

• 临床检验研究论著 •

某地区东方立克次体基因型和遗传特征研究^{*}何凤屏^{1△},徐新¹,王江桥²,柯昌文³,周海燕⁴,罗君¹,唐建红⁵,王箭¹,周建英¹,管振祺¹,刘玉兰¹,郑礼杰¹,刘凤莲¹

(1. 汕头大学医学院附属粤北人民医院,广东韶关 512025; 2. 韶关学院医学院,广东韶关 512005;

3. 广东省疾病预防控制中心,广东广州 510300; 4. 韶关市职业病防治院,广东韶关 512028;

5. 韶关市疾病预防控制中心,广东韶关 512026)

摘要:目的 探讨某地区东方立克次体流行株的基因型和遗传特征。方法 采用荧光定量 PCR 技术对该地区东方立克次体感染患者和鼠类标本 Sta56 蛋白编码基因片段检测,对阳性标本进行基因分型和测序,并与巢式 PCR 分型结果相比较;对测序结果与 GenBank 东方立克次体参考序列进行同源性分析。结果 东方立克次体感染患者和鼠类标本中可扩增出 Gilliam 型 523 bp 目的基因片段,与 Kawasaki 型相似,同源性为 96.3%;鼠类标本中还可扩增出 318 bp 目的基因片段,与 TA686 型相似,同源性为 78.5%。东方立克次体感染患者外周血中东方立克次体核苷酸序列与鼠标本的同源性为 100.0%。结论 粤北山区东方立克次体至少存在 Gilliam 型和 Kawasaki 型相似株,鼠类中存在 TA686 型相似株。粤北山区人、鼠均存在东方立克次体自然感染,已成为恙虫病自然疫源地。

关键词:恙虫病东方体; 基因分型; 序列分析,DNA; 基因同源**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.005**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)05-0521-03**Genotype and hereditary feature analysis of Rickettsia orientalis in certain area**He Fengping^{1△}, Xu Xin¹, Wang Jiangqiao², Ke Changwen³, Zhou Haiyan⁴, Luo Jun¹,Tang Jianhong⁵, Wang Jian¹, Zhou Jianying¹, Guan Zhenqi¹, Liu Yulan¹, Zheng Lijie¹, Liu Fenglian¹

(1. Yue Bei People's Hospital affiliated to Shantou University Medical College, Shaoguan

Guangdong 512025, China; 2. Medical College, Shaoguan University, Shaoguan Guangdong 512005, China;

3. Centre for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou Guangdong 510300, China;

4. Shaoguan Occupational Disease Prevention and Treatment Hospital, Shaoguan Guangdong 512028, China;

5. Shaoguan Centre for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Shaoguan Guangdong 512026, China)

Abstract: Objective To investigate the genotype and hereditary feature of prevalent strains of *Rickettsia orientalis* (Ro) in certain area. **Methods** Gene fragment, encoding Sta56 protein in samples of patients and mice infected by Ro, was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction assay (qPCR). Positive samples were analyzed for genotype and sequence, and the results were compared with nest PCR. The homology was analyzed by comparison between sequencing results and nucleotide sequences of Ro registered in GenBank. **Results** The 523 bp fragments of Gilliam genotype could be amplified in samples of patients and mice, with homology of 96.3% with Kawasaki strain. The 318 bp fragment of Gilliam genotype could be amplified in samples of mice infected by Ro, with homology of 78.5% with TA686 strain. The homology of nucleotide sequences of Ro in samples from patients and mice was 100.0%. **Conclusion** Gilliam genotype and Kawasaki quasispecies could be detected among Ro in this area, and TA686 quasispecies could be detected in mice. Natural infection of Ro might exist in human and mice in this area, and natural foci of tsutsugamushi disease have formed.

