

· 实验研究 ·

黑龙江省东部边境口岸莱姆病生物媒介调查及病原分型研究

何浩 郝琴 呼满霞 侯学霞 范东晖 耿震 张健 张少华 郑超 吴永生
王传松 崔文富 万康林 杨丽炜

【摘要】 目的 调查黑龙江省东部中俄边境口岸蜱的种类、分布、携带莱姆病螺旋体情况及病原基因型。方法 捕蜱采用布旗法；蜱带莱姆病螺旋体率采用直接荧光法检查；病原体分离培养采用 BSK II 培养基，对分离到的螺旋体用单克隆抗体（H₅₃₃₂、H₆₈₃₁、H₉₇₂₄）、SDS-PAGE 蛋白图谱分析、PCR-RFLP 分析以及基因测序等方法进行表型和基因分型研究。结果 黑龙江省东部 7 个中俄边境口岸蜱的种类为 1 科 3 属 4 种，即硬蜱科硬蜱属全沟硬蜱，革蜱属森林革蜱，血蜱属嗜群血蜱和日本血蜱。不同生态环境中蜱的分布不同，各口岸优势蜱种不同。全沟硬蜱带莱姆病螺旋体率较高，平均为 31.4%，森林革蜱和嗜群血蜱的带菌率较低，平均为 2.2% 和 3.8%，日本血蜱中未检出阳性者。首次在中俄边境口岸——东宁、同江采集的全沟硬蜱中分离到伯氏疏螺旋体并鉴定为 *B. garinii* 基因型。结论 黑龙江省东部边境口岸为莱姆病的自然疫源地。

【关键词】 莱姆病；蜱；伯氏疏螺旋体；基因分型

Investigation on the vectors of *Borrelia burgdorferi* and on the identification of the isolates along China-Russia border in Eastern Heilongjiang province, China HE Hao*, HAO Qin, HU Man-xia, HOU Xue-xia, FAN Dong-hui, GENG Zhen, ZHANG Jian, ZHANG Shao-hua, ZHENG Chao, WU Yong-sheng, WANG Chuan-song, CUI Wen-fu, WAN Kang-lin, YANG Li-wei. *Suifenhe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suifenhe 157300, China
Corresponding author: WANG Kan-lin, Email: wankanglin@icdc.cn; YANG Li-wei, Email: yanglw@hljq.gov.cn

【Abstract】 Objective To explore the fact that the east border of Heilongjiang province had been a Lyme disease natural focus, we investigated the species and distribution of ticks and isolated bacteria from ticks and identified genomic species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. This study provided evidence for prevention and control of Lyme disease. **Methods** Ticks were caught by flagging method and Direct immunofluorescence method was used to detect the rate of bacteria borne by the tick. BSK II culture medium was used to isolate the agent and Specific McAbs were used to identify the bacteria. SDS-PAGE protein profile and PCR-RFLP method were also used to identify the species of Spirochetes. **Results** Ticks, collected from China-Russia border of east Heilongjiang province were classified including *Ixodes persulcatus* Schulze, *Dermacentor sivarum* Olenner, *Haemaphysalis concinna* Kock, and *Haemaphysalis japonica* Kock. We found that the distribution of ticks was different under different circumstances and the predominant species were also different in different ports. The rate of bacteria borne by *Ixodes persulcatus* Schulze was 31.4%, by *Dermacentor sivarum* Olenner and *Haemaphysalis concinna* Kock were 2.2% and 3.8%, respectively. However, it was negative for *Haemaphysalis japonica* Kock. Spirochetes isolated from *Ixodes persulcatus* Schulze were collected from Dongning and Tongjiang while Genomic species of Spirochetes, isolated from ticks of the border belonged to *B. garinii*. **Conclusion** All the results showed that the east border of Heilongjiang province was the natural focus of Lyme disease.

