

单位代码：11810
学 号：2000306291

分类号：R18
密 级：公开



海南医学院

硕士学位论文

海南不明原因发热患者9种致病菌分子流行病学调查及恙虫
病东方体抗原蛋白表达

院（系）、所 公共卫生与全健康国际学院

研究生姓名 谢晓菲

学科、专业 公共卫生

学位类型 专硕

指导教师 尹飞飞、梁未丽、秦爱平

二〇二三年六月

学位论文题目：海南不明原因发热患者9种致病菌分子流行病学调查及恙虫病东方体抗原蛋白表达

学位申请人姓名：谢晓菲

学位申请人专业：公共卫生

指导老师姓名及职称：尹飞飞研究员、梁未丽研究员、秦爱平研究员

答辩委员会主席：郑继平教授

答辩委员会成员：张荣光教授、李孔宁教授、李晓珍副教授

论文答辩日期：2023年6月8日

目 录

前言.....	1
第一章:海南不明原因发热患者 9 种重要致病菌分子流行调查研究.3	
1 材料和方法.....	3
1.1 材料.....	3
1.2 方法.....	5
2 结果.....	11
2.1 9 种重要致病菌 Real-time PCR 筛查结果.....	11
2.2 Nest PCR 验证分析.....	14
2.3 遗传进化分析.....	15
3 讨论.....	16
4 小结.....	19
第二章:恙虫病东方体 56 kDa 与 47 kDa 外膜蛋白的表达与作为 ELISA 诊断抗原的研究.....	21
1 材料和方法.....	21
1.1 材料.....	21
1.2 方法.....	24
2 结果.....	32
2.1 截短型 56 kDa 基因扩增、截短型 47 kDa 基因合成与重组质粒的鉴定.....	32
2.2 高表达恙虫病东方体 56 kDa 蛋白和 47 kDa 蛋白菌株的筛选.....	35
2.3 两种条件下蛋白表达对比分析.....	36
2.4 诱导表达恙虫病东方体 47 kDa 蛋白及验证.....	37
2.5 恙虫病东方体 47 kDa 大量纯化结果.....	37
2.6 BCA 法测定表达蛋白含量结果.....	38
2.7 家兔免疫血清 WB 检测结果.....	39
2.8 ELISA 方法检测家兔血清抗体滴度结果.....	39
2.9 ELISA 方法检测海南阳性患者血清结果.....	40
2.10 WB 方法检测血清样本结果.....	40
3 讨论.....	41
4 小结.....	43
参考文献.....	44
综述 2010-2020 年中国恙虫病流行及临床研究进展.....	49
参考文献.....	55

缩略语

英文缩写	英文全称	中文缩写
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer	TBE 缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核苷酸
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量 PCR
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	核酸对比工具
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
WB	Western Blot	蛋白质印迹法
EB	Ethidium Bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzymelinkedimmunosorbentassay	酶联免疫吸附试验
Dhl	Chloramphenicol	氯霉素
Kan	Kanamycin	卡那霉素

海南不明原因发热患者9种致病菌分子流行病学调查及恙虫病东方体抗原蛋白表达

摘要

目的：（1）通过对海南不明原因发热患者中9种重要病原菌的感染进行分子流行病学调查，分析其在海南的流行趋势和流行特点，为海南地区不明原因发热类疾病的临床诊治和精准防控政策的制定提供科学依据。（2）克隆表达恙虫病东方体主要免疫应答抗原47 kDa与56 kDa TSA蛋白，并初步评估其作为诊断抗原的可行性。

方法：（1）采用实时荧光定量PCR技术（real-time PCR）对海南2018-2021年间收集的503份不明原因发热患者血液样本中9种致病菌的感染情况进行筛查。筛查病原体及靶点基因包括恙虫病东方体（47 kDa基因）、嗜吞噬细胞无形体（*msp 2*基因）、立克次氏体（17 kDa基因）、贝氏柯克斯体（23S rRNA基因）、埃立克次氏体（*dsb*基因）、鸚鵡热衣原体（*Ch 23S*基因）、类鼻疽伯克霍尔德菌（*orf 2*基因）、伯氏疏螺旋体菌（*rec 2*基因）、布鲁氏杆菌（*bcs p 31*基因）。对筛查阳性样本应用巢式PCR反应进行进一步验证，并基于巢式PCR产物测序结果进行遗传进化分析。（2）采用PCR方法从海南恙虫病东方体阳性患者血液DNA样本中扩增截短的56 kDa基因片段，通过基因合成获得截短的47 kDa基因片段，克隆于表达载体Pet-28a(+)。将47 kDa基因与56 kDa基因重组质粒转入BL21(DE3)pLysS，IPTG诱导表达。纯化的蛋白免疫家兔制备血清，包被96孔板用于ELISA、WB方法的建立。

结果：（1）海南不明原因发热的503例患者中共筛查出2种病原菌，分别为恙虫病东方体和嗜吞噬细胞无形体。恙虫病东方体总阳性率为14.51%（73/503），在12个县市检测到阳性病例，其中琼中县检测到的病例数最多为25例，昌江县检出率最高为28.57%，发病高峰在8-11月，高发人群年龄为50-70岁之间，

各职业中以农民为主，基因型包括 Karp、Gillam 型。嗜吞噬细胞无形体总阳性率为 5.57% (28/503)，在 6 个县市检测到阳性病例，其中海口市检测到病例最多为 9 例，昌江县检出率最高为 14.29%，发病高峰集中在 7-10 月，学生为高发人群。本研究首次在海南不明原因发热患者中检测到恙虫病东方体和嗜吞噬细胞无形体共感染个体，占比为 1.59% (8/503)。(2) 成功构建了重组质粒，表达了 47 kDa 与 56 kDa 蛋白，纯化 47 kDa 蛋白并制备家兔标准血清，抗体滴度可达 1: 640000，具有良好的免疫原性，但该蛋白不被恙虫病阳性患者血清中的抗体所识别。本实验中 56 kDa 蛋白未能成功大量纯化。

结论： (1) 结果显示海南不明原因发热患者检测的 9 种病原菌中以恙虫病东方体感染为主，海南临床感染恙虫病东方体表现出基因型多样性，其次为嗜吞噬细胞无形体感染。恙虫病和嗜吞噬细胞无形体病海南各地区广泛分布，患病率最高的人群分别为农民与学生，应加强此类人群的健康检测。两种疾病相近的发病时间与发病高峰，尤其是共感染病例的发现，提示其可能存在共同的传播媒介。本研究立克次氏体属病原零检出率与以往高检出率的报道形成鲜明的对比，提示立克次氏体类疾病病原种类的转变。(2) 本研究中克隆的恙虫病东方体 47 kDa 与 56 kDa 蛋白均可在 BL21(DE3)pLysS 中表达，但 56 kDa 表达量低未能大量纯化，47 kDa 重组蛋白对家兔具有很强免疫原性，抗体滴度可达 1:640000，但是其不能作为恙虫病诊断的靶蛋白。

关键词： 不明原因发热患者；重要病原；分子流行病学调查；恙虫病东方体；嗜吞噬细胞无形体；共感染

Molecular epidemiology of 9 critical bacterial pathogens in patients with undefined febrile illness in Hainan and the expression of the major immune response antigens of *Orientia tshtsugamushi*

ABSTRACT

Objective: (1) To provide scientific bases for the diagnosis、treatment and the control of 9 clinical important bacteria, the epidemiology of these bacteria was evaluated in patients with undefined febrile illness in Hainan. (2) To test the feasibility of the major immune response antigens, 47 kDa and 56 kDa of *Orientia tshtsugamushi*, as diagnostic target proteins for ELISA, and as candidates for protein subunit vaccine, the corresponding genes are cloned, expressed and tested.

Methods: (1) Blood samples from patients with undefined febrile illness were collected in Hainan during 2018-2021 (N=503) and screened for 9 important bacterial pathogens by real-time PCR method. The pathogens and target genes included *Rickettsia sibirica* (17 kDa gene), *Orientia tshtsugamushi* (47 kDa gene), *Anaplasma phagocytophilum* (*mosp2* gene), *Coxiella burnetii* (23S rRNA gene), *Ehrlichia chaffeensis* (*dsb* gene), *Chlamydia psittaci* (*Ch 23S* gene), *Burkholderia pseudomallei* (*orf 2* gene), *Borrelia burgdorferi* (*rec 2* gene) and *Brucella* spp (*bcbp31* gene). Positive samples were further verified by Nest PCR and phylogenetic analyses of positive samples were performed based on Sanger sequencing of the Nest PCR product. (2) Truncated 56 kDa was amplified from scrub typhus patient blood DNA sample by high fidelity PCR and the truncated 47 kDa gene was synthesized. The fragments were cloned into prokaryotic expression vector PET-28a (+) and transformed into BL21(DE3)pLysS, and then induced by IPTG and purified. Rabbits

were immunized with the purified 47 kDa protein to generate anti-serum, 96-well plates were then coated by the anti-serum to establish ELISA and WB method.

Result: (1) *Orientia tsutsugamushi* and *Anaplasma phagocytophilum* were detected in the patients with undefined febrile in Hainan. The positive rate of scrub typhus was 14.51% (73 / 503). Scrub typhus was detected in 12 cities among which Qiongzong County has the highest number of cases (N=25), and Changjiang county showed the highest detection rate (28.57%). The peak of the cases was found in August to November, and the highest incidence population was between 50 and 70 years old and the genotypes included Karp and Gillam. The positive rate of anaplasmosis was 5.57% (28 / 503). Anaplasmosis was detected in 6 cities among which Haikou city has the highest number of cases (N=9), and Changjiang County showed the highest detection rate (14.29%). The peak of the cases was found from July to September. Co-infection of Scrub typhus and anaplasmosis was first detected from patients in Hainan, accounting for 1.59% (8 / 503). (2) Recombinant plasmids for 47 kDa and 56 kDa protein gene were successfully constructed and the proteins were expressed. However, only the 47 kDa protein can be purified for rabbit immunization. Rabbit anti-46 kDa serum was harvested with a high titer up to 1:640,000, indicating the high immunogenicity of the expressed 47 kDa protein. Unfortunately, the 46 kDa protein can not be recognized by antibodies in the serum of patients from Hainan and the 56 kDa protein failed to be largely purified.

Conclusions: (1) The results showed that *Orientia tsutsugamushi* is the dominant pathogen in the 9 important bacterial pathogens with undefined febrile illness in Hainan. Clinical infection of *Orientia tsutsugamushi* in Hainan showed genotypic diversity. The second is *Anaplasma phagocytophilum*. Scrub typhus and phagocytic anaplasmosis are widely distributed in Hainan. The populations with the highest prevalence are farmers and students, health testing for these populations

should be strengthened. Similar peak time of scrub typhus and anaplasmosis, specially the discovery of co-infection cases implied a shared vector for the diseases. Unlike previous reports with high positive rate, rickettsiae was not detected in this study, which indicates the shift in pathogenic species of rickettsia diseases in Hainan.

(2) In this study, the 47 kDa and 56 kDa protein of *Orientia tsutsugamushi* can be expressed in BL21 (DE3) pLysS. However, 56 kDa protein was not largely purified due to the low expression. The 47 kDa recombinant protein possesses a high immunogenicity in rabbits. However, 47 kDa is not sufficient as target protein for the diagnosis of scrub typhus.

KEY WORDS : Undefined febrile patients; bacterial pathogen; molecular epidemiology; *Orientia tsutsugamushi*; *Anaplasma phagocytophilum*; co-infection

前言

立克次氏体 (*Rickettsia*) 类疾病由蜱、跳蚤等媒介传播, 随着分子诊断工具的发展, 许多新的立克次氏体被发现, 它是全球最常见的人兽共患病^[1], 也是海南地区引起不明原因发热类疾病的常见病因; 恙虫病又称丛林斑疹伤寒 (*scrub typhus*), 是由恙虫病东方体感染引起的广泛流行于“恙虫病三角区”的自然疫原性疾病, 近年于东南亚、泰国、韩国、澳大利亚、俄罗斯、太平洋岛屿和日本等地再次流行, 因该病早期症状与其他感染如登革热、流感和冠状病毒等急性发热疾病相似, 故易被忽视^[2], 1985 年林碧瑚教授等人首次分离到了一株恙虫病东方体^[3], 证实了海南岛为此种疾病的疫源地; 无形体 (*Anaplasma*) 经由蜱等节肢动物传播, 其中嗜吞噬细胞无形体 (*Anaplasma phagocytophilum*) 最易导致人群患病, 我国黑龙江、内蒙古、湖南、广东等地均发现过此病^{[4][5]}; 贝氏柯克斯体 (*Coxiella burnetii*) 可引起急性或慢性 Q 热, 这是一种以吸入受含致病菌的气溶胶为主要传播方式的人兽共患病, 该病原体感染剂量低且在环境中持续时间长, 曾有随风传播引起的大规模暴发的报道^[6]; 布病是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 感染所致, 布鲁氏菌为革兰氏阴性杆菌, 在过去的十年中, 布鲁氏菌属出现了显著的遗传多样性, 宿主物种的种类明显增加^[7]; 类鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia pseudomallei*) 感染可引起肺部感染及其他部位的慢性感染, 近年来类鼻疽患者数量呈上升趋势, 已成为海南重要的人畜共患病原菌^[8]; 鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*) 为专性胞内寄生菌, 是重要的人兽共患病病原, 多数病例因与鸟类或家禽的密切接触而患病, 最新研究显示本病还有可能通过人际传播, 被感染患者可出现肺炎样症状^[9]; 查菲埃里克体 (*Ehrlichia chaffeensis*) 是一种新发蜱传病原体, 被感染者常出现流感样症状, 是人类最常感染的埃立克体^[10]; 博疏式螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 可引起莱姆病, 是一种重要的蜱传疾病, 主要发生于北半球国家, 我国已鉴定出该病多个基因种^[11]。这些常见的人兽共患病中嗜吞噬细胞无形体、贝氏柯克斯体、布鲁氏菌、类鼻疽伯克霍尔德菌、博疏式螺旋体近年在海南地区人群或环境中均有检出, 且与立克次氏体类疾病有着相似的临床感染症状, 如发热、头痛肌痛, 常因缺乏典型临床表现而漏诊误诊^[12]。

海南地区拥有热带气候和充沛的降雨量，十分利于节肢动物与鸟类的生存繁衍，因而易于以上病原的传播。近年来有对于恙虫病、立克次氏体的流行病学特征分析^[13]，但对其他可导致发热的病原以及海南地区恙虫病基因型类别尚未全面深入研究，为探究 2019-2021 年间不明原因发热患者中各类病原体的发病情况、流行趋势以及患者所携带病原的基因类型，本研究对海南地区 503 份不明原因发热病人血液标本进行检测并将其他与立克次氏体病临床表现相似、传播媒介相同的发热性疾病同时纳入筛查范围。

目前对这几种疾病的筛查方法有分子生物学、血清学、组织活检、二代测序等^[14]。分子生物学方主要通过核酸扩增来检测病原，例如巢式 PCR 方法和实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)。以患者血液或焦痂拭子为模版提取 DNA，通过设计特异性引物来检测不同的病原。本研究中应 Real-time PCR 方法筛查立克次氏体类疾病，总结了海南 2018-2021 年主要流行的细菌性人兽共患病感染情况与流行趋势。血清学方法中免疫荧光测定 (IFA) 为检验本病的金标准，但此方法耗材费用高、对操作人员及实验室条件要求高、诊断的回顾性差。酶联免疫吸附测定灵敏度和特异性大于 90.0%^[15]，但本较高且抗原较难获取。因此，恙虫病仍需探索一种早期、快速、经济的诊断方法。重组抗原拥有特异性、便捷的特点，为血清学研究提供了更广阔的前景。用恙虫病患者血清对全细胞抗原进行蛋白质印迹分析发现了 22 kDa，47 kDa，56 kDa 和 110 kDa 蛋白均可识别患者血清，表明这些蛋白具有免疫原性可用于诊断^[16]。已有许多证据证明 Karp、Kato 等血清型特异性单克隆抗体可以与 56 kDa 蛋白反应^{[17][18]}，这表明它可用作诊断抗原，但 56 kDa 具有多样性因此需要表达几种基因型该蛋白的嵌合抗原以提高检出率^[19]。47 kDa 蛋白含有恙虫病东方体反应性和菌株特异性 B 细胞表位，且不同的东方体菌株中呈现高度保守性，通过对比常见的菌株 Karp, Kato 和 Gilliam 之间的蛋白质发现，47 kDa 蛋白的氨基酸序列仅在 7 个氨基酸中的 24 个位置不同，差异小于 2%^{[16][20]}。因此我们选择这两种蛋白为研究目标，通过目的基因的扩增、重组质粒构建获取重组蛋白，并探讨其作为 ELISA 诊断靶蛋白的可行性。

第一章：海南不明原因发热患者 9 种重要致病菌分子流行调查研究

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与耗材

本实验室以海南医学院第一附属医院和第二附属医院等为哨点医院，于 2018 年 6 月至 2021 年 8 月收集海南不明原因发热患者的 EDTA 抗凝血液样本 503 份。样本收集后 4 °C 保存，于 48 小时内运送至实验室，分装后于 -80 °C 保存备用。其他主要试剂与耗材具体详见表 1.1。

表 1.1 试剂耗材与公司

Table 1.1 Reagent and compnies

试剂	公司
荧光定量 PCR 八连排	Axygen, 美国
离心管	Axygen, 美国
血液组织 DNA 提取试剂盒	Qiagen, 德国
2×Fast Taq Man Mixture	康为世纪生物科技有限公司, 中国
2×Es Taq MasterMix	擎科生物技术有限公司, 中国
Golden view	北京艾德莱生物科技公司, 中国
Trans2K® Marker	北京全式金生物技术有限公司, 中国
引物	擎科生物技术有限公司, 中国

