

· 实验研究 ·

山东地区恙虫病东方体分离株的基因分型与序列分析

杨丽萍 赵仲堂 刘运喜 冯月秋 王显军 李忠

【摘要】 目的 鉴定山东地区恙虫病东方体分离株的基因型别,分析其核苷酸序列。方法 以日本、韩国常用的恙虫病东方体分型引物,用巢式 PCR 技术检测恙虫病东方体分离株的相对分子质量 (M_r) 56×10^3 蛋白基因片段,对群引物扩增的 PCR 产物纯化回收后测序,并行序列分析。结果 Gilliam、Karp、Kato、山东分离株用群引物均扩增出 481~507 bp 的目的片段,Gilliam、Karp、Kato 经相应的型引物扩增出了目的片段。山东分离株仅 Kawasaki 型的分型引物扩增出目的条带,序列分析证实山东分离株与 Kawasaki 型相似。结论 在国内首次扩增出 Gilliam、Karp、Kato 三型标准株,山东地区恙虫病东方体分离株为 Kawasaki 型;山东地区恙虫病东方体与日本的 Kawasaki 型相似,两者有较近的亲缘关系。

【关键词】 恙虫病东方体;基因分型;序列分析

Genotype identification and sequence analysis of *Orientia tsutsugamushi* isolated from Shandong area
 YANG Li-ping*, ZHAO Zhong-tang, LIU Yun-xi, FENG Yue-qiu, WANG Xian-jun, LI Zhong.
 *Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University,
 Jinan 250012, China

Corresponding author: ZHAO Zhong-tang, Email: ztzhao@sdu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine genotype, nucleotide sequence homology and phylogenesis of *Orientia tsutsugamushi* isolated from Shandong, China. **Methods** *Orientia tsutsugamushi* isolated from patients, *Apodemus agrarius* and *Leptotrombidium scutellare* in Shandong area were identified by nested-PCR. On the basis of the nucleotide sequence of the gene that encoding the Ot M_r 56×10^3 antigen, the primers were frequently used in Japan and Korea. Nucleotide sequences of three isolates were determined. The DNA sequences were compared with nucleotide sequences of *Orientia tsutsugamushi* registered in GenBank for sequence homology analysis. Phylogenetic analysis of the isolates and some published sequences was carried out with Neighbor-joining method by MEGA 3.1 software. **Results** 481-507 bp DNA fragments encoding *Orientia tsutsugamushi* M_r 56×10^3 protein were amplified successfully in the samples of Gilliam, Karp, Kato and Shandong isolates by group-specific primers. The corresponding target fragments of the three international reference strains of Gilliam, Karp, and Kato were amplified successfully with each of their own type specific primers. 523 bp DNA fragments were amplified successfully from Shandong isolates by the nPCR with Kawasaki-specific primer, and no DNA fragment was amplified by the nPCR with Gilliam, Karp, Kato, Kuroki and Saitama-specific primer. Comparing with the sequences of *Orientia tsutsugamushi* registered in GenBank, all the Shandong isolates shared higher than 95% nucleotide sequence homology with Kawasaki strain founded in Japan. Data from phylogenetic analysis showed that Shandong isolates belonged to the same branch with Kawasaki strain. **Conclusion** To facilitate international comparison and communication, the primers should be employed in the *Orientia tsutsugamushi* research in China. *Orientia tsutsugamushi* isolated in China were similar to Kawasaki strain in Japan.

【Key words】 *Orientia tsutsugamushi*; Genotyping; Sequence analysis

恙虫病是恙虫病东方体 (*Orientia*

tsutsugamushi, Ot)引起的自然疫源性疾病。疫区不断扩大是当前我国恙虫病流行趋势,已有 22 个省市区发现病例或感染者,根据动物地理资料预测,我国恙虫病疫源地决不限于上述地区,凡有 *Rattus* 属野生型存在的地区都有可能存在恙虫病疫源地^[1]。有关 Ot 基因型的研究,由于各地所用引物各异,使恙虫病病原体的比较、分析有一定困难。为便于恙

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371237);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20030422017)

作者单位:250012 济南,山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学研究所(杨丽萍、赵仲堂、冯月秋);北京军事医学科学院流行病与微生物学研究所(刘运喜);山东省疾病预防控制中心(王显军、李忠)

