

浙江省在鼠类中检测到巴贝西原虫 DNA 片段

姜理平¹, 张磊¹, 鲍庆汉², 陆群英¹, 程苏云¹, 徐宝祥¹

1 浙江省疾病预防控制中心病原微生物所, 杭州 310051; 2 淳安县疾病预防控制中心

摘要: 目的 用聚合酶链反应(PCR)检测浙江省淳安县鼠中感染巴贝西原虫的情况。方法 利用PCR方法检测淳安县106份鼠肝、脾标本,对检测到的阳性片段,进行序列测定和分析。结果 PCR检测结果显示,3份标本呈阳性,其中2份来自黄胸鼠,1份来自褐家鼠;PCR产物序列与巴贝西原虫高度相似,相似率均为99%。结论 浙江省淳安县鼠类中检测到巴贝西原虫DNA片段,提示该地区可能有巴贝西原虫感染。

关键词: 鼠; 巴贝西原虫; 聚合酶链反应

中图分类号:S443; R382 文献标志码:A 文章编号:1003-4692(2012)04-0303-03

Babesia DNA segments detected from rodents in Zhejiang province

JIANG Li-ping¹, ZHANG Lei¹, BAO Qing-han², LU Qun-ying¹, CHENG Su-yun¹, XU Bao-xiang¹

1 Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, Zhejiang Province, China; 2 Chun'an Center for Disease Control and Prevention

Abstract: Objective To detect the infection of *Babesia* protozoa in rodents in Chun'an county, Zhejiang province. **Methods** The polymerase chain reaction (PCR) was employed to detect the liver and spleen samples of 106 rodents from Chun'an county and the positive ones were sequenced, followed by phylogenetic analysis. **Results** It was found that there were three positive samples, 2 of which were obtained from *Rattus tanezumii* and one of which from *R. norvegicus*. The sequences of the positive samples were of high similarity with those from *Babesia*, with the rates of similarity being both 99%. **Conclusion** DNA segments of *Babesia* can be detected from rodents in some mountain areas of Zhejiang province, indicating that it is likely that there exists infection of rodents with *Babesia* in the area.

Key words: Rodents; *Babesia* protozoa; Polymerase chain reaction

巴贝西原虫(*Babesia* spp.)可引起巴贝西原虫病(typical babesiosis),1991年在美国首次发现。该病主要是在美国沿海地区和一些欧洲国家出现,是一种少见却具有潜在生命威胁的疾病^[1]。巴贝西原虫病是由梨形虫目(Piroplasmida)、巴贝西科(Babesiidae)、巴贝西属(*Babesia*)的虫体寄生于动物红细胞内引起的一类寄生虫病。巴贝西原虫病作为一种人兽共患性疾病越来越引起人们的关注^[2]。带巴贝西原虫的家畜如牛、马、羊、犬等和啮齿类动物如田鼠、小鼠等均可成为传染源;蜱为该病的传播媒介。巴贝西原虫病主要由感染性硬蜱叮咬而传播,各个年龄组人群均对该病易感。易感性与当地家畜感染的频率、程度和接触家畜密切与否有关;当地蜱生长密度和是否易被蜱叮咬有关。脾切除者更易受感染且发病后病情重^[3]。人巴贝西原虫病在美洲、欧洲、非洲和亚洲部分地区都有报道,我国台湾、云南和内蒙古地区有人巴贝西原虫感染

病例的零星报道,但有关我国人巴贝西原虫的感染状况还缺乏系统研究^[4]。巴贝西原虫种类很多,多数只感染家畜和野生动物,仅有少数几种可以感染人类,引起血红蛋白尿、黄疸、高热、寒战、肌痛和腰腹痛,严重者可致死,但也有无症状感染者。

巴贝西原虫常规检测方法有血涂片法、血清学检查、动物接种、分子生物学检查,血清学检查有琼脂扩散法、间接血凝法、补体结合试验、间接免疫荧光试验(IFA)和ELISA,PCR敏感性可达30虫体/ml^[5]。我们用针对巴贝西原虫核糖体小亚基基因核苷酸序列设计1对引物^[5],应用PCR法检测鼠肝、脾内巴贝西原虫的DNA片段,旨在调查浙江省淳安县鼠类巴贝西原虫的感染情况。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Taq DNA聚合酶、组织DNA提取试剂盒、100 bp ladder标志物和琼脂糖等,购自宝生物工程(大连)有限公司。

作者简介:姜理平(1964-),男,主任技师,从事自然疫源性疾病预防研究。Email: jlp1964@126.com

1.2 PCR 扩增引物 PIRO-A:5'-AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G-3';PIRO-B:5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3'。

1.3 主要仪器 LTD 恒压恒流电泳仪、1285USA 生物安全柜、PCR 扩增仪、FR-200A,上海复日科技有限公司提供;全自动紫外与可见分析装置、INC 高速离心机、精密电子天平、4℃冰箱、-40℃冰箱、微量加样器、漩涡混合器。