1.1.2 主要仪器

主要仪器具体详见表 1.2。

表 1.2 主要仪器与公司

Table 1.2 Instruments and Companies

仪器	公司
PCR 仪	Sensquest, 德国
电泳仪	Bio-Rad, 美国
凝胶成像仪	Bio-Rad, 美国
Retsch MM400	Retsch, 德国
高速冷冻离心机	Signa, 德国
生物安全柜	青岛海尔生物医疗股份有限公司, 中国
纯水仪	锐思捷科技仪器有限公司, 中国
离心机	SIGMA, 德国
Quant Gene 9600 实时荧光定量 PCR 分析仪	博日科技, 中国
Nanophotometer	Implen, 德国

1.1.3 相关试剂的配制

(1) 1×TBE 溶液的配制

- ① 称量 54g Tris 与 27.5g Boric acid 溶于 800 ml 纯水中。
- ② 加入 20 ml 0.5 M EDTA (PH=8.0)。
- ③ 定容至 1000 ml, 配制成 5×TBE 溶液。
- ④ 将配好的 5×TBE 溶液稀释 5 倍, 配制成 1×TBE 溶液。

(2) 配制 1%琼脂糖凝胶

- ① 胶板的制备: 将胶槽两端分别用橡皮膏(宽约 1 cm)紧密封住。封好的胶槽置于水平支持物上,插上梳子,梳子齿下缘应与胶槽底面保持 1 mm 间隙。
- ② 称取 1g 琼脂糖,置于 500 ml 锥形瓶中,加入 200 ml 1×TBE 稀释缓冲液,盖上封口膜,放入微波炉中加热至琼脂糖全部熔化,取出摇匀,此为 1%琼脂糖凝胶液。加热时应不时摇动,使附于瓶壁上的琼脂糖颗粒进入溶液。
- ③ 待 1%琼脂糖凝胶液冷却至 60℃时,按比例 1:100 加入(或不加)Golden view,缓慢摇匀并倒入胶槽,待凝结后使用。

1.1.4 生物信息学软件

实验数据分析及论文撰写所应用的软件包括: Primer6 引物设计软件、NCBI

BLAST 序列对比搜索工具、MEGA-X 遗传进化分析软件、SnapGene 序列对比及拼接软件、IBM SPSS Statistics 27 统计学分析软件、EndNote 论文参考文献引用软件。

1.2 方法

1.2.1 技术路线

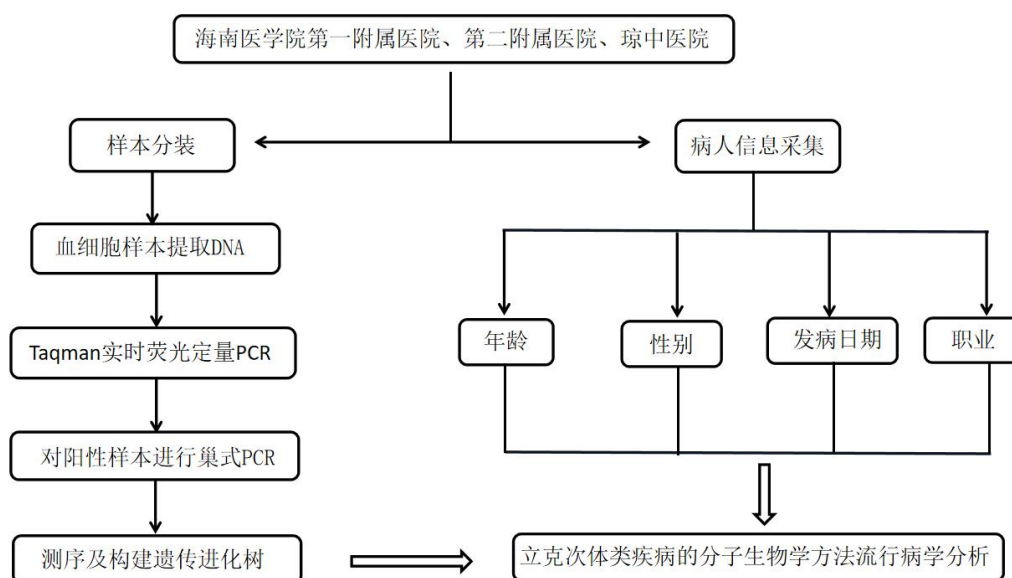


图 1.1 技术路线

Figure 1.1 Technical route

1.2.2 标准 DNA 模板

恙虫病东方体、立克次氏体、埃立克体，贝氏柯克斯体，嗜吞细胞无形体，鸚鵡热衣原体标准模版应用棉拭子法从免疫荧光试剂盒中的抗原片回收。具体方法步骤为：应用棉拭子沾取相应抗原片上的抗原后浸泡于 300 μ l 的 PBS 溶液中，通过涡旋离心，使抗原充分转入溶液中，应用血液组织 DNA 提取试剂盒试剂盒提取。类鼻疽、布鲁氏菌阳性样本为本研究所其他实验室赠与。

1.2.3 样本的采集与处理

(1) 临床样本采集

本课题组收集 2018 年 6 月至 2021 年 8 月海南不明原因发热患者的 EDTA 抗凝血全血样本 503 份，采样地点包括了海南省内除五指山市外的所有地区，见图 1.2。以及样本信息包括年龄、性别、民族、职业、发病地点、临床症状等。本研究严格遵守实验室生物安全管理制度，所有成员均具备医学或生物学教育经历，并经过系统的生物安全技术专业培训，通过本研究中的所有方法均按照中国疾病预防控制中心传染病预防控制所相关的指南和规定进行。



图 1.2 海南省不明原因发热患者采样地区分布图

Figure 1.2 Distribution map of undefined febrile illness sampl in Hainan Province

(3) 临床样本处理

全血样本：用高速冷冻离心机常温 3500 rpm 离心 3 min，将样本分为血细胞与血清，血浆与抗凝血细胞。用冻存管分装，每管 500 μ l，标记信息，放入- 80 °C 保存。

血块样本：将灭菌钢珠放入含有 1-2 ml 血凝块的 2 ml 离心管中，使用 Retsch MM400 破碎仪 30 HZ，3 min 破碎血块。

拭子样本：将拭子放入 300 μ l 的 PBS 溶液中，通过涡旋离心，使抗原充分转入溶液内。

(4) DNA 提取

① 室温下融化抗凝血细胞样本。

- ②取 1.5 ml 离心管，标记信息，每管加入 20 μ l Proteinase K。
- ③加入 200 μ l 血液或拭子样本（同时加入 1 μ l PhHV 内参质粒（108 copies/ μ l）。
- ④加入 200 μ l Buffer AL ,涡旋混匀，点离。
- ⑤56 $^{\circ}$ C 孵育 10 min（孵育 5 min 时手弹混匀一次，继续孵育）。
- ⑥加入 200 μ l 无水乙醇，颠倒混匀，涡旋 15 s，点离。
- ⑦将混合物移入 QIAamp mini 吸附柱上，放入 2 ml 收集管中，12000 rpm 离心 1 min，换新的收集管。
- ⑧加入 500 μ l Buffer AW1（使用注意观察是否已添加无水乙醇），12000 rpm 离心 1 min，换新的收集管。
- ⑨加入 500 μ l Buffer AW2（使用注意观察是否已添加无水乙醇），12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液。
- ⑩12000 rpm 空转 2 min。
- ⑪将 QIAamp mini 吸附柱移入新的 1.5 ml 离心管中，开盖晾 2-3 min。
- ⑫向吸附柱中间的吸附膜加入 50 μ l Buffer AE，室温孵育 2 min。12000 rpm 离心 2 min，将 DNA 洗脱。
- ⑬检测样品 DNA 的浓度范围为 2-50 ng/ μ l，将 DNA 样本用 1.5 ml 离心管分装为 2 份，每份 25 μ l，-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 用 Real-time PCR 方法筛查 9 种病原

(1) 引物与探针

本研究中所用立克次氏体立克次氏体、恙虫病东方体、贝氏柯克斯体、嗜吞噬细胞无形体、布鲁氏菌、埃立克次氏体的 Real-time PCR 引物和探针序为本实验室前期设计^[21]。所有引物探针应用 Primer Premier 6.0 软件设计，鹦鹉热衣原体、类鼻疽的引物与探针序列依据 Ch23s 和 *orf2* 基因设计；恙虫病东方体、嗜吞噬细胞无形体巢式 PCR 引物分别基于 56 kDa、*msh2* 基因设计，具体引物序

列见表 1.3。

表 1.3 TaqMan PCR 引物探针序列

Table 1.3 Sequences of primer and probe for the TaqMan PCR

病原	靶基因	引物探针	序列 (5'-3')
立克次氏体 ^[21]	17 kDa	17 kDa F	ACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACC
		17 kDa R	CAACTTGCCATTGTCCGTCAGG
		17 kDa P	FAM-ACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTA GAATGGC-BHQ1
恙虫病东方体 ^[21]	56 kDa	56 kDa F	AGATGATAAGGATATTAAGGGCATACA G
		56 kDa R	ATACACCCTCAGCAGCATTAAATTG
		56 kDa P	FAM-CATGGTTGCATCAGGAGCACTTGGT G-BHQ1
查菲埃立克体 ^[21]	<i>dsbA</i>	<i>Dsb</i> F	GTGCAGCATGGTAGAACTCGATGTA
		<i>Dsb</i> R	AGAGATTTTCCAATACTTGGAGAAG
		<i>Dsb</i> P	FAM-TGCTAGTGCTGCTTGAACAGCTTTC AGTGAT-BHQ1
嗜吞噬细胞无形体 ^[21]	<i>msp 2</i>	<i>msp 2</i> F	ATGGAAGGTAGTGTTGGTTATGGTATT
		<i>msp 2</i> R	TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA
		<i>msp 2</i> P	FAM-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATT G-BHQ1
贝氏柯克斯体 ^[21]	23 s rRNA	23 s F	CGGCTGAATTTAAGCGATTTATTTT
		23 s R	CGTAACCACACACGCATCTCA
		23 s P	FAM-CCGAACCCATTGCAA-BHQ1
鸚鵡热衣原体*	<i>ch 23 s</i>	ch 23 s F	CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT
		ch 23 s R	ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC
		ch 23 s P	FAM-CTCATCATGCAAAAAGGCACGCCG-T AMRA
类鼻疽伯克氏菌 ^[22]	<i>orf 2</i>	orf 2 F	GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATA A
		orf 2 R	CGTGCACACCGGTCAGTATC
		orf 2 P	FAM-CCGGAATCTGGATCACCACCACTTT CC-BHQ1
布鲁氏菌 ^[21]	<i>bcs p31</i>	<i>Bcsp 31</i> F	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC
		<i>Bcsp 31</i> R	GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG
		<i>Bcsp 31</i> P	FAM-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCAT CA-BHQ1
伯氏疏螺旋体菌*	<i>recA</i>	<i>LemrecAF</i>	GTTCTGCAACATTAACACCTAAAGCTT
		<i>LemrecAR</i>	AGGTGGGATAGCTGCTTTTATTGAT
		<i>LemrecAP</i>	FAM-ACAGGATCAAGAGCATG-BHQ1

* 本次试验设计

(2) 反应体系

反应体系的配制见表 1.4。

表 1.4 TaqMan PCR 反应体系

Table 1.4 TaqMan PCR Reaction system

试剂	体积 (μl)
2×Fast TaqMan Mixture	10
F ($10 \mu\text{M}$)	1
R ($10 \mu\text{M}$)	1
P ($10 \mu\text{M}$)	1
ROX	0.4
H ₂ O	4.6
DNA	2
总体积	20

(3) 反应条件

反应条件见表 1.5。

表 1.5 TaqMan PCR 反应条件

Table 1.5 TaqMan PCR reaction conditions

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间
95	5 min
95	15 s
60	20 s

} 40cycles

(4) 筛查步骤

将上述提取的 DNA 样本每份取 $5 \mu\text{l}$, 每 5 份混为一组, 作为混筛样本。其余未混合的样本作为后续单筛样本。先进行一次混筛, 对混筛出现阳性结果的样本组进行两次单筛。96 孔板如图 1.3(本图改编自文献^[21])加入病原的引物探针混合物与发热患者的混筛样本。采用 $20 \mu\text{l}$ 反应体系: $10 \mu\text{l}$ 2× Fast TaqMan Mixture, 正向引物 $1 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{M}$), 反向引物 $1 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{M}$), 探针 $1 \mu\text{l}$ ($2 \mu\text{M}$), dd H₂O $5 \mu\text{l}$, DNA 模板 $2 \mu\text{l}$ 。扩增条件: 95°C 预变性 5 min, 然后 95°C 变性 5s, 60°C 退火延伸 10s, 循环 40 次, 在 60°C 阶段采集荧光信号。Ct 值 ≤ 35 为阳性, $35 < \text{Ct}$ 值 < 40 为弱阳性, Ct 值 ≥ 40 为阴性^[21]。

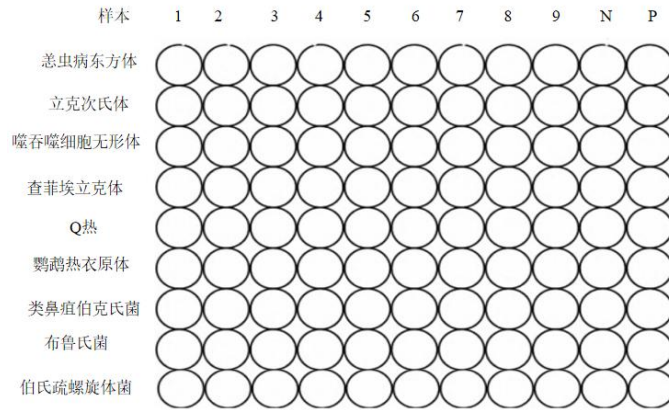


图 1.3 TaqMan 方法筛查 9 种病原

Figuer 1.3 TaqMan Methods screen 9 pathogens

1.2.5 巢式 PCR

(1) 引物与探针

对 TaqManPCR 方法筛查阳性的样本，继续用巢式 PCR（Nest PCR）方法检测。本实验中一轮与二轮所用引物与反应条件相同，具体引物序列见表 1.6。

表 1.6 巢式 PCR 引物序列

Table 1.6 Sequences of primer for the Nest PCR

病原	靶基因	引物探针	序列 (5'-3')	片段大小 (bp)	退火温度°C
恙虫病东方体	56 kDa	002 F	GGCCAAGTTAAACTCTA TGCTGAC	166	55
		002 R	CAGCATTAATTGCTACA CCAAGTGC		
吞噬细胞无形体	<i>msp 2</i>	015 F	ACTGGAACACTCCTGAT CCTCGGAT	130	56
		<i>msp 2</i> R	TTGGTCTTGAAGCGCTC GTA		

(2) 反应体系

反应体系的配制见表 1.7

表 1.7 巢式 PCR 反应体系

Table 1.7 Nest PCR Reaction system

试剂	体积 (μl)
----	---------

2×Fast TaqMan Mixture	12.5
F (10 μm)	1
R (10 μm)	1
H ₂ O	8.5
DNA	2
总体积	25

(3) 反应条件

反应条件见表 1.8

表 1.8 巢式 PCR 反应条件

Table 1.8 Nest PCR reaction conditions

温度 (°C)	时间
94	5 min
94	20s
55 (56)	20s
72	20s
72	10 min

(4) 筛查步骤

挑选 Real-time PCR 筛查结果中 CT<30 的样本进行, Nest PCR 完成后取 5 μl 样本加入上述配制的 1%琼脂糖凝胶中进行电泳, 200 V 15 min。通过凝胶成像系统进行观察, 对出现目的条带的 PCR 产物进行高通量测序, 通过 NCBI 中 BLAST 进行序列比对, 应用 MEGA 10.1.8 软件构建遗传进化树。

2 结果

2.1 9 种重要致病菌 Real-time PCR 筛查结果

2.1.1 筛查阳性患者人群与时间分布

本研究首先用 real-time PCR 方法筛查 9 中重要致病菌的感染情况, 包括恙虫病东方体、嗜吞噬细胞无形体、立克次氏体、贝氏柯克斯体、埃立克次氏体、鹦鹉热衣原体、类鼻疽伯克霍尔德菌、伯氏疏螺旋体菌、布鲁氏杆菌。在海南地区 503 例不明原因发热患者中, 检测到恙虫病东方体和嗜吞噬细胞无形体感染,

其他 7 种病原体检测结果为阴性。恙虫病阳性率为 14.51% (73/503)；发病集中在 8-11 月；女性患者多于男性，占比 65.75%(48/73)；年龄分布较广 50~70 岁人群中占比高，70 岁以上人群占比最高，为 18.03% (11/61)；职业分布中农民检出数量最多且占比最高，为 19.46% (36/185)。嗜吞噬细胞无形体病阳性率 5.57% (28/503)；发病集中在 7-9 月；女性患者多于男性，女性占比为 71.43%(20/28)；年龄分布 40~50 岁人群中占比最高为 4.65% (4/86)；职业分布农民检出数量最多 (13 人) 但学生占比最高，为 14.29% (3/21)；共感染患者占比 1.59% (8/503)，发病集中在 8-10 月男性多于女性，年龄分布以 40-50 岁人群为主 4.65% (4/86)，职业分布农民检出数量最多且占比最高，为 3.87% (7/185)，结果见表 1.9 与图 1.4。

表 1.9 中国海南患者中嗜吞噬细胞无形体与恙虫病东方体的感染及共感染情况

Table 1.9 Infection and coinfection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Orientia tsutsugamushi* in patients from Hainan, China