通讯作者:赵仲堂, Email: ztzhao@sdu.edu.cn

虫病研究成果的国际比较与分析,本文采用的恙虫病东方体表面蛋白(Ot sta) $M_r 56 \times 10^3$ 基因编码区的群、型特异引物,在日本、韩国的恙虫病研究中常用。我们用 Gilliam、Karp、Kato 3 株国际参考株来验证这些引物的群、型特异性,同时对分离自山东地区恙虫病疫区患者、黑线姬鼠和小盾纤恙螨的 Ot 分离株进行了 nPCR 检测与分型研究,并对山东 Ot 分离株进行了核酸序列分析。

材料与方 法

1. 参考株和分离株: Gilliam、Karp、Kato 3 株国际参考株。4 株山东地区 Ot 分离株中, 2 株分离自恙虫病病例 (WG, FC), 1 株分离自黑线姬鼠 (HXS), 另 1 株分离自小盾纤恙螨 (XDM)。

2. 主要试剂: Ex Taq PCR 试剂盒和 DL2000 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品, PCR 产物凝胶回收试剂盒为 Omega 公司产品, 其他化学试剂均为分析纯以上国产试剂。

3. 引物: 参照 Furuya 等^[2] 及 Tamura 等^[3] 设计的 Ot sta $M_r 56 \times 10^3$ 型特异引物, 包括外引物和内引物, 其中内引物又可分为群特异引物和型特异引物, 由上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成。其中, P34、P55 为外引物, P10、P11 为群特异引物。P10 分别与型特异引物 PGL、PKP、PKT、PKR、PHSB 配成 Gilliam、Karp、Kato、Kuroki、Saitama 等型引物对; P11 与 PKW 构成 Kawasaki 型引物对。具体序列及 PCR 产物大小见表 1。

表1 研究应用的引物

引物来源	引物对	引物序列 (5'~3')	扩增片段 (bp)
外引物	P34	tca agc tta ttg cta gtg caa tgt ctg c	1003
	P55	agg gat ecc tgc tgc tgt gct tgc tgc g	
群特异引物	P10	gat caa gct tcc tca gcc tac tat aat gcc	481~507
	P11	cta ggg atc ccg aca gat gca cta tta ggc	
Gilliam	P10	gat caa gct tcc tca gcc tac tat aat gcc	407
	PGL	ctt tat atc act ata tat ctt	
Karp	P10	gat caa gct tcc tca gcc tac tat aat gcc	230
	PKP	aca ata tcg gat tta taa cc	
Kato	P10	gat caa gct tcc tca gcc tac tat aat gcc	242
	PKT	gaa tat tta ata gca ctg ga	
Kuroki	P10	gat caa gct tcc tca gcc tac tat aat gcc	220
	PKR	cac egg att tac cat at	
Saitama	P10	gat caa gct tcc tca gcc tac tat aat gcc	600
	PHSB	ctg acc tct tet aat agc tc	
Kawasaki	P11	cta ggg atc ccg aca gat gca cta tta ggc	523
	PKW	atg ctg cta ttg ata cag gc	

4. Ot-DNA 的提取: 取分离株传代小鼠脾脏约 0.3 g 于 Eppendorf 管内, 剪碎加 800 μ l 1 \times TE 缓冲液, 离心, 取沉淀; 加 500 μ l 裂解缓冲液, 13 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml), 2.5 μ l 溶菌酶 (4 mg/ml), 55 $^{\circ}$ C 过夜; 加入等体积酚/氯仿/异戊醇提取 DNA, TE 溶解, -20 $^{\circ}$ C 备用。

5. nPCR 反应:

(1) Ot 检测: 第一次 PCR 使用引物 P34 和 P55, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 2 min, 70 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。第二次 PCR 将引物改为 P10 和 P11, 用第一次 PCR 产物为模板, 其他反应成分及条件同第一次 PCR。取第二次 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 有 481~507 bp 带者为阳性。

(2) 分型: 检测出阳性标本的第一次 PCR 产物 1 μ l, 分别加入 Gilliam、Karp、Kato、Kuroki、Kawasaki 和 Saitama 6 对 Ot 型特异性引物对, 其他反应成分及条件同第一次 PCR 扩增。进行琼脂糖凝胶电泳, 某一型引物对中见相应 bp 扩增带即为某一型 Ot。

