

山东地区不同季节优势恙螨自然感染恙虫病东方体的分子流行病学调查

张倩 刘运喜 高媛 赵仲堂 张景兰 杨占清 薛健 曹务春

【摘要】 目的 从分子水平探讨山东地区不同季节优势恙螨自然感染恙虫病东方体(Ot)情况及其作为恙虫病传播媒介的可能性。方法 根据Ot-Sta56 kDa 外膜蛋白基因部分序列设计 Ot 种和型特异性引物,对本标提取的 DNA 先采用种特异性引物扩增,然后再采用型特异性引物扩增分型,并对部分标本进行序列测定。结果 从不同季节优势恙螨幼虫共得到 11 株 Ot 分离株和 16 份恙螨匀浆,从这 27 份标本提取的 DNA 经首轮 PCR 扩增后,18 份标本有预期的目的带。对首轮 PCR 产物采用 nested PCR 扩增分型,结果 17 份为 Kawasaki 型,1 份(LHGM2 株)为 Karp 型。序列同源性分析结果证实了 nested PCR 分型结果:XDM2 株首轮 PCR 产物碱基序列与 Kawasaki 型相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高,为 97.00%,在系统发育树上与 Kawasaki 株位于同一分支,应属于 Kawasaki 型;LHGM2 株首轮 PCR 产物碱基序列与 Karp 型相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高,为 96.45%,在系统发育树上与 Karp 株位于同一分支,应属于 Karp 型。结论 山东地区不同季节优势恙螨中存在 Ot 自然感染,Ot 主要基因型为 Kawasaki 型。

【关键词】 恙虫病;恙螨;恙虫病东方体;Sta56 基因

Study on the molecular epidemiology regarding the natural infection of *Orientia tsutsugamushi* in 4 species of dominant chiggers collected in various seasons from the foci of Shandong province ZHANG Qian*, LIU Yun-xi, GAO Yuan, ZHAO Zhong-tang, ZHANG Jing-lan, YANG Zhan-qing, XUE Jian, CAO Wu-chun. *State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China
Corresponding author: CAO Wu-chun, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 Objective In order to investigate the natural infection of *Orientia tsutsugamushi* (Ot) in 4 species of dominant chiggers collected in various seasons from the foci of Shandong province. **Methods** Species-specific and type-specific primers were designed according to the published sequence of Sta56 gene. The DNAs extracted from the samples were amplified by initial PCR using species-specific primers before the genotypes of initial PCR amplicons were identified by nested PCR using type-specific primers, and using the nucleotide sequence analysis of 2 representative samples to confirm the PCR results. **Results** The expected specific fragments from 18 of the 27 Ot-Sta56 genes (11 isolated strains and 16 homogenates of various mite larvae) were initially amplified by PCR. Out of the 18 initial PCR positive samples, 17 were identified as Kawasaki types by nested PCR, while one LHGM2 strain was identified as Karp type. DNA sequence analysis confirmed the nested PCR results. The Sta56 gene nucleotide sequence homology was 97.00% to Japan Kawasaki strain of XDM2 from the above 17 samples which were identified as Japan Kawasaki strain by nested PCR. The sequence homology to Karp strain of LHGM2 was 96.45%. **Conclusion** These data indicated that Ot was widely distributed in 4 species of dominant chigger mites collected from different seasons in Shandong province. The epidemic genotypes of Ot belonged to Kawasaki strain.

【Key words】 Scrub typhus; Chigger mite; *Orientia tsutsugamushi*; Sta56 gene

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371237);解放军总后勤部卫生部全军医药卫生科研基金资助项目(01Q016)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室(张倩、刘运喜、曹务春);济南军区联勤部疾病预防控制中心(高媛、张景兰、杨占清、薛健);山东大学公共卫生学院(赵仲堂)

通讯作者:曹务春,Email:caowc@nic.bmi.ac.cn

恙虫病是由恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*, Ot) 经恙螨叮咬感染人所致的自然疫源性疾病^[1]。我们以往采用生态学、病原学和血清学已初步证实小盾纤恙螨为山东地区恙虫病流行季节(秋冬季)的主要传播媒介,但同时发现在当地恙虫病非流行季节几种优势恙螨——须纤恙螨(冬季优势恙螨)、临淮岗纤恙螨(夏季优势恙螨)及太平洋无前恙螨(夏季优势恙螨)幼虫中亦存在 Ot 自然感染,并且后两种恙螨能经期传播 Ot^[2]。为了从分子水平查明山东地区不同季节优势恙螨体内 Ot 自然感染情况及其基因型,以便进一步探讨不同种类的恙螨作为 Ot 媒介的可能性,同时为进一步研究 Ot 在恙虫病流行与非流行季节的贮存与转换方式提供依据,我们对 1995-2003 年间从山东地区不同季节优势恙螨中分离的 Ot 毒株或收集的恙螨幼虫匀浆用 PCR 法检测并进行基因分型,结果报告如下。

