

一株斑点热立克次体的病原学研究

陈香蕊 胥照平 陈万荣 李申龙 张永国

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘要 自内蒙古自治区的草原革蜱(*D. nuttalli*)中分离到一株斑点热立克次体。用微量酶染色方法进行血清学鉴定表明,系西伯利亚(*Rickettsiae sibirica*)种血清型。G+C mol%含量为32.4%。对其核酸进行聚合酶链扩增/限制性核酸内切酶消化(PCR/RFLP)分析DNA长度多态性,分别引用立氏立克次体蛋白抗原基因Rr190序列作为扩增引物Rr190.70p~602n和Rr190.4442p~5664n,扩增后分别用PstI和RsaI限制性核酸内切酶消化。其电泳图谱证明,该分离株的DNA多态图谱与*R. sibirica*完全一致。上述结果可确证该分离株为西伯利亚斑点热立克次体种,称内8501株即NM-8501。

关键词 斑点热立克次体,血清型鉴定,PCR/RFLP

斑点热立克次体(Spotted Fever Group *Rickettsiae*, SFGR)是立克次体属中最复杂的一群微生物。其种类繁多,抗原性复杂,生物学性状相似,致病性不同。SFGR分布于世界各大洲,不同种依其媒介不同而各有其分布范围。立氏立克次体(*R. rickettsii*)主要分布于美洲。康氏立克次体(*R. conorii*)主要分布于欧洲。西伯利亚立克次体(*R. sibirica*)主要分布在北亚和西南亚地区。到目前为止,我国证实有三种斑点热立克次体,多见西伯利亚立克次体,广泛分布在新疆维吾尔自治区,内蒙古自治区和黑龙江省境内^[1~3],北京地区也有报

道^[4]。经血清学和分子生物学分析证实的两个新种:黑龙江斑点热立克次体(*R. heilongjiangii*)^[5]和内蒙古斑点热立克次体(*R. HA91*)分别局限在黑龙江省和内蒙古自治区境内。本文报道从内蒙古自治区的草原革蜱(*Dermacentor, nuttalli*)中分离的一株斑点热立克次体的血清型和分子生物学分析结果。

1 材料和方法

1.1 毒种

1995-10-25 收稿

普氏立克次体(*R. prowazekii*) E株,引自世界卫生组织(WHO),恙虫病立克次体(*R. tsutsugumushi*) Gilliam株和Q热立克次体(*Coxiella burnetti*)九里株分别由北京热带病研究所和第三军医大学惠赠。斑点热群立克次体有引自ATCC的西伯利亚(*R. sibirica*)246株,引自WHO的康氏立克次体 Simko和 Barbash株,立氏立克次体的R株和小蛛立克次体(*R. akari*)的Kaplan株。国内参照株有已鉴定为西伯利亚种的精河株(Jinghe)和黑龙江立克次体054株。大肠杆菌*E. coli* K12株由本所细菌室提供。

1.2 动物和鸡胚

250 ~ 300g 雄性豚鼠(本院动物中心提供),5 ~ 6日龄来杭母鸡之鸡胚(购自北京生物制品研究所)。

1.3 蝉标本及立克次体分离方法

1985年在内蒙古自治区海拉尔市郊采集到200只游离的草原革蝉。用无菌离子水反复洗涤干净,用75%酒精消毒,再用无菌pH7.2 PBS缓冲液洗涤3次以上,将其分为3组,每组70只左右。加入少量PBS研磨匀浆,再用无菌PBS稀释为1:10(W/V),接种于本实验室饲养3d未见体温上升和反应的健康豚鼠。每组蝉悬液接种3只豚鼠,逐日测肛温和观察其阴囊肿大情况。

1.4 立克次体的培养,抗原悬液及抗原片的制备

参照本实验室常规方法进行。

1.5 免疫血清、小白鼠抗立克次体免疫血清

本实验室1987年制备保存的试剂。

1.6 免疫酶标记法(MIP法)