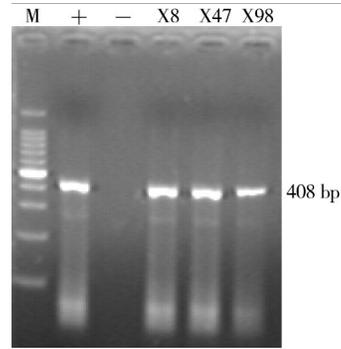
1.4 材料 2010 年 10 月于浙江省淳安县汾口镇龙山村采用鼠夹法捕鼠,分类鉴定后,无菌取其肝、脾-20℃保存待用。利用 DNA 提取试剂盒,提取鼠肝、脾基因组 DNA,操作步骤按照说明书进行。

1.5 PCR 扩增 PCR 反应体系:10×buffer 2.5 μl, dNTPs(各 2.5 mmol/L) 2.0 μl, Taq DNA 聚合酶(5 U/μl) 0.25 μl,引物 PIRO-A(10 μmol/L) 2.0 μl,引物 PIRO-B (10 μmol/L) 2.0 μl,模板 6 μl, ddH₂O 10.5 μl,总体积 25 μl。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃ 30 s, 60℃ 40 s, 72℃ 40 s, 35 个循环;72℃延伸 3 min。阳性对照模板为巴贝西原虫的基因组 DNA。通过 1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.6 核酸序列测定及分析 回收和纯化目的条带后送上海美季生物技术有限公司双向测序,所获序列经 Contigl 软件拼接后,在 NCBI 中进行比对分析,并用 Mega 4.0 软件分析同源关系。

2 结果

2.1 PCR 检测巴贝西原虫 应用 PCR 扩增巴贝西原虫 DNA 片段,检测浙江省淳安县鼠肝、脾标本 106 份,扩增出阳性 3 份(图 1),阳性率为 2.8%。其中 2 份来自黄胸鼠(*Rattus tanezumi*),1 份来自褐家鼠(*R. norvegicus*)。



注:M. 100 bp ladder Maker; +. 阳性对照; -. 阴性对照。

图 1 巴贝西原虫 DNA 片段 PCR 结果

Fig. 1 PCR results of DNA segments from *Babesia* protozoa

2.2 序列分析 从 3 份鼠肝、脾标本中扩增到的巴贝西原虫 DNA 片段序列,分别命名为 CA-X-98、CA-X-47 和 CA-X-8,测其序列长度分别为 391、389 和 388 bp。序列比对结果显示,3 条序列相似性高,与 CA-X-98 比较,CA-X-47 存在 2 处单碱基缺失,CA-X-8 存在 3 处单碱基缺失和 1 处单碱基置换(T/C)转换(图 2)。

CA-X-98	CTGCTCACTATTAACCACTACTCTGGCTCAATAACCAACAAAATAGAACCAAAGTCCTAC
CA-X-47-
CA-X-8-
CA-X-98	TTCAATTATCCATGCTGTAGTATTCAAGGCAAAATGCCTGTTTGAACACTCTAGTTTTCT
CA-X-47
CA-X-8
CA-X-98	CAAAGTAAATCCCGGAAAAATAGAACCCCGAAGGGAACCAAAATCCAGAAGATGCCAAGTCA
CA-X-47
CA-X-8
CA-X-98	ATAAAAAACGCTCGGAAGCGAATTTAATGACAAGGCAGAAATTCAACTACGAGCTTCTT
CA-X-47
CA-X-8C.....
CA-X-98	AACTGCAACAACCTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAG
CA-X-47
CA-X-8
CA-X-98	ACTTGCCCTCCAATTGATACTCTGGGACAGGGTTTAGATTCCCATCATTCCAATTACAAG
CA-X-47
CA-X-8
CA-X-98	ACTTTAAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTC
CA-X-47
CA-X-8

图 2 巴贝西原虫核糖体小亚基基因核苷酸序列比对

Fig. 2 Comparison of the sequences of the nuclear small subunit ribosomal RNA from *Babesia* protozoa

进一步分析本研究获得的序列,发现与GenBank中的AB112050相似性最高,相似率为99%,尚无文献发表,其注释为*Babesia microti*,具体片段为*Babesia microti* genes for 18S rRNA,ITS1,5.8S rRNA,ITS2, 28S。与AB241632相似率也为99%,该片段由Saito-Ito等^[6]登记,其注释为*Babesia microti*。他们对鼠类进行巴贝西原虫调查时,在中国南部发现,类似的*Babesia microti*型别曾在日本引起人的感染。