样本	嗜吞噬细胞无形体		恙虫病东方体		共感染*	
	阳性数 †	阳性率 (%)	阳性 数†	阳性率 (%)	阳性数†	阳性率 (%)
性别‡						
女	320	20	48	15	1	0.31
男	183	8	25	13.67	7	3.83
总计	503	28	73	14.51	8	1.59
年龄						
<20	25	4	3	12	0	—
20-	44	0	2	4.54	0	—
30-	78	4	10	12.82	0	—
40-	86	8	14	16.28	4	4.65
50-	86	4	15	17.44	1	1.17
60-	98	5	15	15.3	2	2.04
70-	61	1	11	18.03	1	1.64
未知	25	2	3	12	0	—
职业‡						
学生	21	3	3	14.29	0	—
务农	185	13	36	19.46	7	3.87
退休	35	1	6	17.14	0	—
工人	53	2	7	3.21	0	—
个体经 营	9	0	0	—	0	—
未知	200	9	21	10.5	0	—

* 合并感染恙虫病东方体与嗜吞噬细胞无形体

† TaqMan PCR Ct < 40

‡ 合并感染的性别和职业分布均有统计学意义(P<0.05)

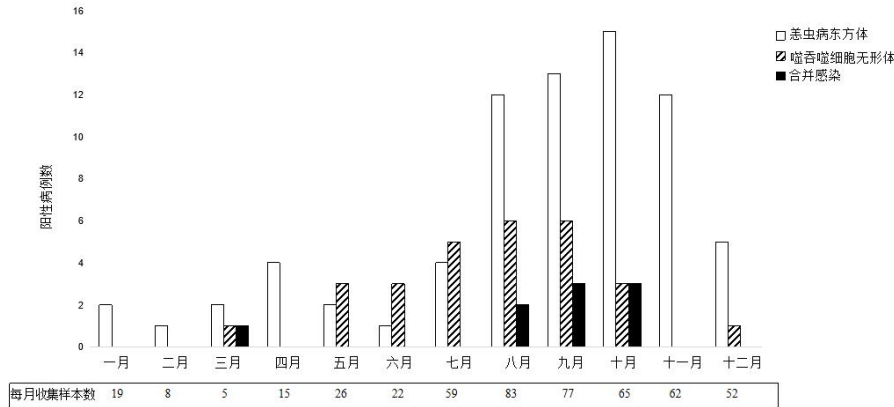


图 1.4 海南嗜吞噬细胞无形体、恙虫病东方体与共感染患者月份分布图

Figure 1.4 Monthly distribution of *Anaplasma phagocytophilum* 、 *Orientia tsutsugamushi* and Coinfection in Hainan

2.1.2 地域分布

将 503 份全血样本按患者发病地点进行划分：安定县 14 份、白沙县 3 份、保亭县 1 份、澄迈县 28 份、东方市 24 份、海口市 88 份、乐东县 5 份、临高县 17 份、陵水县 17 份、琼海市 6 份、琼中县 136 份、三亚市 2 份、屯昌县 11 份、万宁市 25 份、文昌市 13 份、儋州市 14 份、未知地区 102 份。恙虫病东方体在 12 个县市检测到阳性病例，其中琼中县检测到的病例数最多为 25 例，昌江县检出率最高为 28.57%。嗜吞噬细胞无形体在 6 个县市检测到阳性病例，其中海口市检测到病例最多为 9 例，昌江县检出率最高为 14.29%。恙虫病东方体和嗜吞噬细胞无形体共感染病例在琼中县检出数量最多为 3 例，琼中县检出率最高为 14.29%，数据见表 1.10。昌江县恙虫病、嗜吞噬细胞无形体和两种病原共感染检出率均为最高。

表 1.10 不明原因发热患者中嗜吞噬细胞无形体病、恙虫病及共感染地区分布

Table 1.10 Endemic distribution of anaplasmosis, scrub typhus and coinfection in undefined febrile illness patients

地区	样本数	恙虫病		嗜吞噬细胞无形体		共感染	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
安定县	14	3	21.43	0	/	0	/
白沙县	3	0	/	0	/	0	/
保亭县	1	0	/	0	/	0	/
昌江县	7	2	28.57	1	14.29	1	14.29
澄迈县	28	4	14.29	1	3.57	1	3.57
东方市	24	5	20.83	0	/	0	/
海口市	88	12	13.64	9	10.23	2	2.27
乐东县	5	1	20	0	/	0	/
临高县	17	4	23.53	0	/	0	/
陵水县	2	0	/	0	/	0	/
琼海市	6	0	/	0	/	0	/
琼中县	136	25	18.38	7	5.15	3	2.21
三亚市	2	0	/	0	/	0	/
屯昌县	11	1	9.09	0	/	0	/
万宁市	25	3	12	3	12	1	4
文昌市	13	2	15.38	0	/	0	/
儋州市	14	3	21.43	1	7.14	0	/
未知	107	8	7.45	6	5.61	0	/
总计	503	73	14.5	28	5.57	8	1.59

各地区两种疾病的检出率均无统计学意义($P>0.05$)

2.2 Nest PCR 验证分析

对 Real-time PCR 筛查结果中 4 份恙虫病东方体（名称为 HN-342、HN-76、HN-338、HN-503）与 5 份嗜吞噬细胞无形体阳性样本（HN-63、HN-260、HN-398、HN-79、HN-245）进行 Nest PCR 方法验证。Nest PCR 扩增片段经 1%琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像系统进行观察，结果见图 1.5。发现基于 56 kDa 基因扩增的 HN-342、HN-338、HN-503 出现与目的条带相同大小（166 bp）的条带。基于 *msp 2* 基因扩增的 HN-398、HN-79 出现与目的条带相同大小（130 bp）的条带，HN-245 出现约 170 bp 的条带。

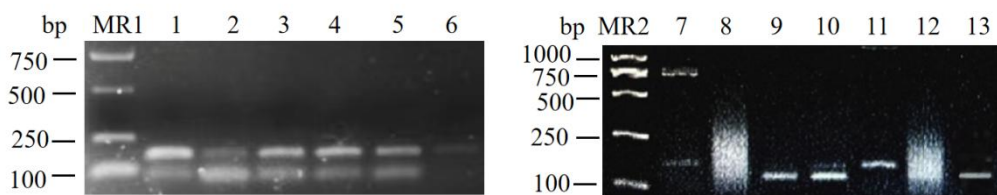


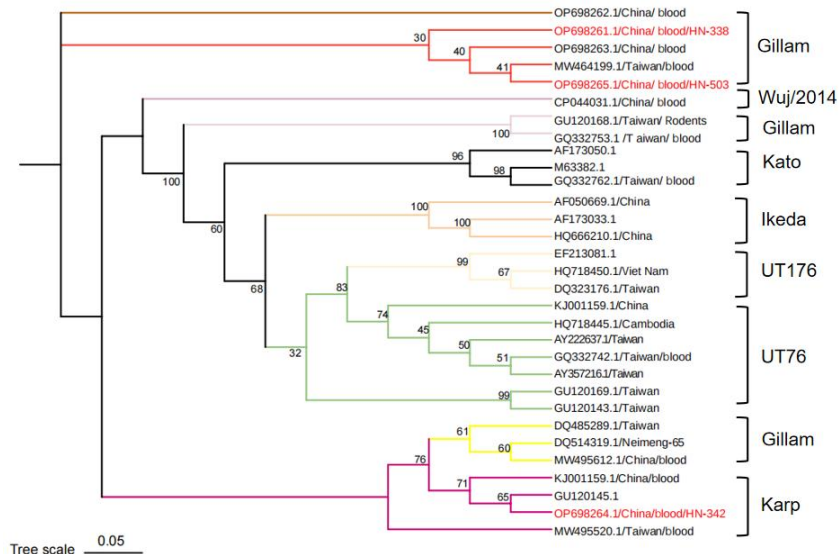
图 1.5 基于 56 kDa 基因片段的恙虫病东方体 PCR 凝胶电泳（左）与基于 msp 2 基因片段的嗜吞噬细胞无形体 PCR 凝胶电泳（右） MR1、2: DNA 分子量标准； Line 1: HN-342； Line 2: HN-76； Line 3: HN-338； Line 4: HN-503； Line 5、13: 阳性对照； Line 6、12: 阴性对照； Line 7: HN-63； Line 8: HN-260； Line 9: HN-398； Line 10: HN-79； Line 11: HN-245。

Figure 1.5 Agarose gel electrophoresis of *Orientia tsutsugamushi* 56 kDa gene (left) and agarose gel electrophoresis of *Anaplasma phagocytophilum* msp 2 gene (right) MR1、2: DNA Marker； Line 1: HN-342； Line 2: HN-76； Line 3: HN-338； Line 4: HN-503； Line 5、13: positive control； Line 6、12: negative control； Line 7: HN-63； Line 8: HN-260； Line 9: HN-398； Line 10: HN-79； Line 11: HN-245.

2.3 遗传进化分析

根据以上 Nested PCR 检测分析，我们将 HN-342、HN-76、HN-338、HN-503 的 PCR 产物进行测序，其中 HN-76 因为 PCR 目的片段浓度较低，未获得测序结果，其他三个样本基于测序结果进行 BLAST 分析，结果显示 HN-342 与 Karp 株同源性为 93%，HN-338、HN-503 与 Gillam 株同源性为 100%。选取 Karp、Gillam、Ikeda、Kato、UT76、UT176 的基因序列为参考序列，应用 MEGA10.1.8 软件进行系统进化树分析，并绘制遗传进化树，见图 1.6A。HN-342、HN-338、HN-503 分别与 GU120145.1、OP608263.1 与 MW464119.1 株处于同一分支，并且与云南地区的 OP608262.1 株、台湾地区的 MW464199.1、MW495520.1 株、内蒙 DQ514319.1 等接近。将 HN-398、HN-79、HN-245 产物进行测序，BLAST 结果显示与嗜吞噬细胞无形体 100%同源。选取不同国家不同物种中分离出的嗜吞噬细胞无形体基因序列为参考序列，并绘制遗传进化树，见图 1.6B。HN-398 与 MW491252.1、AY642115.1 株接近，HN-79 与 MH734193.1 接近（本研究中的序列用均红色字体标记）。

A



B

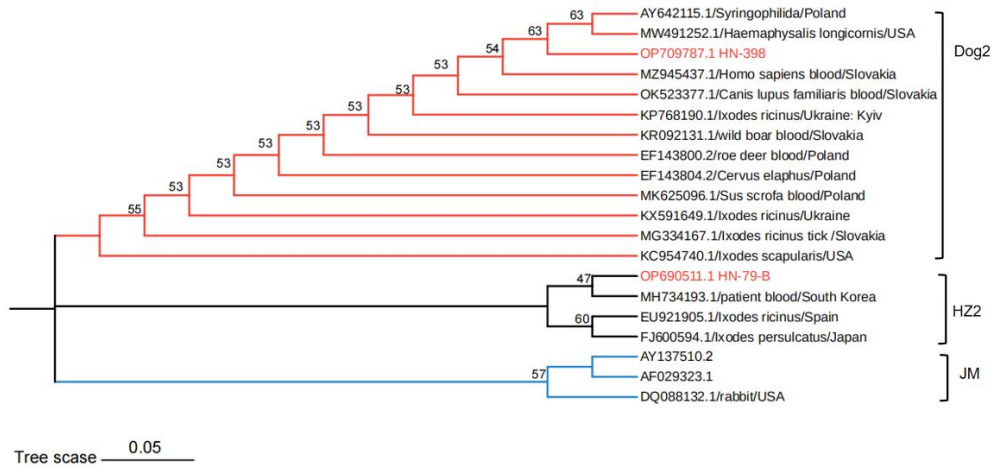


图 1.6 基于 56 kDa 基因片段的恙虫病东方体遗传进化分析 A 与基于 *msp 2* 基因片段的嗜吞噬细胞无形体遗传进化分析 B

Figure 1.6 Genetic evolution of *Orientia tsutsugamushi* 56 kDa gene A and genetic evolution of *Anaplasma phagocytophilum* *msp 2* gene B

3 讨论

恙虫病经媒介恙螨叮咬传播，多发生于“恙虫病三角区”，包括从俄罗斯远东地区到巴基斯坦、阿富汗、澳大利亚，还包括了西南太平洋和印度洋岛屿国家^[23]。海南省正处于恙虫病三角区内，是恙虫病的流行区。本次研究收集了海南 17 个市县不明原因发热患者样本 503 份，经筛查发现恙虫病在海南省 12 个市县均有

检出，发病范围大，其中昌江县检出率最高为 28.57% (2/7)。发病年龄分布较广、跨度较大，高发人群年龄为 50-70 岁之间，各职业中以农民为主，8-11 月份为海南地区发病高峰期，与之前的研究结果相较，恙虫病的易感人群、高发季节等各种风险因子无明显变化^[13]。但恙虫病发病率有所上升，从 2009-2011 年间的 5.5%^[24]增长至 14.51%，可见恙虫病流行趋势上升。此外病人多有发热、头痛、肌痛等无特异性的临床表现，易造成漏诊误诊，故应注意其与流行性感冒、疟疾等疾病的鉴别^[25]。海南恙虫病基因型中 Karp 型在与临近省份云南、广西地区也有分布，Gillam 型在台湾地区有分布，这与它们的地理位置特点，自然环境气象等因素相关。本研究基于 3 个恙虫病东方体阳性样本进行遗传进化分析，结果发现 2 个 Karp 基因型，1 个样本为 Gillam 基因型，说明海南地区不明原因发热患者中恙虫病东方体基因型存在多态性。前期报道表明，海南地区恙虫病东方体存在 Karp、Gillam、Kato 和 TSA56 等多种基因型^{[24][26]}，本研究只检测到 Karp 和 Gillam 基因型，其主要原因为测序样本量较小。恙虫病东方体基因型多态性可能与此地区位于热带地区，具有特殊的气候条件和多种植被，进而导致恙螨等媒介种类多样相关。随着海南自由贸易港建设推进，对地区环境的开发和日益频繁的人员往来可能成为影响恙虫病基因型多样性的潜在因素，需要对恙虫病东方体基因型多态性及其群体遗传学变化及相关风险因子进行进一步调查和持续监测。

嗜吞噬细胞无形体为蜱传的专性胞内菌，主要在热带和亚热带地区流行。中国于 2006 年首次报道了嗜吞噬细胞无形体病^[27]。海南省拥有热带季风气候，温度和雨量都适宜蜱类生长。有文献研究显示目前海南省硬蜱有 6 属 20 种，并可以携带嗜吞噬细胞无形体病原体^[28]。本研究在海南地区不明原因发热患者中检测到嗜吞噬细胞无形体，提示此地区存在此疾病的威胁。本研究在海南多市县筛查出嗜吞噬细胞无形体病，其中昌江县检出率最高为 14.29% (1/7)，发病于 4-5 上升，7-9 月达到高峰，10-11 月下降，男性多于女性。而北方的内蒙、河北、山东等地此病发病由 3 月开始上升，4-5 月达到高峰^{[21][29]}，可见嗜吞噬细胞无形体病南北流行存在差异，此差异与蜱的季节性消长和人类活动频率相关。值得注意的是本研究发现 20 岁以下青少年人群嗜吞噬细胞无形体病的患病率最高，达到 16% (4/25)，所以应加强对 20 岁以下不明原因发热性疾病的人群嗜吞噬细胞无形体感染的检测和筛查，以便进行早期诊断和治疗。调查显示海南省犬及牛

体上蜱可携带嗜吞噬细胞无形体和牛无形体 (*Anaplasma bovis*)，且蜱的季节消长与此次研究中嗜吞噬细胞无形体病的发病高峰相吻合^{[30][31]}。因患病者农民数量最多，故该病原通过牛或犬传播给目标人群的可能性大，其中犬身上所携带的蜱无形体阳性率高于牛，可达 7.5%^[32]，所以继续探究患者生活环境、职业暴露等因素有十分重要的意义。海南省恙虫病的防控工作重点应在高发季到来之前，对高发地区的重点人群开展个人防护及健康宣传教育工作，减少感染机会，对立克次氏体类疾病的预防应采取控制传播媒介、加强自身防护的措施，如合理使用杀虫剂、勤换衣物、野外游玩注意防护等。本研究无形体病职业分布中，学生阳性率最高，应加强对学生群体的筛查与健康监测。过去我们普遍认为焦痂溃疡等皮损是恙虫病的特异性临床表现，但本次研究在广西地区发现了带有焦痂的嗜吞噬细胞无形体患者，我国东北地区也曾出现过无形体患者伴焦痂的报道，在所有病患中占比 36%^[33]，临床诊断时加以重视，避免误诊。

本研究中发现恙虫病与嗜吞噬细胞无形体病合并感染病例，综合实验结果发现在海南地区这两种疾病的发病时间与发病高峰相近，因为二者有共同的宿主和相似的风险因素，更加大了合并感染的可能。内蒙地区于 2015-2016 年曾有过鲁氏菌病与立克次氏体病共感染的报道^[34]；海南地区还曾出现过恙虫病不同基因型共感染的情况，可见多种立克次体共感染较为普遍，这可能与一只蜱虫或恙螨可携带多种病原体 and 多种基因型的同一种病原体有关^[26]。恙虫病东方体交叉免疫反应较弱，所以患者往往会因为感染不同基因型恙虫病东方体而导致共感染^[25]。实验结果提示我们诊断蜱叮咬后急性发热患者时应考虑不同基因型、不同种类病原体的合并感染，需要进行进一步实验室诊断和流行病学调查。

为继续探究合并感染情况，本研究筛查了我国其他地区血液样本。在云南地区健康者 679 份血液样本中，恙虫病东方体阳性率 3.69 % (23/624)，嗜吞噬细胞无形体阳性率 8.97 % (56/624)；共感染率为 0.48 % (3/624)；广西地区 13 份样本均为恙虫病阳性，其中 8 人出现了合并感染。结合中国台湾、以及韩国等地的报道^{[35][36]}，我们推断这恙虫病东方体和嗜吞噬细胞无形体感染在中国乃至恙虫病三角区可能普遍存在。在云南正常人中有检出共感染的情况，结合福建省一项血清流行病学调查结果显示，无形体病、莱姆病、恙虫病均有共感染病例^[37]，提示健康人群中也可能普遍存在合并感染且感染情况复杂，涉及疾病种类多。

