DOI:10.3969/j.issn.1002－2694.2021.00.168

·调查研究·

河北省野鼠立克次体感染调查

刁丹红[1]，王蒋丽[1]，郭文平[2]，李彩云[1]，杨欢欢[1]，李雁飞[1]，谢广成[2]

摘　要：目的　调查河北省南部和东北部野鼠立克次体感染情况以及感染株的遗传进化特征。**方法**　采用粘鼠板和鼠笼在河北南部邯郸市及北部承德市进行捕鼠，提取鼠脾脏DNA，采用半巢氏PCR扩增立克次体的16S *rRNA*、*ompA*、*gltA*基因，对扩增阳性产物进行测序，并对获得序列进行同源性比较和系统发生树分析。**结果**　在邯郸市和承德市共捕获鼠100只，在这些鼠脾脏样本中有6份（6%）被PCR扩增阳性，其中邯郸市2份、承德市4份。PCR阳性产物测序后同源性分析，发现本研究中扩得的6株立克次体的3个目的基因序列均与劳氏立克次体相应基因序列的同源性最高，16S *rRNA*与*gltA*的同源性大于99.9%，*ompA*大于98.8%。基因序列系统发生树分析结果显示河北野鼠携带的立克次体菌株与我国其它地区检出的劳氏立克次体菌株有密切的亲源关系。**结论**　河北省南部和东北部野鼠均存在劳氏立克次体的感染，野鼠生存地区可能为立克次体感染的自然疫源地，应加强当地人群立克次体感染的防控。

关键词：野鼠；劳氏立克次体；遗传进化分析；半巢氏PCR

中图分类号：R376　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1002－2694(2022)01－0084－05

Investigation of *Rickettsia* infections in wild rodents in Hebei Province

DIAO Dan-hong[1], WANG Jiang-li[1], GUO Wen-ping[2], LI Cai-yun[1], YANG Huan-huan[1], LI Yan-fei[1], XIE Guang-cheng[2]

(1.*Chengde Center for Disease Control and Prevention*, *Chengde* 067000, *China*;
2.*Chengde Medical College*, *Chengde* 067000, *China*)

Abstract: This study investigated *Rickettsia* infections and genetic characteristics in wild rats in southern and northeastern Hebei Province. Rodents were captured with sticky boards and cages in Handan and Chengde, Hebei. DNA was extracted from the mice spleens. The 16S *rRNA*, *ompA* and *gltA* genes of *Rickettsia* were amplified with semi-nested PCR. The PCR products were sequenced, the nucleotide identities were determined, and phylogenetic analysis was performed. A total of 100 rodents were captured in Handan City in southern Hebei Province and Chengde City in northern Hebei Province. Six rodents tested positive for the 16S *rRNA* gene in the spleen, with a positivity rate of 6%. Of them, two were detected in Handan City, and four were detected in Chengde City. In addition, the *ompA* gene and *gltA* gene sequences were obtained. Nucleotide identity analysis indicated that all six strains were closely related, and shared the highest nucleotide identity (more than 99.9% for 16S *rRNA* or *gltA*, and 99.9% for *ompA*) with *R. raoultii*. Phylogenetic analysis using MEGA 6.0 indicated that all six strains had the closest relationship with known *R. raoultii* strains from other parts of China. *Rickettsia* infections exist in wild rodents in southern and northeastern Hebei Province. Monitoring and prevention measures for *Rickettsia* disease should be strengthened to decrease the threats to animal and human health.

Keywords: wild rodents; *Rickettsia raoultii*; phylogenetic analysis; semi-nested PCR

2021年度医学科学研究课题计划项目（No.20210234）和河北省教育厅青年拔尖人才项目（No.BJ2020024）联合资助

通讯作者：王蒋丽，Email：cdcwjl@126.com；
ORCID:0000-0001-6062-9095
郭文平，Email：guowenping@nwsuaf.edu.cn；
ORCID: 0000-0002-3047-179X
作者单位：1.承德市疾病预防控制中心，承德　067000；
2.承德医学院，承德　067000

Supported by the Research Project of Medical Science in 2021 (No. 20210234) and the Young Talent Program of Higher School in Hebei Province (No.BJ2020024)

Corresponding authors: Wang Jiang-li, Email: cdcwjl@126.com; Guo Wen-ping, Email: guowenping@nwsuaf.edu.cn