材料与方 法

1. 材料:

(1) 国际参考株: Gilliam, Karp, Kato 3 株国际参考株由军事医学科学院微生物流行病研究所保存。

(2) Ot 分离株和恙螨幼虫匀浆: 将收集的同种恙螨活幼虫以 45~55 只为一组, TE 缓冲液洗 3 遍后, 用制成盲端的塑料吸头捣碎, 加 TE 缓冲液, 冻融 3 次, 制成恙螨匀浆。共检测从不同季节 4 种优势恙螨活幼虫得到的 11 株 Ot 分离株, 其中 4 株分离自费县小盾纤恙螨幼虫(XDM 1~4), 3 株分离自费县须纤恙螨幼虫(XUM 1~3), 2 株分离自费县临淮岗纤恙螨幼虫(LHGM 1~2), 2 株分离自费县太平洋无前恙螨幼虫(TPM 1~2)。从不同季节 4 种优势恙螨活幼虫匀浆提取的模板 DNA 16 份。上述标本均于 -70℃ 冰箱冻存备用。

(3) 引物: 参照已发表的文献^[3-6], 根据 Ot-Sta56 基因部分序列设计 Ot 种和型特异性引物, 由上海生工生物公司合成。其中 Ot 种特异性引物 P1 和 P2, 用于首轮 PCR 检测 Ot-Sta56 基因。同时合成 5 条型特异性引物(PG, PKp, PKt, PKw, PKr), 与 P1 或 P2 配成 5 个型特异性引物对(P1 和 PG; P2 和 PKp; P1 和 PKt; P2 和 PKw; P1 和 PKr), 用于对首轮 PCR 产物进行基因分型。种特异性引物序列: Primer 1: + 5'-tac att agc tgc agg tat gac-3'; Primer 2: - 5'-aat tct tea acc aag cga tcc-3'。Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki 株 PCR 扩增产物 DNA 片段

分别为 326, 332, 320, 317, 332(bp)。型特异引物序列: Primer G: - 5'-tga gca aga ata tca gta tc-3'; Primer Kp: + 5'-cag acc tca gca gca agc ac-3'; Primer Kt: - 5'-ata ccg ctg agg cat agg ag-3'; Primer Kw: + 5'-atg ctg cta ttg ata cag gc-3'; Primer Kr: - 5'-ttg cgc ttg tgc ctg agg ta-3'。

2. 方法:

(1) 模板 DNA 的提取^[7]: ①取 Ot 传代阳性的小鼠脾 0.1~0.5 g, 研磨, 加 TE 缓冲液, 离心, 取沉淀; 取恙螨匀浆, 离心, 取沉淀; ②加入 400 μl 裂解缓冲液 [10 mmol/L Tris (pH 值 8.0), 0.1 mol/L EDTA, 0.5% SDS], 蛋白酶 K (20 mg/ml) 至终浓度 0.5 mg/ml, 混匀, 加溶菌酶 (4 mg/ml) 2 μl, 50℃ 水浴 6 h; ③加入等体积酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 混匀 3~5 min, 离心, 取水相, 重复 ③ 2~3 次; ④取水相, 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc, RnaseA (10 mg/ml) 至终浓度 0.25~0.3 μg/μl, 37℃ 孵育 30 min; ⑤加 2.5 倍体积预冷的无水乙醇, 置 -20℃ 过夜; ⑥10 000 g, 离心 15 min, 沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次, 待乙醇挥发干净后, 加 20 μl 无菌三蒸水溶解, -20℃ 备用。

(2) PCR: 反应总体积为 50 μl, 其中 10 μmol/L P1 和 P2 各 1 μl; DNA 模板 1 μl。反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 再延伸 5 min。取 3~5 μl PCR 产物进行 2% 琼脂糖电泳, 紫外灯下见有大小为 317~332 bp 特异扩增带者为阳性。实验同时设阳性和阴性对照。