海南地区的发热患者中曾有过立克次氏体属病原感染的报道,斑疹伤寒和斑点热群立克次体阳性率可达 5.9%^[24]。研究显示健康人血清中会携带立克次氏体病原的抗体,且立克次氏体病存在无症状感染者^[38],本次实验筛选此种病原的靶基 17 kDa 为保守基因,可筛查斑点热、斑疹伤寒等多种立克次氏体属疾病^[39],但仍未筛查出阳性患者,提示立克次氏体类疾病病原流行种类有所转变。随着近二十年来经济的快速发展和社会转型,海南确诊的类鼻疽病患者数量大幅增加,后续实验中可根据其他基因如 *recA*、*hisA* 等进行进一步筛查检测^{[40][41]}。本研究目标人群为不明原因发热患者,未对海南健康人群中立克次氏体病做大规模筛查。本研究结果中立克次氏体属病原感染流行趋势下降而恙虫病东方体属病原感染上升值得深入探究,有必要结合健康人群的筛查结果共同分析。此外,很多寄生虫、病毒也可引起不明原因发热,例如新发现的松岭病毒、亨尼巴病毒等也可通过蜱或其他动物传播^{[42][43]},对这些病原也应当加以重视,建立病毒、细菌、寄生虫的多病原筛查方法,提高不明原因发热患者病原的诊断水平,为临床治疗和防控提供科学依据。本研究仅利用了分子生物学技术进行病原筛查,后续有必要结合血清学方法对发热患者血清进行筛查,对筛查结果共同分析。

4 小结

本研究应用 Real-time PCR 方法对不明原因发热患者中 9 种重要致病病原体进行了筛查,在海南地区筛查出了恙虫病与嗜吞噬细胞无形体病,研究发现海南临床感染恙虫病东方体表现出基因型多样性。恙虫病和嗜吞噬细胞无形体病在海南多个市县均有检出,发病范围广,高发年龄分别为 50-70 与 40-50 岁区间,高发时间分别为 9-10 与 8-9 月。

研究发现恙虫病和嗜吞噬细胞无形体病的共感染患者,综合我国其他省份与其他国家研究结果,提示在我国乃至整个恙虫病三角区这两种病原体共感染普遍存在。共感染病例的发现以及两种疾病相近的发病时间与发病高峰,提示其可能存在共同的传播媒介。

本研究中立克次氏体属病原零检出率与以往高检出率的报道形成鲜明的对比,提示海南立克次氏体类疾病病原种类的转变。立克次氏体类疾病常因劳动中频繁接触孳生场所或动物而感染,提海南地区应加强预防此类疾病的宣传教育

工作，加强对高危人群的疾病预防指导。本研究分析了恙虫病东方体和嗜吞噬细胞无形体在海南的流行趋势和特点，为海南不明原因发热患者的临床诊疗和立克次体病精准防控策略的制定提供科学依据。

第二章：恙虫病东方体 56 kDa 与 47 kDa 外膜蛋白的表达与作为 ELISA 诊断抗原的研究

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与耗材

(1) 恙虫病阳性患者 DNA (UT76 型)、恙虫病东方体 IgG 和 IgM 阳性血清由本实验室提供。

(2) 恙虫病东方体全菌蛋白的获取：本实验室在海南患者血液中分离得到恙虫病东方体菌株，经宏基因组测序鉴定为阳性，培养 1 ml 菌液至 OD 值为 1 时离心获取菌体，用 2×Loding Buffer 重新悬浮，沸水浴 5 min，离心 5 min，获得全菌蛋白样品。

(3) 其他主要试剂与耗材具体详见表 2.1。

表 2.1 试剂耗材与公司

Table 2.1 Reagent and compnies

试剂与耗材	公司
光谱彩虹预染蛋白 Marker	
DNase (RNase Free)	
Protease Inhibitor Cocktail	
SDS-PAGE Loading Buffer	
BSA Standard Solution	康为世纪生物科技有限公司，中国
Ni-Agarose Resin (His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂)	
2xSuper Pfx MasterMix	
TEMED	
BL21(DE3)plysS 感受态细胞	
Goat Anit-Rabbit IgG	
Immobilon-P 卷膜，PVDF, 0.45 μm	Merck, 德国
Chemiluminescent HRP Substrate	Takara, 日本
LB 肉汤	
LB 营养琼脂	北京博奥拓达科技有限公司，中国

Chloramphenicol	
1M Tris-HCL 缓冲液 (PH=6.8)	
1M Tris-HCL 缓冲液 (PH=8.8)	
Kanamycin Sulfate	
IPTG	索莱宝科技有限公司, 中国
SDS	
PBS 磷酸盐缓冲液	
DH5a感受态细胞	
羊抗人 IgG-HRP	
QuickBlue 快速染胶液	
His-Tag mouse MonoAb	北京博奥龙免疫技术有限公司, 中国
HRP 山羊抗小鼠 IgG	
lysozyme	天根生化科技有限公司, 中国
Difco Skim Milk	Becton,Dickinson and Company,美国
免疫荧光试剂盒	Focus, 美国
TWEEN	Sigma-alorich,德国
OMEGA Plasmid mini Kit	Omega Bio-Tek, 美国
Eel Extraction kit(100)	
Tris	北京欣经科技生物技术有限公司, 中国
山羊抗人 IgM	北京中杉金桥生物技术有限公司

1.1.2 主要仪器

主要仪器具体详见表 2.2。

表 2.2 主要仪器与公司

Table 2.2 Instruments and Companies

仪器	公司
高速冷冻离心机	Hitachi Limited, 日本
空气浴摇床	INFORS,瑞士
电泳仪	BIO-RAD, 美国
电泳槽	
Protein A/G 纯化柱	武汉云克隆科技有限公司, 中国
脱色摇床	SCIOLOGEX, 美国
50 ml 离心管	康宁, 中国
恒温水浴槽	JulABO, 德国
电子天平	乐祺, 中国
酶标仪	
全自动洗板机	Thermofisher, 美国

1.1.3 相关试剂的配制

(1) 配制 LB 培养基与 LB 平板

- ① 称量 20g LB 肉汤与 32g LB 营养琼脂溶于 1000 ml 蒸馏水中。
- ② 将配好的培养基放入高压蒸汽灭菌锅中，121°C，15 min。
- ③ LB 肉汤放于阴凉干燥处保存，使用前根据需要加入 500 μ l Kan (100 mg/ml) 与 1 ml Dh1 (34 mg/ml)。LB 营养琼脂放入恒温水浴槽中，待温度降为 55°C 取出，加入上述同等量的 Kan 与 Dh1，混匀并倒入平板中。平板冷却晾干后放入 4°C 冰箱保存。

(2) 配制 P-40 Lysis Buffer

150 mM NaCl、1% NP-40 或 TritonX-100、50 mM Tris-Hcl，2 mM MgCl₂，PH 调定至 7.4。

(3) 配制 Lysis Buffer

0.5M NaCl、15 mM Tris-Hcl，2 mM MgCl₂，6 M 尿素，PH 调定至 8。

(4) 配制咪唑溶液

低浓度咪唑：15 mM Tris-Hcl，0.5 M NaCl、10 mM 咪唑，PH 调定至 8。

高浓度咪唑：15 mM Tris-Hcl，0.5 M NaCl、300 mM 咪唑，PH 调定至 8。

(5) 配制 PBST 溶液

将 1 包 PBS 粉末溶于 2 L 超纯水中，再加入 1ml TWEEN，混匀。

(6) 配制 Running Buffer 溶液

配制 5×Running Buffer，称取 Tris 15.1 g，Glycine 94 g 倒入 1000 ml 带盖玻璃瓶中。加入 10%的 SDS 溶液 50 ml，用纯水定容至 1000 ml，混匀。加入 1 ml TWEEN，混匀。使用时将配好的溶液稀释 5 倍，配制成 1×TBE Running Buffer。

(7) 配制 Transfer Buffer 溶液

称取 Tris 2.9 g，Glycine 5.8 g，SDS 0.37 g 倒入 1000 ml 带盖玻璃瓶中。加入甲醇 200 ml，加用纯水定容至 1000 ml，混匀。

(8) 配制 SDS-PAGE 凝胶

- ① 清洗 1.5 mm 玻璃板并晾干，将玻璃板对齐后卡紧。

- ② 注入纯水，观察确定是否漏液。
- ③ 配制 12% 的分离胶，取一个 50 ml 离心管，加入纯水 9.9 ml, 30% 的丙烯酰胺溶液 12 ml, 1.5 mol/l Tris-HCL (PH=8.8) 7.5 ml, 10% SDS 300 μ l, 10 % 过硫酸铵 300 μ l, TEMED 24 μ l。将配好的溶液摇匀后灌胶，每板 6.5 ml 然后胶上加一层水，液封后可使胶凝固更快。
- ④ 待胶凝固后倒出水，并将玻璃板周边水珠用厨房用纸吸净。
- ⑤ 配制 4% 的浓缩胶，取一个 50 ml 离心管，加入纯水 8.1 ml, 30% 的丙烯酰胺溶液 2.01 ml, 1.5 mol/l Tris-HCL (PH=6.8) 1.5 ml, 10% SDS 120 μ l, 10 % 过硫酸铵 120 μ l, TEMED 12 μ l。将配好的溶液摇匀后灌胶，每板 2 ml。灌胶后立即插入梳子。

1.2 方法

1.2.1 技术路线

主要技术路线见图 2.1。

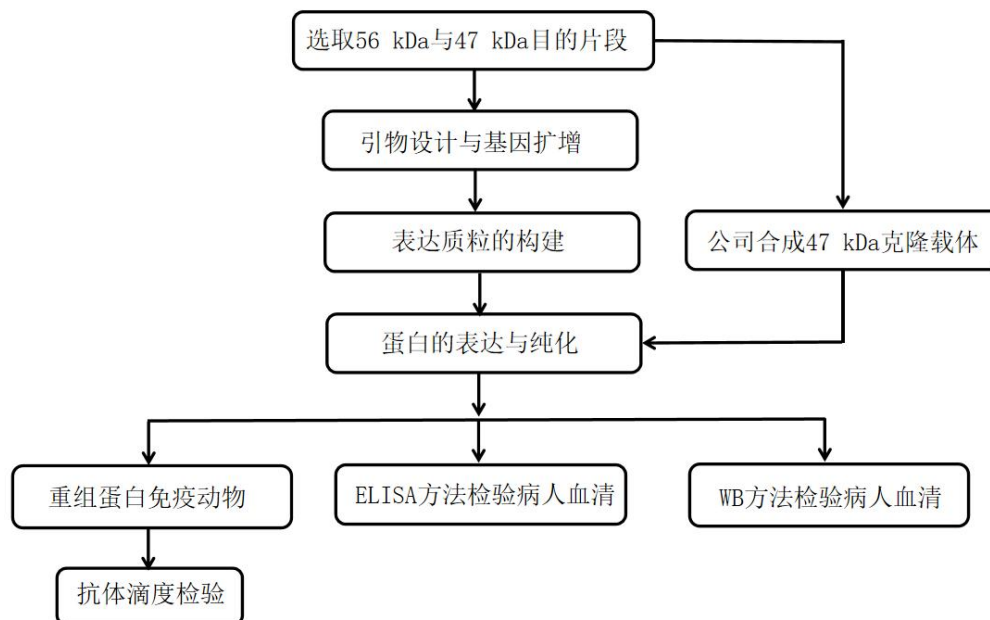


图 2.1 技术路线

Figure 2.1 Technical route

1.2.2 56 kDa 与 47 kDa 目的片段的选取

(1) 本实验室提供恙虫病东方体阳性患者 DNA (UT76 型) 为 56 kDa 基因扩增的模板, 选取 56 kDa 基因 (序列号为 LS398547.1) 设计引物, 扩增片段为 839251 bp-840282 bp 片段, 共计 1578 bp。

(2) 进入 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 选取 Genebank 中基因型为 UT76 的 47 kDa 基因序列 (序列号为 LS398552.1), 选取片段为 470881 bp-469484 bp, 共计 1398 bp, 由擎科生物技术有限公司合成基因, 并进行酶切 (*Bam*HI 与 *Xho* I)、连接 (PET-28a(+))、转化 (DH5α), 获得菌株 Y0039793-2。

1.2.3 引物设计与基因扩增

根据表达载体 PET-28a (+) 的酶切位点与含有 His-Tag 标签蛋白位置 (如图 2.2), 选择 *Nde* I 与 *Xho* I 限制性内切酶, 将待表达的基因 (1578 bp) 插入两者之间。根据 56 kDa 基因序列应用 Primer 6 软件设计引物, 用于目的基因扩增与重组质粒的鉴定。

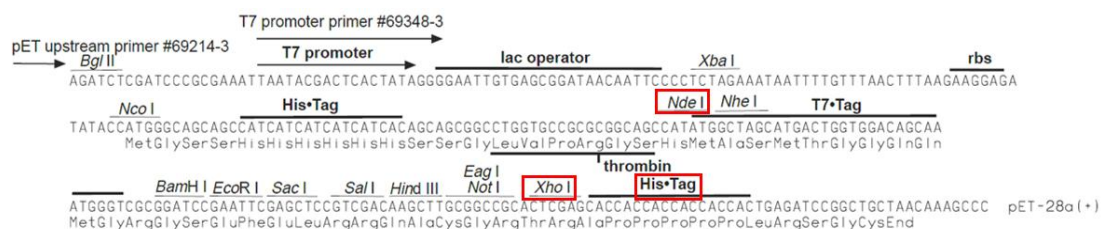


图 2.2 载体酶切位点图

Figure 2.2 Vector restriction sites

上游引物为: 56 kDa-16F, 加入保护碱基 ATAT 并引入酶切位点 *Nde* I。下游引物为: 56 kDa-17R, 加入保护碱基 AGCA 并引入酶切位点 *Xho* I。

56 kDa-16F 5' ATATCATATGGCTAGTGCAATGTCTGCATTG 3'

Nde I

56 kDa-17R 5' AGCACTCGAGGAAGTTATAGCGTACACCTAA 3'

Xho I

根据 47 kDa 基因序列设计引物, 用于重组质粒的鉴定。

47 kDa-003F 5' ATGAAAAAGGCATTTTATTTAC 3'

47 kDa-004R 5' CTTATTAATGTTAGGTAAAGC 3'

用 2xSuper Pfx MasterMix 高保真酶进行扩增，扩增体系见表 2.3。

表 2.3 扩增体系

Table 2.3 Amplification system

试剂	体系 (μl)
Pfx Mix	25
F (10 μm)	2.5
R (10 μm)	2.5
模版	2
H ₂ O	18
总体积	50

1.2.4 表达质粒的构建

(1) PET-28a (+) 表达载体质粒的提取

- ① 将宿主大肠杆菌复苏并涂布于 LB(Kan 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 平板增菌。
- ② 将单个菌放入 5 ml LB 培养基中，200 rpm，37°C 摇 12h。
- ③ 取 3 个 1.5 ml 离心管，分别加入 1 ml 菌液，1000 rpm 1 min，弃掉上清。
- ④ 离心管中分别加入 250 μl Solution I，吹吸涡旋混匀。
- ⑤ 加入 250 μl Solution II，迅速颠倒几次，直至菌体裂解，形成清亮的裂解液（此步骤时间应于 2 min 内完成）。
- ⑥ 加入 350 μl Solution III，迅速颠倒几次，直至出现白色絮状固体，室温 12000 rpm 离心 10 min。
- ⑦ 将三管上清吸入同一吸附柱中，室温 12000 rpm 离心 1 min
- ⑧ 弃掉滤液，加入 500 μl Buffer HBC，12000 rpm 离心 1 min。
- ⑨ 弃掉滤液，加入 700 μl Wash Buffer（使用注意观察是否已添加无水乙醇），12000 rpm 离心 1 min。
- ⑩ 弃掉滤液，12000 rpm 空转 2 min。
- ⑪ 将吸附柱移入新的 1.5 ml 离心管中，开盖晾 2-3 min。

⑫加 50 μl Buffer EB 在滤膜上，室温孵育 2 min。12000 \times g 离心 5 min。测浓度为 226 ng/ μl 。

(2) 目的基因与表达质粒的酶切与胶回收

①将 56 kDa 目的基因与 PET-28a (+) 质粒用 *Nde*I 与 *Xho*I 酶切，两种酶加入时间间隔 2 h，混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，体系见表 2.4。

表 2.4 酶切体系

Table 2.4 Digestion system

试剂	体系 (μl)
10 \times Cutsmart Buffer	5
<i>Nde</i> I	1
<i>Xho</i> I	1
产物/载体	10
H ₂ O	33
总体积	50

②向两种产物中分别加入 5 μl 10 \times DNA Loading Buffer，混匀。用上述配制的不加 Golden view 1%琼脂糖凝胶进行电泳，加入全部样本。100 V 65 min。

③染胶：琼脂糖凝胶放入加入 EB 染液中（500ml 0.5 \times TBE 中加入 200 μl EB 染料）染色 30 min，脱色 30 min。

④切胶：将琼脂糖凝胶放在切胶仪上，切下目的片段胶条，称量重量，目的片段重量：0.38 g,载体片段重量:0.31 g。

⑤溶胶：向胶中分别加入 0.38 ml 与 0.31 ml 的 Binding Buffer，水浴 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 溶胶