立克次体（*Rickettsia*）为原核单细胞微生物，其专性寄生于真核细胞内。由该类菌引起的立克次体

病是一类重要的人兽共患疾病[1-2]。近年来，世界范围出现多种新发及再发立克次体病[3-5]。我国在新疆、黑龙江、云南等地野生动物和/或患者样本中检出或分离到某些致病性立克次体[6]。

由于立克次体严格胞内寄生这一特性，人们很难用传统的细菌学分类手段对该类菌进行区分。16S *rRNA* 基因由于其高变区有种属特异性，保守区在各细菌之间差异不大的特点，已经成为最适合细菌属种分类鉴定的目的基因[7-8]。立克次体属的柠檬酸合成酶基因（*gltA*）、外膜蛋白 A（*ompA*）基因为鉴定立克次体种的常用基因[9]。立克次体的 *ompA* 基因序列具有种内差异，为种内菌株分型的目的基因[10]。

本研究捕获河北省南部和东北部两个特定地区的野鼠作为调查对象，扩增鼠脾脏样本的立克次体 16S *rRNA*、*ompA*、*gltA* 基因，并对扩得的目的基因片段测序，对测定的基因序列进行同源性比对和系统发生树分析，研究当地立克次体的遗传特征和流行特征，为当地立克次体病预防与控制提供重要数据。

1　材料与方法

1.1　主要仪器设备与试剂　PCR 仪（Applied Biosystem，美国）、凝胶成像仪（Bio-Rad，美国）、电泳仪（北京六一仪器厂，北京）、组织研磨机（上海净信实业有限公司，上海）、核酸提取仪（江苏硕世生物科技股份有限公司，江苏）、PCR master Mix（TIANGEN，北京）。

1.2　野鼠样本采集　2020 年 4 月－9 月，在河北省邯郸市及承德市选取的 5 个乡镇用粘鼠板和鼠笼法捕获野鼠，其中邯郸市 50 只，承德市 50 只，分别编号登记，无菌操作解剖，取脾脏样本，－80 ℃ 冻存待检。

1.3　脾 DNA 提取　每只鼠分别取约 10 mg 脾脏组织用研磨机进行研磨，使用硕世生物科技有限公司的组织 DNA 提取试剂盒（磁珠法）提取脾脏组织全 DNA，并保存于－20 ℃ 备用。

1.4　PCR 扩增　根据文献[11]中的引物（表 1）采用半巢氏 PCR 进行立克次体 16S *rRNA*、*ompA*、*gltA* 基因的扩增，其中 16S *rRNA* 分为两段进行扩增。扩增条件为：94 ℃ 5 min 后；94 ℃ 40 s、50 ℃ 40 s、72 ℃ 50 s，循环 35 次；最后 72 ℃ 7 min。二轮扩增的 PCR 程序与第一轮相同。16S *rRNA* 前后两半段、*ompA*、*gltA* 扩增产物目的片段的大小分别为 950 bp、700 bp、750 bp 和 1 000 bp。

1.5　序列分析及遗传进化特征分析　PCR 阳性产物送至北京擎科生物技术有限责任公司进行测序，所得序列先用 blast 进行比对分析，然后用 Lasergene 程序计算序列之间的同源性，用 MEGA 6.0 中的最大似然法（ML）构建系统发生树，核苷酸替代模型为 GTR＋I＋G，分析采用 Bootstrap Replication 的值为 100。

表 1　本研究所用引物

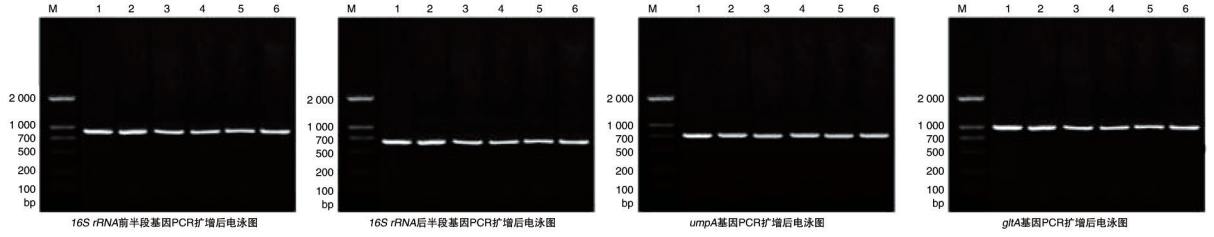
Tab.1　Primer sequences for bacterial identification through PCR

