

广东省斑点热群立克次体自然疫源地调查

何剑峰 郑夔 黎薇 罗会明 李灵辉 毕德增 张远富 常炳功

【摘要】 目的 了解广东省是否存在斑点热自然疫源地。方法 用血清流行病学方法调查广东省人群、宿主动物感染状况;用聚合酶链反应初筛,鸡胚卵黄囊培养法直接从标本中分离立克次体,用血清学试验、序列测定对分离株进行鉴定。结果 检测 860 份自然人群及 321 份鼠类血清标本,发现健康人群平均阳性率为 3.84%,各调查点之间的阳性率差异有显著性($\chi^2 = 602.39, df = 8, P < 0.01$),山区和平原阳性率差异无显著性($\chi^2 = 0.32, df = 1, P > 0.05$);鼠类阳性率为 4.67%,针毛鼠、白腹巨鼠、板齿鼠的阳性率分别为 11.59%、12.90% 和 3.13%。在针毛鼠、白腹巨鼠、板齿鼠发现斑点热自然感染抗体是国内首次报道;采集鼠脾标本 321 份,未分离出菌株;自鼠体表采集到蜱 394 匹,从 2 只针毛鼠体表采集的蜱中分离到 2 株斑点热群立克次体,命名为 GDFK58-2000 株、GDFK59-2000 株,经血清学鉴定为西伯利亚种,对 GDFK58-2000 和 GDFK59-2000 的 OmpA 基因起始部位 533 bp 片段进行克隆和测序,测序结果与 Genbank 中其他斑点热群立克次体相应基因片段的核苷酸进行比较,GDFK58-2000、GDFK59-2000 和西伯利亚立克次体之间的核苷酸同源性为 99.6% ~ 100%,推断氨基酸同源性为 100%。结论 从宿主动物、媒介及病原学上证实广东省存在北亚蜱传斑点热自然疫源地。

【关键词】 斑点热立克次体;蜱;序列分析

Study on spotted fever group *Rickettsiae* in Guangdong province HE Jian-feng*, ZHENG Kui, LI Wei, LUO Hui-ming, LI Ling-hui, BI De-zeng, ZHANG Yuan-fu, CHANG Bing-gong. *Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China

【Abstract】 Objective To explore the existence of spotted fever group *Rickettsiae* (SFGR) in Guangdong province. **Methods** Sera were tested to find the SFGR in population and host animals. The target samples were screened by polymerase chain reaction (PCR), and *Rickettsiae* was isolated with embryonated hen eggs and identified by serological tests. **Results** Eight hundred and sixty people in natural condition and 321 of mice were determined. The mean positive rate of healthy population was 3.84%. To compare results among elected places, Fisher's exact test was applied. The difference was suggestive ($P < 0.01$), and there was no significant difference between mountain and plain areas. There was also no significant difference between mountain and plain areas ($P > 0.05$). Positive rate of mice was 4.67%, with *Rattus fulvescens*, *Rattus edwardsi*, *Bandicota indica* 11.59%, 12.90%, 3.13% respectively. It was the first time that SFGR antibodies in *Rattus fulvescens*, *Rattus edwardsi*, *Bandicota indica* were reported. A total number of 321 mice spleens and 394 ticks from the surface of mice body were collected. Two strains of SFGR, GDFK58-2000 and GDFK59-2000, were isolated in the ticks from the body surface of 2 *Rattus fulvescens*. They were identified as *Rickettsia sibirica* by serological tests. Five hundred thirty-three bp OmpA gene fragments of the two strains were cloned and sequenced. Compared with other relevant strains in Genbank, the rates of homology of nucleotide sequences of GDFK58-2000 and GDFK59-2000 and other *Rickettsia sibirica* strains were from 99.6% to 100%, and the homology of amino acid speculated was 100%. **Conclusion** It has been proved that epidemic areas of north Asia tick-transmitted SFGR, did exist in Guangdong province confirmed by host animals, transmission vectors and aetiology.

