

吉林省长白山区斑点热立克次体自然疫源地调查

郝永建 曹务春 高淑萍 张泮河 赵秋敏 杨红 张习坦

R5/3 A

【摘要】 目的 了解吉林省长白山区蜱传斑点热的自然疫源地情况。方法 利用立氏立克次体 [相对分子质量 (M_r) 190×10^3] 外膜蛋白 A (R. rOmpA) 基因序列设计引物, 对 683 只蜱类标本进行聚合酶链反应 (PCR) 检测, 并随机抽取一株森林革蜱阳性扩增产物进行克隆与序列测定。结果 从森林革蜱和嗜群血蜱标本中检测出了斑点热立克次体 DNA 片段, 阳性率分别为 53.81% 和 7.41%; 所测序列与前苏联的 DnS 14 株的同源性为 100.00%, 与 DnS 28 和 RpA 4 的同源性均为 99.00%; 而与国内所检测的 BJ-90、HLJ-054 的同源性分别为 88.00% 和 86.00%。结论 长白山区存在斑点热的自然疫源地, 存在与 DnS 14 株型别一致的斑点热立克次体, 在中国系首次发现。

【关键词】 蜱; 斑点热立克次体; 序列分析

A new type of spotted fever group *Rickettsias* detected in the area of Changbai mountain, Jilin province HAO Yong-jian*, CAO Wu-chun, GAO Shu-ping, ZHANG Pan-he, ZHAO Qiu-min, YANG Hong, ZHANG Xi-tan. *The Preventive Team of People's Liberation Army Second Artillery, Beijing 100071, China

【Abstract】 Objective In order to find out the current situation of tick-borne spotted fever in the area of Changbai mountain, Jilin province. **Methods** In this study, a polymerase chain reaction (PCR) method was developed with primers R. rOmpA 190.70p and R. rOmpA 190.701n designed on the basis of rOmpA gene, which is specific for examining spotted fever group *Rickettsias* (SFGR). Six hundred eighty-three ticks were tested and a positive PCR product amplified from *D. silvarum* specimen (named JL-02) was cloned and sequenced. **Results** The SFGR DNA was detected from *D. silvarum*, *Haemaphysalis concinna* with the positive rates were 53.81% and 7.41% respectively. Its nucleotide sequence of 587 bp rOmpA and derived amino-acids showed 100.00% similarity with nucleotide sequence of DnS 14 and 99.00% with DnS 28 from the Former Soviet Union according to the result of BLUST and CLUSTAL, which was differential from the DNA sequences of strains previously detected in China. **Conclusion** The natural focus of tick-borne spotted fever did exist in the area of Changbai mountain. The DNA sequence of SFGR was similar to that of DnS 14, which was first reported in China.

【Key words】 Ticks; Spotted fever group *Rickettsias*; Sequence analysis

目前我国已经分离的斑点热立克次体 (spotted fever group *Rickettsias*, SFGR) 有西伯利亚、黑龙江、内蒙古和虎林等立克次体^[1]。我们参考文献 [2], 采用立克次体种特异性引物——立氏立克次体 [相对分子质量 (M_r) 190×10^3] 外膜蛋白 A (R. rOmpA) 基因序列, 用聚合酶链反应 (PCR) 扩增的方法, 对从吉林省长白山区采集的森林革蜱、嗜群血蜱和全沟硬蜱进行了 SFGR DNA 的检测。

材料与方法

1. 蜱类标本来源: 从吉林省长白山区采集的森林革蜱、嗜群血蜱和全沟硬蜱 3 种蜱类标本, 森林革蜱为该地的优势种群。

2. 蜱标本中 DNA 模板的提取: 将蜱用 75% 的酒精浸泡后用生理盐水洗 3 次, 晾干, 每只一组用研磨器研碎, 加入 TE 40 μ l, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 上清即为 DNA 模板, -20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

3. PCR 检测: 对蜱标本的 DNA 模板用 R. rOmpA 190 70p/R. rOmpA 190 701n 作为引物,

作者单位: 100071 北京, 第二炮兵防护防疫队 (郝永建、高淑萍); 军事医学科学院微生物流行病学研究所 (曹务春、张泮河、赵秋敏、杨红、张习坦)

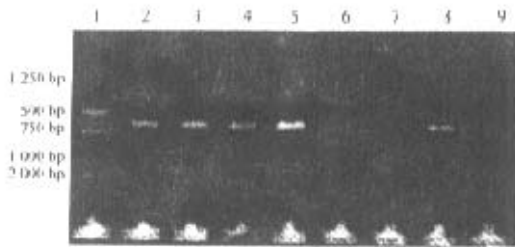
序列如下:上游引物:R. rOmpA 190 70p 5'-ATG GCGAATATTTACCAAAA-3' (70~90); 下游引物:R. rOmpA 190 701n 5'-GTTCCGTTAATG GCAGCATCT-3' (701~681)。PCR 反应总体积:纯水 18 μ l, buffer 3 μ l, dNTP (2 mol/L) 3 μ l, 70p (5 μ mol/L) 1 μ l, 701n (5 μ mol/L) 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 (1 U/ μ l) 1 μ l, 样本 DNA 模板 3 μ l, 反应总体积 30 μ l; 在 DNA 扩增仪 (Perkinelmer DNA Thermal Cycler 480 USA) 上扩增: 95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 然后 70 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取产物 10 μ l 于 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳。