目的基因	引物名称	引物序列（5′-3′）
16S *rRNA* 前半段	R-16-F	GTACGGAATAACTTTTAGAAAT
	R-16-R1	CATGATGACTTGACRTCGT
	R-16-R2	CATCTCACGACACGAGCTG
16S *rRNA* 后半段	R-rrs-F1	GAAGGCGRTCATYTRGGCT
	R-rrs-F2	GRTCATYTRGGCTRCAACTG
	R-rrs-R	CTGCCTCTTGCGTTAGCT
ompA	ompAF725	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA
	ompAR1-725	ACCTACATTATCAAHGCCTGT
	ompAR2-725	ACCTSTTAATACTGCATTTRCAT
gltA	R-gltA-F1	CCGGGYTTTATGTCTACTGC
	R-gltA-F2	CTTTATGTCTACTGCKTCTTG
	R-gltA-R	AGCTGTCTWGGTCTGCTGATT

2　结　果

2.1　PCR 电泳结果　在河北省邯郸市和承德市分别采集 50 只野鼠，根据形态学特征与线粒体 *cytb* 基因分析，邯郸市捕捉到的老鼠为黑线姬鼠，承德市捕捉到的为褐家鼠。将 100 只鼠的脾脏组织分别提取 DNA 做模板，采用 PCR 扩增立克次体的 16S *rRNA* 基因，然后扩增阳性标本的 *ompA* 基因及 *gltA* 基因，扩增产物使用 1.5％琼脂糖凝胶电泳成像。结果检出 6 只野鼠样本的 3 个目的基因扩增

均为阳性(图 1),4 个目的基因扩增片段分别约为 950 bp、700 bp、750 bp 和 1 000 bp,与预期目的片段大小相符。承德市褐家鼠的立克次体感染率为 8%(4/50),邯郸市黑线姬鼠的立克次体感染率为 4%(2/50)。



M:DL2000 maker; 1-6:鼠脾脏样本

图 1 野鼠脾脏样本 16*S rRNA* 基因前半段、16*S rRNA* 基因后半段、*ompA* 基因及 *gltA* 基因 PCR 扩增后电泳图

Fig.1 PCR products of the first half of the 16*S rRNA* gene, the second half of the 16*S rRNA* gene, and the *ompA* and *gltA* genes in the spleens of wild rodents

2.2 16S *rRNA* 基因测序结果分析 将 6 株立克次体的 16S *rRNA* 基因进行同源性分析,它们之间的同源性为 99.9%~100%。此外,这 6 条 16S *rRNA* 基因序列与 GenBank 中劳氏立克次体相应基因之间的序列同源性最高,为 99.9%~100%。下载 GenBank 中立克次体的已知 16S *rRNA* 基因序列,用 MEGA 6.0 中的 ML 方法构建的系统发生树(图 2)。在 16S *rRNA* 基因序列的系统发生树上,本研究中检出的 6 个菌株与劳氏立克次体有最密切的亲缘关系,位于同一分支。提示从河北两地野鼠中检出立克次体均为斑点热群的劳氏立克次体。本研究中获得的 16S *rRNA* 基因序列的 GenBank 登记号为 MZ292055~MZ292060。

2.3 *ompA* 基因和 *gltA* 基因测序结果分析 本研究中获得的 6 条立克次体的 *ompA* 基因的同源性为 99.7%~100%;此外,这 6 条 *ompA* 基因序列与 GenBank 中劳氏立克次体相应基因序列之间的同源性最高,为 98.8%~100%。采用 *ompA* 基因序列构建的系统发生树上,结果显示河北 6 个立克次体菌株与劳氏立克次体有最密切的亲缘关系,与我国其它地区检出的劳氏立克次体位于同一分支。本研究中获得的 6 条立克次体的 *gltA* 基因的同源性为 100%;此外,这 6 条 *gltA* 基因序列与 GenBank 中劳氏立克次体相应基因序列之间的同源性最高,为 99.9%~100%。采用 *gltA* 基因序列构建的系统发生树上,结果显示河北立克次体与劳氏立克次体的位于同一分支,与我国其它地区发现的劳氏立克次体的亲缘关系最近(图 3)。本研究中获得的 *ompA* 与 *gltA* 基因序列的 GenBank 登记号为 MZ297803~MZ297814。

