

· 现场调查 ·

河南省信阳地区鼠类感染立克次体的调查

付秀萍 张景山 申晓靖 栾明春 李孟磊 张丽娟

【摘要】 目的 了解河南省信阳疫区鼠类中恙虫病东方体、斑点热及斑疹伤寒立克次体感染状况。方法 采用巢式-聚合酶链反应(nested-PCR),对信阳市淮滨县捕获的家鼠肝、脾、肾、血液标本进行扩增恙虫病东方体、斑点热群及斑疹伤寒群立克次体热休克蛋白(groEL)基因并测序分析。采用间接免疫荧光方法(IFA)对家鼠血清标本进行斑疹伤寒病原体、恙虫病东方体特异抗体检测。结果 共捕获鼠 62 只,其中内脏标本中检出恙虫病东方体 10 份(16.13%),斑疹伤寒立克次体 5 份(8.06%),斑点热群立克次体 4 份(6.45%);血液标本中检出恙虫病东方体 5 份(8.06%),斑疹伤寒群立克次体 4 份(6.45%),斑点热群立克次体 1 份(1.61%)。有 5 份标本同时检出恙虫病和斑疹伤寒,复合感染率为 8.06%。在鼠内脏标本中检测到 2 株蚤传斑点热病原体 *R. felis*。用 IFA 检测 26 份鼠血清抗体,3 份恙虫病阳性(11.5%)。结论 信阳地区啮齿动物宿主鼠类标本中检测出恙虫病东方体、斑点热群和斑疹伤寒群立克次体,存在复合带菌状况,鼠血清恙虫病东方体特异抗体流行率较高。

【关键词】 立克次体;巢式-聚合酶链反应;间接免疫荧光;疫源地

Surveillance on Rickettsia in epidemic areas of scrub typhus in Xinyang areas of Henan province FU Xiu-ping*, ZHANG Jing-shan, SHEN Xiao-jing, LUAN Ming-chun, LI Meng-lei, ZHANG Li-juan. *Rickettsia Disease Department, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: ZHANG Li-juan, Email: zhanglijuan@icdc.cn

【Abstract】 Objective To understand the epidemic status of *Rickettsia* in Xinyang areas of Henan province. **Methods** Samples including liver, spleen, kidney from mouse and chigger mites from Xinyang areas and serum samples were detected by nested-polymerase chain reaction (PCR) and indirect immunofluorescence assay (IFA). **Results** In 62 viscous samples from mice organs, the positive rates were 16.13%, 8.06% and 6.45% for *Orientia tsutsugamushi*, *R. typhi* and *Spotted fever group rickettsiae* respectively. In blood clots samples from mice, the positive rates were 8.06%, 6.45% and 1.61% for *O. tsutsugamushi*, *R. typhi* and *Spotted fever group rickettsiae* respectively. Three out of 26 mouse serum samples were positive for the predicted fluorexcent intensity *O. tsutsugamushi*. **Conclusion** Using nested-PCR and IFA methods, *O. tsutsugamushi*, *R. typhi* and *Spotted fever group rickettsiae* were detected in the captured mice living in Xinyang areas of Henan province. Results showed that there were intensive natural reservoirs of *Rickettsia* in Henan province, suggesting that the risk of outbreak of *Rickettsia* in these areas was high.

【Key words】 *Rickettsia*; Nested-polymerase chain reaction; Indirect immunofluorescence assay; Natural foci

恙虫病是由恙虫病东方体引起的一种自然疫源性疾病,主要传染源为啮齿类动物,传播媒介为恙螨。我国恙虫病分布广泛,且新疫区不断出现^[1,2];有 24 个省(市、自治区)发现或证实存在恙虫病。2005 年 10 月河南省首次报道有恙虫病的流行。为了进一步了解河南省恙虫病疫区动物宿主带菌状

况,应用分子生物学方法对当地采集的鼠脏器及血清标本进行了研究。

材料与方 法

1. 疫源地概况:信阳市淮滨县位于河南省东南部,大陆性气候;年平均气温 15℃,平均降水量 926 mm,全年无霜期 224 d;雨量充沛,空气湿润。疫区地处淮河、洪河冲积三角地带,有纵横分布的河沟,潮湿低凹地。劳动力主要以种植业为主。

