

· 论 著 ·

北京郊区旅游景点北亚蜱传斑点热分子流行病学调查

陈 敏 范明远 毕德增

摘要 用 PCR/RFLP 技术对北京郊区 11 个旅游景点的媒介蜱及小哺乳动物进行斑点热群立克次体的检测，并进行了病原体分离和鉴定。结果从北京航空博物馆附近地区收集的刺猬和其体表寄生的中华革蜱中分离出 2 株斑点热群立克次体，分别命名为 BJH - 95 株和 BJ - 95 株，经 SDS - PAGE、Western blot 和 PCR/RFLP 技术进行了鉴定认为是西伯利亚立克次体。结果证明了该立克次体在蜱和动物宿主间呈水平传播，并且表明在被调查的旅游景点中除航空博物馆附近地区外，大多数景点基本上是北亚热的安全区。在刺猬中分离出西伯利亚立克次体为国内、外首次报道。

关键词 北亚蜱传斑点热 分子流行病学

A Molecular Epidemiologic Investigation of North Asia Fever in Scenic Spots of Beijing Suburb Chen Min, Fan Ming-yuan, Bi De-zeng. Department of Rickettsiology, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Abstract PCR/RFLP technique was used to detect spotted fever group rickettsiae (SFGR) in ticks and small mammals collected in eleven scenic spots of Beijing suburb. We not only detected *Rickettsia sibirica* in *D. sinicus* and hedgehog collected nearby the Museum of Aviation, but also isolated two strains of SFGR from them, named as BJ - 95 strain and BJH - 95 strain respectively. The two strains were identified as *R. sibirica* by SDS - PAGE, Western blot and PCR/RFLP. The results demonstrated the existence of horizontal transmission of *R. sibirica* between ticks and small mammals and showed the most scenic spots except the vicinity of Museum of Aviation being investigated were safe to North Asia Fever. This is the first report on the isolation of *R. sibirica* in hedgehogs.

Key words North Asia fever Molecular epidemiology

我室自 1990 年从北京市昌平县孟祖村北的草地刺猬身上寄生的中华革蜱中首次分离出斑点热群立克次体 (spotted fever group rickettsiae, SFGR) BJ - 90 株以来^[1]，1991、1993 年又先后分离到 2 株 SFGR(BJ - 91、BJ - 93)，其中 BJ - 90 株和 BJ - 93 株经分子生物学方法的鉴定被认为是西伯利亚立克次的亚种或变种^[2,3]。北京地区旅游资源丰富，有多种不同地理景观及植被分布，适合媒介蜱种生长。为了解旅游景点媒介蜱及动物宿主中 SFGR 的

感染情况，我们用 PCR/RFLP 分型系统对该地的媒介蜱和动物宿主进行了检测，并进行病原体分离，然后用 SDS - PAGE、Western blot、PCR/RFLP 等技术对新分离株进行了分类鉴定，现将结果报告如下。

材料和方法

一、现场一般情况及标本的收集：我们于 1995~1996 年以北京市郊区 11 个旅游景点为调查点，对上述景点的蜱和小哺乳动物进行了调查。调查点海拔在 400~1 800 米之间，地理景观多种多样，有河谷、丘陵、山区、平原等。分布有高山草原、阔叶林、混交林、灌木丛等多种

作者单位：中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206

本课题为国家自然科学基金资助项目

植被。调查点也有绵羊、山羊、牛、马等家畜活动。蜱种有长角血蜱、草原革蜱和中华革蜱等。标本按常规分别自草丛或从家畜及小哺乳动物等身上采集并分类鉴定,按收集地区、种类分组。标本的种类及来源见附表。

附表 北京旅游景点标本的种类和来源

地 区	旅游景点	标本名	份 数	收 集 时 间
北京市昌平县	航空博物馆附近	中华革蜱	3	1995
		刺 猬	2	1995
北京市密云县	黑龙潭、密云水库、云蒙山	长角血蜱	700	1996
北京市怀柔县	青龙峡、红螺寺	长角血蜱	200	1996
北京市平谷县	京东大峡谷	长角血蜱	400	1996
北京市房山县	十渡	长角血蜱	900	1996
北京市门头沟区	东灵山	长角血蜱	400	1996
北京市延庆县	海沱山	草原革蜱	3	1996
	松山森林公园	长角血蜱	350	1996