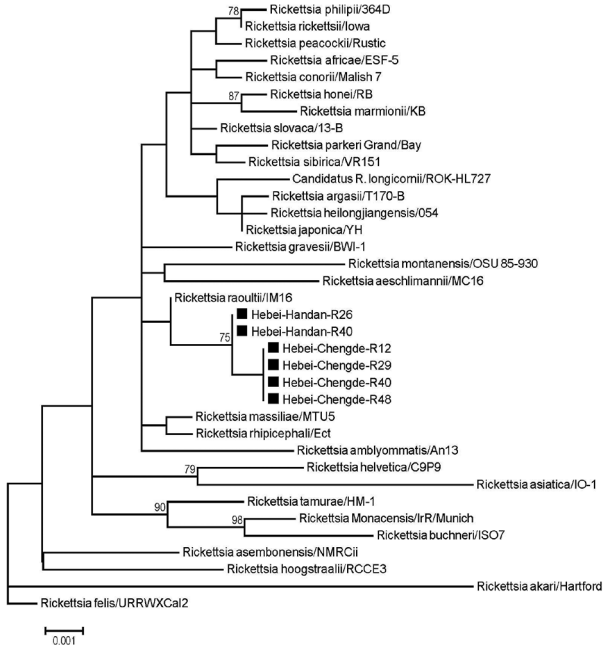


图 2 基于立克次体 16*S rRNA* 基因序列构建系统进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of *Rickettsia* according to 16*S rRNA* gene sequences

3 讨 论

本课题从河北省南部和东北部两个代表性地区捕捉野鼠提取鼠脾脏的 DNA 样本,采用 PCR 方法扩增鼠样本的立克次体 16S *rRNA*、*ompA* 和 *gltA* 基因进行立克次体的检测与鉴定。脾脏是重要的机体免疫器官,是血液循环过程的一个过滤器官,因此血液中的病原体会经过脾脏,它们可能被脾脏免疫活性细胞吞噬清除,某些病原体可以在脾脏细胞内生长繁殖,再次进入血液。因此,脾脏组织是否带菌可以作为机体是否曾发生过或正存在菌血症的一种