2. 捕鼠及标本处理:2006 年 6-8 月,在居民居

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(付秀萍、张景山、栾明春、张丽娟);河南省疾病预防控制中心(申晓靖、李孟磊)

通讯作者:张丽娟,Email: zhanglijuan@icdc.cn

住地用鼠笼法捕捉家鼠 62 只。鉴定鼠种并编号,其中褐家鼠 24 只,占 38.7%;黄胸鼠 15 只,占 24.2%;小家鼠 23 只,占 37.1%。鼠经乙醚麻醉,取心血标本 26 份。无菌解剖鼠取其肝、脾、肾等标本, -20℃ 保存。检测时将鼠内脏在生理盐水中洗 3 次,每份标本中加入 0.5 ml SPG 研磨器中研磨,然后加入 0.5 ml SPG 冲洗研磨器。将研磨液保存在 1.5 ml 无菌离心管中,待提 DNA。

3. 试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶试剂盒和 dNTPs 购自北京赛百盛基因技术有限公司。PCR 扩增仪 (MJ Research 公司, PTC-100TM), 水平电泳仪 (DYY-6 型, 北京六一仪器厂), 凝胶成像仪 (Alpha Innotech 公司, AlphaImager TM), 离心机 (5417C 型, Eppendorf 公司), 荧光显微镜 (Nikon Eclipse 50i)。

4. 提取 DNA: 采用 QIAGEN 组织标本提取 DNA 试剂盒, 按说明书操作。血液、内脏悬液起始量为 150 μl。以无菌水代标本进行同样操作作为 PCR 阴性对照。莫氏立克次体 DNA、恙虫病东方体 Kato 株 DNA 以及西伯利亚斑点热立克次体 (*R. sibirica*) 作为 PCR 阳性对照 (WHO 立克次体协作中心提供, 法国, 马赛)。

5. 巢式 PCR 扩增及测序: 根据斑疹伤寒群、斑点热群立克次体及恙虫病东方体热休克蛋白 (*groEL*) 基因保守区设计通用外引物 (*R. rickettsia* U96733), 序列为: 外引物 P1: 5'-AAG AAG GA/C GTG ATA AC-3', P2: 5'-ACT TCA/ CGT AGC ACC-3'。立克次体属、恙虫病东方体属病原体分别扩增得到 649 bp 和 661 bp 片段。两对 PCR 内引物参照文献 [3, 4], 引物序列为: SF1: 5'-GAT AGA AGA AAA GCA ATG ATG-3', SR2: 5'-GAT AGA AGA AAA GCA ATG ATG-3', TF1: 5'-ATA TAT CAC AGT ACT TTG CAA C-3', TR2: 5'-GTT CCT AAC TTA GAT GTA TCA T-3'; 其中 SF1、SR2 与斑疹伤寒群和斑点热群立克次体 *groEL* 基因特异结合, 均扩增出 217 bp 片段。TF1、TR2 与恙虫病东方体属 *groEL* 基因特异结合可扩增出 364 bp 片段。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。第 1 次 PCR 反应体系: 10×Taq 酶缓冲液、PCR 染料、通用外引物 1 及 2 (10 pmol/μl) 各 2 μl, dNTPs (10 mmol/L) 0.2 μl, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.3 μl, DNA 模板 1 μl 加水至 20 μl。94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 40 s, 45℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s,

共计 39 个循环, 72℃ 总延伸 4 min。第 2 次 PCR 反应体系: 10×Taq 酶缓冲液、PCR 染料各 2.5 μl, 引物 SF1、SR2、TF1、TR2 (10 pmol/μl) 各 1 μl, dNTPs (10 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 各 0.5 μl, 模板为上次 PCR 产物 1 μl, 用水补足至 25 μl。94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 35 s, 56℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 35 s, 共计 39 个循环, 72℃ 总延伸 4 min, 1.5% 琼脂糖-溴化乙锭凝胶中电泳, 观察结果, 产物送上海生工生物工程有限公司商业测序。

