

图1 PFGE图谱聚类分析

个,分别为bruce04、bruce07、bruce09、bruce16;前两者同源性高于后两者,M5与16M同源性较低。

3. 讨论:三胜黄凝集、阳性血清、生理盐水凝集、R血清凝集、噬菌体裂解等实验中,疫苗株与标准株获得一致结果,可考虑使用疫苗株来替代标准株进行上述实验。多重PCR和PFGE中,544A与S19、1330S与S2结果相同,利用这2种方法进行鉴定时可用S19代替544A,S2代替1330S;MLST结果表明,进行这个实验时只有S2可替代1330S;MLVA中3对菌株均存在差异。

M5与16M在多重PCR和PFGE中均可直接看出条带不统一。MLVA可以区分M5与16M、S2与1330S和S19与544A,MLST可区分M5与16M和S19与544A^[4]。这些实验适用于鉴别疫苗菌株与标准菌株,并建议进一步开展与流行菌株的鉴别研究。

参 考 文 献

- [1] Tian GZ, Hou XX, Li ZJ, et al. Development and application of one-step polymerase chain reaction (PCR) for rapid identification of *Brucella* species and some biovars [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2013, 33(2): 133-137. (in Chinese)
田国忠,侯雪新,李振军,等.布鲁氏菌种及种内部分生物型快速PCR鉴定方法的建立及应用研究[J].中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(2): 133-137.
- [2] Jiang H, Zhao HY, Cui BY, et al. Application of multiple locus variable number tandem repeats analysis in Brucellosis surveillance [C]. The third national Symposium on Zoonoses, 2011: 259-264. (in Chinese)
姜海,赵鸿雁,崔步云,等.多位点可变数目串联重复序列分析方法在布鲁氏菌病监测中的应用[C].第三届全国人畜共患病学术研讨会, 2011: 259-264.
- [3] Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay [J]. BMC Microbiol, 2006, 6(1): 9.
- [4] Zhao ZX, Zhao HY, Cui BY, et al. Difference of the vaccine strain M5 and the virulent strain 16M of *Brucella* species [J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(10): 961-963. (in Chinese)
赵振祥,赵鸿雁,崔步云,等.布鲁氏菌强毒株16M和疫苗株M5差异探索[J].中国人畜共患病学报, 2009, 25(10): 961-963.

(收稿日期:2013-12-18)

(本文编辑:万玉立)

滇西横断山区鼠类及蜚自然感染立克次体调查

亚红祥 张云智 王静林

【关键词】立克次体;巢式聚合酶链反应;序列分析

Investigation on rickettsiae infection among rodents and ticks in Hengduan Mountains, west of Yunnan province

Ya Hongxiang, Zhang Yunzhi, Wang Jinglin. Yunnan Institute of Endemic Diseases Control and Prevention, Dali 671000, China

Corresponding author: Ya Hongxiang, Email: yahongxiang@163.com

【Key words】Rickettsiae; Nested PCR; Sequence analysis

云南为我国立克次体病流行的主要省份之一,由于其地理环境较为复杂,生物多样性异常丰富,加之近年随着旅游业等人类活动的日益扩张,立克次体病例逐渐增多,尤其是滇西横断山区时有恙虫病和斑疹伤寒的流行^[1,2],为此对滇西横断山区开展立克次体调查,为人群有效防治提供参考依据。

1. 材料与方法:

(1) 标本采集:2011—2013年在滇西横断山区盈江、云县、保山和祥云县居民区与山地采用鼠夹和鼠笼诱捕法捕鼠11种272只,现场无菌解剖取鼠肝和脾,以及牛舍捕获的蜚2种42只,置液氮保存。