二、实验用立克次体菌株:斑点热群立克次体国际标准株:立氏立克次体(*R. rickettsii*)R株,西伯利亚立克次体(*R. sibirica*)246株来自军事医学科学院,康氏立克次体(*R. conorii*)Malish 7株来自 Medical Branch, The Univ. of Texas, USA, 派氏立克次体(*R. parkeri*),澳大利亚立克次体(*R. australis*)W58株来自Dept. of Health Lab., Columbus, OH USA, 小蛛立克次体(*R. akari*)Kaplan株来自 ATCC, USA。中国新分离株 BJH-95 和 BJ-95 于1995年分别在北京郊区航空博物馆附近地区捕获的刺猬及其体表寄生的中华革蜱中分离。

三、实验用引物:引物 Rr 190.70p 和 Rr 190.602n 来自文献^[4],根据立氏立克次体 rOmpA 蛋白基因设计,由中国科学院微生物所合成。

四、立克次体的分离:采用现场标本悬液直接感染鸡胚卵黄囊法^[5]进行立克次体的分离。

五、立克次体的培养、纯化、小鼠免疫血清的制备:均按实验室常规方法进行。

六、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):参照 Laemmli^[6]的方法和条件,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%。将纯化的立克次体轻带与 2×SDS 加样缓冲液等量混合,

100℃煮沸 5 分钟后上样,60V 稳压电泳,至溴酚蓝达胶底部时停止电泳,常规考马斯亮蓝染色及脱色。

七、Western blot 分析:方法参照文献^[7]。

八、立克次体及现场标本 PCR 模板的制备:分别参照 Silhavy^[8]和 Gage^[9]的方法进行。

九、PCR/RFLP 分析:方法及程序见文献^[10],结果作银染分析。

结 果

一、PCR 检测:用 PCR 对北京 11 个景点收集的蜱和小哺乳动物脏器进行检测,结果只在航空博物馆附近地区捕获的中华革蜱和刺猬脏器中扩增出 SFGR 特异的 533bp 大小的 DNA 片段,在其它地区收集的蜱种扩增则为阴性,阳性对照及空白对照成立。

二、立克次体的分离结果:用上述蜱及刺猬脏器标本的悬液直接感染鸡胚卵黄囊,结果仅从航空博物馆附近地区捕获的刺猬及其体表寄生的中华革蜱中分离出 2 株斑点热群立克次体,分别命名为 BJH-95 株和 BJ-95 株。

三、PCR/RFLP:被检蜱和刺猬脏器标本及新分离株 BJ-95 和 BJH-95 株 PCR 产物,分别经 PstI 和 RsaI 酶切后作银染分析,并与国际标准株比较发现:现场标本和新分离株 BJ-95 株、BJH-95 株 PCR 产物的 PstI 和 RsaI 图谱均与西伯利亚立克次体国际标准株一致(图 1)。

四、SDS-PAGE:SFGR 国际标准株和新分离株 BJ-95、BJH-95 的 SDS-PAGE 图谱在 40KD 以下极为相似,在 212~57KD 范围内存在差异,其中 BJ-95、BJH-95 与西伯利亚立克次体株在主带型上完全相同,而与其它标准株不同。

五、Western blot:从图 2 可见 BJ-95 株小鼠免疫血清除不与澳大利亚立克次体反应外,与其它标准株均发生反应,其中 BJ-95 株、BJH-95 株及西伯利亚立克次体 246 株的反应带型完全一致(116KD、130KD),与立氏立克次体及小蛛立克次体均有一条反应带,与康氏立