6. 序列分析: 采用 NCBI Blast 进行同源比较。利用 DNASTAR, MegAlign 分析软件对不同检出序列进行树状分析。

7. 血清学检测: 采用 WHO 推荐的间接免疫荧光方法 (IFA)。用密度梯度离心的莫氏立克次体 W 株制备斑疹伤寒立克次体抗原片, 恙虫病东方体 Karp 株和 Gillam 株混合菌液制备恙虫病东方体抗原片。兔阳性对照血清为本研究室制备。将待检血清倍比稀释后, 按照常规 IFA 操作 [5]。

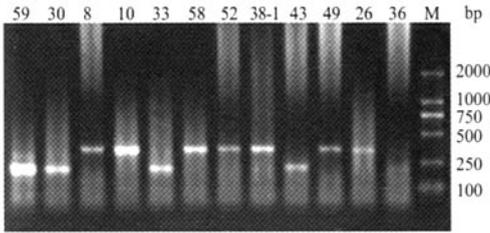
结 果

1. PCR 检测结果: 本次调查共检测 62 只鼠内脏标本, 其中 10 份检出恙虫病东方体, 阳性率为 16.13%; 5 份血液标本中检出恙虫病东方体, 阳性率为 8.06%。另外还检出斑点热和斑疹伤寒群立克次体片段, 内脏标本中 5 份检出斑疹伤寒和 4 份检出斑点热群立克次体, 阳性率分别为 8.06% 和 6.45%。血液标本中 4 份检出斑疹伤寒和 1 份检出斑点热群立克次体, 阳性率分别为 6.45% 和 1.61%, 结果见表 1。用巢式 PCR 方法检测, 有的标本可同时检测出斑疹伤寒和恙虫病以及斑点热和恙虫病, 共有 5 份, 其复合感染率为 8.06%。

表 1 鼠内脏标本恙虫病东方体和斑疹伤寒及斑点热群立克次体 PCR 检测结果

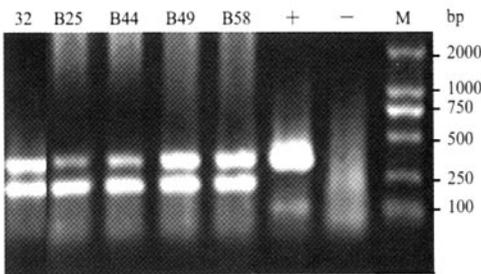
鼠标本	检查只数	斑疹伤寒		斑点热		恙虫病	
		份数	感染率 (%)	份数	感染率 (%)	份数	感染率 (%)
内脏							
褐家鼠	24	2	8.33	2	8.33	5	20.83
黄胸鼠	15	1	6.67	2	13.33	1	6.67
小家鼠	23	2	8.70	0	0	4	17.39
合 计	62	5	8.06	4	6.45	10	16.13
血液							
褐家鼠	24	2	8.33	0	0	3	12.50
黄胸鼠	15	1	6.67	1	6.67	1	4.17
小家鼠	23	1	4.35	0	0	1	4.35
合 计	62	4	6.45	1	1.61	5	8.06

