙虫病东方体(Ot)的情况。**方法** 采用鼠夹捕鼠,从鼠脾中提取 DNA,应用巢式 PCR(nPCR)检测 Ot-Sta56 基因;对部分阳性标本测序,用 Clustal X (5.0)和 DNA Club 软件对序列进行比较分析。**结果** 内蒙古地区捕获各种鼠类共计 90 只,其中 6 只 nPCR 检测阳性,总阳性率为 6.67%,不同鼠种间阳性率有差别,但无统计学意义( $\chi^2 = 8.898, P = 0.148$ );新疆地区捕获各种鼠类共计 20 只,其中 1 只 nPCR 检测阳性,阳性率为 5.00%。不同地区间阳性率比较虽略有差别,但无统计学意义( $\chi^2 = 0.076, P = 0.782$ )。内蒙古、新疆部分地区从农田中捕获的鼠类标本为 9 只,占 8.18%,无阳性标本;从草原捕获的鼠类标本为 101 只,占 91.82%,其中阳性标本为 7 只,草原鼠标本 Ot 感染率为 6.93%。序列分析结果:N59(内蒙古莫氏田鼠)、N69(内蒙古黑线仓鼠)、X33(新疆普通仓鼠)3 份标本 nPCR 产物碱基序列与 Karp 株相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高,均为 99%,应属于 Karp 型;N65(内蒙古黑线仓鼠)及 N88 标本(内蒙古黑线姬鼠)nPCR 产物碱基序列与中国台湾 Taitung-2 株和 TW461 株相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高,均为 94%;N90(内蒙古黑线姬鼠)与日本 Oishi 株相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高,为 96%。系统发育分析表明,N59、N69、X33 位于 Karp 株所在的分支,而 N65、N88、N90 与 Taitung-2 株、TW461 株、Yonchon 株、Sxh951 株、Oishi 株、Kanda 株属同一支系。**结论** 研究证实内蒙古、新疆部分地区鼠类存在 Ot 自然感染,其基因型较为复杂。这为进一步深入进行恙虫病疫源地的调查奠定了基础。

**【关键词】** 恙虫病东方体;恙虫病;啮齿动物;流行病学,分子

**Investigation on rodents' natural infection of *Orientia tsutsugamushi* in some areas of Inner Mongolia and Xinjiang, China** ZHANG Qian, LIU Yun-xi, WU Xiao-ming, ZHAO Qiu-min, ZHANG Pan-he, YANG Hong, CAO Wu-chun. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Corresponding author: CAO Wu-chun, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

**【Abstract】Objective** To investigate rodents' natural infection of *Orientia tsutsugamushi* (Ot) in some areas of Inner Mongolia and Xinjiang, China. **Methods** DNAs were extracted from spleens of the captured mice and nested-polymerase chain reaction (nPCR) technique was used to detect the Ot-Sta56 gene. Six positive samples were sequenced and analyzed by Clustal X (5.0) and DNA Club software. **Results** A total of 90 rodents were captured in Inner Mongolia, and the overall prevalence of Ot was 6.67%. There was no significant difference in infection rates among the positive rodents species. 20 rodents were captured in Xinjiang, and the prevalence of Ot was 5.00%. The geographical difference in infection rates was not statistically significant between Inner Mongolia and Xinjiang. 9 rodents were captured in farmlands of Inner Mongolia and Xinjiang but there was no positive samples found. 101 rodents were captured in grasslands, and the prevalence of Ot was 6.93%. The Sta56 gene nucleotide sequence homology to Karp strain of N59 (from *Microtus maximowiczii*), N69 (from *Cricetulus barabensis*) and X33 (from *Cricetus cricetus*) was 99%. The sequence homology to Taitung-2 strain and TW461 strain of N65 (from *C. barabensis*) was 94%, and the sequence homology to Taitung-2 strain and TW461 strain of N88 (from *Apodemus agrarius*) was also 94%. The sequence homology to Oishi strain of N90 (from *A. agrarius*) was 96.00%. **Conclusion** Our findings indicated that infections of Ot did exist in rodents

基金项目:国家科技攻关计划资助项目(2003BA712A05-1)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物国家重点实验室

通讯作者:曹务春, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

captured from Inner Mongolia and Xinjiang. The genotypes of Ot in Inner Mongolia and Xinjiang were quite complex, with some of them belonged to Karp type, and the others belonged to Taitung-2, TW461 and Oishi types which providing evidence for further investigation on the scrub typhus foci in the two areas.