3 讨论

目前全世界面临着新发传染病的重大威胁,其中相当一部分属人兽共患媒介生物传染性疾病,巴贝西原虫所引起的人类疾病即属这一范畴。引起人巴贝西原虫病的虫株有明显的地理区域分布特征,与宿主动物和媒介物种的分布有关。在北美人巴贝西原虫是由微小巴贝西原虫(*Babesia microti*)引起^[7],而在欧洲以及俄罗斯则是由双芽巴贝西原虫(*Babesia bigemina*)引起。本研究在淳安县黄胸鼠、褐家鼠中检测到与微小巴贝西原虫高度近似的DNA序列,浙江省鼠中感染巴贝西原虫的情况尚需进一步调查。

巴贝西原虫以感染红细胞为主,一般检测以采血为好,但进行流行病学调查时活鼠捕捉相对困难。本次调查利用鼠夹法捕鼠,采集其肝、脾,抽提DNA,检测到巴贝西原虫DNA,证实该调查方法可行。由于人巴贝西原虫没有典型的临床症状,抗体检测和分子生物学检测等手段已成为目前人巴贝西原虫病的主要诊断技术。抗体检测需要有相应的抗原,给检测带来一定

困难。本次实验我们用PCR法检测到鼠中巴贝西原虫DNA,不需要相应的抗原,引物合成简单,试剂均为商品化,给我国人巴贝西原虫检测提供了线索。

浙江省山地和丘陵占70.4%,动物宿主和媒介种类繁多。本次调查地区保持较为完好的原始地貌,开发较少,外来人员也很少,当地居民偶有类似症状病例。但随着经济的发展,这些地区的外来人员增多,完全无免疫力的人员进入,可能会对人群健康构成威胁,应引起高度重视。

参考文献

- [1] 管恩锋,王德亮. 全球新出现的主要致传染病病原体及其传播特点[J]. 医学动物防制, 2004, 20(3): 170-171.
- [2] 李高强,张浩吉,张更利,等. 犬源韦氏巴贝斯虫的分子鉴定和系统发育研究[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(3): 245-249.
- [3] 巫善民,张志勇,张占卿. 新发传染病与再发传染病[M]. 上海: 科技教育出版社, 2010: 168-170.
- [4] 付维明,何浩,呼满霞,等. 黑龙江中俄边境口岸全沟硬蜱中分离到人巴贝西原虫[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2010, 33(4): 99-105.
- [5] Armstrong PM, Katavolos P, Caporale DA, et al. Diversity of *Babesia* infecting deer ticks (*Ixodes dammini*) [J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 58(6): 739-742.
- [6] Saito-Ito A, Takada N, Ishiguro F, et al. Detection of Kobe-type *Babesia microti* associated with Japanese human babesiosis in field rodents in central Taiwan and southeastern mainland China [J]. Parasitology, 2008, 135(6): 691-699.
- [7] Krause PJ, Telford SR III, Spielman A, et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis, evidence for increased severity and duration of illness [J]. J Am Med Assoc, 1996, 275(21): 1657-1660.

收稿日期: 2012-04-25

·读者·作者·编者·

欢迎订阅2012年《中国媒介生物学及控制杂志》

《中国媒介生物学及控制杂志》是由中华人民共和国卫生部主管、中国疾病预防控制中心主办的国家级专业期刊。本刊为中国科技核心期刊(国家科技部中国科技论文统计源期刊)、RCCSE中国核心学术期刊。已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI)、波兰哥白尼索引(IC)数据库、中国科学引文数据库(CSCD)、中国学术期刊综合评价数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国全文数据库等国内外10多家著名数据库收录。辟有述评、专家论坛、论著、调查研究、综述、经验交流、PCO专栏等栏目。刊载内容:(1)媒介生物(鼠类、蚊类、蝇类、蜚蠊、蚤类、螨类等)的分类学、生物学、生态学等;(2)媒介生物的监测与控制技术,媒介生物的控制药剂与器械;(3)媒介生物传染病的媒介效能、病原检测技术及预防控制技术等;(4)卫生杀虫的新技术、新方法、新成果、新产品、新信息等。适合于疾病控制、爱国卫生、植保、林保、草原保护、交通部门、灭鼠和卫生杀虫药械生产厂家及科研单位、大专院校、临床医院等各个层次专业人员的需要。热诚欢迎广大专业人员订阅,欢迎投稿。对基金项目资助的稿件给予优先录用。

本刊为国际标准A4开本,80页,双月刊(逢双月20日出版)。刊号:CN 13-1142/R,ISSN 1003-4692。每期定价10元,全年60元(含邮费;如需挂号,每本挂号费3元,全年78元)。需要订阅的读者请到当地邮局订阅(邮发代号:18-265)或与本刊编辑部联系。亦可从网上直接填写订阅回执,电子邮件发至本刊编辑部,杂志款请从银行或邮局汇出。

地址:北京昌平流字五号(邮编:102206),《中国媒介生物学及控制杂志》编辑部。

电话/传真:010-58900731 Email: bingmei@icdc.cn http://www.bmsw.net.cn

本刊编辑部