【Key words】 Spotted fever group *Rickettsia*; Tick; Sequence analysis

斑点热群立克次体 (spotted fever group

Rickettsia, SFGR) 是以蜱、螨为传播媒介的传染病,目前确定有 8 种,已知有 5 种对人有致病性^[1]。由于缺乏特异性诊断方法,即使在发达国家误、漏诊率也很高,患者因延误治疗死亡者常有发生。我国过去对 SFGR 的研究主要局限在北方几个省区并取得病原学证据,在南方的研究一直比较薄弱。为了解斑点热在广东省人群及鼠类间的自然感染情况, SFGR

基金项目 广东省医学科技研究基金资助项目(A1999069)

作者单位 510300 广州,广东省疾病预防控制中心(何剑峰、郑夔、黎薇、罗会明、李灵辉);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(毕德增、张远富、常炳功)

病原体种别、传播媒介、宿主动物及病原体的分子生物学特征等问题,1998~2001 年我们用血清流行病学、病原学及分子生物学方法对广东省 SFGR 进行了调查。

材料与方法

1. 调查点的选择及样本来源:根据广东省地理景观特点,在东、西、北、中选择山林地区(饶平、东源、乐昌、怀集、封开)、平原地区(四会、东莞、普宁)、海滨台地(湛江)共 9 个调查点,随机采集一定数量的有代表性的自然人群血清标本, -20°C 保存待检;在连平、东源、封开、湛江采用笼日法捕活鼠,鉴定鼠种,按鼠种分类检测鼠体表的蜱,无菌操作采集鼠的脾脏和鼠血清,液氮保存待检。

2. 主要试剂及实验动物:西伯利亚立克次体、小蛛立克次体、康氏立克次体抗原及阳性血清,其他普氏、莫氏、Q 热、恙虫病立克次体阳性血清、补体、溶血素、绵羊血球等均购自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(传染病所)立克次体室。鸡胚购自华南农业大学种鸡场,孵育 7 天检查鸡胚发育正常后用于接种;小白鼠由传染病所动物室提供(动物室合格证:京字 890G03 号,感染动物室合格证:医动字 01-2017 号)。

3. 检验方法:

(1)血清学检测:用微量补体结合试验室温法;滴度 $\geq 1:8$ 者判为阳性,以最高稀释度者确定型别。

(2)病原学检测:用聚合酶链反应(PCR)方法对已鉴定鼠脾脏及体表寄生的蜱进行初筛,用 Rr 190.70p 和 Rr 190.602n 这对引物,引物和 PCR 方法参照文献[2],由大连宝生物有限公司合成,在 Perkin Elmer model 2400 型基因扩增仪上进行。

(3)PCR 扩增阳性标本:用鸡胚卵黄囊培养法直接分离^[3]。

(4)立克次体的培养、纯化、小鼠血清的制备:均按实验室常规方法进行。

(5)分离株的鉴定:①采用微量室温补体结合试验对分离株进行血清学鉴定。②分离株 DNA 的提取按试剂盒说明书进行。③特异 OmpA 基因片段的 PCR 扩增,引物参照文献[2]。④特异基因片段的克隆、鉴定与序列测定用试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 纯化回收 PCR 产物,直接与 pMD18-T 载体(大连宝生物有限公司产品)进行快速连接,30 min 后转化到感受态宿主菌 JM-109,接种于含氨苄青霉素、X-

Gal 和 IPTG 的 LB 琼脂培养基, 37°C 培养 16 h,挑选白色菌落于液体 LB 培养基上增殖, 94°C 煮 10 min 少量提取质粒 DNA,用 PCR 法进行初步鉴定,正确插入片段者再次进行大量增菌,用质粒 DNA 提取试剂盒 QIAprep Spin Miniprep Kit 纯化质粒 DNA,进一步用限制性内切酶 EcoR I、Sal I 进行双酶切鉴定,鉴定正确后将纯化质粒 DNA 由大连宝生物有限公司进行核苷酸序列测定,每段序列重复测 2 次。⑤分离株与其他 SFGR 的亲缘关系,用 DNASTAR 软件将所测序列与已登录于 GenBank 上的立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)、西伯利亚立克次体(*Rickettsia sibirica*)、康氏立克次体(*Rickettsia conorii*)、澳大利亚立克次体(*Rickettsia australia*)和中国的北京株 BJ-90、黑龙江株 HL-93、HLJ-054、福建株 FUJ 相应的 OmpA 基因片段进行核苷酸序列同源性比较、酶切位点分析。