【Key words】 Lyme disease; Tick; *Borrelia burgdorferi* sensu lato; Genotype

莱姆病是由伯氏疏螺旋体 (*Borrelia*

burgdorferi sensu lato) 引起的人兽共患病^[1]，主要经蜱叮咬人兽而传播。伯氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*) 能引起人畜多系统、多器官的损害，严重的可致残，甚至死亡，对人类健康及国民经济发展危害极大^[2,3]。近年来俄罗斯屡有莱姆病报道，黑龙江省中俄边境线长三千余公里，口岸进出口

基金项目：国家“十五”科技攻关项目(2001BA705B07)

作者单位：157300 黑龙江绥芬河出入境检验检疫局(何浩、呼满霞、范东晖、张健、张少华、郑超、吴永生、王传松、崔文富)；中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室(郝琴、侯学霞、耿震、万康林)；黑龙江出入境检验检疫局(杨丽炜)

通讯作者：万康林, Email: wankanglin@icdc.cn; 杨丽炜, Email: yanglw@hljq.gov.cn

人员复杂,查清黑龙江省中俄边境口岸莱姆病生物媒介及病原的相关信息对边境口岸防控莱姆病具有重要意义。

材料与方 法

1. 菌株:国际参考菌株 B31(美国),20047(法国),VS461(瑞士),国内代表性菌株 PD91(内蒙古),FP1(四川),GS1(贵州),CS4(湖南)由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。

2. 试剂:单克隆抗体 H₅₃₃₂、H₆₈₃₁、H₉₇₂₄ 和 BSK II 培养基由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。TaqDNA 聚合酶、RNase、Dra I 内切酶、Mse I 内切酶、蛋白酶 K、Marker、dNTP、琼脂糖、兔抗 B31 荧光抗体、FITC-兔抗鼠 IgG 购于华美生物公司。

3. 引物:5S~23S rRNA 基因间隔区扩增引物由赛百盛公司合成。序列如下:Primer 1:5'-GCG GCAGAGTAGGTTATT-3', Primer 2:3'-CTAGGC ATTCACCATAGACT-5'。

4. 实验方法:

(1) 蜱带菌率调查:对东宁、绥芬河、密山、虎林、饶河、抚远、同江地区的蜱进行整群抽样。采用布旗法收集蜱。根据《中国经济昆虫志》^[4]中相关内容鉴定蜱的种类。将各口岸每种蜱各取 15 只中肠涂片,用直接免疫荧光抗体试验分别检查蜱的带菌率。

(2) 莱姆病螺旋体的分离培养鉴定:对各口岸采集的全沟硬蜱分组,每组 5 只,用 BSK II 培养基培养,进行病原分离。将培养好的菌液适当稀释后滴在抗原片上,固定后,加单克隆抗体,37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 遍,晾干,再加 FITC-兔抗鼠 IgG, 37℃ 孵育 30 min, 用 PBS 洗 3 遍,晾干。用甘油封片,置于显微镜下观看。

(3) 菌体蛋白 SDS-PAGE:取收集的菌液 20 μl 加入等体积 2× 上样缓冲液,煮沸 5~10 min,冷却备用。5% 浓缩胶,15% 分离胶电泳,考马斯亮蓝染色。

(4) 5S~23S rRNA 基因间隔区扩增子 RFLP 分析:莱姆病螺旋体全细胞 DNA 的提取与纯化参照文献^[5],5S~23S rRNA 基因间隔区扩增引物进行 PCR 扩增,反应条件为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,此过程 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增子以 MseI 和 DraI 对 PCR 产物在 37℃ 水浴下进行 5~8 h 充分酶切,酶切产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,硝酸银染色。

(5) rrf~rrl 间隔区扩增子序列分析:分别以 Primer 1 和 Primer 2 为引物,直接测定 5S~23S rRNA 基因间隔区扩增子序列,测序工作由上海博亚公司完成。结果与 GenBank 中所有莱姆病螺旋体基因型序列比较,以明确其同源性。

结 果

1. 蜱的鉴定结果:本次对黑龙江省 7 个中俄边境口岸的 4 种生境——口岸树林、灌木丛、山林、苔草地进行了 180 人工小时蜱的调查,捕蜱 6554 只,均属硬蜱科。经检索并经专家确认^[4],鉴定为 3 属 4 种。分别是:硬蜱属(*Ixodes Iatreille*)的全沟硬蜱(*Ixodes persulcatus* Schulze)、革蜱属(*Dermacentor Olenner*)的森林革蜱(*Dermacentor sivarum* Olenner)、血蜱属(*Heamaphysalis Kock*)的嗜群血蜱(*Heamaphysalis concinna* Kock)和日本血蜱(*Heamaphysalis japonica* Kock)。

2. 不同生态环境中蜱的种类及构成:口岸树林中有 4 种蜱,其中嗜群血蜱、全沟硬蜱为优势种;灌木丛中有 4 种蜱,以森林革蜱为优势种;山林中有 4 种蜱,以全沟硬蜱为优势种,其次为森林革蜱和嗜群血蜱;苔草地中有 4 种蜱,以森林革蜱为优势种,其次为嗜群血蜱,见表 1。