(3) PCR 扩增产物的纯化: 采用美国 Millipore 公司生产的 Ultrafree-DA, 按说明书从琼脂糖中回收 PCR 产物, -20℃ 冻存备用。

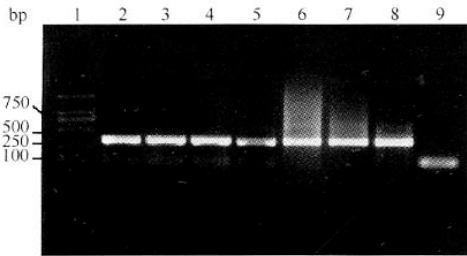
(4) Nested PCR 分型: PCR 反应条件同 1.2.2。以纯化的 PCR 产物为模板, 每份模板建立 5 个反应体系, 分别加入 5 个型特异性引物对 2 μl, 某一型引物对的 nested PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳, 紫外灯下见有相应的特异扩增带即为此型 Ot。

(5) 序列同源性和系统发育树分析: 根据 nested PCR 分型结果, 从首轮 PCR 阳性标本中选出 2 个代表株: XDM2、LHGM2, 将其首轮 PCR 扩增产物纯化后送上海生工生物公司, 采用双向测序法测得碱基序列。对获得的序列和部分 Ot 参考序列采用 BLAST 软件进行同源性分析。运用 Clustal X 1.8 软件对目标序列进行排列, 然后运行 PHYLIP 软件包中 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。

结 果

1. 首轮 PCR 扩增: 27 份标本提取的 DNA 经 Ot 种特异引物 P1 和 P2 扩增后, 18 份标本 (11 份恙螨分离株、7 份恙螨幼虫匀浆) 有预期的特异扩增带 (图 1 中仅显示 4 个代表株: XDM2、LHGM1、XUM2、LHGM2)。



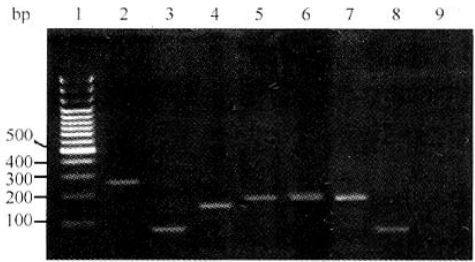
1: Marker (100 bp); 2: Gilliam 株; 3: Karp 株; 4: Kato 株; 5: XDM2 株; 6: LHGM1 株; 7: XUM2 株; 8: LHGM2 株; 9: 阴性对照
注: 由于本研究无法得到 Kawasaki 型标准株, 因此图中无 Kawasaki 型标准株的扩增结果

图1 Ot 种特异性引物 PCR 扩增产物 1.5% 琼脂糖电泳结果

2. Nested PCR 分型: 18 份阳性标本经 nested PCR 分型, 17 份 (图 2 中仅显示 4 个代表株: XDM2、LHGM1、XUM2、LHGM2) 为 Kawasaki 型, 1 份 LHGM2 株为 Karp 型 (表 1)。

3. 2 个代表株 Sta56 基因片段序列与国际参考株相应序列的比较: 同源性分析, XDM2 株首轮

PCR 产物碱基序列与 Kawasaki 型相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高, 为 97.00%, 应属于 Kawasaki 型; LHGM2 株首轮 PCR 产物碱基序列与 Karp 型相应 DNA 片段的碱基序列同源性最高, 为 96.45%, 另外 LHGM2 株与 Kuroki 株序列同源性也达到 88.78%。系统发育树分析: XDM2 株位于 Kawasaki 株所在的分支, 而 LHGM2 株则位于 Karp 株所在的支系 (图 3)。