**【Key words】** *Orientia tsutsugamushi*; Scrub typhus; Rodents; Epidemiology, molecular

恙虫病是经媒介恙螨叮咬而传给人的一种自然疫源性疾病,其病原体为恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*, Ot),以鼠类为主要传染源或储存宿主。以往恙虫病仅发生于我国长江以南地区,1986年以来出现恙虫病疫源地北移的现象,而且在北方新发现的疫区内,近年来不断有新的疫源地被发现,其危害越来越严重<sup>[1-3]</sup>。内蒙古尚无恙虫病方面的报道,新疆虽有 Ot 血清学抗体检测阳性的报告<sup>[2]</sup>,但缺乏直接的病原学证据。为此于 2004 年 3-7 月和 2005 年 3-7 月对内蒙古、新疆自治区部分地区鼠类自然感染 Ot 的情况进行了调查。

**材料与方 法**

1. 标本采集:调查地点为新疆自治区阿勒泰北湾哈巴河地区(主要为农田)和伊犁地区新源县那拉提草原,内蒙古自治区大杨树草原及林区。哈巴河地区和伊犁地区新源县那拉提草原采集鼠标本的地域面积均约为 20 km<sup>2</sup>,内蒙古大杨树草原及林区采集鼠标本的地域面积约为 15~20 km<sup>2</sup>。于 2004 年 3-7 月和 2005 年 3-7 月之间,采用鼠夹诱捕法捕鼠,所获标本经鼠种鉴定后现场无菌解剖,取脾组织置 -20℃ 保存待用。

2. 国际参考株:Karp 株由本所保存。

3. 模板 DNA 的提取:使用 Trizol(Gibco 公司产品)试剂提取 DNA,其过程简述如下:在实验室以无菌操作剪取约 3 mm<sup>3</sup>(约 500 mg)大小的脾组织,放入灭菌研磨器中,加入 Trizol,充分研磨后移入 Eppendorf 管中;通过离心分离去除 RNA 后,用 0.1 mol 柠檬酸钠,10% 乙醇溶液洗涤 2 次后获得 DNA 沉淀,然后将其悬于 75% 酒精中静置 10-20 min。2000 g,4℃ 离心 5 min,然后将 DNA 沉淀溶于 8 mmol NaOH 溶液中,4℃ 过夜。最后将提取好的 DNA 溶于 TE(0.01 mol, pH 值 8.0)中,置 -20℃ 备用。DNA 浓度及质量通过紫外分光光度计进行测量和评价。

4. 引物:根据已发表的 Ot-Sta56 KDa 抗原基因序列设计引物<sup>[4]</sup>,由北京三博远志生物公司合成。采用巢式 PCR(nPCR), P34/P55 为外引物, P10/P11 为内引物。具体序列及位置见表 1。

**表1 所用引物一览表**

名称	序 列	位置	扩增片段 (bp)
P34	5'-TCAAGCTTATTGCTAGTGCAA TGTCTGC-3(F)	12~39	
P55	5'-AGGGATCCCTGCTGCTGTGCT TGCTGCG-3(R)	991~1018	1003
P10	5'-GATCAAGCTTCCTCAGCCTAC TATAATGCC-3(F)	395~424	
P11	5'-CTAGGGATCCCACAGATGCA CTATTAGGC-3(R)	796~817	509

5. nPCR 扩增:所有标本采用 nPCR 扩增以检测是否有 Ot 感染,两轮扩增引物分别为 P34/P55 及 P10/ P11。条件:94℃ 5 min→94℃ 30 s, 57℃ 2 min,70℃ 2 min→72℃ 10 min,扩增 30 个循环。第 2 轮以 1 μl 第 1 轮 PCR 扩增产物为模板。取 nPCR 产物 3~5 μl 进行 1.5% 琼脂糖电泳,紫外灯下见有 509 bp 带者为阳性。实验同时设阳性和阴性对照。