2. 测序结果:将 PCR 产物测序所得序列用 DNASTar 中的 MegAlign 软件做进化树分析,结果见图 3、4。



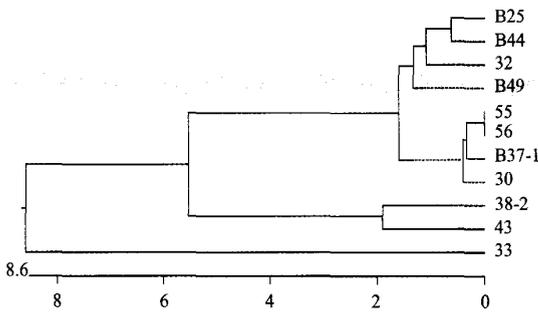
注:M:Marker DL2000; 数字为鼠标本编号

图1 部分鼠脏器标本 PCR 检测结果



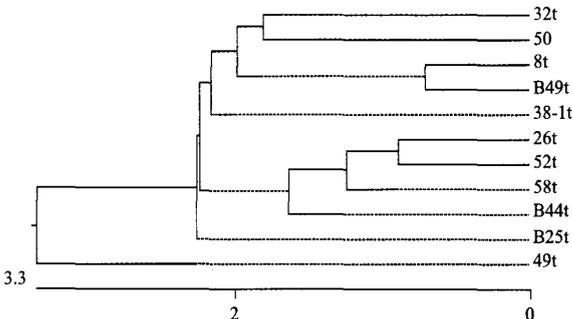
注:M:Marker DL2000; 数字为鼠标本编号,编号中 B 表示血液标本,无 B 的为内脏标本

图2 部分鼠标本复合带菌 PCR 检测结果



注:右侧数字为鼠标本编号,其中 B 表示血液标本,无 B 的为内脏标本

图3 斑疹伤寒群和斑点热群立克次体序列进化树分析



注:同图 3

图4 恙虫病东方体序列进化树分析

3. IFA 检测结果:实验共检测鼠血清标本 26 份,以 1:8 为阳性滴度,斑疹伤寒和斑点热群立克次体未检出阳性结果,其中恙虫病东方体特异抗体 $\geq 1:8$ 阳性者 3 份。

讨 论

在河南省信阳地区送检的鼠标本内脏组织和血标本中分别检测到恙虫病东方体 DNA。说明生态环境条件不断改变的情况下,该地区具备了恙虫病自然疫源地的基础,使恙虫病的流行成为可能。另外,在送检的鼠类内脏标本和血标本中,检测到斑点热和斑疹伤寒群立克次体 DNA 片段,说明除恙虫病外,该地区具备斑疹伤寒和斑点热自然疫源地的必要条件,有可能发生这 2 种病的暴发,应加强监控力度。

值得注意的是,在鼠血液和内脏标本中都出现复合感染的情况,说明同一只鼠中可以携带多种立克次体病原体,在传播条件成熟的情况下,可以引起人间复合感染流行。本实验用 IFA 方法检出 3 份阳性标本,但与 PCR 方法所检出的阳性标本无重合。因此,立克次体疾病监测中,血清学方法与分子生物学方法相结合可起到提高阳性检测率的目的。

在扩增的斑疹伤寒群和斑点热群立克次体序列中,标本 33、43、38-2 用 BLAST 比对时,结果证实为斑点热序列,33 号标本与 *R. bellii* 同源性达 99%,而 43 和 38-2 标本同蚤传斑疹伤寒立克次体热休克蛋白基因序列同源性最高,由此提示信阳地区可能存在该病原体的感染流行。测序的恙虫病东方体序列中,所得到的 11 个标本的序列均与恙虫病东方体 Kato 株同源性最高 ($\geq 97\%$)。进化树所描述的进化关系中,同目前所知的资料如标本来源鼠种、标本类型、采集时间、采集地点等都没有相关关系,有待进一步探讨。

(感谢福建省疾病预防控制中心周淑娟及何似研究员对恙螨标本分类鉴定的帮助)

参 考 文 献

- [1] 张丽娟,付秀萍,范明远. 我国立克次体研究与立克次体病的流行现状. 热带病与寄生虫学, 2005, 3(1): 37-42.
- [2] 李静,李晓燕,刘运喜. 我国恙虫病流行病学及其传播媒介研究进展. 实用预防医学, 2005, 12(5): 1251-1253.
- [3] Lee JH, Park HS, Jang WJ, et al. Differentiation of *Rickettsia* by *groEL* gene analysis. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 2952-2960.
- [4] Park HS, Lee JH, Jeong EJ, et al. Rapid and simple identification of *Orientia tsutsugamushi* from other group *Rickettsia* by duplex PCR assay using *groEL* gene. Microbiol Immunol, 2005, 49(6): 545-549.
- [5] Tissot-Dupont H, Thirion X, Raoult D. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. Clin Diag Lab Immunol, 1994, 1: 189-196.

(收稿日期:2007-01-05)

(本文编辑:尹廉)