⑥将溶解的样本分别吸入吸附柱中，离心 12000 rpm，1 min。（一次 700 μl ，可分多次进行）

⑦丢弃废液，加入 300 μl Binding Buffer，离心 12000 rpm，1 min。

⑧丢弃废液，加入 500 μl Wash Buffer（使用注意观察是否已添加无水乙醇），离心 12000 rpm，1 min。此步骤重复两次。

⑨弃掉滤液，12000 rpm 空转 2 min。

⑩ 将吸附柱移入新的 1.5 ml 离心管中，开盖晾 2-3 min。

⑪ 加 30 μ l Buffer EB 在滤膜上，室温孵育 2 min。12000 \times g 离心 5 min，测浓度。

目的片段:22.05 ng/ μ l,载体片段: 3.9 ng/ μ l。

(3) 目的片段与 PET-28a (+) 质粒连接

将酶切好的目的片段与 PET-28a (+) 质粒片段连接，体系见表 2.5。混匀后金属浴 16 $^{\circ}$ C 过夜。

表 2.5 连接体系

试剂	体系 (μ l)
载体片段	2
目的片段	1
10 \times T4 Buffer	1
T4 Ligase	1.5
H ₂ O	1
总体积	15

(4) 将连接产物转化至 DH5 α 克隆菌株中

① DH5 α 取感受态细胞 25 μ l，冰上融化

② 取 2 μ l 连接产物加入感受态细胞中，冰浴 30 min，其间轻弹管壁 2 次。

③ 42 $^{\circ}$ C 金属浴热激 90 s，然后冰浴 2 min。

④ 向管中加入 250 μ l LB 培养基，摇床 200 rpm，37 $^{\circ}$ C 培养 1h。

⑤ 取 100 μ l 菌液涂布于 LB+Kan 的平板上，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

⑥ 筛选阳性菌落。

(5) 提取 56 kDa 与 47 kDa 重组质粒并鉴定

按上述 1.2.4 步骤提取 DH5 α 克隆载体中的质粒，浓度分别为 56 kDa: 102 ng/ μ l，47 kDa: 86 ng/ μ l。重组质粒分别命名为 PET-28a (+) -Ot56 与 PET-28a (+) -Ot47。重组质粒分别用 56 kDa-16F/56 kDa-17R、47 kDa-003F/47 kDa-004R 进行 PCR 扩增，产物由擎科生物技术有限公司测序，与原始序列进行比对。

(6) 将重组质粒转化至 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞中

按上述 1.1.3 步骤配制 LB+Kan+Dhl 的平板。按上述 1.2.4 步骤将重组质粒转

化到表达载体 BL21(DE3)pLysS 中。

(7) 筛选阳性菌株

选取转入 BL21(DE3)pLysS 中的不同单菌落，摇菌 2 ml，分为经 IPTG 诱导与未经 IPTG 的两组菌液，进行小量蛋白表达并转膜，一抗 (His-tag Mouse monAb 1:5000 稀释) 常温结合 1 h 后用 PBST 缓冲液洗涤，15 min 一次，洗涤三次，再与二抗结合 (山羊抗小鼠 IgG 1:5000 稀释)。观察表达结果，保存阳性菌株。

1.2.5 蛋白的表达与纯化

(1) 确定蛋白表达条件

① 将保菌管中的菌复苏并菌接种于 2 ml 的 LB+Kan+Dhl 的培养基中,摇床 37°C, 2 h, 待菌 OD=0.5 时, 开始诱导, 从如下方案中中选择最适条件。

2 ml 培养基+IPTG (0.5 mM) $\left\{ \begin{array}{l} 37^{\circ}\text{C} \text{ 诱导 } 6 \text{ h} \\ \text{常温 诱导过夜} \end{array} \right.$

② 吸取 1 ml 菌液, 5500 rpm, 离心 10 min, 弃上清。菌体用 2×Loding Buffer 重新悬浮, 沸水浴 5 min, 离心 5 min。

③ 取 20 μl 样本进行 SDS-PAGE, 100 V, 120 min。

(2) 大量表达蛋白与蛋白纯化

① 按上述步骤培养 500 ml 菌液, 离心收集菌体。

② 菌体加入 5 ml P-40 Lysis Buffer, 30 μl lysozyme(50 mg/ml)、300 μl DNase (1 u/ μl)、20 μl DNase Buffer、150 μl 蛋白酶抑制剂, 室温 20 min。

③ 按上述步骤破碎后加 25 μl Lysis Buffer+8M 尿素。离心 5500 rpm 30 min, 收集上清。

④ 小量纯化 47 kDa 蛋白并验证: 取 50 μl Ni-Agarose Resin, 5 倍体积的清水洗涤。吸取 1 ml 上清, 与 Ni-Agarose Resin 结合 30 min, 2000 rpm 离心 5 min。将未与 Ni-Agarose Resin 结合的上清、离心后的 Ni-Agarose Resin、与 Ni-Agarose Resin 结合后的上清各取 20 μl , 进行 SDS-PAGE 与 WB 检验。

- ⑤ 吸取 1 ml Ni-Agarose Resin 加入蛋白纯化柱用 5 倍体积的水清洗。
- ⑥ 将上清加入纯化柱中，控制滴速，使蛋白与 Ni-Agarose Resin 充分结合，收集滴落的上清（标记为 second，可进行二次洗脱）。用 40 ml Lysis Buffer 洗涤 Ni-Agarose Resin。
- ⑦ 将滴落的上清（标记为 second）重新加入蛋白纯化柱中，与 Ni-Agarose Resin 二次结合。
- ⑧ 用低浓度咪唑洗涤 Ni-Agarose Resin，洗去杂带。再加入 4ml 高浓度咪唑洗脱，用 1.5 ml 离心管收集，每管 1 ml。
- ⑨ 按比例加入 1×Loding Buffer，沸水煮 5 min，12000 rpm 离心 5 min。
- ⑩ 取 20 μ l 洗脱液进行 SDS-PAGE，100 V，120 min。两张胶，一张染色，一张转膜。
- ⑪ 染胶：将胶放入培养皿中，倒入考马斯亮蓝染液，常温 100 rpm，1h。
- ⑫ 脱色：用双蒸水脱色，常温 100 rpm，1h。
- ⑬ 转膜：将胶、衬垫、滤纸放在 Transfer Buffer 中平衡 5 min，印记膜放于甲醇中平衡 5 min。按正极-衬垫-滤纸-印记膜-胶-滤纸-衬垫-负极的顺序排列，放入电泳槽中，倒入 Transfer Buffer。将电泳槽放入冰盒中进行电泳，40V，50 min。
- ⑭ 将印记膜放入培养皿中，按上述步骤与一抗（His-tag Mouse monAb 1:5000 稀释）、二抗结合（山羊抗小鼠 IgG 1:5000 稀释）。
- ⑮ 用 Chemiluminescent HRP Substrate 染色，上机观察。

1.2.6 BCA 法测定表达蛋白含量

- (1) 按 BCA Protein Assay Kit 说明书操作，稀释 BCA 标准品，使终浓度分别为 2000 μ g/ml、1000 μ g/ml、500 μ g/ml、250 μ g/ml、125 μ g/ml、25 μ g/ml、0 μ g/ml。
- (2) 试剂 A、B 以 1:50 体积混匀，作为 BCA 工作液。
- (3) 上述稀释好的工作液 200 μ l 与待测蛋白 25 μ l 加入 96 孔板中，每孔做 3 组为平行对照。混匀，37°C 孵育 30 min。冷却至室温后使用酶标仪测定 562 nm 处

吸光值。

(4) 绘制曲线，测蛋白浓度。

1.2.7 重组蛋白免疫家兔

(1) 47 kDa 蛋白由卡梅德生物科技有限公司免疫家兔。

(2) 取表达的 47 kDa 蛋白 20 μl 进行凝胶电泳并转膜。

(3) 免疫家兔获得的血清 1:5000 稀释，二抗用山羊抗兔 IgG 1:5000 稀释，用上一步的膜进行 WB 检验。

1.2.8 ELISA 方法检测家兔血清抗体滴度

(1) **包被：**将抗原稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，包被 96 孔板（每孔 100 μl ），4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜。

(2) **封闭：**弃包被液，用 5%的脱脂牛奶包被（每孔 200 μl ），室温湿盒孵育 30 min。

(3) **检测：**

① 弃封闭液，每孔用 150 μl PBS 洗涤 4 次。

② 用 PBS 倍比稀释一抗血清（1:20000、1:40000、1:80000、1:160000、1:320000、1:640000），每孔 100 μl ，每个样本均做复孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 30 min。

③ 弃血清，每孔用 150 μl PBS 洗涤 4 次。

④ 二抗为 Goat Anti-Rabbit IgG，用 5%的脱脂牛奶稀释到终浓度为 1:5000，每孔 100 μl ，室温湿盒孵育 30 min。

⑤ 弃二抗，每孔用 150 μl PBS 洗涤 4 次。

(5) **显色：**每孔加入 100 μl 显色剂，观察每孔颜色决定终止反应时间。每孔加 50 μl 终止液，30 min 内使用酶标仪测 450 nm OD 值。

1.2.9 ELISA 方法检测海南与广西恙虫病阳性患者血清

(1) 取海南 20 份病阳性患者血清，血清由本实验室经胶体金检测 IgM 与 IgG

均为阳性。取广西 6 份恙虫病阳性患者血清，经胶体金检测 IgG 为阳性。

(2) 将血清 1:50 稀释，以家兔血清 (1:40000 稀释) 与 His-Tag muose MonoAb (1:5000 稀释) 为阳性对照，健康人的血清 (1:50 稀释) 为阴性对照。

(3) 二抗分别用羊抗人 IgG-HRP、Goat Anit-Rabbit IgG、HRP 山羊抗小鼠 IgG (1:5000 稀释)。

(4) 按上述步骤进行 ELISA 检验。

1.2.10 WB 方法复核血清样本

取 47 kDa 蛋白与全菌蛋白分别进行蛋白免疫印迹，其中 47 kDa 蛋白免疫印迹膜用海南 IgG 阳性血清 1:32 稀释进行检测，兔血清 1:5000 稀释为阳性对照。全菌蛋白免疫印迹膜用兔血清 1:5000 稀释为阳性对照。二抗用分别用山羊抗人 IgG 1:2500 稀释与山羊抗兔 IgG 1:5000 稀释。按上述步骤 PBST 缓冲液洗涤，加染液上机观察。

2 结果

2.1 截短型 56 kDa 基因扩增、截短型 47 kDa 基因合成与重组质粒的鉴定

2.1.1 56 kDa 目的基因扩增

以恙虫病阳性患者血液样本提取的 DNA 为模版，健康人的 DNA 作为阴性对照，56 kDa-16F、56 kDa-17R 为引物进行 PCR 扩增，经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，获得与目条带大小 1578 bp 相符的条带，如图 2.3。将 PCR 产物进行 Sanger 测序鉴定，结果如图 2.4，目的基因与 NCBI 序列 LS398547.1 同源性为 95.09%，含插入与突变碱基共 76 个。

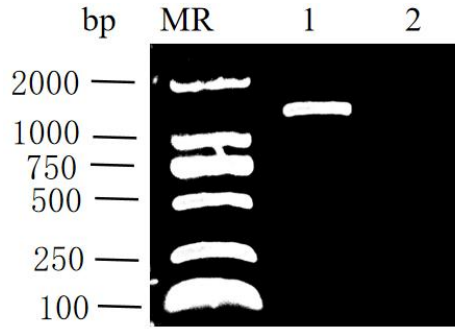


图 2.3 56 kDa 蛋白基因的 PCR 扩增 MR:DNA 分子量标准; Line 1:目的基因扩增产物; Line 2:阴性对照

Figure 2.3 PCR amplification of 56kDa protein gene MR:DNA Marker; Line 1:Gene amplification product; Line 2: Negative control.

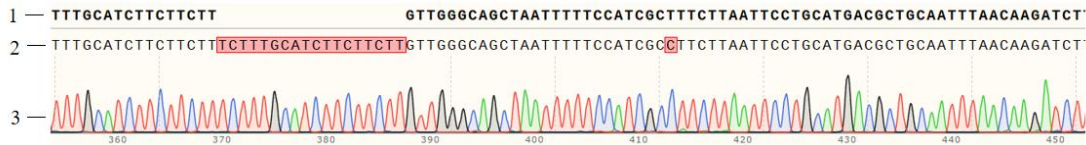


图 2.4 56kDa 蛋白基因测序图 Line 1: 56kDa 初始序列; Line 2: 目的基因测序序列; Line 3: 56 kDa 测序峰图

Figure 2.4 Sequencing diagram of 56 kDa protein gene MR:DNA Marker; Line 1: Initiation sequence of 56 kDa; Line 2: Detection sequence of target gene; Line 3: Detection sequence feak figure of target gene.

2.1.2 重组 PET-28a (+) 质粒的构建

质粒 PET-28a (+) 与 56 kDa PCR 扩增产物分别用 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切。质粒 PET-28a (+) 经双酶切切去片段长度为 80 bp，剩余片段长度为 5289 bp，目的基因扩增产物 1578 bp 切去片段长度为 20 bp，剩余目的片段为 1558 bp，酶切产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 2.5 所示。

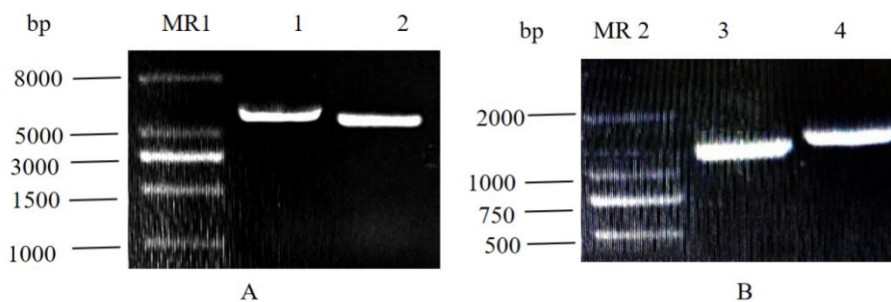


图 2.5 质粒 PET-28a (+) 与 PCR 扩增产物双酶切鉴定 MR1、MR2: DNA 分子量标准; Line 1: PET-28a (+) 质粒 (5369 bp); Line 2: 经双酶切 PET-28a (+) (5289 bp); Line 3: 经酶切的 56 kDa PCR 扩增产物 (1558 bp); Line 4: 56 kDa PCR 扩增产物 (1578 bp)

Figure 2.5 PET-28a(+)and PCR prodouct sdigestde by *Nde* I and *Xho* I MR1、MR2: DNA Marker; Line 1: PET-28a (+) plasmid (5369 bp); Line 2: Digested PET-28a (+) (5289 bp); Line 3: The digested 56 kDa PCR product (1558 bp); Line 4: 56 kDa PCR product (1578 bp) .

2.1.3 重组质粒的鉴定

含有截短型 47 kDa 基因的 PET-28a (+) 重组质粒由生物技术公司合成。经测序验证重组质粒 PET-28a (+) -Ot47 与 PET-28a (+) -Ot56 与样本 PCR 扩增产物序列同源性均为 100%。测序部分序列见图 2.6 (A: PET-28a (+) -Ot47, B: PET-28a (+) -Ot56) 。

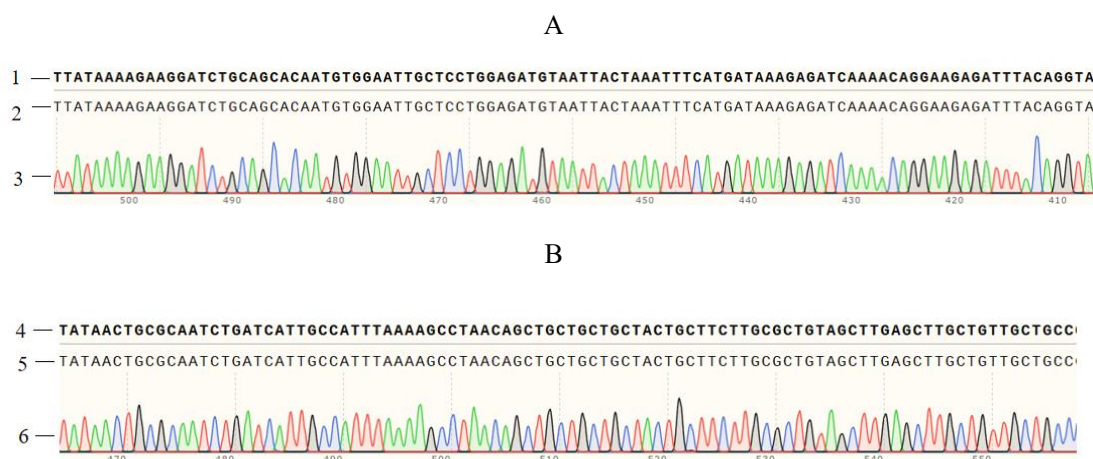


图 2.6 重组质粒部分碱基波峰图 Line 1: PET-28a (+) -Ot47 目标序列; Line 2: PET-28a (+) -Ot47 测序序列; Line 3: PET-28a (+) -Ot47 测序峰图; Line 4: PET-28a (+) -Ot56 目标序列; Line 5: PET-28a (+) -Ot56 测序序列; Line 6: PET-28a (+) -Ot56 测序峰图

Figure 2.6 Partial base wave crest of recombinated plasmid Line 1: Target sequence of PET-28a (+) -Ot47; Line 2: Detection sequence of PET-28a (+) -Ot47; Line 3: Detection sequence wave crest figure of PET-28a (+) -Ot47 测序峰图; Line 4: Target sequence of PET-28a (+) -Ot56; Line 5: Detection sequence of pET-28a (+) -Ot56; Line 6: Detection sequence wave crest figure of PET-28a (+) -Ot56.