6. 核酸序列测定: 根据 nPCR 分型结果, 选出 3 个代表株: WG、HXS、XDM。将其第二次 PCR 产物纯化回收后作为序列测定的模板。以 P10 作为序列测定的引物, 采用双脱氧末端终止法, 在 ABI3730 测序仪上进行序列测定。

7. 序列同源性分析和系统进化树分析: 将所测序列与 GenBank 中 Ot 的核苷酸序列做 BLAST 比较与分析。应用 MEGA 3.1 软件中的 Neighbor-joining (NJ) 法, 1000 次的 Bootstrap 分析重复数, 对所测到的序列与 GenBank 中一些 Ot 株的相应序列进行系统发生树分析。

结 果

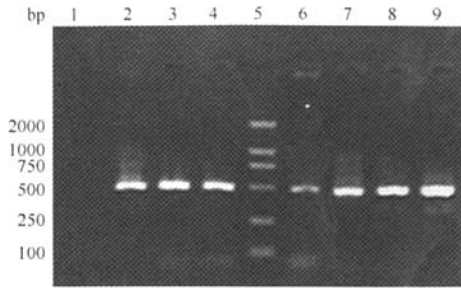
1. Ot 检测: 3 株国际参考株和 4 株山东地区 Ot 分离株, 经群特异引物扩增, 均见有 481~507 bp 的扩增带 (图 1)。

2. Ot 分型: 3 株国际参考株 Ot 分别经型引物扩增出相应条带 (Gilliam: 407 bp; Karp: 230 bp; Kato: 242 bp), 型与型之间无交叉扩增; 4 株山东分离株只发现在 Kawasaki 型的引物管中有 523 bp 的扩增带, 其他 5 对分型引物未见扩增带 (图 2)。

3. 测序: WG 株的 GenBank 核苷酸序列号为 DQ489310, 长 438 bp。分离自黑线姬鼠和小盾纤恙

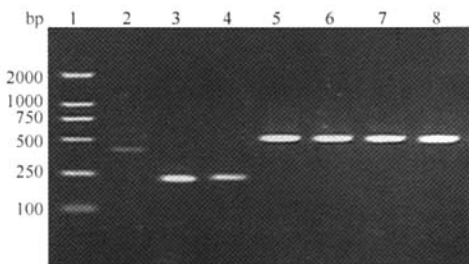
螨的碱基长度分别为 438 bp 和 435 bp, 与 DQ489310 的碱基差异如下(黑斜体标示):

HXS : 1 GATCGTG·····GTCGGGATCCC(434) **TAGA**
 DQ489310 1 ATCGTG·····GTCGGAAATCCC(433) **CTAGA**
 XDM 1 CGTGA·····GTCGG(425) **GTACCCTAGA**
 DQ489310 1 ATCGTGA·····GTCGG(427) **AATCCCTAGA**



1: 阴性对照; 2: Gilliam; 3: Karp; 4: Kato; 5: Marker(DL2000); 6: FC; 7: WG; 8: HXS; 9: XDM

图1 群特异引物 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳



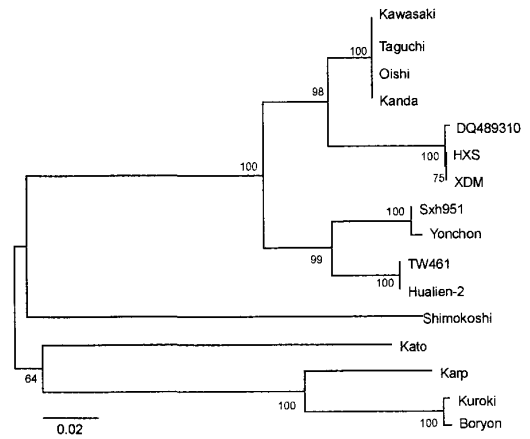
1: Marker(DL2000); 2: Gilliam; 3: Karp; 4: Kato; 5: FC; 6: WG; 7: HXS; 8: XDM

图2 型引物 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

4. 同源性分析和系统进化树分析: 将各分离株的核苷酸序列在 NCBI 行 BLAST, 结果显示: WG(DQ489310) 与 Taguchi 和 Oishi 型的同源性均为 95.99%; 与 Kanda 和 Kawasaki 型的同源性为 95.75%。HXS 与 Taguchi 和 Oishi 型的同源性为 96.00%; 与 Kanda 和 Kawasaki 型的同源性为 95.76%。XDM 与 Taguchi 和 Oishi 型的同源性为 95.97%; 与 Kanda 和 Kawasaki 型的同源性为 95.73%。3 株 Ot 分离株与其他 Ot 基因型的同源性均低于 92%。系统发生树分析显示, 山东地区 Ot 分离株与 Kawasaki、Taguchi、Oishi 和 Kanda 株在同一分支(图 3)。