(2) 检测方法:①DNA提取:采用75%乙醇消毒蜚再以生理盐水清洗,将同类蜚2只一组分成21组;利用生理盐水将蜚及鼠内脏分别在乳钵内研磨,取60 μl样本悬液,采用Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega),按说明书操作。②巢式PCR(nPCR)检测:应用文献[3,4]中的引物(上海生工生物工程有限公司合成)及条件扩增立克次体*groEL*和斑点热群立克次体(SFGR)*ompA*。PCR反应总体积为25 μl,应用Promega公司GoTaqGreen Master Mix试剂盒在Biometra TProfessional PCR仪中进行二次PCR扩增,以无菌水作为阴性对照,无阳性对照。第一次扩增取模板6 μl,第二次扩增取第一次扩增产物1 μl为模板。取二次PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶检测。③DNA序列测定及分析:PCR阳性产物送上海生工生物工程有限公司测序。采用DNASar中的MegAlign软件对序列进行同源性比较和SeqMan软件

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.033

作者单位:671000 大理,云南省地方病防治所/云南省病毒立克次体研究中心/云南省自然疫源性疾病重点实验室

通信作者:亚红祥, Email: yahongxiang@163.com

对序列进行拼接,运用 Mega 5.0 软件构建系统进化树。

2. 结果:

(1) 立克次体 *groEL* 检测及序列分析: 在 272 份鼠内脏样本中, 检出恙虫病东方体 (*Ot*) *groEL* 片段 1 份 (YXP24, 阳性率 0.37%), 其序列 (320 bp) 分析显示与 Kato 株同源性最高达 99.4%, 与 Karp 株的同源性为 99.1%。检出 SFGR *groEL* 片段 2 份 (YXP13 和 YJP73, 阳性率 0.74%), 其序列 (177 bp) 分析显示与 Hauke (*R. rickettsii*)、ATCC VR-151 (*R. sibirica*) 株的同源性最高, 分别为 98.9%、99.4%, YXP13 与 YJP73 的同源性为 99.4%。检出莫氏立克次体 (*Rm*) *groEL* 片段 1 份 (BSP16, 阳性率 0.37%), 其序列 (177 bp) 分析显示与 Wilmington 等株的同源性为 99.6%。21 组蜱样本检出 *groEL* 片段 3 份 (YXT3、YXT8 和 YXT10, 阳性率 14.29%), 其序列 (177 bp) 分析显示与 054 (*R. heilongjiangensis*)、GDM17 (*R. sp*) 株的同源性均为 100%, 与 YXP13、YJP73 的同源性分别为 98.3%、98.9%, YXT3、YXT8、YXT10 三者间的同源性均为 100%。

(2) SFGR *ompA* 检测及序列分析: 对检出 SFGR *groEL* 片段的 2 份鼠内脏及 3 份蜱, 应用半巢式 PCR 扩增 SFGR *ompA*, 结果 3 份蜱中 (YXT3、YXT8、YXT10) 检出 *ompA* 片段。利用 SeqMan 软件对序列进行拼接得到 629 bp 大小的序列, 序列分析显示 YXT3、YXT10 与 YXT8 的同源性均为 99.7%, YXT3 和 YXT8 与 *R. sp* FUJ98 株的同源性最高, 分别为 99.5%、99.8%, 与 *R. heilongjiangensis* 054、*R. sp* ZJ43/2007 株

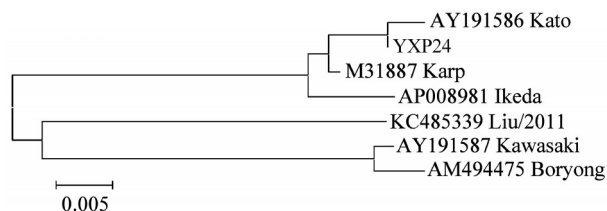


图 1 根据 *Ot groEL* 基因部分序列构建系统进化树

的同源性在 95.6%、92.8%。

(3) 系统进化树分析: 据 *Ot groEL* 部分序列 (320 bp) 构建系统进化树, 结果显示 YXP24 与 Kato 株在同一个分支上 (图 1)。