结 果

1. 调查点地理景观概况:饶平、连平、乐昌、怀集、封开县(市)属山林地区,海拔高度 800~1 000 m,年平均气温 20°C 左右,年平均降雨量 1 500~1 700 mm,除水稻外,多出木材、茶叶、竹等山货;湛江市属于海滨台地,亚热带气候,高温多雨,小灌木丛多,年平均气温 23°C ,年平均降雨量 1 534 mm,多种植水稻、甘蔗、黄红麻、橡胶等;四会、东莞、普宁市位于珠江三角洲及韩江平原,年平均气温 21°C ,年平均降雨量约 1 800 mm,以种植水稻及经济作物为主。

2. 健康人群感染情况(表 1)

(1)年龄、性别分布:健康人群血清标本男 452 份,检出阳性 18 份,阳性率 3.98%,女 408 份,检出阳性 15 份,阳性率 3.68%,经卡方检验差异无显著性($P > 0.05$);阳性者年龄最小 11 岁,最大 67 岁,其中的 31 例集中在 10~40 岁年龄组。

(2)职业分布:在 33 例阳性者中,农民 12 例占 36.36%,学生 9 例占 27.27%,工人 6 例占 18.18%,其他占 18.18%。

(3)地区分布:各调查点之间的阳性率差异有显著性($\chi^2 = 602.39, P < 0.01$);山区与平原地带阳性率比较差异无显著性($\chi^2 = 0.32, df = 1, P > 0.05$);但山区各调查点之间阳性率差异有显著性($\chi^2 = 363.65, P < 0.01$);平原各调查点之间阳性率差异有显著性($\chi^2 = 10.437, P < 0.01$),封开最高为

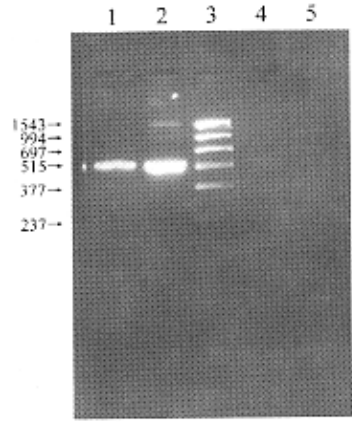
14.46% , 普宁为 8.91% 湛江为 4.76%。

3. 鼠类斑点热感染情况 : 在连平、封开、湛江共捕鼠 321 只 捡捕蜱 394 匹。仅在针毛鼠、白腹巨鼠、板齿鼠、黄胸鼠等 4 种鼠类检出 SFGR 抗体(表 2)。

4. 病原学 :

(1) PCR 扩增结果 321 份鼠脾标本的 PCR 扩增未发现阳性带 , 鼠体表蜱 117 匹 , 在封开的 2 只针毛鼠体表寄生的蜱 58 和 59 号标本扩增出大小约为 533 bp 的片段(图 1)。

(2) 立克次体分离结果 : PCR 阳性的蜱 58 和 59 号标本接种鸡胚卵黄囊见有类似立克次体样微生物生长 , 记为 + , 传至第 3 代见较多立克次体增殖达 卅 ~ 卅卅 , 至此确定分离成功 , 新分离株定为 GDFK 58-2000 株和 GDFK59-2000 株。