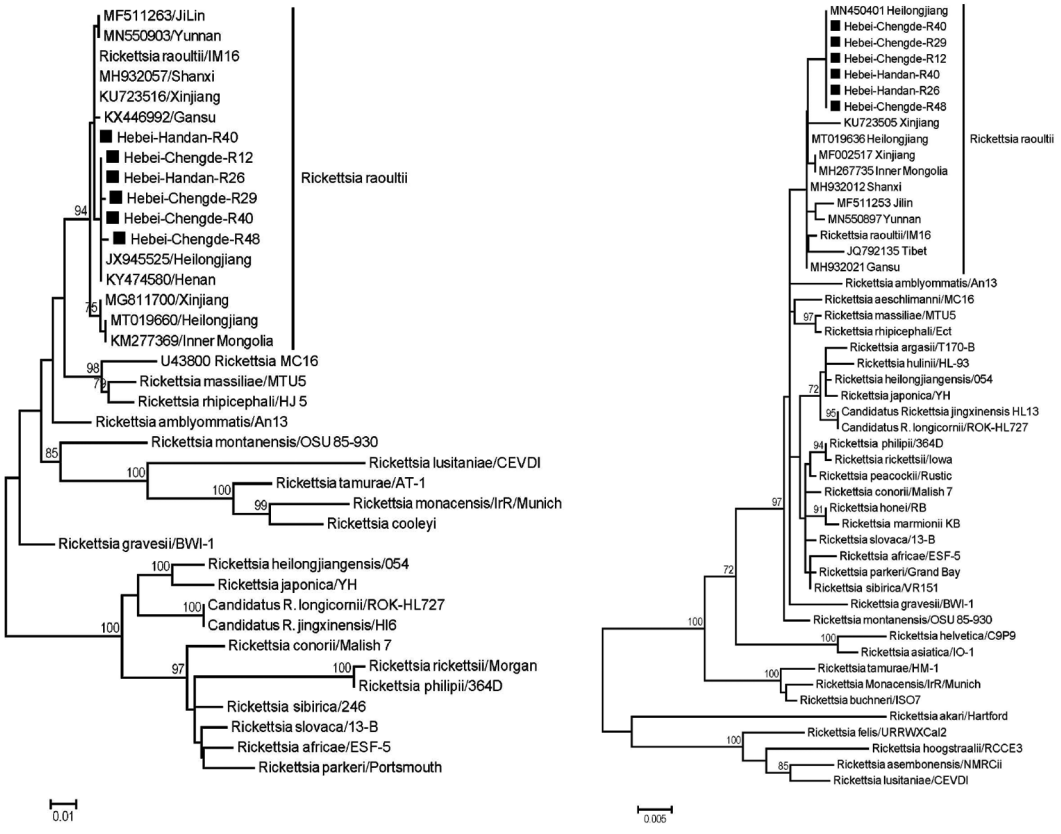


图 3　基于立克次体 *ompA* 基因(左)与 *gltA* 基因(右)序列构建系统进化树

Fig.3　Phylogenetic analysis of *Rickettsia* according to *ompA* (left) and *gltA* (right) gene sequences

反映。同时，有研究结果显示，脾脏组织检查适合监测依靠鼠作为贮存宿主而传播的病原体[12]。因此，通过动物宿主研究病原体存在状况时，我们应根据所研究病原体的组织亲嗜性特征选择对应靶器官或组织。因此，本研究选取了脾脏组织标本进行立克次体的检测。检测结果表明邯郸与承德市的啮齿动物立克次体感染阳性率为 6%，同源性与系统发生树分析证明野鼠携带的立克次体病原体为劳氏立克次体。本研究中，鼠的立克次体感染率与内蒙古西部口岸地区啮齿动物携带立克次体的阳性率一致(6.18%)[13]，高于云南省泸西县和黑龙江省逊克县啮齿动物中立克次体的阳性率[14-15]，但远远低于新疆北疆地区啮齿动物中立克次体的阳性率(34%)[16]。

能够感染人的立克次氏体目成员包括无形体科与立克次体科。其中的立克次体科又包含立克次体属和东方体属。而立克次体属又可分为斑疹伤寒群立克次体和斑点热群立克次体。目前国际上已经鉴定出 30 余种斑点热群立克次体，其中已经证明对人致病的有 20 多种[9]。在我国，已发现的立克次体也有 10 多种[17]。在 2015－2016 年，内蒙古、河南、山东等地已报道劳氏立克次体感染的病例[18]。在此次研究中，河北检出的 6 株立克次体与黑龙江、内蒙古分离出的劳氏立克次体有最密切的亲缘关系。河北省位于中国华北地区，东南部、南部衔山东和河南省，北部与内蒙古交界。我们的研究证明河北省部分区域的野鼠携带立克次体，野生啮齿动物为立克次体贮存宿主，因此这些野鼠生活地区可为立克次体感染的自然疫源地。下一步我们将扩大河北省区域筛查范围，除检查野生啮齿动物外，也检测蜱作为传播媒介携带立克次体种类和感染水平，以判断哪些立克次体病原体有传播的可能性，为河北省立克次体病的预防和控制提供可靠数据支持。

利益冲突：无

引用本文格式：刁丹红，王蒋丽，郭文平，等.河北省野鼠立克次体感染调查[J].中国人兽共患病学报，2022，38(1)：84-88. DOI：10.3969/j.issn.1002－2694.2021.00.168

参考文献：

[1] Ny holm SV，Graf J. Knowing your friends：inwertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses[J]. Nat Rev Microbiol，2012，10(12)：815-827. DOI：10.1038/nrmi-

cro2894

[2] 张敬媛，张渝疆，孙素荣. 新疆地区立克次体调查研究进展[J]. 中华地方病学杂志，2018，37(8)：681-685. DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-4255.2018.08.020

[3] 徐军，王安东，罗丹，等.中哈边境艾比湖湿地游离蜱斑点热群立克次体的分子流行病学特征[J]. 中国兽医杂志，2016，52(8)：18-20.DOI：10.3969/j.issn.0529-6005.2016.08.006