Key words: orientia tsutsugamushi; genotype; sequence analysis,DNA; genetic homolgy

恙虫病是由恙虫病立克次体(又名东方立克次体,Rickettsia orientalis,Ro)感染引起的自然疫源性传染病,鼠类是主要传染源,通过恙螨叮咬传播。自 20 世纪 80 年代以来,粤北山区不断发现 Ro 感染病例和流行,且近年来发病率有上升趋势^[1-2]。采用分子生物学技术研究粤北山区 Ro 流行株的基因型和遗传特征尚无报道。因此,笔者于 2008~2010 年采用定量荧光 PCR(quantitative real time PCR,qPCR)技术对粤北山区人、鼠所感染 Ro 的基因型进行了同源分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 5 个调查点共 660 例发热患者检出感染患者 224 例,其中 108 例为发热 5 d 内早期感染患者,采集所有患者

全血标本。23 例 Ro 感染黄毛鼠脾组织标本,22 例 Ro 感染褐家鼠脾组织标本,2 例地理纤恙螨匀浆标本。Ro 国际参考株 Gilliam、Karp、Kato 由广东省疾病预防控制中心提供。

1.2 方法

1.2.1 Ro 特异性探针、引物的设计 Ro 特异性探针采用 MGB 探针。对参考文献^[3-4] 中 Sta56 基因引物设计方法进行改良及优化,所设计引物序列如下。引物 1: 5'-TAC ATT AGC TGO GGG TAT CAC-3'; 引物 2: 5'-CCA GCA TAA TTC TTC AAC CAA-3'; 引物 3: 5'-GAG CAG AGC TAG GTA TGT CGC-3'; 引物 4: 5'-TAG GCA TTA TAG TAG GCT GAC-3'(引物 1 和引物 2 为外引物;引物 3 和引物 4 为群

^{*} 基金项目:韶关市科技项目[韶科(卫)2008(文件编号:韶财教[2008]45 号)]。 △ 通讯作者,E-mail:fengphe@hotmail.com。

引物)。Gilliam型引物:5'-TAC ATT AGC TAG GTA TGT CGC-3';Karp型引物:5'-GAT CAA GCT TCG TCC AGT CGC-3';Kato型引物:5'-ATA ACA TCG GAT TAT CGT CGC-3';Kawasaki型引物:5'-CTA GGG ATC CCG TAG GCT GAC-3'。Gilliam株的扩增片段为:AGA TGA AAG GAT ATT AAA GGG CAT ACA GGC ATG GTT GCA TCA GGA GCA CTT GGT GTA GCA ATT AAT GCT GCT GAG GGT GTA T。Kawasaki型扩增片段为:CTA GGG ATC CCG ACA GAT GCA CTA TTA GGC ATG CTG CTA TTG ATA CAG GTC GAT CAA GCT TCC GGT。

1.2.2 qPCR反应体系 每个反应中含12.5 μL TaqMan Universal PCR Master Mix, 5 μL 外引物和探针混合物[100 μL 体系中含引物3 μL(50 μmol), 探针2 μL(50 μmol), 92 μL 去离子水], 5.5 μL 去离子水, 2 μL DNA模板, 反应体系为25 μL。扩增条件:50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 循环45次。

1.2.3 标准DNA模板的建立 用引物扩增Ro Gilliam株相对分子质量为 6×10^3 的外膜蛋白编码基因片段, 胶回收试剂盒回收纯化该片段, 将该片段与T载体连接, 构建外膜蛋白编码基因重组质粒, 以该质粒作为标准DNA模板, 将其倍稀释后用于建立qPCR标准曲线。

1.2.4 核酸的提取 以QIAamp DNA MinKit试剂盒提取患者外周血DNA作模板; 具体步骤按试剂盒说明书操作。鼠DNA提取:取鼠脾脏标本约0.3 g于Eppendorf管内, 剪碎后加800 μL TE缓冲液, 离心后弃去上清液, 向沉淀中加入600 μL裂解缓冲液、15 μL蛋白酶K(20 mg/mL)、25 μL溶菌酶(4 mg/mL)55 °C过夜; 后续操作步骤按试剂盒说明书操作。

1.2.5 qPCR检测及产物纯化 按上述要求配制标准DNA模板和待检DNA标本检测体系, 并进行qPCR检测。对qPCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 以琼脂糖凝胶回收、纯化剂盒从凝胶中回收并纯化qPCR产物, 送上海生工生物技术有限公司进行测序。