1: 阳性对照 ; 2: 58 号蜱样本 ; 3: DNA 标准分子量 ; 4: 59 号蜱样本 ; 5: 60 号蜱样本

图1 Rr 190.70p 和 Rr190.602n 引物扩增蜱标本中特异 DNA 片段 PCR 产物电泳图

表1 广东省 9 个调查点自然人群斑点热群立克次体感染情况

地 区	调查人数	阳性例数	阳性率 (%)	立克次体种别			滴度(1:)					
				西伯利亚	康氏	小蛛	< 8	8	16	32	64	
山 区	怀集	118	0	0.00	0	0	0	118	0	0	0	0
	饶平	97	2	2.06	1	1	0	95	0	1	1	0
	连平	100	1	1.00	1	0	0	99	0	1	0	0
	乐昌	87	2	2.30	1	1	0	85	0	1	1	0
	封开	83	12	14.46	5	3	4	71	6	6	0	0
	小计	485	17	3.51	8	5	4	468	6	9	2	0
平 原 台 地	湛江	126	6	4.76	1	4	1	120	2	2	1	1
	东莞	52	1	1.92	1	0	0	51	1	0	0	0
	四会	96	0	0.00	0	0	0	96	0	0	0	0
	普宁	101	9	8.91	5	2	2	92	4	2	2	1
	小计	375	16	4.23	7	6	3	359	7	4	3	2
合计	860	33	3.84	15	11	7	827	13	13	5	2	

注 :山区与平原台地阳性率比较差异无显著性($\chi^2 = 0.32, df = 1, P > 0.05$) ,山区各调查点之间阳性率差异有显著性($\chi^2 = 363.65, P < 0.01$, Fisher's exact test) ;平原各调查点之间阳性率差异有显著性($\chi^2 = 10.437, P < 0.01$ Fisher's exact test) ;各调查点之间的阳性率比较差异有显著性($\chi^2 = 602.39, df = 8, P < 0.05$)

表2 广东省鼠类斑点热群立克次体感染情况

鼠种	调查人数	阳性例数	阳性率 (%)	立克次体种别			滴度(1:)						
				西伯利亚	阳性率 (%)	康氏	阳性率 (%)	< 8	8	16	32	64	128
褐家鼠	11	0	0.00	0	0.00	0	0.00	11	0	0	0	0	0
卡氏小鼠	1	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0	0	0	0	0
黄胸鼠	10	1	1.00	1	1.00	0	0.00	9	1	0	0	0	0
黄毛鼠	66	0	0.00	0	0.00	0	0.00	66	0	0	0	0	0
板齿鼠	64	2	3.13	1	1.56	1	1.56	62	1	0	1	0	0
青毛鼠	37	0	0.00	0	0.00	0	0.00	37	0	0	0	0	0
白腹巨鼠	31	4	12.90	3	9.67	1	3.23	27	0	2	1	1	0
针毛鼠	69	8	11.59	6	8.69	2	2.90	61	0	4	2	1	1
社鼠	4	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	0	0	0	0	0
屋顶鼠	28	0	0.00	0	0.00	0	0.00	28	0	0	0	0	0
合计	321	15	4.67	11	3.43	4	1.25	306	2	6	4	2	1

5. 新分离株鉴定 :

(1) 血清学 : 在所有对照成立的情况下 , 只有西

伯利亚立克次体标准抗原与 GDFK58-2000 株、GDFK59-2000 株免疫的小鼠血清和 GDFK58-2000 株、GDFK59-2000 株制备抗原与西伯利亚立克次体标准阳性血清发生反应,其效价分别为 1:64、1:32 和 1:16、1:8,分离株制备的抗原与康氏立克次体标准阳性血清仅发生低滴度的反应,与小蛛、普氏、莫氏、Q 热、恙虫病标准阳性血清均不发生血清学反应。

(2) 分子生物学:

① 分离株特异 *OmpA* 基因片段的 PCR 扩增: GDFK58-2000 和 GDFK59-2000 的 PCR 扩增片段大小与阳性对照西伯利亚立克次体的扩增片段大小一样,都是在 533 bp 处。

② 分离株与其他参考株核苷酸序列比较: GDFK58-2000 和 GDFK59-2000 与立氏立克次体、西伯利亚立克次体、康氏立克次体、澳大利亚立克次体和中国的北京株 BJ-90、黑龙江株 HL-93、HLJ-054、福建株 FUJ 相应的 *OmpA* 基因片段的核苷酸序列比较,发现西伯利亚立克次体、北京株 BJ-90 和 GDFK58-2000、GDFK59-2000 互相之间的核苷酸同源性在 99.6% ~ 100%,推断的氨基酸同源性为 100%。