1~9: 同图 1

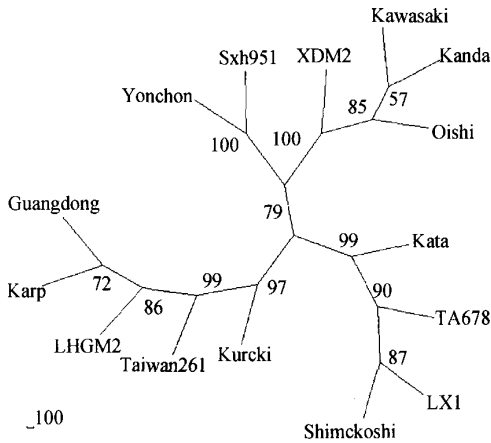
图2 Ot 型特异性引物 PCR 扩增产物 2% 琼脂糖电泳结果

讨 论

国内以往的有关研究主要集中于流行季节某种优势恙螨, 如南方夏季型恙虫病的媒介地理纤恙螨、北方秋冬型恙虫病媒介小盾纤恙螨, 对流行季节优势螨种以外的其他恙螨作为 Ot 媒介意义的研究较少。我们以前的调查结果表明^[8], 山东地区恙虫病新疫区在小盾纤恙螨密度高的月份 (9-11 月), 人群发病率高, 但在小盾纤恙螨不出现的月份, 亦有少数病例出现, 并从 4 种不同季节优势恙螨 (小盾纤恙螨、须纤恙螨、临淮岗纤恙螨、太平洋无前恙螨) 体内

表1 各类恙螨 Ot 分离株及恙螨幼虫匀浆标本 Ot-Sta56 基因检测与分型结果

标本类型	恙螨幼虫组数 (恙螨数)	分离株数	阳性的分离株数或匀浆组数	阳性标本编号	分离或收集时间	恙螨采集地	分离株或匀浆标本基因分型
小盾纤恙螨幼虫分离株	10 (1100)	4	4	XDM1	1996-11	费县	Kawasaki
				XDM2	1996-11	费县	Kawasaki
				XDM3	1996-11	费县	Kawasaki
				XDM4	1996-11	费县	Kawasaki
临淮岗纤恙螨幼虫分离株	4 (500)	2	2	LHGM1	1996-07	费县	Kawasaki
				LHGM2	1996-07	费县	Karp
太平洋无前恙螨幼虫分离株	4 (500)	2	2	TPM1	1996-07	费县	Kawasaki
须纤恙螨幼虫分离株	4 (471)	3	3	TPM2	1996-07	费县	Kawasaki
				XUM1	1997-01	费县	Kawasaki
				XUM2	1997-02	费县	Kawasaki
				XUM3	1997-03	费县	Kawasaki
小盾纤恙螨幼虫匀浆	5 (260)	-	3	XDMY1	2002-10	费县	Kawasaki
				XDMY2	1999-11	邹平	Kawasaki
				XDMY3	2002-11	费县	Kawasaki
临淮岗纤恙螨幼虫匀浆	6 (300)	-	2	LHGY1	2002-07	费县	Kawasaki
				LHGY2	2002-07	费县	Kawasaki
太平洋无前恙螨幼虫匀浆	3 (156)	-	1	TPY1	1997-07	费县	Kawasaki
须纤恙螨幼虫匀浆	2 (95)	-	1	XUMY1	2003-04	费县	Kawasaki



结点处数值为 1000 个 bootstrap 分析后的支持百分数。GenBank 中的序列号: Karp (M33004), Kato (M63382), Kawasaki (M63383), Kuroki (M63380), Shimokoshi (M63381), Yonchon (U19903), Sxh951 (AF050669), TA678 (U19904), Oishi (AF173037), Kanda (AF173039), LX-1 (AF173042), TW26-1 (AY222636), Guangdong (AY283180)

图3 基于 Sta56 基因片段部分序列构建 XDM2、LHGM2 与其他已知序列的恙虫病东方体的系统发育树

分离到 Ot,提示当地恙虫病除小盾纤恙螨作为主要传播媒介外,尚有其他螨种在非流行季节对 Ot 在野鼠间或在人间传播起媒介作用。本项研究在以往工作的基础上,对1995-2003年间从不同季节4种恙螨幼虫分离的 Ot 毒株或收集的恙螨幼虫提取 Ot DNA,采用 PCR 法进行检测与基因分型,结果除从分子水平证实恙虫病发病季节优势恙螨——小盾纤恙螨自然感染 Kawasaki 型 Ot 外,还发现当地恙虫病非流行季节的其他螨种——如须纤恙螨、临淮岗纤恙螨、太平洋无前恙螨也主要携带 Kawasaki 型 Ot,其中须纤恙螨、临淮岗纤恙螨和太平洋无前恙螨自然感染 Kawasaki 型 Ot 国内未见报道。推测这些螨种可能在恙虫病非流行季节对 Ot 在鼠间或在人间传播起一定的作用。这为探讨不同季节的恙螨作为恙虫病传播媒介的可能性提供了先决条件,并为进一步研究 Ot 在恙虫病非流行季节的贮存与转换方式提供了依据。