6. nPCR 扩增产物的纯化:采用 TaKaRa 公司生产的 DNA 片段回收试剂盒,按说明书从琼脂糖中回收 nPCR 产物,-20℃ 冻存备用。

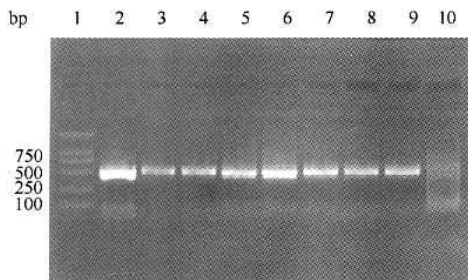
7. 序列同源性比较和系统发育树分析:对 N59、N65、N69、N88、N90、X33 6 份标本 nPCR 扩增产物纯化后送 Invitrogen 公司测得碱基序列。对获得的序列和部分 Ot 参考株的相应序列采用 BLAST 软件做核苷酸序列间的比较和分析。运用 Clustal X 5.0 软件对目标序列进行排列,然后运行 PHYLIP 软件中 SEQBOOT 程序,Bootstrap 分析重复数为 1000,采用 Neighbor-joining(NJ)法,距离模式选用 Jukes-cantor 方式,依次运行 DNADIST、NEIGHBOR 和 CONSENSE 程序得到系统发育树。

8. 统计学分析:应用  $\chi^2$  检验比较不同地区、不同宿主动物感染率的差异,统计处理应用 SPSS 11.5 软件。

**结 果**

1. 宿主动物调查及 nPCR 检测结果:内蒙古地区捕获各种鼠类共计 90 只,均在大杨树草原及林区采集。从其中 6 只鼠脾提取的模板 DNA 扩增出 509 bp 大小的目的片段(图 1),总阳性率为 6.67%。不同鼠种间阳性率有差别,但无统计学意义( $\chi^2 =$

8.898,  $df = 7, P = 0.148$ ); 新疆地区捕获各种鼠类共计 20 只, 阿勒泰北湾哈巴河地区共捕获 9 只, 伊犁地区新源县那拉提草原共捕获 11 只。其中 1 只鼠脾提取的模板 DNA 扩增出 509 bp 大小的目的片段, 阳性率为 5.00%。不同地区间阳性率比较虽略有差别, 但无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.076, P = 0.782$ )。内蒙古、新疆两地区的 110 只鼠标本中, 从农田中捕获的鼠标本为 9 只, 占 8.18%, 无阳性标本; 从草原捕获的鼠标本为 101 只, 占 91.82%, 其中阳性标本为 7 只, 草原鼠标本中 Ot 感染率为 6.93% (表 2)。



1: Marker(100 bp); 2: Karp 株; 3: 标本 N59; 4: 标本 N65; 5: 标本 N69; 6: 标本 N80; 7: 标本 N88; 8: 标本 N90; 9: 标本 X33