1.2.6 PCR分型 采用qPCR检测Ro基因型, 再用巢式PCR(nest PCR, nPCR)鉴定Ro基因型。采用特异性群引物, PCR反应条件为:94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 57 °C 2 min, 70 °C 2 min循环30次, 72 °C 10 min。以1 μL纯化的PCR阳性产物为模板DNA, 分别加入各型引物对2 μL。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 紫外灯下观察结果。

1.2.7 核酸序列分析 根据以上PCR分型结果, 选择5个代表株:2个分离自患者全血标本, 2个分离自黄毛鼠脾脏组织, 1个分离自地理纤恙螨匀浆。以纯化的相应PCR扩增产物作为测序模板, 以PCR群引物作为测序引物, 送上海Invitrogen生物技术有限公司进行测序。

1.2.8 Ro抗体检测 采用间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测660例发热患者血清和55例鼠脾脏组织Ro抗体。严格按照说明书进行操作, 试剂盒购自上海生物技术研究所。

2 结 果

2.1 不同感染时相DNA标本qPCR检测结果 采用qPCR分别在发病5、15、25 d内检测感染患者和鼠类Ro DNA浓度, 结果见图1。

2.2 PCR扩增结果 分离自3株国际参考株和5株代表株的Ro DNA用群引物扩增均出现相应大小片段(图2)。以2例Ro感染患者外周血标本、2例Ro感染鼠脾脏组织标本和1

例地理纤恙螨标本作为粤北代表株, 命名为YB-1、YB-2、YB-3、YB-4。Ro DNA用型引物扩增均出现相应大小片段(图3), 结果显示YB-1、YB-2、YB-3、YB-4为Kawasaki型, YB-3'为TA686型。鼠脾脏标本TA686型PCR扩增结果见图4。

2.3 Ro基因同源分析 4株代表株Ro测序结果表明分离株同源性为100.0%, 与Kawasaki型的同源性为96.3%。部分鼠标本Ro DNA核苷酸序列与TA686型的同源性为78.5%。

2.4 免疫荧光抗体检测结果 IFA检测结果显示, 224例Ro感染患者抗体阳性率为51.79%(116/224), 108例早期感染患者检测结果均为阴性。116例抗体阳性患者血清型为Gilliam型, 未见Karp和Kato型。

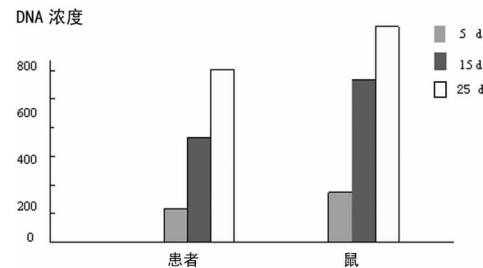


图1 Ro感染患者外周血及鼠脾脏组织标本qPCR检测结果

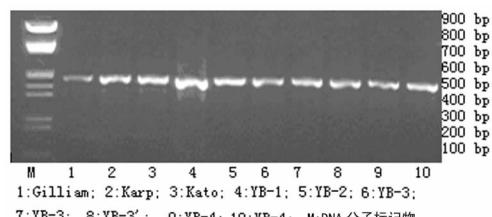


图2 Ro群特异性引物PCR扩增产物电泳结果

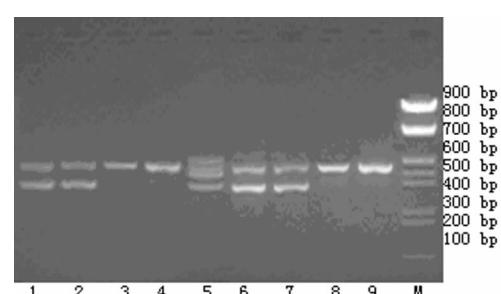


图3 Ro型特异性引物PCR扩增产物电泳结果

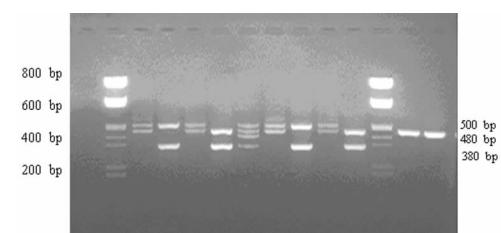


图4 鼠TA686型PCR扩增产物电泳结果

3 讨 论

粤北地区恙虫病患者临床特征以高热、皮疹和淋巴结肿大为主, 部分患者存在多脏器损害, 6~9月为高发季节, 患者以农民为主。虽然国内外已有恙虫病研究相关报道, 但由于各地