表 1 黑龙江中俄边境地区不同生态环境中蜱的种类检测阳性率(%)

地点	检测数	全沟硬蜱	森林革蜱	嗜群血蜱	日本血蜱
灌木丛	1202	5.2	85.0	8.4	1.4
山林	4469	40.8	24.6	31.3	3.0
苔草地	520	7.0	56.2	32.7	4.1
口岸树林	363	35.8	6.9	48.5	8.8
合计	6554	31.5	37.2	28.2	3.1

3. 各口岸蜱的种类及数量:不同口岸蜱的种类及数量不尽相同,其中东宁、虎林以森林革蜱为优势种,其次为嗜群血蜱;绥芬河以全沟硬蜱为优势种,其次为森林革蜱;饶河以全沟硬蜱为优势种,其次为嗜群血蜱;密山、抚远、同江以嗜群血蜱为优势种,其次为全沟硬蜱。同江口岸只捕到 3 种蜱,没有捕到森林革蜱,其他 6 个口岸均捕到 4 种蜱。

4. 各口岸蜱的带菌率:各口岸全沟硬蜱的平均带菌率为 31.4%,森林革蜱和嗜群血蜱的平均带菌率为 2.2% 和 3.8%,日本血蜱中没有检出带菌者,结果见表 2。全沟硬蜱的带菌率高于森林硬蜱的带菌率($\chi^2 = 26.1213, P < 0.0001$)和嗜群血蜱的带菌率($\chi^2 = 25.7210, P < 0.0001$)。

表2 黑龙江省各口岸蜚的带菌率调查结果(%)

地点	全沟硬蜚	森林革蜚	嗜群血蜚	日本血蜚
东宁	40.0	6.7	6.7	0.0
绥芬河	33.3	0.0	0.0	0.0
密山	26.7	0.0	6.7	0.0
虎林	20.0	6.7	6.7	0.0
饶河	33.3	0.0	0.0	0.0
抚远	13.3	0.0	0.0	0.0
同江	53.3	-	6.7	0.0

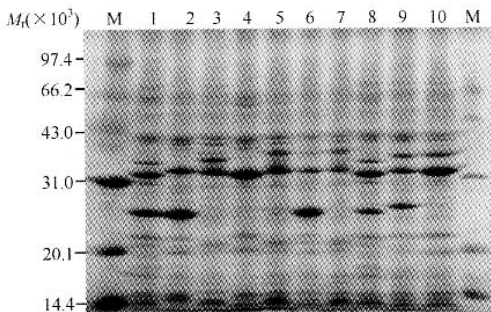
注:“-”表示该采集地未采到此种标本;各口岸检测数均为 15 只

5. 全沟硬蜚中 *B. burgdorferi* 分离及鉴定结果: 从东宁口岸和同江口岸共分离到 3 株 *B. burgdorferi*, 其中, 东宁口岸分离到 1 株; 同江口岸分离到 2 株(表 3)。所分离的菌株用单克隆抗体 H₅₃₃₂、H₆₈₃₁、H₉₇₂₄ 经间接免疫荧光法鉴定均为莱姆病螺旋体。

表3 黑龙江省各口岸伯氏疏螺旋体的分离结果

地点	全沟硬蜚检查只数	培养组数	分离株数
东宁	150	30	1
绥芬河	165	35	0
密山	50	10	0
虎林	25	5	0
饶河	150	30	0
抚远	150	30	0
同江	150	30	2
合计	850	170	3

6. SDS-PAGE 结果: 选用国际参考菌株和本次分离株 HS1(东宁), HS2(同江), HS3(同江)做蛋白 SDS-PAGE(图 1)。图中可见 HS1、HS2、HS3 具有 OspA、OspB、鞭毛蛋白等 *B. burgdorferi* 所具备的重要蛋白条带, 但不同菌株 HS1、HS2、HS3 之间, 蛋白条带又存在差异, 其中 HS1(东宁株)与 HS3(同江株)蛋白表达相近, 而 HS2(同江株)则明显缺失 OspC 蛋白。