图1 内蒙古、新疆地区鼠类脾标本 Ot-Sta56 基因 nPCR 扩增产物 1.5% 琼脂糖电泳结果

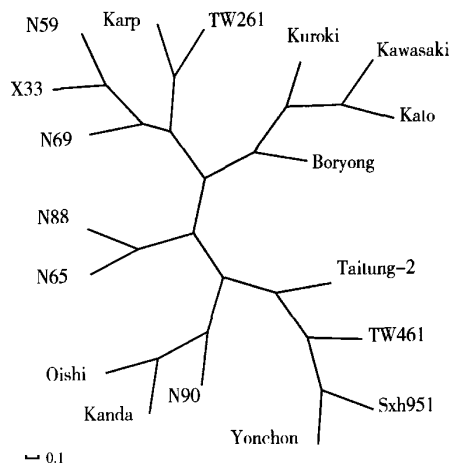
表2 内蒙古、新疆地区不同鼠种 nPCR 检测结果

鼠种	内蒙古			新疆		
	捕获只数	阳性只数	阳性率 (%)	捕获只数	阳性只数	阳性率 (%)
褐家鼠	5	1(N80)	20.00	1	0	0
小家鼠	0	0	0	11	0	0
大林姬鼠	5	0	0	0	0	0
黑线姬鼠	20	2(N88, N90)	10.00	0	0	0
黑线仓鼠	6	2(N65, N69)	33.33	0	0	0
普通仓鼠	0	0	0	4	1(X33)	1/4
红背鼯	13	0	0	0	0	0
棕背鼯	2	0	0	0	0	0
莫氏田鼠	33	1(N59)	3.03	0	0	0
长尾沙土鼠	0	0	0	4	0	0
花鼠	6	0	0	0	0	0
合计	90	6	6.67	20	1	5.00

注: 括号内为标本编号

2.6 份代表标本 Sta56 基因片段序列与已知参考株相应序列的比较: 对 N59、N65、N69、N88、N90、X33 (标本依次来自内蒙古地区莫氏田鼠、黑线仓鼠、黑线姬鼠、黑线姬鼠和新疆地区普通仓鼠) 6 份阳性标本进行测序。同源性分析结果: N59、N69、X33 标本的 nPCR 产物碱基序列与 Karp 型相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高, 均为

99.00%, 应属于 Karp 型; N65 标本 nPCR 产物碱基序列与中国台湾 Taitung-2 株和 TW461 株相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高, 均为 94.00%。N88 标本碱基序列与 Taitung-2 株和 TW461 株相应 DNA 片段的碱基序列同源性也最高, 亦均为 94.00%。另外, N65、N88 与 Yonchon 株 (韩国)、Sxh951 株 (中国山西)、Oishi 株、Kanda 株序列同源性也较高, 同源性在 90%~93% 之间; N90 标本与 Oishi 株相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高, 为 96%, 而与 Kanda 株、Taitung-2 株、TW461 株、Sxh951 株、Yonchon 株序列同源性也分别达到 95%、91%、91%、90%、89%。系统发育树分析结果: N59、N69、X33 3 个标本位于 Karp 型所在的分支; 而 N65、N88、N90 与 Taitung-2 株、TW461 株、Yonchon 株、Sxh951 株、Oishi 株、Kanda 株属同一支系 (图 2)。



GenBank 中的序列号: Karp(M33004), Kato(M63382), Kawasaki (M63383), Kuroki (M63380), Yonchon (U19903), Sxh951 (AF050669), Oishi (AF173037), Kanda (AF173039), TW261 (AY222636), TW461 (AY222631), Boryong (L04956), Taitung-2 (AY335819)

图2 基于 Sta56 基因片段部分序列构建内蒙古、新疆地区 6 份标本与其他已知序列的 Ot 的系统发育树

## 讨 论

恙虫病在我国流行历史悠久<sup>[2]</sup>, 1985 年以前我国恙虫病仅在北纬 31° 以南的广大地区流行, 东至台湾、福建等省, 西至云南、四川和西藏地区南部, 南至海南、广东和广西地区, 北至浙江和湖南省, 陕西有少数病例报告<sup>[3]</sup>。1986 年以来, 我国恙虫病疫源地不断北移<sup>[5]</sup>。已在山东、山西、河北、天津和东北等地区发现该病流行或暴发<sup>[6-8]</sup>。但有关内蒙古、新

疆地区恙虫病的情况尚无病原学报告。本研究首次对这两个地区鼠类自然感染 Ot 的情况进行了调查。结果表明,内蒙古地区鼠总阳性率为 6.67%;新疆地区鼠总阳性率为 5.00%。研究结果填补了内蒙古、新疆地区恙虫病流行病学研究方面的空白,从而为进一步调查两地区恙虫病自然疫源地提供了病原学方面的线索。

恙虫病属于自然疫源性疾病,构成恙虫病自然源地的生境条件有沿河两侧杂草、灌木丛、草地、弃耕地、农田间杂地等<sup>[9]</sup>。本次所调查的内蒙古、新疆部分地区的自然生境具备了恙虫病自然源地的生境条件,符合其传播和感染的条件。同时随着近年来西部大开发,与内地的物质、人员交流增加,为恙虫病传播到这些地区提供了先决条件。这可能是内蒙古、新疆地区出现 Ot 感染的原因。但这两个地区是否是恙虫病自然疫源地还需更多流行病学证据支持。