克次体及派克立克次体也有二条反应带,但带

型位置与西伯利亚立克次体均不相同。

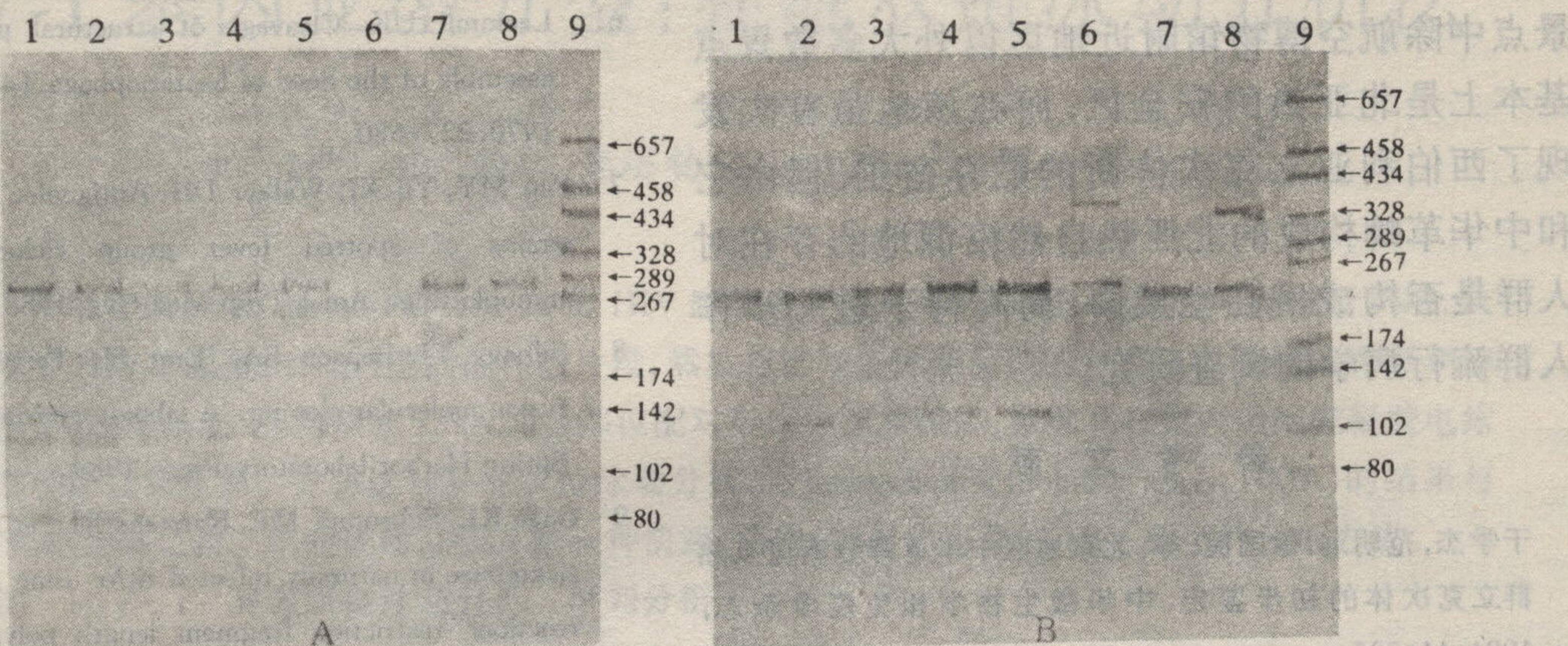


图 1 PstI(A) 和 RsaI(B) 作用于各检测标本及 SFGR 各株的 PCR/RFLP 银染结果

1. 中华革蜱 2. 刺猬 3. BJ - 95 株 4. BJH - 95 株 5. 西伯利亚立克次体 (*R. sibirica* 246 株) 6. 康氏立克次体 (*R. conorii* M7 株) 7. 立氏立克次体 (*R. rickettsii* R 株) 8. 派氏立克次体 (*R. parkeri*) 9. pGEM - 7Zf(+) / HaeIII Markers

