

· 现场调查 ·

中国六省蜱中莱姆病螺旋体分离与鉴定

耿震 侯学霞 万康林 郝琴

【摘要】 目的 了解中国六省蜱中莱姆病螺旋体携带情况。方法 在六省各选取 2 个采样点捕蜱,采用病原分离培养和巢式 PCR 方法对蜱进行莱姆病螺旋体检测,通过基因测序确定分型。结果 六省共采集到 2200 余只蜱,约 1000 只蜱用于病原分离培养,从吉林省长白县全沟硬蜱标本中分离到 13 株螺旋体,从贵州省道真粒形硬蜱标本中分离到 9 株螺旋体。1255 只蜱用于 PCR 检测,从六省的蜱标本中检测到莱姆病螺旋体特异片段,其中吉林省(长白县 27.08%、通化县 20.41%)、青海省(互助县 25.06%、黄南县 21.11%)和贵州省(道真县 25.63%)蜱中莱姆病螺旋体阳性率较高,山西省(垣曲县 4.72%、交城县 3.64%)蜱中莱姆病螺旋体阳性率较低。通过序列同源性分析确定吉林、青海、甘肃和山西省蜱中莱姆病螺旋体基因型均为 *Borrelia garinii*。贵州、湖南省的基因型均为 *Borrelia valaisiana*。结论 六省蜱中均带有莱姆病螺旋体,且带菌率有差异;山西省蜱中存在 *Borrelia garinii* 型莱姆病螺旋体,湖南省蜱中存在 *Borrelia valaisiana* 型莱姆病螺旋体。

【关键词】 莱姆病;螺旋体;蜱

Isolation and identification of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from ticks in six provinces in China
 GENG Zhen, HOU Xue-xia, WAN Kang-lin, HAO Qin. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
 Corresponding author: HAO Qin, Email: haoqin@icdc.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Support Projects for the "Eleventh Five-Year Plan" of China (No. 2008ZX10004-010).

【Abstract】 Objective To understand the carrying status of *Borrelia burgdorferi* in ticks from the mountain areas from six representative provinces, including Jilin, Shanxi, Gansu, Qinghai, Guizhou and Hunan in China. **Methods** Flagging and trapping methods were used to collect ticks in forest area and culture medium was used to isolate the pathogen. Nested-PCR was used to detect the germ-carrying rate of ticks. **Results** More than 2200 ticks from six representative provinces were collected and 1000 ticks were used to isolate the pathogen. 13 Lyme disease spirochetes from ixodes persulcatus in Changbai, Jilin province and 9 Lyme disease spirochetes from ixodes granulatus in Daozhen, Guizhou province were identified. There were 1255 ticks used for PCR testing. Specific fragments of the *Borrelia burgdorferi* in ticks were found from the six representative provinces in China. The carrier rate was higher in Jilin (Changbai 27.08%, Tonghua 20.41%), Qinghai (Huzhu 25.06%, Huangnan 21.11%) and Guizhou (Daozhen 25.63%), than in Shanxi (Yuanqu 4.72%, Jiaocheng 3.64%). Result from the sequence analysis showed that the genotype belong to *Borrelia garinii* in Jilin, Qinghai, Gansu, Shanxi provinces but *Borrelia valaisiana* in Guizhou and Hunan provinces. **Conclusion** Our data showed that there existed Lyme disease spirochetes in all the six representative provinces in China, but the carrying rates of ticks were different. *Borrelia garinii* was found in Shanxi province, and *Borrelia valaisiana* in Hunan province.

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

莱姆病是一种由伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 引起的人兽共患病^[1,2]。为了解中国莱姆病螺旋体主要生物媒介蜱的带菌情况,本研究于

2006—2008 年在吉林、山西、甘肃、青海、贵州、湖南 6 省中各选取 2 个代表性调查点采集蜱,检测蜱中莱姆病螺旋体的携带情况。

材料与方法

1. 调查现场:选取近年来莱姆病发病率较高的地区或某些尚未深入开展工作的地区,包括吉林省长白县、通化县,山西省垣曲县、交城县,甘肃省迭部

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.12.005

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2008ZX10004-010)

作者单位:102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

耿震、侯学霞同为第一作者

通信作者:郝琴, Email: haoqin@icdc.cn

县、民乐县,青海省互助县、黄南县,贵州省道真县、务川县,湖南省浏阳市、石门县共 6 个采集点进行蜱的采集。

2. 蜱的收集:在野外采用人工小时布旗法捕蜱^[3],将采集到的蜱装到透气、有一定湿度的瓶中,带回实验室进行鉴定。

3. 莱姆病螺旋体分离培养:将蜱用无菌的蒸馏水洗涤(去除蜱表面的灰尘和杂物),滤干水后放入 75%乙醇中浸泡消毒 30 min,然后用生理盐水及蒸馏水各冲洗数遍,置于消毒滤纸上待干燥,每组 5~10 只,放入组织研磨器中,加 0.5 ml Bsk II 培养基,研磨,吸取 0.1 ml 加入到含有 5 ml Bsk II 培养基的小试管中培养^[4]。33 ℃ 培养,培养后每周检查 1~2 次,连续 3 个月培养为阴性则弃去。