讨论

Ot sta M₁ 56 × 10³ 与 Ot 的致病性和毒力有关,



GenBank 中的序列号: Karp (M33004), Kato (M63382), Kawasaki (M63383), Kuroki (M63380), Shimokoshi (M63381), Boryon(L04956), Sxh951(AF050669), Yonchon(U19903), Taguchi (AF173038), Oishi (AF173037), Kanda (AF173039), TW461 (AY222631), Hualien-2(AY525145)

图3 山东地区 Ot 分离株与部分 Ot sta M₁ 56 × 10³ 基因序列的系统发生树(NJ法)

含有组和株抗原决定簇, 最能反映 Ot 型的本质差异^[4]。此次研究采用了日本、韩国恙虫病研究中的常用引物, 我们在国内首次用这些序列成功扩增了 Gilliam、Karp、Kato 3 型标准株, 并鉴定出山东地区恙虫病东方体为 Kawasaki 型; 可见这些引物具有很好的群、型特异性, 在中国的恙虫病研究中可采用, 以便于国际比较与分析。

Ohashi^[4] 报道, 日本的 Kawasaki 和 Kuroki 型 Ot 为无毒力或弱毒力, 其主要传播媒介均为小盾纤恙螨, 与山东地区 Ot 流行株的 LD₅₀ 在 0 ~ 10^{-1.875} 之间^[5], 山东秋冬型恙虫病的主要传播媒介为小盾纤恙螨^[5,6] 相符。刘运喜等^[7] 也曾证实山东地区 Kawasaki 型 Ot 是流行优势株。本研究用 2 对 Ot sta M₁ 56 × 10³ 群特异性引物成功扩出了山东地区 Ot 分离株; 用 6 对型特异引物经 nPCR 扩增, 仅见 Kawasaki 引物对的扩增产物中有 523 bp 的扩增带。群引物扩增的 3 株 Ot 分离株的 PCR 产物纯化回收后测序, 其核苷酸序列与 Kawasaki、Taguchi、Oishi 和 Kanda 型的同源性均在 95% 以上; 系统发生树结果表明, 山东地区 Ot 分离株与 Kawasaki、Taguchi、Oishi 和 Kanda 株在同一分支(图 3)。另外, 将 Kawasaki 型的序列在 NCBI 行 BLAST 后, 发现 Kanda 型与其同源性达 100%, Taguchi 型为 99.90%, Oishi 型为 99.79%; 这些均为在日本发现的 Ot 型, 其中 1993 年发现了 Kawasaki 型,

Taguchi, Oishi 和 Kanda 型均发现于 1999 年, 可见 Kawasaki 型是这些 Ot 型的代表。为此从媒介、毒力、流行季节以及基因水平均表明山东地区 Ot 流行株与日本 Kawasaki 株相似, 两者有较近的亲缘关系。

郭恒彬等^[8]报道, 我国江苏省也存在 Kawasaki 型, 且与山东省恙虫病立克次体毒力相似, 均属弱毒株。江苏省 Ot 分离株与日本 Kawasaki 型的同源率为 96.87%^[8], 而山东省 Ot 分离株与日本 Kawasaki 型的同源率为 95.75%。可见, 山东省和江苏省的 Ot 分离株均类似于 Kawasaki 型。Ot 基因的变异是否与中国恙虫病疫源地自南向北扩散有关, 有待进一步研究。

参 考 文 献

1 于恩庶, 陈香蕊, 吴光华, 主编. 中国恙虫病研究. 香港: 亚洲医

药出版社, 2000.

2 Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, et al. Serotype-Specific Amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by Nested Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 1637-1640.

3 Tamura A, Yamamoto N, Koyama S, et al. Epidemiological Survey of *Orientia tsutsugamushi* Distribution in Field Rodents in Saitama Prefecture, Japan, and Discovery of a New Type. *Microbiol Immunol*, 2001, 45: 439-446.

4 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.

5 杨占清, 刘运喜, 于晓敏, 等. 山东省秋冬型恙虫病自然疫源地调查. *中华流行病学杂志*, 2000, 21: 283-286.