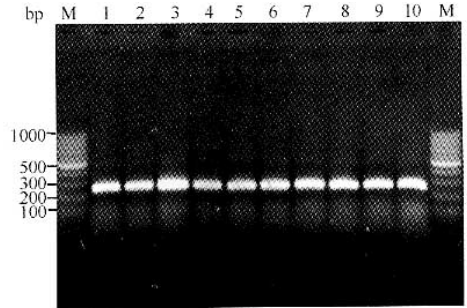


M: 低分子量标准蛋白质; 1~10: B31、20047、VS461、PD91、FP1、HS3、GS1、CS4、HS1、HS2

图1 分离株的 SDS-PAGE 蛋白图谱

7. 5S~23S 间隔区基因扩增结果: 对 3 株国际参考株, 4 株国内代表性菌株及 3 株新分离株进行 PCR 扩增, 可见 240 bp 处均产生 1 条亮带(图 2)。

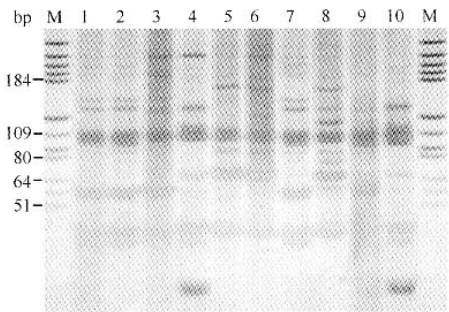
对 3 株分离菌的 PCR 产物进行测序, 结果表明, HS1、HS2 和 HS3 具有相同的 5S~23S 间隔区核酸序列, 并且与 *B. garinii* 的 5S~23S 间隔区核酸序列同源性为 100%。



M: 100 bp DNA Ladder; 1~10: B31、20047、VS461、PD91、FP1、GS1、CS4、HS1、HS2、HS3

图2 伯氏疏螺旋体 *rrf*~*rri* 基因间隔区 PCR 扩增结果

8. 限制性内切酶酶切图谱: 10 株 *B. burgdorferi* 的 *Mse* I 酶切片段长度及 RFLP 图谱类型(图 3); *Dra* I 酶切片段长度及 RFLP 图谱类型(图 4)。新分离菌株 HS1、HS2、HS3 的 *Mse* I、*Dra* I 酶切图谱与国内参考株 PD91 一致, 为 C、C' 带型, *Mse* I 酶切片段长度为 96、54、41、38 bp, *Dra* I 酶切片段长度为 128、52、41 bp, 结果表明, HS1、HS2、HS3 基因型均为 *B. garinii*。



M: Pbr322DNA/Hae III Marker; 1~10: HS3、HS2、HS1、CS4、GS1、FP1、PD91、VS461、20047、B31

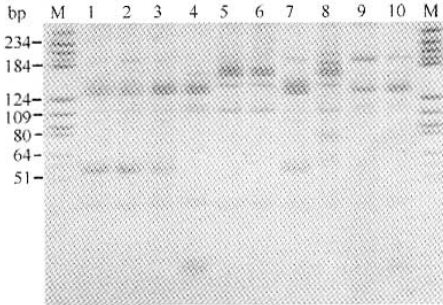
图3 5S~23S rRNA 间隔区限制性内切酶 *Mse* I 酶切图谱

讨论

1. 通过对黑龙江省中俄边境 7 个口岸莱姆病媒介生物的调查显示, 蜚种类有 1 科 3 属 4 种, 与古北界代表蜚种相符合^[6]。

调查显示, 中俄边境 7 个口岸的蜚以全沟硬蜚和森林革蜚为优势种群, 不同生态环境中蜚的种群构成存在差异, 这是因为蜚的活动与栖息环境中植

被、温度、湿度、光周期等因素密切相关,本次调查的 7 个中俄边境口岸虽然都在黑龙江省东部,但生态环境和气候特点却不尽相同,如东宁积温较高,而密山、虎林、同江湿度较高,因此,各口岸蜱的优势种类和分布有所不同。



M: pBR322DNA/*Hae* III Marker; 1~10: HS3、HS2、HS1、CS4、GS1、FP1、PD91、VS461、20047、B31

图4 5S~23S rRNA 间隔区限制性内切酶 *Dra* I 酶切图谱

2. 蜱的带菌率调查结果显示,各口岸全沟硬蜱的带菌率均较高,达到31.4%,森林革蜱和嗜群血蜱的带菌率较低,平均为2.2%和3.8%,日本血蜱中没有检出带菌者,这与样本数量有关,另一方面也说明,在中俄边境地区,全沟硬蜱是莱姆病的主要传播媒介。