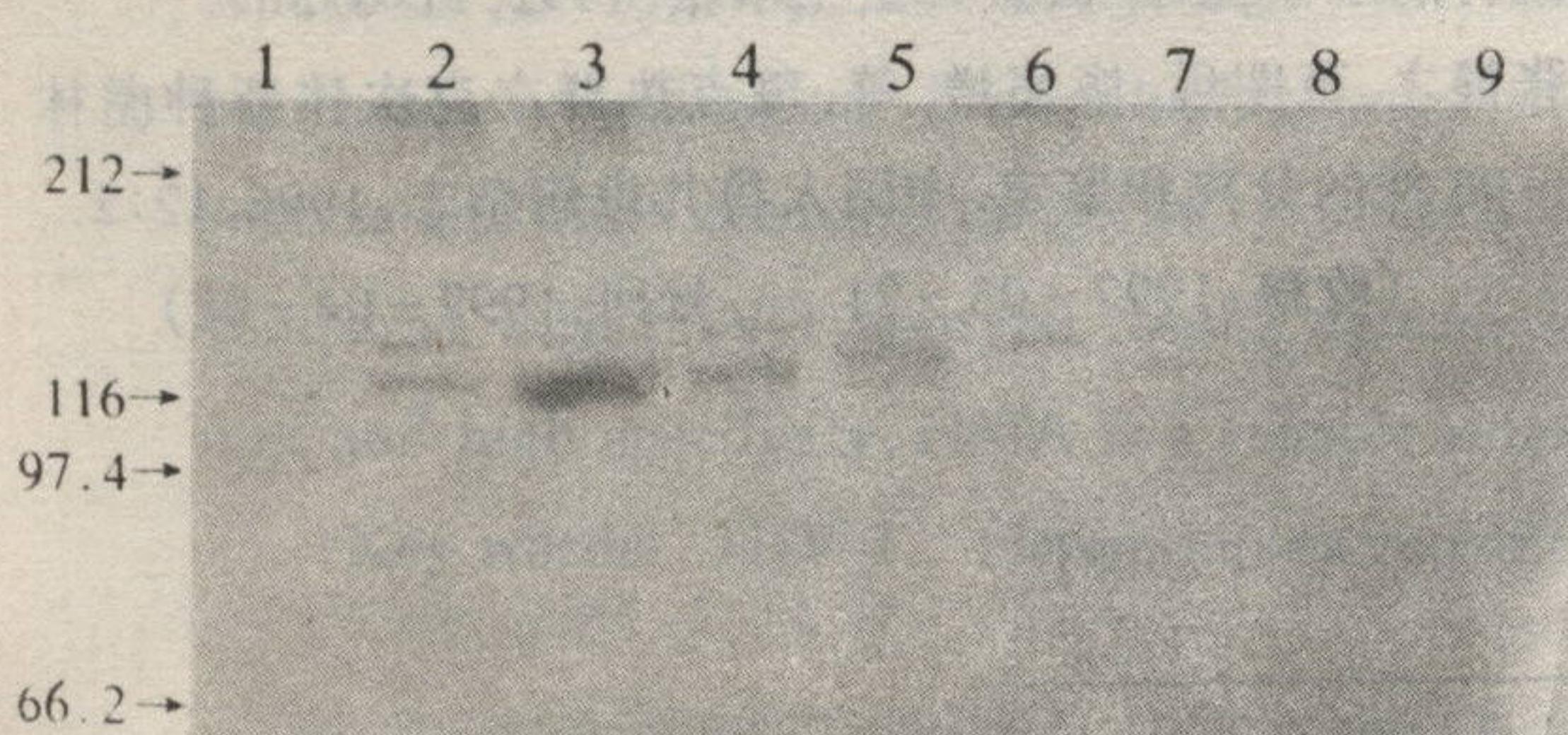


图 2 BJ - 95 株小鼠免疫血清 (1:50) 与 SFGR 各株的蛋白免疫印迹结果

1. 高分子量蛋白标准 2. BJ - 95 株 3. BJH - 95 株 4. 西伯利亚立克次体 (*R. sibirica* 246 株) 5. 康氏立克次体 (*R. conorii* M7 株) 6. 立氏立克次体 (*R. rickettsii* R 株) 7. 派氏立克次体 (*R. parkeri*) 8. 小蛛立克次体 (*R. akari* Kaplan 株)
9. 澳大利亚立克次体 (*R. australis* W58 株)

讨 论

我国目前从病原学上证实至少存在四种斑点热群立克次体: 西伯利亚立克次体 (*R. sibirica*)、黑龙江立克次体 (*R. heilongjiang*)、虎林立克次体 (*R. hulin*) 和内蒙古立克次体 (*R. innermongolia*)^[2, 11, 12], 此外在部分地区的人和啮齿动物血清中还发现有小蛛立克次体 (*R. akari*) 和康氏立克次体 (*R. conorii*) 感染的证据。西伯利亚立克次体是引起北亚蜱传斑点热 (North Asia tick-borne spotted fever, 简称北

亚热) 的病原体, 其在中国的地理分布相当广泛, 媒介及动物宿主种类繁多。

西伯利亚立克次体在自然状态下借助蜱和动物宿主得以传播和延续, 蜱在病原体的自然循环中起双重作用, 它不仅可经卵传递立克次体, 而且还与宿主动物间维持水平传播。此次我们自中华革蜱及其寄主刺猬脏器中检测及分离出西伯利亚立克次体的事实充分证明了这种水平传播的存在。