2.2 高表达恙虫病东方体 56 kDa 蛋白和 47 kDa 蛋白菌株的筛选

将重组质粒 PET-28a (+) -Ot56 与 PET-28a (+) -Ot47 转入 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞中, 筛选高表达克隆。对转入 PET-28a (+) -Ot47 质粒的克隆诱导表达 His-tag 融合 47 kDa 的融合蛋白, 诱导后的细菌裂解产物经 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色后结果见图 2.7, 可见与目的条带大小相符的蛋白条带, 此外在 45 kDa、35 kDa、30 kDa、25 kDa 处有非特异性条带出现。PET-28a (+) -Ot56 与 PET-28a (+) -Ot47 菌株表达蛋白印记图见 2.8, 可见经 IPTG 诱导的菌株均出现特异性表达蛋白条带, 47 kDa 大小与预期相符, 56 kDa 较预期大 10 kDa。将阳性菌株保菌。其中 PET-28a (+) -Ot56 挑选的菌株表达量低, 凝胶染色条带不明显。PET-28a (+) -Ot47 5 号菌表达量最高, 故选择此菌株进行后续实验。

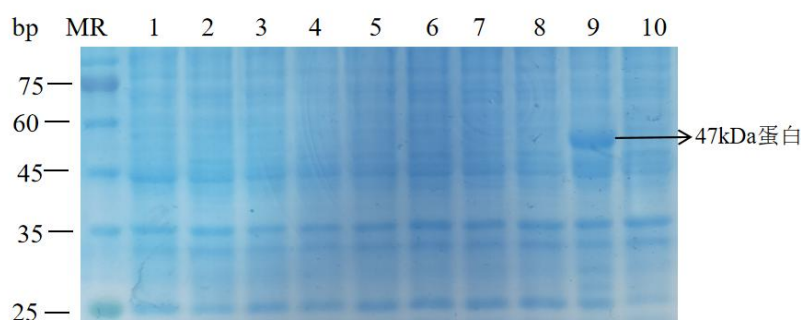


图 2.7 47 kDa 蛋白 SDS-PAGE 凝胶染色 MR: DNA 分子量标准; Line 1、2: 为经诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot47 1 号菌株; Line 3、4: 经诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot47 2 号菌株; Line 5、6: 经诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot47 3 号菌株; Line 7、8: 经诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot47 4 号菌株; Line 9、10: 经诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot47 5 号菌株。

Figure 2.7 SDS-PAGE gel stain of 47 kDa protein MR: DNA Marker; Line 1、2: Induced and uninduced PET-28a(+)-Ot47 strain 1; Line 3、4: Induced and uninduced PET-28a(+)-Ot47 strain 2i; Line 5、6: Induced and uninduced PET-28a(+)-Ot47 strain 3; Line 7、8: Induced and uninduced PET-28a (+) -Ot47 strain 4; Line 9、10: Induced and uninduced PET-28a (+) -Ot47 strain 5.

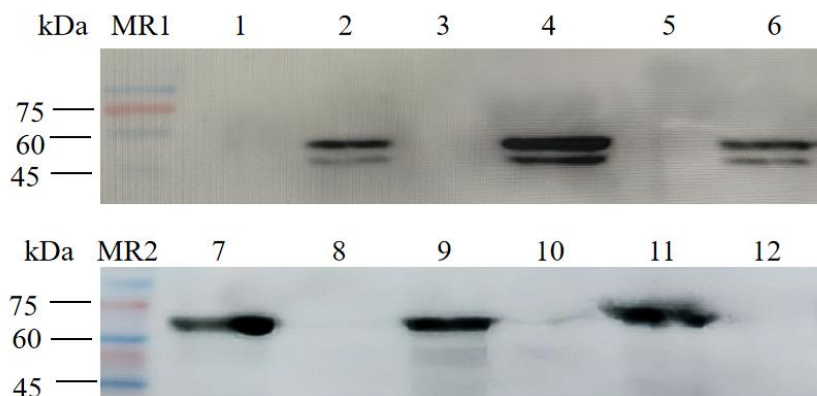


图 2.8 高表达菌株的筛选 MR1、MR2: 蛋白分子量标准; Line 1、2: 为未诱导与诱导的 PET-28a (+) -Ot47 6 号菌株。Line 3、4: 未诱导与诱导的 PET-28a (+) -Ot47 7 号菌株。Line 5、6: 未诱导与诱导的 PET-28a (+) -Ot47 8 号菌株。Line 7、8: 诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot56 1 号菌。Line 9、10: 诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot56 2 号菌。Line 11、12: 诱导与未诱导的 PET-28a (+) -Ot56 3 号菌。

Figure 2.8 Screening the high expressing strains MR1、MR2: Protein Marker; Line 1、2: Uninduced and induced PET-28a (+) -Ot47 strain 6; Line 3、4: Uninduced and induced PET-28a (+) -Ot47 strain 7; Line 5、6: Uninduced and induced PET-28a (+) -Ot47 strain 8; Line 7、8: Induced and uninduced PET-28a (+) -Ot56 strain 1; Line 9、10: Induced and uninduced PET-28a (+) -Ot56 strain 2; Line 11、12: Induced and uninduced PET-28a (+) -Ot56. strain 3.

2.3 两种条件下蛋白表达对比分析

将表达截短型 47 kDa 基因的 5 号菌接种于 2 ml 含 LB+Kan+Dhl 的培养基中, 摇床 200 rpm, 37°C, 2 h, 待培养液 OD=0.5 时, 加入 0.5 M IPTG 进行诱导, 诱导条件分别为 37°C 6 h 与常温过夜。对不同条件诱导后的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色, 结果如图 2.9, 可见两种诱导条件均出现与目的条带大小相符的条带, 常温诱导较 37°C 过夜蛋白表达量更高。

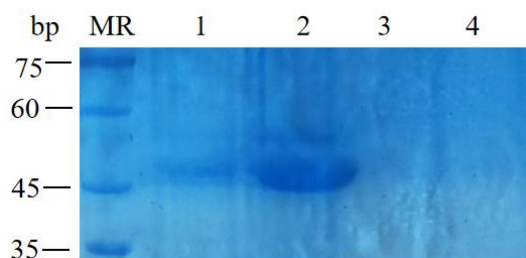


图 2.9 两种诱导条件下 47kDa 蛋白的表达水平 MR: 蛋白分子量标准; Line 1: 47 kDa 蛋白

37°C 6h 诱导; Line 2: 47 kDa 蛋白常温过夜诱导; Line 3、4: 阴性对照孔。

Figure 2.9 Expression levels of the 47 kDa protein under two induction conditions MR: Protein Marker; Line 1: 47 kDa protein induced for 37°C 6h; Line 2: 47 kDa protein induced overnight at room temperature; Line 3、4: Negative control.

2.4 诱导表达恙虫病东方体 47 kDa 蛋白及验证

经 0.5 M IPTG 常温过夜诱导表达 PET-28a (+) -Ot47 的 5 号菌株, 小量纯化后取 20 μ l 经 SDS-PAGE 与 WB 分析, His-tag Mouse monAb 1:5000 稀释为一抗、山羊抗小鼠 IgG 1:5000 稀释二抗, 结果如图 2.10, 发现 47 kDa 出现明显条带, 且上清与 Ni-Agarose Resin 结合洗脱后仍剩余少量蛋白, 可进行二次洗脱。

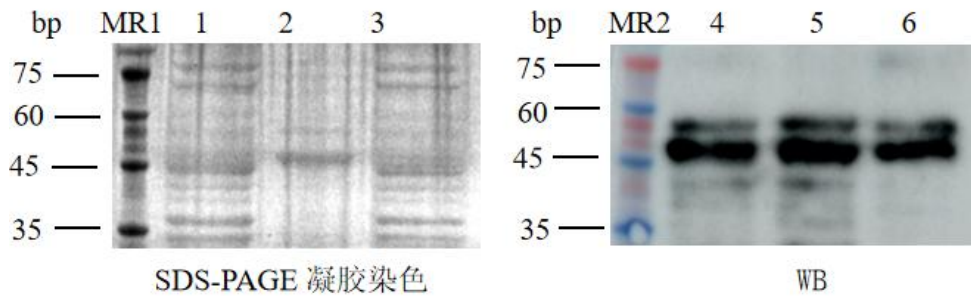


图 2.10 诱导表达 47 kDa 蛋白及验证 MR1、MR2: 蛋白分子量标准; Line 1、4: 未与 Ni-Agarose Resin 结合的上清。Line 2、5: 结合 47 kDa 蛋白的 Ni-Agarose Resin。Line 3、6: 与 Ni-Agarose Resin 结合后的上清。

Figure 2.10 Expression of 47 kDa protein and validation MR1、MR2: Protein Marker; Line 1、4: Supernatant that was not bound to Ni-Agarose Resin; Line 2、5: Ni-Agarose Resin bound to the 47 kDa protein; Line 3、6: Supernatant after bound to Ni-Agarose Resin.

2.5 恙虫病东方体 47 kDa 大量纯化结果

47 kDa 蛋白大量纯化后用 4ml 高浓度咪唑洗脱蛋白, 1.5 ml 离心管收集, 每管 1 ml。进行 SDS-PAGE 凝胶染色结果如图 2.11, 发现 47 kDa 处有明显条带, 并根据洗脱顺序条带逐渐减淡, 表明与 Ni-Agarose Resin 结合的蛋白已被全部洗脱。

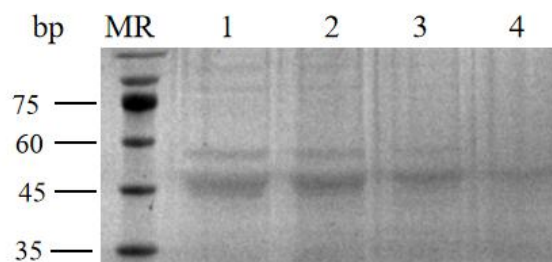


图 2.11 大量纯化 47 kDa 蛋白 MR: 蛋白分子量标准; Line 1、2、3、4: 47 kDa 蛋白大量纯化产物

Figure 2.11 Purified the 47 kDa protein MR: Protein Marker; Line 1、2、3、4: Purified products of 47 kDa protein

2.6 BCA 法测定表达蛋白含量结果

配制 BCA 工作液，稀释标准品至终浓度分别为 2000 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、125 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、0 $\mu\text{g/ml}$ 。工作液 200 μl 与标准品 25 μl 加入 96 孔板中，每孔做 3 组为平行对照。混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。冷却至室温后使用酶标仪测定 562 nm 处吸光值。标准曲线的绘制如下图 2.12，通过标准曲线方程可算出 47 kDa 蛋白浓度，四管蛋白浓度分别为: 1.56 $\text{mg}/\mu\text{l}$ 、1.23 $\text{mg}/\mu\text{l}$ 、0.43 $\text{mg}/\mu\text{l}$ 、0.37 $\text{mg}/\mu\text{l}$ 。

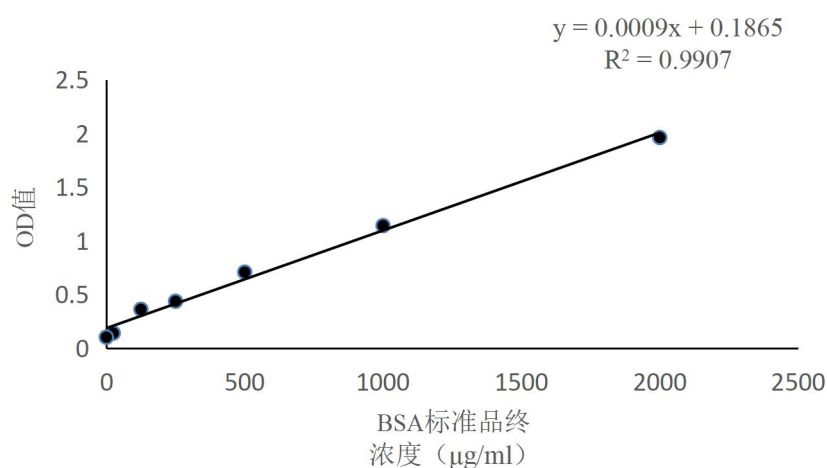


图 2.12 47 kDa 蛋白标准曲线

Figure 2.12 Standard curve of the 47 kDa protein

2.7 家兔免疫血清 WB 检测结果

取 20 μ l 重组 47 kDa 进行蛋白印记, 用家兔免疫血清 1:5000 稀释作为一抗, Goat Anit-Rabbit IgG 1:5000 稀释作为二抗, WB 结果见图 2.13, 结果表明 47 kDa 蛋白可与家兔血清中的 IgG 抗体结合, 同时在 30kDa 处出现两条非特异性条带。

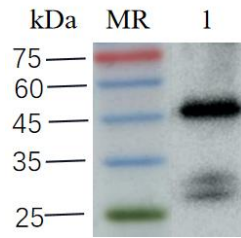


图 2.13 家兔免疫血清 WB 检测 MR: 蛋白分子量标准; Line 1: 47 kDa 蛋白条带

Figure 2.13 WB detection in rabbit immune serum MR: Protein Marker; Line 1: 47 kDa Protein strip

2.8 ELISA 方法检测家兔血清抗体滴度结果

将家兔血清倍比稀释, 浓度梯度为 1:20000、1:40000、1:80000、1:160000、1:320000、1:640000, Goat Anit-Rabbit IgG 1:5000 稀释为二抗, 抗体滴度见图 2.14, 可见抗体滴度从 1:4000 开始下降, 至最小稀释度 1:640000 时, 抗体滴度为 0.5。选择 1:4000 为抗体最佳稀释度。

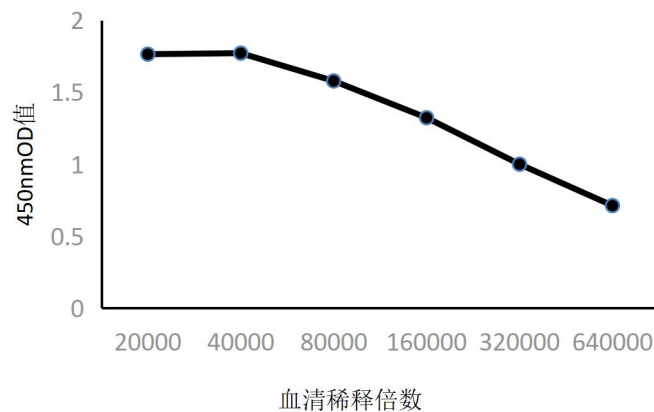


图 2.14 47 kDa 免疫家兔抗体滴度测定

Figure 2.14 Antibody titer determination in 47 kDa immunized rabbits

2.9 ELISA 方法检测海南阳性患者血清结果

ELISA 方法检测海南 20 份恙虫病 IgG、IgM 均为阳性的患者血清，重组恙虫病东方体 47kDa 蛋白（1 ug/ml）包被 96 孔板，每孔 100 μ l。将血清 1:50 稀释，以家兔血清（1:40000 稀释）与 His-Tag muose MonoAb（1:5000 稀释）为阳性对照，健康人的血清（1:50 稀释）为阴性对照，实验重复 3 次，记录平均值。检测血清结果均为阴性，数据结果见表 2.6。结果表明重组 47 kDa 蛋白无法识别恙虫病阳性患者血清。

表 2.6 ELISA 方法检测海南阳性患者血清

Table 2.6 Hainan positive patient serum detected by ELISA

	序号	IgG	IgM
海南	HN-1	0.152	0.059
	HN-2	0.086	0.060
	HN-3	0.07	0.057
	HN-4	0.067	0.056
	HN-5	0.079	0.060
	HN-6	0.067	0.065
	HN-7	0.046	0.060
	HN-8	0.049	0.053
	HN-9	0.045	0.053
	HN-10	0.044	0.046
	HN-11	0.0503	0.063
	HN-12	0.053	0.060
	HN-13	0.055	0.061
	HN-14	0.061	0.055
	HN-15	0.039	0.066
	HN-17	0.059	0.114
	HN-18	0.075	0.056
	HN-19	0.063	0.050
	HN-20	0.058	0.055
	阳性对照	兔免疫血清	2.053
His-Tag		1.179	/
阴性对照	健康人血清 1	0.051	0.047
	健康人血清 2	0.052	0.055

2.10 WB 方法检测血清样本结果

应用海南患者分离培养后的恙虫病东方体全菌蛋白与 47 kDa 蛋白进行 WB

实验，一抗应用本实验中免疫家兔血清作为阳性对照，筛查海南恙虫病胶体金 IgG 阳性患者血清，共筛查患者血清 8 份，如图 2.15。重组 47 kDa 蛋白与全菌蛋白均可识别家兔血清 (Line 1、2)，而重组 47 kDa 蛋白未能识别患者血清 (Line 3-10)。

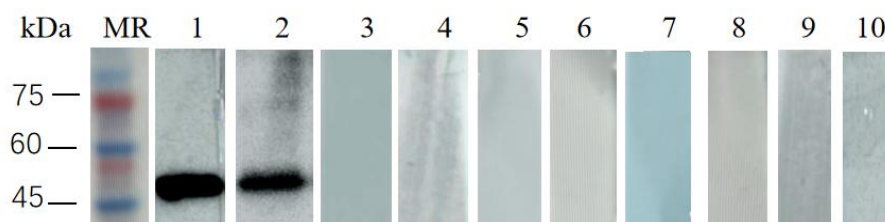


图 2.15 WB 方法检测海南阳性患者血清样本 MR: 蛋白分子量标准; Line 1: HN-503 病人的全菌蛋白印记图, 一抗为家兔血清 (1:5000 稀释); Line 2: 47 kDa 蛋白进行蛋白印记图, 一抗为家兔血清 (1:5000 稀释) 作为阳性对照; Line 3-10: 47 kDa 蛋白进行蛋白印记图, 一抗为患者血清 (1:32 稀释)

Figure 2.15 Positive patient serum detected by WB MR: Protein Marker; Line 1: Whole cell lysate proteins of HN-503 patients protein imprint, primary antibody was rabbit serum (1:5000 dilution); Line 2: 47-kDa protein imprint, primary antibody was rabbit serum (1:5000 dilution), is positive control; Line 3-10: 47-kDa protein imprint, primary antibody was patient's serum (1:32 dilution).