区地理环境、流行特点以及 Ro 基因型变异不同,各地区恙虫病流行特征也有所不同^[3-5]。恙虫病发病初期临床症状不典型,且无特异性实验诊断方法,难以实现及时确诊和早期治疗,因此迫切需要建立特异性强和敏感性高的早期诊断方法。本研究在常规 qPCR 基础上对试验条件进行了优化^[6-8]:(1)采用 TaqMan-MGB 探针,提高了扩增反应的特异性。采用 Taq-Man-MGB 探针时,每扩增 1 个特异性产物只释放 1 个分子荧光物质,且检测信号不受非特异性产物的影响,有效提高了检测特异性。此外,该探针 3' 端的淬灭基团与报告基团的空间位置更为接近,因此,可降低非特异性荧光背景,也有利于提高检测特异性。(2)优化了引物设计,增强了引物特异性,当基因和引物二聚体的熔解温度确定后,在该熔解温度上进行“温度描绘”,维持 15 s 高温扩增,可避免非特异性产物的形成。同时,所设计的 2 条引物在 3' 端不能互补,且 GC 含量基本一致,可减少了引物二聚体的形成,提高了检测特异性和灵敏度。有学者针对 Sta56 基因序列设计特异性引物并以 qPCR 检测疑似血标本,阳性率达 73%^[3-4]。本研究以上述经条件优化的 qPCR 检测 660 例发热(体温 38.5 ℃ 以上)患者外周血标本,检出 224 例为 Ro DNA 阳性,阳性率为 33.94%。

本研究采用 IFA 检测 224 例 Ro 感染患者血清 Ro 抗体,抗体阳性率为 51.79%(116/224),108 例 Ro 早期感染患者均为阴性,与血清 Ro 抗体在病程后期或恢复期才能检出有关^[8]。恙虫病早期快速诊断主要依靠分子生物学技术。本研究采用优化的 qPCR 技术在 Ro 早期感染患者外周血中检出 Ro DNA,最低检测限为 5 copy/μL DNA,说明优化的 qPCR 有较高灵敏度。朱丽娜等^[9]的研究显示 qPCR 具有 Ro 种特异性,检测灵敏度约为 nPCR 的 100 倍,且重复性好。本研究中 qPCR 检测结果批内变异系数为 0.05%~1.6%,批间变异系数为 1.4%~3.1%,也说明 qPCR 具有良好重复性。

本研究中,Ro 抗体阳性患者 IFA 检测血清型均为 Gilliam 型,未检出 Karp 和 Kato 型,qPCR 也提示为 Gilliam 型,鼠 DNA 扩增片段不同于国际参考株 Gilliam、Karp、Kato,经 nPCR 分型证实为 Kawasaki 型。Paris 等^[10]在 2009 年以 groEL 基因为靶序列,构建了高度敏感的 qPCR。同年,Sonthayanan 等^[11]应用 qPCR 检测了患者外周血 Ro 16S rRNA 含量,结果表明其含量与病情呈正相关。本研究证实患病时间长的 Ro 感染者外周血 Ro DNA 浓度高于患病时间短的患者,与上述报道基本一致。

本研究中的同源性分析显示,粤北山区 Ro 感染患者和鼠类所感染 Ro 的核苷酸序列同源性为 100.0%,与 Kawasaki 型的同源性为 96.3%,提示与日本 Kawasaki 型存在明显亲缘关系。部分鼠类感染 Ro 与 TA686 型的同源性为 78.5%,提示与泰国 TA686 型存在明显亲缘关系。可见粤北山区 Ro 感染至少存在 Gilliam 型、Kawasaki 型相似株、TA686 型相似株。

(上接第 520 页)