Iwasa 等^[9]对日本 Gifu 县南部恙虫病新流行区媒介研究,认为小盾纤恙螨是 Gilliam 株在人间流行的主要媒介,苍白纤恙螨可能是 Karp 株在野鼠间或偶尔在人间流行的媒介。Kawamari 等^[10]在富士山东麓恙虫病新流行区从当地病例中检测到3种血清型 Ot,研究结果认为小盾纤恙螨是主要传播媒介,苍白纤恙螨是次要媒介,分别传播 Kawasaki 型

和 Karp 型 Ot。但还有 Kuroki 型 Ot,故推测尚有媒介 Kuroki 型 Ot 恙螨起作用。Pham 等^[11]对日本 Oita 县恙虫病流行地区和非流行区收集的恙螨采用 PCR/RFLP 检测 Ot-Sta56 基因,结果从收集到的9种恙螨中的8种检测到 Ot,表明 Ot 在各种恙螨中广泛存在,并推测 Ot 在恙螨间存在水平传播。本研究不仅从恙虫病流行季节优势恙螨——小盾纤恙螨幼虫检测到 Ot-Sta56 基因,而且从非流行季节3种优势恙螨——须纤恙螨、临淮岗纤恙螨及太平洋无前恙螨中也检测到 Ot-Sta56 基因,该结果部分支持了这种观点。我们以前的研究结果已证实当地不同季节优势鼠种黑线姬鼠和大仓鼠体中存在 Ot 自然感染^[2]。由于本研究所采用的恙螨系从当地不同季节优势鼠种黑线姬鼠和大仓鼠体外收集到的,因而都具有相同种类的鼠宿主^[12]。这些不同种类的恙螨之间可能通过在共同的宿主上吸食形成水平传播,这可能是导致 Ot 在山东地区不同季节4种优势恙螨中广泛存在的原因。

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 Liu YX, Yang ZQ, Wu QY, et al. Epidemiological study of autumn-winter type scrub typhus in a new endemic focus of Feixian county, Shandong province, China. Systematic Appl Acarol, 2000, 5: 25-31.
- 3 Stover CK, Marana DP, Carter JM, et al. The 56-kilodalton major protein antigen gene of *Rickettsia tsutsugamushi*: molecular cloning and sequencing analysis of the Sta56 gene and precise identification of a strain-specific epitope. Infect Immun, 1990, 58: 2076-2084.
- 4 Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, et al. Cloning and sequencing of the gene (tsg56) encoding a type-specific antigen from *Rickettsia tsutsugamushi*. Gene, 1990, 91: 119-122.
- 5 Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, et al. Diversity of immunodominant 56-kDa type specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. J Biol Chem, 1992, 267: 12728-12735.
- 6 郭恒彬, 吴光华, 唐家琪, 等. 应用 nPCR 发现我国 Kawasaki 型恙虫病立克次体. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11: 22-24.
- 7 陈香蕊, 主编. 恙虫病和恙虫病东方体. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2001. 176-179.
- 8 杨占清, 于晓敏, 刘运喜, 等. 济南东郊秋冬季恙虫病临床流行病学调查研究. 中华流行病学杂志, 1997, 18: 233-235.
- 9 Iwasa M, strickman D, Eamsila C, et al. *Trombiculid* mites and *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from wild rodents in a new endemic area of Japan. J Med Entomol, 1990, 27: 155-158.
- 10 Kawamari F, Akiyama M, Sugieda M, et al. Epidemiology of tsutsugamushi disease in relation to the serotypes of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from patients, field mice and unfed chiggers on the eastern slope of mount Fuji, Shizuoka prefecture, Japan. J Clin Microbiol, 1992, 30: 2842-2846.
- 11 Pham XD, Otsuka Y, Suzuki H, et al. Detection of *O. tsutsugamushi* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) in unengorged chiggers (Acari: Trogilidae) from Oita prefecture, Japan, by nested polymerase chain reaction. J Med Entomol, 2001, 38: 308-311.
- 12 刘运喜, 赵仲堂, 吴钦永, 等. 山东部分地区小兽类寄生恙螨群落结构的初步研究. 动物学杂志, 2004, 39: 62-65.

(收稿日期: 2005-10-21)

(本文编辑: 张林东)