3 讨论

本实验表达了恙虫病东方体 56 kDa 和 47 kDa 重组蛋白, 并评估其基于该蛋白开发 ELISA 与 WB 检测方法的可行性。56 kDa 蛋白占细胞蛋白总量 10% 至 15% , 是最具免疫优势的蛋白^[6], 大多数恙虫病患者的血清可识别这种蛋白质。本研究中通过构建重组质粒少量表达了 56 kDa 蛋白, 但大量纯化失败。47 kDa 为刺激小鼠 T 细胞免疫的主要抗原, 具有较强的免疫原性, 多应用于恙虫病分子疫苗研制^[7]。本实验探究了两种重组蛋白表达条件, 研究过程中首先利用大肠埃希菌 BL21 菌株做为表达宿主未能成功表达, 后选择 BL21(DE3)pLysS 作为表达宿主进行尝试, 成功优化了 47 kDa 蛋白最适表达条件, 用 0.5 M 的 IPTG, 常温

过夜诱导可明显增加蛋白的表达量。重组的 47 kDa 蛋白可特异性识别经免疫的家兔血清 IgG 抗体，且能与阳性患者（UT76 型）的全菌蛋白反应，提示这种蛋白具有免疫原性，家兔血清抗体滴度可达 1: 640000。

56 kDa 主要的开放阅读框编码 516-541 个氨基酸，其中含有四个高变区^[16]。本研究发现 56 kDa 模版 DNA 经扩增与 NCBI 上的序列有一定差异，碱基突变 76 个，且表达的蛋白比预期大 10kDa，我们应用 47 kDa-003F /47 kDa-004R 对海南阳性患者(UT76 型)模版进行扩增作为对比，测序发现与原始序列同源性 100%，进一步说明了 56 kDa 的低保守性。由于其低保守性导致的部分碱基突变或许是本实验中 56 kDa 大量纯化困难的原因之一。有研究表明将 PCR 产物克隆于载体 pRSET-B 可成功表达蛋白，且进行 ELISA 实验发现 IgM 与 IgG 的灵敏度分别为 87.0% 和 59.8%，特异性均为 100%^[18]。后续我们可采取更换模版、更换载体或根据其他 56 kDa 序列重新设计引物进行尝试。

有研究报道重组 47kDa 抗原可识别台湾患者血清，有 76% 的患者 IgM 可被重组 47kDa 抗原识别，有 93% 的患者 IgG 可被重组 47kDa 抗原识别^[16]。但本研究中重组 47 kDa 蛋白未能识别患者血清中的抗体。通常恙虫病东方体感染产生的针对 56 kDa 蛋白的抗体出现时间早、维持时间长，而针对 47 kDa 蛋白的抗体则出现晚且检测结果不佳。研究发现 95% 以上的恙虫病患者样本可识别 56 kDa 蛋白^[16]，而对重组 47 kDa 蛋白有抗体反应的样本只有不到 70%^[20]，表明 47 kDa 对患者血清的敏感程度不高。患者感染病原的变异程度也会对抗体滴度产生影响，例如变异的 Shimokoshi 型患者血清对相应菌株的抗体滴度有所下降^[44]，本研究下一步计划对提供血清的阳性患者进行分子生物学筛查，探究其基因型类型及是否有变异。此外，密码子使用偏好性对蛋白质折叠过程会产生影响，从而影响蛋白质功能^[45]。这些都有可能导致重组 47 kDa 蛋白无法识别病人血清。本试验中重组 47 kDa 蛋白原始扩增模版序列选取了 UT76 型序列，而海南地区流行的优势基因型为 Karp 和 Gilliam 型^[46]，后续我们可尝试 Karp 或 Gilliam 株进行蛋白表达。

研究提示用 Gilliam, Karp 和 Kato 株的 30 kDa 外膜蛋白制备嵌合抗原，其 IgM 和 IgG 抗体的灵敏度和特异性可达 99%，使用多种重组抗原混合物可以识别单重抗原无法识别的血清，显著提高了敏感性和特异性^[19]。除传统的识别恙虫病

东方体的两种蛋白外，有研究发现其他蛋白也可用于诊断与鉴别。高度保守的 GroEL 蛋白是一种热休克蛋白（HSP21），也可用作诊断靶标，并开发了基于此蛋白的免疫层析抗原检测方法^[47]。新发现的 27 kDa 抗原较 56 kDa 蛋白有更好的诊断特异性与敏感性^[48]，为恙虫病东方体的诊疗提供了新的研究方向。

4 小结

本实验成功表达了恙虫病东方体的 47 kDa 与 56 kDa 重组蛋白，并探究了重组蛋白最适表达条件，两种蛋白可在 BL21(DE3)pLysS 中表达，大量纯化 47 kDa 重组蛋白，并验证其具有免疫原性。

47 kDa 重组蛋白未能识别阳性患者血清，不能作为恙虫病 ELISA 血清学诊断理想的靶抗原。分析其可能原因包括：47 kDa 蛋白本身对患者血清敏感程度不高、选取目的基因片段不是本地区主要流行株、密码子使用偏好性对蛋白质折叠过程的影响、选取的阳性患者样本可能存在基因型的变异等。未能大量纯化 56 kDa 重组蛋白，分析可能原因为 56 kDa 的低保守性与序列多态性导致。

参考文献

- [1] SALJE J, WEITZEL T, NEWTON P N, et al. Rickettsial infections: A blind spot in our view of neglected tropical diseases [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(5): e0009353.
- [2] BHANDARI M, SINGH R K, LAISHEVTCEV A, et al. Revisiting scrub typhus: A neglected tropical disease [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2022, 90-91: 101888.
- [3] 林碧瑚, 詹志农, 王华民, 等. 海南岛恙虫病立克次体研究 [J]. 海南医学院学报, 2003, (05): 261-264+269.
- [4] 吴东兴, 李淑艳, 包黎明, 等. 蝉传人兽共患无形体科属病原体研究 [J]. 畜禽业, 2021, 32(11): 3.
- [5] 赵清, 逯军, 潘翔. 人感染立克次体致病研究现状 [J]. 中国热带医学, 2020, 20(6): 6.
- [6] ABEYKOON A M H, CLARK N J, SOARES MAGALHAES R J, et al. Coxiella burnetii in the environment: A systematic review and critical appraisal of sampling methods [J]. Zoonoses Public Health, 2021, 68(3): 165-81.
- [7] WHATMORE A M, FOSTER J T. Emerging diversity and ongoing expansion of the genus Brucella [J]. Infect Genet Evol, 2021, 92: 104865.
- [8] 陈如寿, 钟佳芳, 石挺丽, 等. 海南病原类鼻疽伯克霍尔德菌质谱数据库的构建及验证 [J]. 广东医学, 2022, 43(6): 5.
- [9] ZHANG Z, ZHOU H, CAO H, et al. Human-to-human transmission of Chlamydia psittaci in China, 2020: an epidemiological and aetiological investigation [J]. Lancet Microbe, 2022, 3(7): e512-e520.
- [10] RIKIHISA Y. The "Biological Weapons" of Ehrlichia chaffeensis: Novel Molecules and Mechanisms to Subjugate Host Cells [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 830180.
- [11] STARK J H, LI X, ZHANG J C, et al. Systematic Review and Meta-analysis

- of Lyme Disease Data and Seropositivity for *Borrelia burgdorferi*, China, 2005–2020 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28(12): 2389-2397.
- [12] 曹国平, 占炳东, 钟建跃, 等. 2017-2019 年浙江省衢州市城区公园蜱分布及携带病原体情况调查 [J]. *疾病监测*, 2021, (009): 036.
- [13] 高浩然, 刘水, 王凯新, 等. 1507 例立克次体病患者的流行病学特征 [J]. *热带医学杂志*, 2022, 22(02): 283-286+290.
- [14] ABDAD M Y, ABOU ABDALLAH R, FOURNIER P E, et al. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(8).
- [15] SARASWATI K, DAY N P J, MUKAKA M, et al. Scrub typhus point-of-care testing: A systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(3): e0006330.
- [16] CHEN H W, ZHANG Z, HUBER E, et al. Kinetics and magnitude of antibody responses against the conserved 47-kilodalton antigen and the variable 56-kilodalton antigen in scrub typhus patients [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(6): 1021-1027.
- [17] WALKER D H, MENDELL N L. A scrub typhus vaccine presents a challenging unmet need [J]. *NPJ Vaccines*, 2023, 8(1): 11.
- [18] CHANKATE P, KALAMBAHETI T, KOSOLTANAPIWAT N, et al. A Use of 56-kDa Recombinant Protein of *Orientia tsutsugamushi* Karp Serotype in Serodiagnosis of Scrub Typhus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Thais [J]. *Trop Med Infect Dis*, 2022, 8(1).
- [19] KIM Y J, YEO S J, PARK S J, et al. Improvement of the diagnostic sensitivity of scrub typhus using a mixture of recombinant antigens derived from *Orientia tsutsugamushi* serotypes [J]. *J Korean Med Sci*, 2013, 28(5): 672-679.
- [20] SEONG S Y, CHOI M S, KIM I S. *Orientia tsutsugamushi* infection: overview and immune responses [J]. *Microbes Infect*, 2001, 3(1): 11-21.
- [21] 张瑛, 海岩, 滕中秋, 等. 不明原因发热患者血样中 9 种致病性胞内菌病原调查 [J]. *疾病监测*, 2022, 37(04): 457-463.
- [22] PENG Y, ZHENG X, KAN B, et al. Rapid detection of *Burkholderia*

- pseudomallei with a lateral flow recombinase polymerase amplification assay [J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0213416.
- [23] RICHARDS A L, JIANG J. Scrub Typhus: Historic Perspective and Current Status of the Worldwide Presence of Orientia Species [J]. Trop Med Infect Dis, 2020, 5(2).
- [24] 吴捷, 王少玲, 马焱, 等. 海南省 2009 年-2011 年发热病人立克次体病检测及结果分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(09): 1311-1313+1316.
- [25] 谢晓菲, 王高玉, 黄艺, 等. 中国恙虫病流行及临床研究进展 (2010—2020) [J]. 海南医学院学报: 1-9.
- [26] TANG C, ZHANG L, HUANG Y, et al. Mixed genotypes of Orientia tsutsugamushi in conserved genes and a single immune-dominant tsa56 genotype discovered from a patient with scrub typhus in Hainan Island, China: a case report [J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 698.
- [27] ZHANG L, LIU Y, NI D, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China [J]. Jama, 2008, 300(19): 2263-2270.
- [28] 周飒, 林洋, 祖海月, 等. 海南部分地区犬体表蜱种鉴定及无形体携带情况调查 [J]. 热带生物学报, 2023: 1-10.
- [29] ZHANG L, WANG G, LIU Q, et al. Molecular analysis of Anaplasma phagocytophilum isolated from patients with febrile diseases of unknown etiology in China [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57155.
- [30] 张宏泽, 尹家祥. 中国人粒细胞无形体病流行现状及其影响因素 [J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(05): 478-481.
- [31] 孙定炜, 王善青, 赵伟, 等. 海南澄迈县牛及犬体上蜱季节消长调查 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(09): 1081-1082.
- [32] ZHANG L, LIU H, XU B, et al. Anaplasma phagocytophilum infection in domestic animals in ten provinces/cities of China [J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 87(1): 185-189.
- [33] LI H, ZHENG Y C, MA L, et al. Human infection with a novel tick-borne Anaplasma species in China: a surveillance study [J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(6): 663-670.

- [34] YIN X, GUO S, DING C, et al. Spotted Fever Group Rickettsiae in Inner Mongolia, China, 2015-2016 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(11): 2105-2107.
- [35] TSAI K H, CHUNG L H, CHIEN C H, et al. Human granulocytic anaplasmosis in Kinmen, an offshore island of Taiwan [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13(9): e0007728.
- [36] HEO D H, HWANG J H, CHOI S H, et al. Recent Increase of Human Granulocytic Anaplasmosis and Co-Infection with Scrub Typhus or Korean Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Korea [J]. *J Korean Med Sci*, 2019, 34(11): e87.
- [37] 林光宇, 张守印, 谢克锦, 等. 福建省北部林区人群人粒细胞无形体血清流行病学检测 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(12): 1179-1180.
- [38] 别双双, 杜春红. 我国新发蜱传立克次体病研究进展 [J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2021, 28(04): 263-270.
- [39] ROBINSON M T, SATJANADUMRONG J, HUGHES T, et al. Diagnosis of spotted fever group Rickettsia infections: the Asian perspective [J]. *Epidemiol Infect*, 2019, 147: e286.
- [40] ZHENG X, XIA Q, XIA L, et al. Endemic Melioidosis in Southern China: Past and Present [J]. *Trop Med Infect Dis*, 2019, 4(1).
- [41] SCOFFONE V C, TRESPIDI G, BARBIERI G, et al. Methodological tools to study species of the genus *Burkholderia* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(24): 9019-9034.
- [42] MA J, LV X L, ZHANG X, et al. Identification of a new orthonairovirus associated with human febrile illness in China [J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 434-439.
- [43] ZHANG X A, LI H, JIANG F C, et al. A Zoonotic Henipavirus in Febrile Patients in China [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(5): 470-472.
- [44] LIU Y, YANG Q, ZHAO F. Synonymous but Not Silent: The Codon Usage Code for Gene Expression and Protein Folding [J]. *Annu Rev Biochem*, 2021, 90: 375-401.
- [45] SETO J, TANAKA S, MURAKATA T, et al. Scrub typhus caused by

- Shimokoshi type *Orientia tsutsugamushi* showing variant 56-kDa type-specific antigen gene sequence in Tohoku region, Japan [J]. *Microbiol Immunol*, 2019, 63(7): 280-284.
- [46] 王寒强, 王高玉, 林璋礼, 等. 海南省琼中黎族苗族自治县 2019 年恙虫病东方体分子流行病学及遗传进化分析 [J]. *中国热带医学*, 2022, 22(07): 591-596.
- [47] INDRAWATTANA N, AIUMURAI P, SAE-LIM N, et al. GroEL Chaperonin-Based Assay for Early Diagnosis of Scrub Typhus [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12(1).
- [48] KIM W, LEE S Y, KIM S I, et al. Identification of a Novel Antigen for Serological Diagnosis of Scrub Typhus [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2021, 105(5): 1356-1361.

综述

2010—2020 年中国恙虫病流行及临床研究进展

恙虫病是由恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*, Ot)感染引起的急性发热性疾病。主要通过恙螨幼虫叮咬传播,啮齿类动物在恙虫病传播过程中发挥重要作用。随着气候变化和人类活动范围的扩大等原因,我国恙虫病感染病例数和流行区域呈明显增加和北扩趋势。本文基于文献总结分析了 2010-2020 年我国各地区恙虫病发病情况、流行病学特征、临床研究等进展。结果表明 Kato、Karp、Gilliam 型为我国恙虫病东方体主要流行基因型;恙虫病在我国各地区均有分布,其中云南、广州、福建等地是高发区;传播媒介种类呈明显地理差异;本病发病高峰期与季节温度、人群年龄、职业等相关。对我国恙虫病流行趋势变化、人群感染风险、环境影响等因素的研究,将为优化媒介防控措施、完善临床诊治方案、提高突发疫情的应急处置能力及精准防控策略的制定提供科学的指导。

1 前言

恙虫病又名丛林斑疹伤寒(Scrub typhus),其病原体为恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*, Ot),是主要通过恙螨幼虫叮咬感染而引起的一种急性热性传染病。恙虫病东方体起初归属于立克次氏体科立克次氏体属,后因该病原体与其他立克次氏体的生物学特性有较大不同,故单独为东方体属(*Orientia*)^[1]。恙虫病早期无临床特异性表现,多为发热、皮疹、溃疡等,部分患者伴有焦痂,与其他疾病区分困难,因而误诊率、漏诊率高。治疗不当会导致患者病情加重,出现肝脏、肾脏等多器官受累,严重者可导致死亡^[2]。恙病患者死亡率随年龄增加而上升,未经诊断的患者死亡率可达 14.3%-70%^[3]。本病的治愈率与病程紧密相关,研究显示病程在一周内、两周内和两周以上的患者治愈率分别为 100%、88%和 71%^[4]。

传统的恙虫病流行区主要位于“恙虫病三角区”,其范围从俄罗斯远东地区到巴基斯坦、阿富汗、澳大利亚,还包括了西南太平洋和印度洋岛屿国家。近年来在“恙虫病三角区”外的范围发现其感染广泛存在,例如阿拉伯联合酋长国分离出了 O.chuto 株,智利出现血清检测阳性患者,非洲一些国家也陆续出现恙虫病的报道^[5](图 3.1)。恙虫病在我国主要流行于热带、亚热带地区,云南、福建、