到目前为止,世界各地已从患者、媒介昆虫及啮齿动物中分离到百余株恙虫病病原体,公认的标准型为 Karp、Kato 和 Gilliam 3 个血清型<sup>[10]</sup>,1968 年从泰国分离株的分型中,又增 5 个型,即 Fan 型和 Chon 型,TA686,TA716 和 TA763。近年来,日本发现不同于上述型别的新型株, Shimocoshi、Kawasaki、Kuroki、Irie 和 Hirano 株<sup>[11-14]</sup>。根据血清学分型结果,我国 Ot 以 Gilliam 型为主,其次是 Karp 型,Kato 型很少见。本研究采用核苷酸序列分析技术测定从内蒙古及新疆地区鼠标本中检测到的 Ot-Sta56 基因序列,结果发现两地区鼠标本基因型大致可分为 2 类。内蒙古地区 N59 标本、N69 标本,新疆地区 X33 标本均为 Karp 型,该结果与我国 Ot 血清学分型结果基本吻合。同时,来自内蒙古的 N65 标本、N88 标本与 Taitung-2 株,N90 标本与 Oishi 株相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高,表明内蒙古地区 Ot 基因型别较为复杂。同时系统发育树分析结果还显示 N65、N88、N90 标本与 Taitung-2 株,TW461 株、Yonchon 株和山西 Sxh951 株共处 1 个分支,初步表明内蒙古恙虫病疫源地与

山西疫源地可能存在一定的关联,但尚待进一步扩大样本量来确证这种关联。

参 考 文 献

- 1 魏曦,主编. 医用立克次体学. 上海:上海科学技术出版社, 1984. 268-322.
- 2 于恩庶,主编. 中国人兽共患病学. 第 2 版. 福州:福建科技出版社,1996. 481.
- 3 于恩庶. 我国目前恙虫病流行特征分析. 中华流行病学杂志, 1997,18:56.
- 4 Han-IL REE, Tae-Eun KIM, IN-Yong LEE, et al. Determination and geographical distribution of *Orientia tsutsugamushi* serotypes in Korea by nested polymerase chain reaction. J Trop Med Hyg, 2001,65:528-534.
- 5 吴光华. 我国恙虫病的流行病学特点与防治策略. 中国公共卫生,2000,16:777-779.
- 6 陈龙宝,田福建,孙桐,等. 济宁市任城区首次发现恙虫病流行. 中国人兽共患病杂志,1997,13:70-71.
- 7 祖文刚,李春明,陈素良,等. 河北太行山区恙虫病疫源地调查. 中国寄生虫病防治杂志,2002,15(4):插页 5.
- 8 陈香蕊,郑乡占,于强,等. 山西省首次流行恙虫病的证实. 中国人兽共患病杂志,1996,12(2):2.
- 9 陈香蕊,主编. 恙虫病和恙虫病东方体. 北京:军事医学科学出版社,2001. 91-122.
- 10 Shishido A. Identification and serological classification of the causative agent of scrub typhus in Japan. Jpn J Sci Biol,1962,15: 308-321.
- 11 Tamura A, Takahashi K, Tsuruhara T, et al. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. Microbiol Immunol, 1984,28: 873-882.
- 12 Yamamoto S, Kawabata N, Tamura A, et al. Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyushu. Microbiol Immunol,1986,30:611-620.
- 13 Yamamoto S, Kawabata N, Oura K, et al. Antigenic types of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from patients with tsutsugamushi fever and their distribution in Miyazaki Prefecture. J Jpn Assoc Infect Dis,1989,63:109-117.
- 14 Ohashi N, Tamura A, Sakurai H, et al. Characterization of a new antigenic type, Kuroki, of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from a patient in Japan. J Clin Microbiol,1990,28:2111-2113.

(收稿日期:2005-12-09)

(本文编辑:尹廉)