讨 论

斑点热具明显的自然疫源地特征,我们用微量补体结合试验室温法对广东省 9 个调查点内 860 份自然人群及 321 份鼠类血清标本进行 SFGR 抗体检测,平均阳性率分别为 3.84% 和 4.67%,与张健之等在大埔等地的调查结果(西伯利亚立克次体 16.99%,康氏立克次体 22.63%,小株立克次体 18.28%) 相比,明显低许多,这可能是微量补体结合试验室温法和微量间接免疫荧光法这两种不同的检验方法所致,本次调查发现西伯利亚立克次体、康氏立克次体和小株立克次体混合感染的存在。在人群调查中发现调查点之间的阳性率差异有显著性,山区与平原台地阳性率比较差异无显著性,这种差异提示广东省斑点热可能存在特定地区分布的特点。

在针毛鼠、白腹巨鼠、板齿鼠、黄胸鼠等 4 种鼠类检出 SFGR 抗体,并且前三种鼠的阳性率高达 11.59%、12.90% 和 3.13%;针毛鼠和白腹巨鼠主要栖息在林区,是广东省山林野鼠中的优势鼠种,活动范围大,板齿鼠则是平原地区的主要野外鼠种,作为宿主动物其意义重大。在针毛鼠、白腹巨鼠及板

齿鼠中发现 SFGR 的自然感染证据在中国尚未见报道。

广东省地处热带、亚热带,斑点热传染媒介的生活习性与北方不同,用布旗法捕捉蜱收效甚微,从动物体表找蜱是一种有效的方法。在调查中发现针毛鼠、白腹巨鼠、板齿鼠在林区的体表带蜱率可高达 50%,这一方面可解释这三种鼠斑点热抗体阳性率高的原因,另一方面为开展病原学分离工作指导了方向。

目前对 SFGR 的分类和鉴定,多采用多项指标进行综合评价,根据立克次体外膜蛋白的基因序列相关性决定种群关系已得到广泛应用^[4],特别是外膜蛋白 *OmpA*,可作为 SFGR 群内种鉴定,从核酸水平上准确揭示 SFGR 种间关系^[5],由于 SFGR 的 *OmpA* 蛋白的进化慢,其编码的基因在种间存在变异,且几乎所有的 SFGR 都存在的特点,被认为是研究立克次体亲缘关系的首选基因,本研究对 GDFK58-2000 和 GDFK59-2000 的 *OmpA* 基因起始部位 533 bp 片段进行克隆和测序,并将测定的序列与 Genbank 中其他 SFGR 相应基因片段的核苷酸进行比较,GDFK58-2000、GDFK59-2000 和西伯利亚立克次体之间的核苷酸同源性为 99.6% ~ 100%,推断的氨基酸同源性为 100%,在血清学、遗传学上确定了广东两株分离株在分类上属于 SFGR 的西伯利亚立克次体种,证实了广东省存在北亚蜱传斑点热自然疫源地。

(肇庆市卫生防疫站周跃华、封开县卫生防疫站莫洪林、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所贺金荣等同志参与研究工作,一并致谢)

参 考 文 献

- 1 于恩庶,林继煌,陈观今,等,主编. 中国人兽共患病学. 第 2 版. 福州:福建科学技术出版社,1996. 532-547.
- 2 Russell L, Catherine L, Barriand P. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two *Rickettsial* genes. J Bacteriol, 1991, 173: 1576.
- 3 毕德增,张健之,范明远,等. 用鸡胚卵黄囊分离斑点热立克次体的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997, 8: 47.
- 4 Bernard LA, Scola D, Didier Raoult. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis old and new rickettsial disease. J Clin Microbiol, 1997, 35: 2715-2727.
- 5 Eremeeva M, YU XJ, Raoult D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. J Clin Microbiol, 1994, 32: 803.

(收稿日期 2002-08-20)

(本文编辑:尹廉)