广东等省市是我国恙虫病的高发区，但近年来我国恙虫病的流行区域不断由南向北扩展并且南北两地季节性差异明显^[6]。

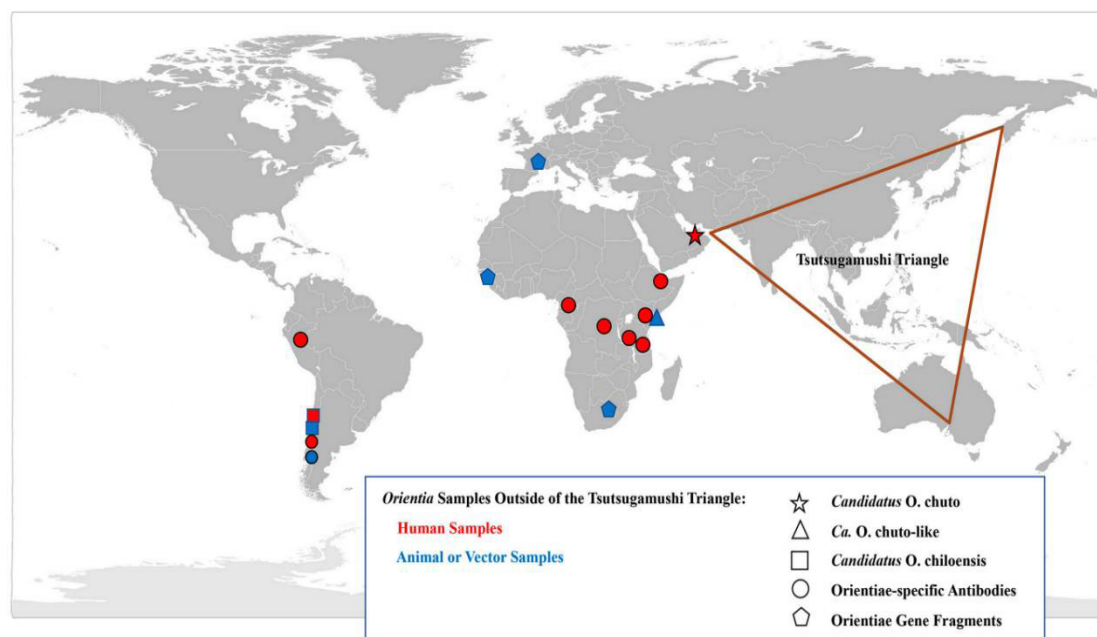


图 3.1 恙虫病世界范围内地理分布图^[7]

Fig 3.1 Geographic distribution of scrub typhus worldwide

为进一步探究恙虫病的发病趋势、流行状况、临床表现、治疗方法及基因型进化等问题，作者根据 2010—2020 年间中国各地区恙虫病研究相关文献，总结分析了恙虫病的时空分布、人群特征及临床现状。

2 恙虫病东方体的研究历史

许多国家都对恙虫病的流行情况有过报道，1951 年朝鲜战争期间相关病例的出现使人们认识到这种疾病；在二十世纪六十年代的越南战争期间，通过对美国士兵和后勤人员中发热患者进行免疫荧光法筛查发现了恙虫病^[8]。日本也曾于 1976 年至 1984 年爆发过此种疾病，那时也将其称为日本江河热^[9]。二十世纪八十年代开始，恙虫病的发病范围逐渐扩大、发病率上升，其流行区域从最开始的传统地区逐渐扩展到中东、非洲、南美洲等非传染病流行地区^[8]。从全球范围来看，约有 10 亿人位于该“恙虫病三角区”正面临着恙虫病的威胁^[10]。

我国是世界上最早记录恙虫病的国家，早在公元 313 年，晋代葛洪所著的《肘后备急方》中将其称为“沙虱毒”^[8]；1943 年魏曦等人证实恙虫病的存在；1948 年彭淑景等在血液中首次分离到了恙虫病东方体^[11]。1986 年以前，恙虫病多流行于我国南方省份，比如海南、广州、台湾、浙江、湖北等，

而自 90 年代以来本病在北方省份也常有流行,例如江苏、河南、天津等地区^[12]。我国曾于 1990 年起停止了对恙虫病的法定检测,但由于该疾病的传播范围日益扩大,感染人数不断增多,我国于 2006 年再次将其纳入了国家法定疾病监测系统中。近年随着经济的发展、气候的变化及人口的流动等一系列因素影响,各省份都相继出现了恙虫病的流行。

3 2010—2020 年恙虫病全国流行病学调查研究进展

3.1 时间分布特征

中国疾病预防控制中心统计了 2006—2018 年我国 12 个省份不同月份恙虫病病例分布情况,总结得出恙虫病传播过程具有明显的季节性,自 5 月开始迅速增加,6—8 月达到峰值,9—12 月下降。季节分布类型以北纬 31°为分界线,界线以南主要是夏季型,发病高峰在 5—11 月,与媒介恙螨的活跃时期相符。界线以北主要为秋冬型,发病高峰在 10—11 月^[5],流行时间与秋收相吻合。最新研究发现夏季型和秋冬型疫区可能在同一省份或同一地区中交错出现^[13]。

3.2 空间分布特征

除青海以外,中国大陆各省均有恙虫病报道。目前这种疾病已从中国南部,西南,东南和东部海岸扩散到中国大陆的中部,北部,东北和西北部^[14]。我国代表性地区的恙虫病发病情况如下,秋冬型疫区有山东、江苏、安徽、北京及天津交界区等;夏季型疫区有浙江、福建、江西、广西、云南、四川等。其中安徽省南部、江西省中部等有部分地区属于过渡地带^[15]。

我国多地区出现过恙虫病的小规模爆发流行,比如华东地区的江苏南京市、安徽阜阳市,山东蒙阴,天津宝坻等;华北地区山西侯马、翼城,天津、北京平谷等;东北地区的黑龙江、吉林、辽宁省以及华中地区的河南淮滨县等地区^[16]。恙虫病的高发区域可划分为三个子区域:北部地区为山东,安徽和江苏。西南地区为云南和四川。南部地区为海南,广西,广东,福建,湖南,江西和浙江^[17]。

3.3 宿主及媒介

恙虫病的传播需要依赖媒介生物和自然宿主,它的流行趋势与宿主分布、季节更替密切相关。恙螨是恙虫病东方体感染人类的唯一媒介,啮齿类动物是最重要的中间宿主。

目前,我国已经证实的媒介恙螨有地里纤恙螨(*Leptotrombidium deliense*)、小板纤恙螨(*L.scutellare*)、微红纤恙螨(*L.rubellum*)、高湖纤恙螨(*L.kaohuense*)、海岛纤恙螨(*L.insulare*)和吉首纤恙螨(*L.jishoum*)等。恙螨主要滋生在江河沿岸、山谷森林、荒废农田等植被茂盛的地方,且各个地区种类分布不同,如地里纤恙螨主要分布在长江以南,是夏季型疫区的主要媒介螨种;小板纤恙螨在我国分布广泛,是长江以北的大部分秋冬型疫区的主要媒介螨种^[13]。

鼠类中黄毛鼠(*Rattus losea*)、黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)和大仓鼠(*Tscherskia triton*)等是其宿主,其次是食虫类动物,如鼯形目等;某些禽类、猫、兔等也可感染^[9]。

宿主媒介会被新出现的自然和社会因素所影响,譬如近几年工业用地减少、植被恢复、禁止焚烧秸秆等措施为啮齿动物和螨类繁衍提供了有利环境,导致新自然疫源地的形成^[17]。

3.4 易感人群

各地区发病年龄以 41-70 岁人群为主,其中老年人更易感。各职业中农民发病数较多。统计结果显示长时间野外作业且没有防护措施,衣物未定期清洁等是恙虫病发病的危险因素^[18]。此外社会经济因素已被定为恙虫病的危险因素之一,如职业因素、受教育程度等^[19]。近年来 10 岁以下的儿童患病的风险升高,尤其在南部省份,但儿童又往往是易感人群中易被忽视的一部分^[20],故应该加强对农民的健康知识教育和对儿童预防教育以及制定对应措施。

4 恙虫病东方体的基因型及致病机理

56 kDa 特异性蛋白是恙虫病东方体的主要外膜蛋白,此蛋白的特异性抗原决定簇是恙虫病东方体的菌株分型基础,并决定了恙虫病东方体的免疫学特性基础。目前在全球范围内已确定的 40 多种恙虫病东方体中最常见的基因型是 Karp,其次是 Gilliam,还有其它类型如: Kato、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshi 等^[21]。

我国主要流行 Karp、Kato、Gilliam 等基因型，这些基因型在我国各个地区流行存在一定差异。长江以南流行 Gilliam、Karp 和 Kawasaki 等型，例如云南省多为 Karp、Gilliam 型。Kawasaki 是长江以北地区主要报道的基因型，Karp 和 Gilliam 等也曾出现，例如新疆维吾尔自治区的部分地域^[22]。

恙虫病东方体通过恙螨叮咬感染人，不同基因型恙虫病东方体交叉免疫反应较弱，所以患者往往会因为感染不同血清型恙虫病东方体而再次发病。恙虫病东方体感染的潜伏期为 5 天到 2 周，它能够感染多种类型的细胞，如巨噬细胞，单核细胞，树突状细胞等。树突状细胞和真皮层的巨噬细胞是原发感染过程中的靶细胞，它们会将病原体传播到淋巴结导致 T 淋巴细胞攻击受感染的宿主细胞从而引起发病^[23]。

5 恙虫病东方体的实验室检测方法

恙虫病东方体为专性胞内寄生菌，病原分离培养比较困难，血清学检测是诊断恙虫病的主要方法。感染恙虫病东方体后产生的 IgM 抗体在第一周内达到可检测水平，IgG 抗体在首次感染的两周后和再次感染的一周内出现；酶联免疫吸附法（ELISA）操作简单、敏感性高、特异性强但成本较高且易受温度和时间影响；外斐试验是一种较早且耗资较小的辅助诊断试验，但其敏感性和特异性较差。其他用于恙虫病的检测方法还有免疫酶染色法、补体结合试验等^[24]。

近年来，分子生物学技术在该病诊断中的广泛应用有效的提高了检测敏感度和特异度。在患者发热的最初几天中血清学检测可能会呈阴性，仅用此方法进行诊断有可能漏诊，此时可应用巢式聚合酶链式反应（Nested Polymerase Chain Reaction, Nested PCR）方法。此方法通过设计特异性 PCR 引物，从而对目的片段进行扩增，但若患者使用了适当的抗生素，PCR 常常出现假阴性结果，此时可将焦痂组织样本作为 PCR 的模板进行检测^[25]。重组酶聚合酶扩增方法（Recombinant polymerase amplification, RPA）在 37°C 条件下 20 分钟完成扩增，然后通过免疫层析条观察结果，对仪器设施要求低且灵敏性特异性高^[26]；环介导等温扩增技术（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）可用于恙虫病急性期的检测，扩增效率高且检测成本低^[27]；宏基因组学二代测序技术（Metagenomics next generation sequencing, mNGS）识别本病快速准确，可在患者缺乏特异性临床

表现时应用^[28]。分子技术的发展和應用提高了诊断率，因此近年来恙虫病患者增加的部分原因是由于使用了更灵敏可靠的检测方法^[29]，可见分子生物学方法将是未来恙虫病病原体检测的重要研究方向。

6 恙虫病患者临床表现

恙虫病东方体所释放的毒素可使多器官受累，例如皮肤、肺、心、肝、肾、血液和中枢神经系统等^[30]。所以恙虫病的临床表现复杂多样，做出正确判断需要结合临床特征与检验结果。一些特殊皮损（焦痂以及溃疡）常见于会阴、腹股沟等部位，可以作为临床诊疗的依据。但发热、淋巴结肿大等特征与许多疾病的临床表现相似，例如流行性感冒、疟疾、登革热等，而且经常出现这些疾病与恙虫病共同感染的情况^[31]。

恙虫病患者最佳就诊时间在发病 2 周内，需要患者多休息饮水，维持机体水电解质平衡。高热患者可以使用解热镇痛药；皮肤出现特异性皮损的患者可以外用 Dhl、红霉素等。因恙虫病东方体是胞内寄生的微生物，所以抗感染治疗应使用能通过宿主细胞膜的脂溶性抗生素，如四环素类、喹诺酮类、大环内酯类等。一些难以通过细胞膜的抗生素如氨基糖苷类、头孢菌素类、青霉素类等治疗效果不佳^[32]。

7 恙虫病问题的总结与展望

恙虫病是一种在世界范围内流行且范围不断扩大的自然疫源性疾痼。尽管此种疾病死亡率相对较低，但它给社会公共卫生带来沉重负担。

研究显示自然环境因素例如降雨量、气候、植被覆盖度等因影响宿主和媒介生物的活动继而影响恙虫病的流行趋势和范围^[9]。与登革热、肾综合征出血热等这一类重要虫媒传染病相比较，恙虫病影响因素研究大多停留在环境方面，而关于恙虫病未来流行趋势预测以及其与社会经济发展间的联系研究还存在欠缺。近年来我国恙虫病发病病例数与范围都有所增加但原因还未阐明。因此结合空间统计学方法和地理信息技术，对恙虫病流行、影响因素、地域分布等进行研究十分必要，可为我国恙虫病的预防控制提供科学的依据和指导。

综述参考文献

- [1] 方益荣, 叶冬青, 朱保平. 恙虫病流行病学研究进展 [J]. 中国农村卫生事业管理, 2013, (4): 5.
- [2] 林洋城, 孙家敏, 钟华胜. 恙虫病 67 例临床特征分析及研究 [J]. 中外医学研究, 2020, 18(31): 3.
- [3] TAYLOR A J, PARIS D H, NEWTON P N. A Systematic Review of Mortality from Untreated Scrub Typhus (*Orientia tsutsugamushi*) [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(8): e0003971.
- [4] 吴秋美. 早期诊断及治疗恙虫病的临床价值 [J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(26): 3.
- [5] ABDAD M Y, ABOU ABDALLAH R, FOURNIER P E, et al. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp [J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(8).
- [6] 陶志勇, 吕樵岚, 刘韦萍, 等. 恙虫病东方体目视 LAMP 现场化检测方法的建立 [J]. 热带病与寄生虫学, 2021, 19(1): 4.
- [7] RICHARDS A L, JIANG J. Scrub Typhus: Historic Perspective and Current Status of the Worldwide Presence of *Orientia* Species [J]. Trop Med Infect Dis, 2020, 5(2).
- [8] 李贵昌, 刘起勇. 恙虫病的流行现状 [J]. 疾病监测, 2018, 33(2): 10.
- [9] 吴义城, 李青华, 张文义, 等. 恙虫病流行特征及危险因素研究进展 [J]. 公共卫生与预防医学, 2015, 26(2): 5.
- [10] LUO L, GUO Z, LEI Z, et al. Epidemiology of *tsutsugamushi* disease and its relationship with meteorological factors in Xiamen city, China [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2020, 14(10): e0008772.
- [11] 吴光华. 我国恙虫病流行病学研究现状与展望 [J]. 中华传染病杂志, 2000, 18(2): 3.
- [12] 吴家兵, 胡岱霖, 何凡, 等. 2008 年安徽省阜阳市首起恙虫病暴发疫情的流行病学调查 [J]. 中华疾病控制杂志, 2009, 13(6): 3.

- [13] 李文、李贵昌、刘小波等. 恙虫病流行特征及影响因素研究进展 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2020, 31(6): 6.
- [14] YUE Y, REN D, LIU X, et al. Spatio-temporal patterns of scrub typhus in China, 2006-2017 [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2019, 13(12): e0007916.
- [15] 李贵昌, 王玉姣, 岳玉娟, 等. 我国恙虫病夏季型和秋季型疫区划分研究 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, (3): 4.
- [16] 姜志宽, 吴光华, 王长军, 等. 我国秋冬型恙虫病流行病学研究概况 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2014, (3): 5.
- [17] 陈辉, 张丽杰, 唐雪峰, 等. 四川省 2008—2014 年恙虫病发病流行病学特征分析 [J]. 中国热带医学, 2015, (9): 3.
- [18] ELLIOTT I, PEARSON I, DAHAL P, et al. Scrub typhus ecology: a systematic review of *Orientia* in vectors and hosts [J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 513.
- [19] 卫宪钰, 欧琳琳, 张文义, 等. 中国大陆恙虫病流行特征、危险因素及预测研究进展 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2022, 29(01): 60-66.
- [20] YAO H, WANG Y, MI X, et al. The scrub typhus in China: spatiotemporal expansion and risk prediction underpinned by complex factors [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 909-919.
- [21] 姚立农, 陆群英, 阮卫, 等. 五例恙虫病东方体感染基因型及其基因变异 [J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2020, 14(2): 7.
- [22] 党荣理, 任立松, 高金拽, 等. 新疆博乐地区大沙土鼠感染恙虫病东方体基因分型与序列分析 [J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(4): 3.
- [23] BANERJEE A, KulkARNI S. *Orientia tsutsugamushi*: The dangerous yet neglected foe from the East [J]. Int J Med Microbiol, 2021, 311(1): 151467.
- [24] 冯星梅, 贾向敏, 阮妍妍, 等. 恙虫病实验室诊断方法研究进展 [J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(12): 4.
- [25] KANNAN K, JOHN R, KUNDU D, et al. Performance of molecular and serologic tests for the diagnosis of scrub typhus [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(11): e0008747.
- [26] QI Y, YIN Q, SHAO Y, et al. Development of a rapid and visual nucleotide

- detection method for a Chinese epidemic strain of *Orientia tsutsugamushi* based on recombinase polymerase amplification assay and lateral flow test [J]. *Int J Infect Dis*, 2018, 70: 42-50.
- [27] KARTHIKEYAN P A, HOTI S L, KANUNGO R. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of scrub typhus in patients with acute febrile illness presenting to a Tertiary Care Center in Puducherry, India [J]. *J Lab Physicians*, 2019, 11(1): 82-86.
- [28] CHEN J, ZHENG X D, DAI Q H, et al. Diagnosis of severe scrub typhus infection by next-generation sequencing:a case report [J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1): 270.
- [29] FANG L Q, LIU K, LI X L, et al. Emerging tick-borne infections in China: an increasing public health threat [J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(12): 1467-1479.
- [30] 张立芹, 宋卫萍, 曲宏宇, 等. 北京市恙虫病发病时空扫描分析及感染危险因素研究 [J]. *职业与健康*, 2015, (23): 4.
- [31] 韩雪玲, 景莉, 张莹, 等. 我国恙虫病临床流行病学研究进展 [J]. *现代医学*, 2018, 46(3): 6.
- [32] 蒙雪兰. 恙虫病的病原学研究与治疗进展 [J]. *中国民康医学*, 2020, 32(10): 3.