4. PCR 阳性产物的克隆与测序: 随机选择一株森林革蜱阳性扩增产物用 DNA 玻璃奶回收试剂盒 (北京博大泰克生物制剂公司) 进行回收、纯化, 用 T4 DNA 连接酶将回收的片段与 pGEM-T 载体连接, 并将连接产物转化至 *E. coli* XL1-Blue 宿主菌中进行克隆。采用 QIAprep 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司) 提取重组质粒作测序 DNA 模板, 送至大连宝生物公司, 应用 ABI PRISMTM 377XL DNA 测序仪进行测序。

5. 序列分析: 应用 Internet 网中 BLAST 操作平台, 将所测序列与 GenBank 中注册的 R. rOmpA 进行同源性比较, 选择 20 个有代表性的参照菌株, 并推导氨基酸序列, 用 CLUSTAL X (1.8) 软件做聚类分析。

结 果

1. SFGR 检测结果: 对该地采集的蜱类标本 683 只, 用 SFGR 引物 70p/701n 进行 PCR 检测。结果从森林革蜱和嗜群血蜱中检测出了 SFGR DNA, 阳性率分别为 53.81% 和 7.41%, 而从全沟硬蜱中未检出; 其中森林革蜱的阳性率高于嗜群血蜱 ($\chi^2 = 90.5267, P < 0.001$)。PCR 电泳结果见图 1。



1: Marker; 2~4: 森林革蜱阳性标本; 5, 6: 嗜群血蜱阳性标本; 7: 阴性标本; 8: 阳性对照; 9: 阴性对照

图1 检测蜱类标本 SFGR 菌株 629 bp PCR 产物电泳结果

2. 核苷酸和推导的氨基酸序列比较: 通过测序获得一个 629 bp 的 SFGR DNA 片段, 命名为“JL-02”; 去掉两端引物, 将其 587 bp 片段与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行最大同源性比较, 结果与 Rydkina 等^[3] 从西伯利亚地区草原革蜱中分离的一株新的立克次体 DnS 14 株 $M_r 190 \times 10^3$ 的此段序列完全相同, 与 DnS 28 株和 RpA4 株相应序列的同源性均为 99%。

所测序列与康氏立克次体 (CON) 相比, 其 160~162 位碱基缺失一个三联码“TTT”, 而且 CON 株在 237~386 位之间的碱基缺失, 其 587 bp 核苷酸序列的同源性为 82%; “JL-02” 核苷酸序列对于西伯利亚立克次体 (SIB) 和立氏立克次体 (RR) 在 124~126 位碱基缺失一个三联码“AAT”, 其 149~153 位为“TTGCC”, 而 SIB 和 RR 株相应的位置则为“GCAAT”, 其 DNA 的遗传同源性分别为 93% 和 92%。

对本研究所测 JL-02 株核苷酸序列所推导的氨基酸序列和从 GenBank 中选择的 20 个代表性菌株的 587 bp rOmpA 序列推导的氨基酸序列进行比较, JL-02 株与 DnS 14 株氨基酸序列也完全一致, 与 RpA4 的同源性为 99%, 与 DnS28 的同源性为 98%, 与 SIB 和 BJ-90 株的同源性为 88%, 与黑龙江立克次体 (HL-93 和 HLJ-054) 株的同源性为 86%。JL-02 株 587 bp rOmpA 核苷酸推导的氨基酸序列与 SIB 相比, 其 42 位氨基酸位置缺乏一个异亮氨酸, 这可能会导致相应生物学性质的改变。

3. 核苷酸和推导的氨基酸序列的聚类分析: 对 21 个 SFGR 的碱基序列进行编辑后, 对其 587 bp rOmpA 核苷酸序列做聚类分析图 (图 2)。从聚类图上看, JL-02 株的 587 bp rOmpA 序列与 DnS 14 株分类一致, 与 RpA 4、DnS 28 比较接近, 与蒙大拿立克次体 (MON) 同属一支, 但 JL-02 株与 MON 的同源性也只有 94%。可以推测所测序列既不属于 RR, 也不属于 SIB, 与我国以前发现的“福建立克次体 (FUJ)”、BJ-90、HL-93 和 HLJ-054 株等种类差异较大。

推导的 21 个氨基酸序列聚类分析图 (图 3) 大致与核苷酸序列一致, JL-02 株的氨基酸序列与 DnS 14 株一致, 与 RpA 4 株、DnS 28 株和 MON 聚为一支; 我国的“FUJ”、HL-93 和 HLJ-054 与日本立克次体 (JAP) 聚为一支; 北京分离的 BJ-90、内蒙古立克次体 (MOGOL) 分属于 SIB 所代表的一支。