参见文献[6]。

1.7 G+C mol测定

所需立克次体的纯化,DNA的提取及G+C mol%的测定均见前报^[7]。

1.8 PCR/RFLP

所用两对引物选自编码立氏立克次体抗原蛋白的基因(Rr.190)序列中的70p和602n,4442p和5664n两对序列(中科院微生物研究

所合成),扩增产物分别用PstI和RasI限制性内切酶消化,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱分析其DNA长度多肽^[8]。

2 结果

2.1 立克次体分离

三组蝉匀浆物分别接种的三组豚鼠中,其中1组的3只豚鼠于接种后4 ~ 6d全部发病,阴囊肿大,体温升高到39.6 ~ 40℃,高热持续3d以上。解剖高热3d以上的豚鼠,发现肝脾肿大,是健康豚鼠肝脾的2 ~ 3倍。抽取高热期的豚鼠心血接种5d龄鸡胚卵黄囊,于感染后第5d死亡,镜检经Giemsa染色的卵黄囊膜涂片,可见较丰富的立克次体样颗粒。将此分离物称内8501(即NM-8501)。

2.2 血清型分析

用常规方法制备NM8501株抗原悬液及小鼠免疫血清后,用微量免疫斑点式酶标染色法(MIP)将其与立克次体属的恙虫病立克次体、斑疹伤寒立克次体、斑点热群立克次体三个群及柯克斯体属的Q热立克次体的代表株的免疫血清及抗原进行交叉反应。结果表明,NM8501的抗原和免疫血清与普氏立克次体(E株)、恙虫病立克次体(Gilliam株)及Q热立克次体(九里株)的免疫血清和抗原无反应。进而将NM8501的抗原与免疫血清与斑点热群的不同种立克次体的免疫血清和抗原进行反应。其抗原均用1:10(W/V)的卵黄囊膜悬液,免疫鼠血清作二倍系列稀释。从表1结果看出,NM8501与西伯利亚种的246株及Jinghe株呈高滴度反应。此三株的任何一株抗原与三株免疫血清反应均可达1:1024 ~ 1:1638的MIP抗体滴度,三株为同一血清型——西伯利亚种。此三株均不与立氏立克次体和小蛛立克次体反应,与康氏立克次体有交叉反应,其抗体滴度均低于本株反应的4倍,说明NM8501与后三种非同种。

2.3 G+C mol%测定

普氏立克次体(E株),康氏立克次体(Barbash株),国内分离的Jinghe株和054株

表1 斑点热立克次体内 8501 株的 MIP 血清学反应结果

抗原	抗 体 滴 度					
	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. conorii</i>	<i>R. akari</i>	<i>R. sibirica</i>	Jinghe	NM8501
<i>R. rickettsii</i>	1:16384	— *	—	—	—	—
<i>R. conorii</i>	1:512	1:8192	—	1:512	1:256	1:2048
<i>R. akari</i>	—	—	1:16834	—	—	—
<i>R. sibirica</i>	1:514	1:1028	—	1:8192	1:4096	1:8192
Jinghe	1:127	1:514	—	1:16384	1:16384	1:8192
NM8501	1:32	1:128	—	1:2048	1:1024	1:1024
未感染卵黄 囊悬	—	—	—	—	—	—

*: 当免疫血清为 1:40 时仍与抗原不反应

及大肠杆菌 *E. coli* K12 株的 Tm 值及其 G+C mol% 值见表 2。NM8501 的 G+C mol% 为 32.4，与斑点热群的 Barbash 株，054 株和 Jinghe 株无明显差别，同时也与普氏立克次体很接近。

表2 不同立克次体的 DAN 的 G+C mol% 含量测定结果

菌 株	Tm(°C)	G+C (mol%)
普氏立克次体 E 株	65.8	29.1
康氏立克次体 Barbash 株	67.2	32.5
国内分离株 Jinghe 株	67.3	32.7
054 株	66.4	30.6
内 8501 株	67.2	32.4
细菌 <i>E. coli</i> K12 株	74.8	50.9