3. 本次试验在东宁和同江两地的全沟硬蜱中分离到 *B. burgdorferi*,证明黑龙江省中俄边境口岸存在莱姆病疫源地。我国已从全沟硬蜱、粒形硬蜱、锐附硬蜱、嗜群血蜱、日本血蜱、长角血蜱、二棘血蜱、台湾角血蜱、微小牛蜱、草原革蜱和森林革蜱 11 种蜱分离到伯氏疏螺旋体。但有研究表明,长角血蜱、嗜群血蜱、森林革蜱和草原革蜱等不具备经期传播 *B. burgdorferi* 的能力^[7],虽然有自然感染,但作为莱姆病媒介的可能性不大^[8]。故本次试验将重点放在全沟硬蜱,没有分离嗜群血蜱等其他几种蜱,因此不能排除其他蜱携带其他基因型 *B. burgdorferi* 的可能。

4. 本研究采用了国内外常用的5S~23S 基因间隔区 PCR-RFLP 分析方法。对东宁、同江分离到的 HS1(东宁株)、HS2、HS3(同江株)进行研究,并与国际参考株比较。HS1、HS2、HS3 的 *Mse* I 酶切带型与国际标准株 *B. garinii* 的 C 带型高度一致,其 *Dra* I 酶切带型与国际标准株 *B. garinii* 的 C' 带型高度一致。新分离菌株5S~23S rRNA 基因间隔区的 PCR 产物测序结果与国际标准株 *B. garinii* 的同源性为 100%。这说明,中俄边境口岸分离到的

B. burgdorferi HS1、HS2、HS3 同为第二基因型 *B. garinii*。

5. 蛋白图谱分析结果表明 HS1、HS2、HS3 存在 *B. burgdorferi* 的主要蛋白,但其蛋白图谱间有差异,与国际标准株之间也存在一定差异,这说明 *B. burgdorferi* 的蛋白图谱虽然也具有高度的遗传性,但由于不同地域、生物来源的菌株其蛋白图谱同样具有多样性,而且某些蛋白质和质粒在传代过程中容易丢失^[9,10],因此在分类研究中,蛋白图谱具有局限性,只能作为辅助方法。

6. 史翠霞等^[11]研究表明,我国北方以第二基因型(*B. garinii*)和第三基因型(*B. afzelii*)的分布为主。本次调查结果证明黑龙江省边境地区 *B. burgdorferi* 基因型主要为第二基因型 *B. garinii*,与其研究结果相一致。*B. garinii* 为致病基因型,可引起人和动物的莱姆病,所以应在该地区开展莱姆病的预防控制工作。

(绥芬河出入境检验检疫局、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所和黑龙江出入境检验检疫局对本文有同等贡献。在本课题研究过程中得到东宁出入境检验检疫局、密山出入境检验检疫局、虎林出入境检验检疫局、饶河出入境检验检疫局、抚远出入境检验检疫局、同江出入境检验检疫局的大力支持和协助,在此衷心感谢)

参 考 文 献

[1] Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, et al. Lyme disease, A Tick borne Spirochetosis. Science, 1982, 216: 1317-1319.
 [2] 崔步云. 莱姆病研究进展. 中国药物与临床, 2004, 4: 611-613.
 [3] 万康林, 张哲夫. 莱姆病的流行病学. 中华流行病学杂志, 1997, 18(3): 187-188.
 [4] 邓国藩, 姜在阶. 中国经济昆虫志. 第 39 册. 蜱螨亚纲. 硬蜱科. 北京: 科学出版社, 1991.
 [5] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 52-54.
 [6] 中国科学院中国自然地理编辑委员会. 中国自然地理动物地理, 1979: 71-81.
 [7] 孙毅, 许荣满, 郭天宇, 等. 森林革蜱、草原革蜱感染和经期传播莱姆病螺旋体的实验研究. 昆虫学报, 2002, 45: 578-582.
 [8] Sun Y, Xu RM, Guo TY, et al. Incapability of *Haemaphysalis longicornis* and *Dermacentor nuttalli* to acquire and trans-stadial transmit the Lyme spirochetes *Borrelia garinii*. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 2003, 10: 174-180.
 [9] Adam T, Gassmann GS, Rasiyah C, et al. Phenotypic and Genotypic Analysis of *Borrelia burgdorferi* Isolates from Various Sources. Infect Immun, 1991, 59(8): 2579-2585.
 [10] Karlsson M, Hovind-Hougen K, Svenungsson B, et al. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. Clin Microbiol, 1990, 28: 473-479.
 [11] 史翠霞, 万康林, 马凤琴, 等. 中国莱姆病螺旋体的核糖体基因分型研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21: 298-301.

(收稿日期: 2006-07-26)

(本文编辑: 王多春)