- [8] Tanne D, Haim M, Goldbourt U, et al. Prospective study of serum homocysteine and risk of ischemic stroke among patients with pre-existing coronary heart disease[J]. Stroke, 2003, 34(3): 632-636.
- [9] Narayanan S. Sialic acid as a tumor marker[J]. Ann Clin Lab Sci, 1994, 24(4): 376-384.
- [10] Watts CF, Crook MA, Haq S, et al. Serum sialic acid as an indicator of change in coronary artery disease[J]. Metabolism, 1995, 44(2): 147-148.
- [11] Lindberg C, Eklund GA, Gullberg B, et al. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality [J]. BMJ, 1991, 302(6769): 143-146.
- [12] 刘大勇, 罗勇, 赵慧强, 等. 冠心病患者血清唾液酸含量变化及其与血脂的相关性分析[J]. 贵州医药, 2001, 25(6): 494-495.

粤北山区海拔 800~2 000 m,属亚热带地区,气候温暖、潮湿,年平均气温 16~20 ℃,年平均相对湿度 78%~96%,易出现 Ro 孪生和流行。黄毛鼠是该地区 Ro 主要贮存宿主,也是野外优势鼠种,活动范围大^[12]。本研究证实可感染人及鼠类的 Ro 核苷酸序列同源性为 100.0%,说明粤北山区域恙虫病自然疫源地已经形成,感染好发于 6~9 月,是夏季型疫源地。

参考文献

- [1] 周杰,李德昌,卢志坚. 粤北儿童与成人恙虫病临床特点对比分析[J]. 华夏医学, 2006, 19(4): 641-643.
- [2] 张联标,黄履芳. 恙虫病致心脏损害 86 例临床分析[J]. 河北医学, 2006, 12(11): 1143-1144.
- [3] Bakshi D, Singhal P, Mahajan SK, et al. Development of a real-time PCR assay for the diagnosis of scrub typhus cases in India and evidence of the prevalence of new genotype of *O. tsutsugamushi*[J]. Acta Tropica, 2007, 104(1): 63-71.
- [4] Lu HY, Tsai KH, Yu SK, et al. Phylogenetic analysis of 56-kDa type-specific antigen gene of *Orientia tsutsugamushi* isolates in Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(3): 658-663.
- [5] 赖名耀,吴娜,柳爱华,等. 恙虫病东方体检测及分型的分子生物学技术进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(10): 782-798.
- [6] Cheng A, Magdaleno S, Vlassov AV. Optimization of transfection conditions and analysis of siRNA potency using real-time PCR [J]. J Virol Methods, 2011, 175(1): 80-84.
- [7] Van Stelten A, Kreman TM, Hall N, et al. Optimization of a real-time RT-PCR assay reveals an increase of genogroup I norovirus in the clinical setting[J]. Methods Mol Biol, 2011, 764(1): 199-213.
- [8] 王誓闻,张丽娟,王园园,等. 普通 TaqMan 探针及 TaqMan MGB 探针 real-time PCR 检测物形体 msp-2 基因方法的建立与比较[J]. 疾病监测, 2011, 26(1): 12-14.
- [9] 朱丽娜,张品波,陈梅岭,等. 实时荧光定量 PCR 检测恙虫病东方体[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(3): 228-231.
- [10] Paris DH, Aulkkanit N, Jenjaroen K, et al. A highly sensitive quantitative real-time PCR assay based on the groEL gene of contemporary Thai stains of *Orientia tsutsugamushi*[J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(5): 488-495.
- [11] Sonthayanan P, Chierakul W, Wuthiekanun V, et al. Association of high *Orientia tsutsugamushi* DNA loads with disease of greater severity in adults with scrub typhus [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(2): 430-434.
- [12] 吴家兵. 我国恙虫病疫源地研究进展[J]. 安徽预防医学杂志, 2010, 16(6): 467-469.

(收稿日期:2011-11-19)

(2): 147-148.

- [11] Lindberg C, Eklund GA, Gullberg B, et al. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality [J]. BMJ, 1991, 302(6769): 143-146.
- [12] 刘大勇, 罗勇, 赵慧强, 等. 冠心病患者血清唾液酸含量变化及其与血脂的相关性分析[J]. 贵州医药, 2001, 25(6): 494-495.

(收稿日期:2011-11-09)