西伯利亚立克次体的生态学研究表明, 在多种蜱属中均存在西伯利亚立克次体的自然感染, 在长期的进化过程中, 立克次体与革蜱属的关系最为密切。本次对旅游景点的调查发现长角血蜱虽为北京地区的优势蜱, 但 PCR 检测及病原体分离均为阴性, 可能这些蜱中的立克次体量低于 PCR 的检出下限或者根本就不存在 SFGR 的自然感染。中华革蜱成虫活动高峰在 5 月份, 以食虫目刺猬等野生动物为其寄主, 也袭击牛、羊、马等家畜。我们在少数中华革蜱中多次分离出西伯利亚立克次体的事实表明中华革蜱的带菌率很高。刺猬作为一种小哺乳动物虽与人的直接接触机会不多, 但其活动范围相当广泛, 它作为中华革蜱的主要寄主可能在西伯利亚立克次体的保存和种的延续中起着重要

作用。

综上研究,我们认为在上述北京郊区旅游景点中除航空博物馆附近地区以外大多数景点基本上是北亚热的安全区,而在该地虽首次发现了西伯利亚立克次体新的贮存宿主,但由它和中华革蜱构成的北亚热自然疫源地的存在对人群是否构成潜在性威胁,尚有待于进一步作人群流行病学的调查研究。

参 考 文 献

- 1 于学杰,范明远,徐国民,等.北京地区中华革蜱分离斑点热群立克次体的初步鉴定.中华微生物学和免疫学杂志,1991,11:305.
- 2 Yu XJ, Jin Y, Fan MY, et al. Genotypic and antigenic identification of two strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. *J Clin Microbiol*, 1993, 31:83.
- 3 张健之,范明远,毕德增.斑点热群立克次体BJ-93株的分离和鉴定.中华微生物学和免疫学杂志,1997,17:28.
- 4 Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*, 1991, 173: 1576.
- 5 毕德增,张健之,范明远,等.用鸡胚卵黄囊分离斑点热群立克次体的研究.中国媒介生物学及控制杂志,1997,8:47.
- 6 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970, 227:680.
- 7 Fan MY, Yu XJ, Walker DH. Antigenic analysis of Chinese strains of spotted fever group rickettsiae by protein immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*, 1988, 39:497.
- 8 Silhavy TJ, Benson SA, Emr SD. Experiments with gene fusion molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.
- 9 Gage KL, Schrumpf ME, Karstens RH, et al. DNA typing of rickettsiae in naturally infected ticks using a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 50:247.
- 10 陈敏,范明远,徐国明,等.PCR/RFLP技术对黑龙江沿岸蜱类和鼠类中北亚蜱传斑点热的检测.中华流行病学杂志,1997,18:5.
- 11 范明远,于学杰,毕德增,等.中国北亚蜱传斑点热的分子流行病学研究.中国公共卫生学报,1992,11:673.
- 12 张健之,范明远,毕德增,等.斑点热群立克次体新种虎林-93株的分离和鉴定.中国人兽共患病杂志,1996,12:2.

(收稿:1997-03-21 修回:1997-04-08)

一起在高疟区作业导致疟疾暴发的报告

陈志勇

吴德雷

某乡是海南岛南部山区主要的疟区之一,为黎、苗族聚居地。1996年4月20日,该乡组织了1806名民工在高疟区修公路。民工中有1071人来自中低疟区,均在工地露宿,几乎没有蚊帐防护,尽管工地上组织预防性服药,但由于思想麻痹,措施不落实,服药率低。4月30日民工全部撤离工地,5月1日经血检确诊首例病例,尔后疫情急剧上升,截至5月30日止,共确诊病人89例,1例死于脑型疟。其中间日疟占40%,恶性疟占58.45%,混合疟占1.6%,带配子体者占14.6%。中低疟区民工罹患率占8.2%,发病村队占全村队的

77.8%,经调查327名无症状民工,带虫率为11.6%。暴发后组织工地民工预防服药,服药率达96.8%,全程服率为94.5%。同时,凡发热民工送当地卫生院血检,现症病人给予免费正规治疗。至5月25日基本控制流行。一个月后对全部病例和带虫者116人进行复检,无阳性发现。且追踪观察未出现第二代病人。本次事件是中低疟区人口进入高疟区作业致暴发性流行。其主要原因是预防性服药不落实,个人防护意识差;有相当一部分病人被乡医误诊而截留,延误了疫情报告。流动人口是造成疟疾传播和流行的主要原因之一。