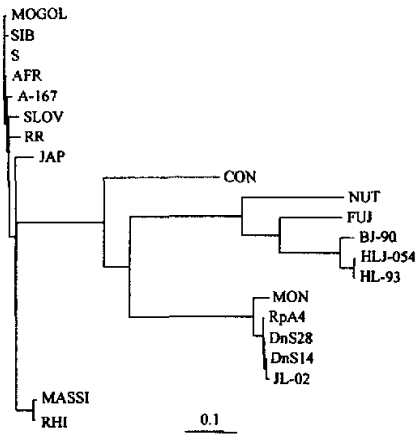


图2 不同 SFGR 菌株 587 bp rOmpA 核苷酸序列聚类分析

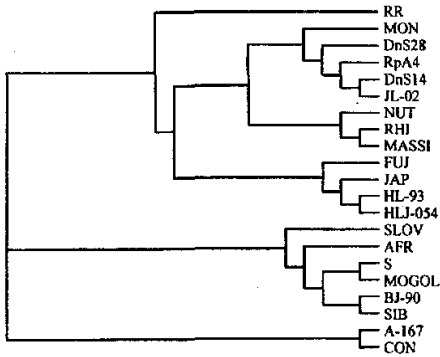


图3 不同 SFGR 菌株 587 bp rOmpA 核苷酸序列推导的氨基酸序列聚类分析

讨 论

$M_{1,190 \times 10^3}$ 外膜蛋白 A 基因是 SFGR 所特有的基因序列^[4],其所呈现的充分的差异性使其通过 5' 端基因的 632 bp 区域比较可以精确鉴定该群中的菌种,现已广泛用于种的鉴定和基因相关性的研究,因此选择该序列片段设计引物具有较好的特异性;同时,在保证扩增出的片段为 SFGR 的同时,能够找出 SFGR 基因型或基因亚型之间的差别,并可利用该差别进行基因型或亚型的鉴定和分类研究。该引物扩增 SFGR 的 DNA 片段长度为 629~632 bp,能够扩增大部分 SFGR,且可用以该群内种的鉴定。

我们采用根据 RR $M_{1,190 \times 10^3}$ 外膜蛋白 A 基因序列设计的引物,利用 PCR 扩增的方法进行

SFGR 的检测。共检测了采集自吉林省长白山区的 3 种蜱类标本 683 只,结果从森林革蜱和嗜群血蜱中检测出了 SFGR DNA 片段。随机抽取 1 份森林革蜱的阳性 PCR 扩增产物进行克隆与测序,与 GenBank 中注册的 SFGR 基因序列进行比较和聚类分析,结果所测序列与前苏联 Rydkina 等从西伯利亚地区草原革蜱中分离的一株新的立克次体 DnS 14 株 $M_{1,190 \times 10^3}$ 的此段序列完全相同;与 SIB、CON、RR 差异较大;与我国以前已经检测的黑龙江立克次体、MOGOL、BJ-90 株等差异也较大。证明了 $M_{1,190 \times 10^3}$ 外膜蛋白 A 基因序列具有种特异性,可用于种的鉴定。依据“JL-02”株核苷酸序列与推导的氨基酸序列与 DnS 14 株一致,可以推测所测序列“JL-02”株与 DnS 14 株属同一基因型,由于 DnS 14 株的致病性尚未确定^[3],所以所测序列的致病性也有待于进一步研究;但立克次体是通过媒介蜱类叮咬传播的,可以相信只要具有节肢动物贮存宿主可叮咬人类的条件,可能每种立克次体均有有效的致病性^[5]。

以上研究证明吉林省长白山区的森林革蜱和嗜群血蜱携带 SFGR,从该地区的野鼠脏器标本中也检测出了 SFGR DNA 片段,证明该地区存在斑状热的自然疫源地。由于所测序列在我国系首次发现,而且该地区以前未进行过类似的调查,所以该病原体的致病性和该区人群中发病情况的调查有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 陈敏,范明远,毕德增,等. 斑状热群立克次体的血清学和病原学调查. 中国人兽共患病杂志,1999,15:90-93.
- 2 Roux V. Differentiation of spotted fever group *Rickettsiae* by sequencing analysis of restriction fragment length polymorphism of Pcr amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. J Clin Microbiol, 1996,34:2058-2065.
- 3 Rydkina E, Roux V, Fetisova N, et al. New *Rickettsiae* in ticks collected in territories of the former soviet union. Emerging Infect Dis, 1999,5:811-814.
- 4 Bernard LA, Raoult D. Laboratory diagnosis of old and new rickettsial disease. J Clin Microbiol, 1997,35:2715-2727.
- 5 俞树荣,陈香蕊. 立克次体与立克次体病. 北京:军事医学科学出版社,1999. 46.

(收稿日期:2002-10-21)

(本文编辑:尹廉)