[4] Angelakis E，Richet H，Raoult D. *Rickettsia* sibirica mongolitimonae infection，France，2010－2014[J]. Emerg Infect Dis，2016，22(5)：880-882. DOI：10.3201/eid2205.141989

[5] Graves SR，John S. Tick-borne infections diseases in Australia[J]. Med J Australia Med，2017，206(7)：320-324. DOI：10.5694/mja17.00090

[6] 刘城成，唐天才，塔英，等. 四川石渠县牦牛源蜱感染斑点热群立克次体分子流行病学调查[J]. 中国人兽共患病学报，2020，36(1)：50-55. DOI：10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.183

[7] Jia N，Zheng YC，Ma L，et al. Human infections with *Rickettsia* raoulitt，China [J]. Emerg Infect Dis，2014，20(5)：866-868.DOI：10.3201/eid2005.130995

[8] 潘玉平，杨吉飞，牛庆丽，等. 黑龙江省全沟硬蜱携带伯氏疏螺旋体广义种和斑点热群立克次体的研究[J]. 中国兽医科学，2017，47(1)：31-37.DOI：10.16656/j.issn.1673-4696.2017.01.005

[9] Parola P，Paddock CD，Socolovschi C，et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world：a geographic approach[J]. Clin Microbiol Rev，2013，26(4)：657-702. DOI：10.1128/CMR.00032-13

[10] 杨菊凤，刘琴华，杜迎春，等. 青海血蜱传斑点热群立克次体带菌率及遗传进化分析[J]. 当代畜牧，2019，1：22-26. DOI：1002-2996(2019)03-0022-05

[11] Guo WP，Wang YH，Lu Q，et al. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in hard ticks，northern China[J]. Transbound Emerg Dis，2019，66(4)：1587-1596.DOI：10.1111/tbed.13184

[12] 栗冬梅，徐兆楠，朱彩英，等. 应用 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 法调查北京市部分城郊区鼠传病原体流行状况[J]. 中国媒介生物学及控制杂志，2019，30(1)：12-17. DOI：10.11853/j.issn.1003.8280.2019.01.003

[13] 王宁，靳木子，蒋兰芬，等. 内蒙古西部口岸地区鼠类及其携带病原体调查[J]. 中华疾病控制杂志，2020，24(6)：716-722. DOI：10.16462/j.cnki.zhjbkz.2020.06.019

[14] 袁庆虹，杨向东. 云南省泸西县鼠类斑点热立克次体基因检测分析[J]. 中国热带医学，2020，20(2)：164-167. DOI：10.13604/j.cnki.46-1064/r.2020.02.16

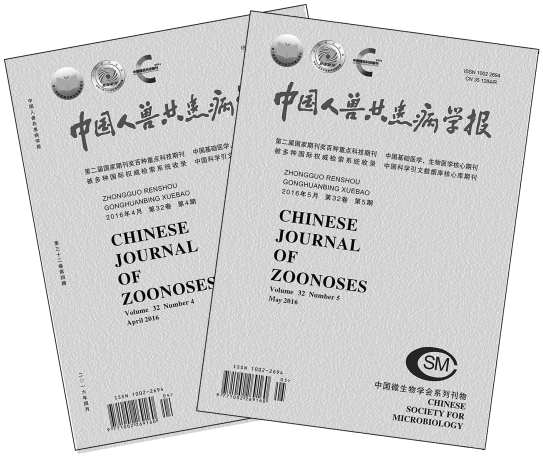
[15] 杨军，鞠文东，焦丹，等. 黑龙江省逊克县火山熔岩地区啮齿动物携带病原体调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志，2015，26(03)：238-241. DOI：10.11853/j.issn.1003-4692.2015.03.005

[16] 郭刚. 新疆北疆地区鼠类和体外寄生生物病原携带及遗传特征研究[D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2016.

[17] 高悦，李爽，王立富，等. 青海省蜱传立克次体流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医，2019，(18)：65-69. DOI：10.13881/j.cnki.hljxmsy.2018.04.0279

[18] Caporaso JG，Lauber CL，Walters WA，et al. Global patterns of 16S *rRNA* diversity at a depth of millions of sequences sample[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2011，108(suppl)：4516-4522. DOI：10.1073/pnas.1000080107

收稿日期：2021-04-29 编辑：张智芳



欢迎订阅

《中国人兽共患病学报》

邮发代号：34-46