据立克次体属 *groEL* 部分序列 (177 bp) 构建系统进化树, 结果显示 YXP13 和 YJP73 均与 Hauke (*R. rickettsii*)、ATCC VR-151 (*R. sibirica*) 株在同一个分支上, YXT3 与 054 (*R. heilongjiangensis*)、GDM17 (*R. sp*) 株在同一个分支上 (图 2), BSP16 与 Wilmington 等株在同一个分支上。

3. 讨论: 本次调查应用分子生物学技术对滇西横断山区 11 种 272 只鼠和 2 种 42 只蜱样本进行立克次体核酸序列检测分析, 结果显示该地区鼠类存在 *Ot*、*Rm* 和 SFGR 自然感染; 蜱中存在 SFGR 自然感染, 其基因遗传进化关系与 FUJ

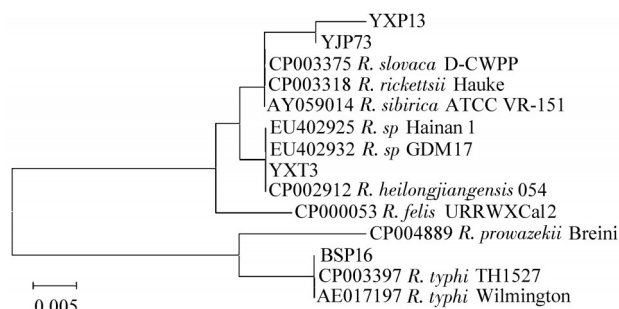


图 2 根据立克次体 *groEL* 基因部分序列构建系统进化树

98 株密切相关。首次证实该地区宿主动物及媒介中存在 *Ot*、*Rm* 和 SFGR 感染, 表明该地区可能为多种立克次体疾病的自然疫源地。

以往血清学方法证实云南省 *Ot* 以 Karp 和 Gillian 型多见, Kato 型罕见^[5], 而本次调查仅见 Kato 型 *Ot*, 然而该地区是否存在 Kato 型恙虫病患者还有待进一步研究。本研究结果还显示宿主动物及媒介中的 SFGR 感染率均大于 *Ot* 和 *Rm* 的感染率, 提示可能该地区宿主动物及媒介中 SFGR 感染更为普遍, 当地应更注重斑点热的预防控制。

(致谢: 盈江、云县、保山、祥云相关疾病预防控制人员在标本采集方面给予的帮助)

参 考 文 献

- [1] Ya HX, Zhang HL, Zhou JH, et al. An outbreak of endemic typhus in Baoashan city, Yunnan province[J]. Chin J Epidemiol, 2011, 32(1): 51-54. (in Chinese)
亚红祥, 张海林, 周济华, 等. 云南省保山市一起地方性斑疹伤寒暴发的调查[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(1): 51-54.
- [2] Ya HX, Wang JL. Serotyping and sequence analysis of *Oreintia tsutsugamushi* from patients with fever of unknown origin in Dali, Yunnan[J]. Chin J Zoonoses, 2013, 29(9): 84-88. (in Chinese)
亚红祥, 王静林. 云南大理地区恙虫病血清学诊断及病原体基因序列分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(9): 84-88.
- [3] Zhang LJ, Li XM, Zhang DR, et al. Molecular epidemic survey on co-prevalence of scrub typhus and marine typhus in Yuxi city, Yunnan province of China [J]. Chin Med J, 2007, 120(15): 1314-1318.
- [4] Wikswo ME, Hu R, Dasch GA, et al. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in Dermacentor species from southern California[J]. J Med Entomol, 2008, 45(3): 509-516.
- [5] Lei YM, Feng XG, Chen YM, et al. Study on serological typing of *Rickettsial tsutsugamushioi* in Yunnan province [J]. Chin J Zoonoses, 1994, 10(2): 62-63. (in Chinese)
雷亚民, 冯锡光, 陈渊民, 等. 云南省恙虫病立克次体血清学分型研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1994, 10(2): 62-63.

(收稿日期: 2013-10-15)

(本文编辑: 张林东)