2.4 基因型分析

Rr190.70p ~ 602n 和 Rr190.4442p ~ 5664n 两对引物扩增 NM8501 立克次体 DNA 片段产物的大小分别为 532bp 和 1222bp，532bp 的 PstI 内切酶消化的电泳图谱及 1222bp 的 RasI 内切酶消化的电泳图谱均表明，NM8501 与西伯利亚的 246 及 Jinghe 株完全一致，与斑点热群的立氏立克次体，康氏立克次体和小蛛立克次体不同，证明为西伯利亚种(附图略)。

3 讨论

从内蒙古自治区草原革蜱中分离到一株斑

点热立克次体，经血清学和基因型鉴定确认为西伯利亚种，与其它学者所报道内蒙古自治区的蜱株和人株斑点热立克次体多为西伯利亚种一致。然而于学杰等又分离鉴定了一株，认为是斑点热群新种的 HA91 株^[6]。由此看来，内蒙古自治区境内可能存在两个斑点热种。但至今除发现了个别西伯利亚斑点热病例外尚未见有其它斑点热流行的报道。是斑点热患者极少发生，还是误诊为其它热性病，尚待进一步调查。

在 NM8501 分类鉴定中可以看出，血清型为主要分类依据，也是国际上认可的。近年来人们注意了基因型的分析，但尚无明确分类指标，多用于不同立克次体发生学研究^[9]。而 G+C mol% 含量作为分类学依据则显不力，因为立克次体簇中不同属间的差别都不大，一般不大于 5%，难以作为分类指标。此点与细菌分类中 G+C mol% 测定的地位比，没能显示出其优势，还需要进行大量工作，方能提出可靠的依据。

斑点热立克次体主要分布在我国北方。近年来我国学者陆续发现我国南方也存在斑点热立克次体，林碧瑚等报道了海南人血清中有斑点热立克次体抗体^[9]，陈振光发现福建人群中存在斑点热立克次体抗体阳性者^[10]。本实验室用 PCR 方法检测到福建蜱体中斑点热立克次体 DNA(待发表)。因此，有必要更加广泛地调

查我国斑点热立克次体的分布及其疾患，以利防治。

参 考 文 献

[1] 孔昭敏, 胥照平, 周新荣等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1985, 5(6): 386 ~ 389.

[2] Fan M Y, Walker D H, H Liu Q, et al. Am J Trop Med Hyg, 1987, 36: 615 ~ 620.

[3] 娄丹, 吴益民, 王宾等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1985, 5(6): 250 ~ 253.

[4] Yu X J, Yan Jin, My Fan, et al. J Clin Microbil, 1993, 31(1): 83 ~ 88.

[5] Chen X R, Xu Z P, Wo J E, et al. in Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Bratislava, 1991, Slovak Academy Press, 474 ~ 482.

[6] 胥照平, 孙东莲, 陈香蕊等. 中国人兽共患病杂志, 1986, 2(2): 30 ~ 33.

[7] 陈香蕊, 陈葛荣, 陈建龙等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1986, 6(5): 293 ~ 325.

[8] Regnery R L, Spruill G L, Plikaytis B D. J Bacteriol, 1991, 173(5): 1576 ~ 1589.

[9] 林碧瑚, 孙晓娟, 林英姿等. 中国人兽共患病杂志, 1994, 10(2A): 130 ~ 132.

[10] 陈振光, 毕德增, 宋秀萍等. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11(3): 52 ~ 54.

STUDIES ON THE FEATURES OF THE STRAIN OF SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIAE

Chen Xiangrui Xu Zhaoping Chen Wanrong
 Li Shenlong Zhang Yongguo

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract The features of the NM8501 strain of Spotted Fever Group Rickettsiae (SFGR) from ticks in HalLaer city, Inner Mongolia were analysed. The serotype of NM8501 was the same with *R. sibirica* (strain 246 and Jinghe); It's DAN base composition, G+C mol%, was 32.4% that was identical with those of other members of SFGR. The genetic type of NM8501 were no different from 246 and Jinghe strains of *R. sibirica* specie of SFGR in PCR /RFLP polyacrylamide electrophologram of Rr190.70p ~ 602n (PstI) and Rr190.4442p ~ 5664n (Rasi). The results above revealed that NM8501 strain was thought as sibirica specie of SFGR.

Key words Spotted Fever Group Rickettsiae, Serotype, PCR /RFLP