6 王显军, 王勤忠, 李忠. 山东省恙虫病研究. *中国人兽共患病杂志*, 2003, 19: 95-97.

7 刘运喜, 赵仲堂, 高媛, 等. 应用 PCR/RFLP 对山东地区恙虫病的基因型分析. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20: 71-74.

8 郭恒彬, 唐家琪, 李先富, 等. 我国新型恙虫病立克次体目标基因 PCR/RFLP 和序列分析研究. *中国公共卫生学报*, 1997, 16: 193-196.

(收稿日期: 2006-04-27)

(本文编辑: 王多春)

• 疾病控制 •

87 例孕妇狂犬病暴露后接种狂犬疫苗对孕妇影响的研究

刘琼芳

为探讨孕妇在狂犬病毒暴露后接种狂犬疫苗的免疫效果及对胎儿的影响, 对 2000-2005 年前来咸宁市疾病预防控制中心免疫接种门诊求治的 87 例被疯动物和疑似疯动物致伤的孕妇进行追踪观察, 暴露分级按 WHO 疯动物致伤程度分级标准进行^[1]。对伤者的伤口常规冲洗消毒、全程足量接种狂犬疫苗、对Ⅲ类暴露者加用狂犬病人免疫球蛋白, 狂犬疫苗剂量由 5 支增至 9 支。于每针接种后 24、48、72 h 观察局部和全身反应。人用纯化狂犬疫苗分别由长春生物科技股份有限公司和赛诺菲·巴斯德公司生产; 狂犬病人免疫球蛋白由卫生部武汉生物制品研究所生产, 在有效期内严格按说明书要求使用。全程接种后 45-50 d 进行血清抗体检测。建立孕妇接种档案, 追踪观察至胎儿出生, 观察记录流产、死胎、先天缺陷情况, 并随访观察 8 个月。

结果与分析: 87 例孕妇中, 66 例为初次妊娠, 21 例为多次妊娠; 年龄在 22-38 岁; 83 例妊娠 2-8 个月, 有 4 例咬伤发生在临产前。按暴露严重程度分类, Ⅱ类暴露 82 例, Ⅲ类暴露 5 例。在接种疫苗的 87 例孕妇中, 有 15 例发生局部反应, 发生率为 17.24%; 同时有 87 名普通人群接种疫苗后局部反应 14 例, 发生率为 16%, 孕妇与普通人群无明显差别。有 5 例Ⅲ类暴露孕妇接种狂犬病人免疫球蛋白, 其中 1 例在接种的第 2 d 出现发热(37.5℃), 48 h 后恢复正常。对 87 例

孕妇全程接种后 45-50 d 采集静脉血测定抗狂犬病毒中和抗体, 结果血清抗体全部阳转, 阳转率为 100%, GMT 为 11.2 IU/ml。孕妇在接种狂犬疫苗后虽有少数发生局部反应, 但反应轻微。与普通人群接种疫苗后反应发生率没有差异; 87 例孕妇中, 只有 1 例发生低热, 未经任何处理在 48 h 后恢复正常。世界卫生组织提示, GMT ≥ 0.52 IU/ml 血清抗体滴度具有保护性^[2]。本组孕妇接种狂犬疫苗中和抗体阳转率达 100%, 说明免疫效果良好。迄今国内外尚未见到有关孕妇因接种狂犬疫苗而导致胎儿损害的报道。本次研究显示, 流产、死胎、死产、先天缺陷和畸形的发生率为零。表明目前使用的人用纯化狂犬疫苗对孕妇和胎儿均安全, 怀孕不应作为狂犬疫苗接种的禁忌症。孕妇作为特殊群体在受到动物攻击后反应较为强烈, 出现惊吓、恐惧、焦虑, 担心注射疫苗后会损伤胎儿。如果不及时解决这些问题, 患者难以配合治疗。这就需要医生耐心解释、正确引导, 介绍接种疫苗的重要性与安全性, 消除她们的紧张、焦虑、恐惧不安心理, 及时得到治疗。

参 考 文 献

1 彭文伟. 传染病学. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 43-46.

2 贾芙蓉, 卢天林, 杜双兰, 等. 狂犬病疫苗的血清学效果观察. *中国人兽共患病杂志*, 1989, 5(6): 41-42.

(收稿日期: 2006-09-15)

(本文编辑: 尹廉)