4. 蜱标本 DNA 模板制备^[5,6]:将采集的蜱标本用 75%乙醇浸泡消毒 15 min;然后用 0.01 mol/L、pH 值 7.4 的 PBS 洗 3 次,用滤纸吸干;将单只蜱放入 1.5 ml 的离心管中,加入 TE 50 μl;研碎后 100 ℃ 煮 10 min(取出后放入冰箱冷却);3000 r/min 离心 3 min;取上清移入新 Eppendorf 中;置 -20 ℃ 储存备用。

5. 巢式 PCR 扩增:根据参考文献[7]以伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 间隔区两侧基因高度保守区合成内外 2 对引物进行 PCR 扩增。第一轮上游引物:5'-CGA CCT TCT TCG CCT TAA AGC-3',下游引物:5'-TAA GCT GAC TAA TAC TAA TTA CCC-3';第二轮上游引物:5'-TCC TAG GCA TTC ACC ATA-3',下游引物:5'-GAG TTC GCG GGA GA-3'。第一轮反应体系 50 μl,其中 PCR 预混液 25 μl,上下引物各 1 μl,DNA 模板 3 μl,灭菌水 20 μl。第二轮反应体系 50 μl,其中 PCR 预混液 25 μl,上下引物各 1 μl,DNA 模板 1 μl,灭菌水 22 μl。PCR 反应条件设置为预变性 94 ℃ 2 min,变性 94 ℃ 45 s,退火 55 ℃ 45 s,延伸 72 ℃ 45 s,35 个循环,最后延伸 72 ℃ 5 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果,产物大小为 250 bp。将阳性 PCR 产物送上海生物工程有限公司测序,并利用 MegAlign 软件进行聚类分析。

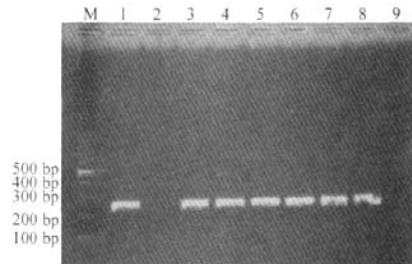
结 果

1. 标本收集:中国 6 省山林地区共收集到蜱 2200 余只,吉林、山西、甘肃、青海省以全沟硬蜱为优势蜱种,贵州省以粒形硬蜱为优势蜱种,湖南省以二棘血蜱为优势蜱种。1000 只用分离培养的方法

检测莱姆病螺旋体,1255 只用 PCR 方法检测莱姆病螺旋体。

2. 病原分离培养:吉林省长白全沟硬蜱标本中莱姆病螺旋体阳性率为 10.74%(13/121),贵州省道真粒形硬蜱标本中莱姆病螺旋体阳性率为 6.47%(9/139),经莱姆病螺旋体 OspA 及 41 kDa 鞭毛蛋白单克隆抗体鉴定为莱姆病螺旋体。

3. 巢式 PCR 检测:6 省蜱中莱姆病螺旋体检测均得到 250 bp 大小的片段,显示 6 省蜱中均存在莱姆病螺旋体(图 1、表 1)。



注:M:100 bp DNA Ladder; 1:阳性对照; 2:阴性对照; 3~8 分别为吉林、山西、甘肃、青海、贵州、湖南省蜱标本; 9:空白对照

图 1 中国 6 省蜱标本中莱姆病螺旋体的阳性

PCR 产物电泳结果

表 1 中国 6 省不同地区蜱标本莱姆病螺旋体 PCR 检测结果

调查点	检查 蜱只数	阳性		调查点	检查 蜱只数	阳性	
		只数	率(%)			只数	率(%)
吉林长白	144	39	27.08	青海黄南	90	19	21.11
吉林通化	98	20	20.41	贵州道真	160	41	25.63
山西垣曲	106	5	4.72	贵州务川	126	18	14.29
山西交城	110	4	3.64	湖南浏阳	67	8	11.90
甘肃肃部	85	10	11.76	湖南石门	80	11	13.75
甘肃民乐	72	8	11.11	合计	1255	211	16.81
青海互助	117	28	25.06				

4. 同源性分析:随机从各省蜱中莱姆病螺旋体 PCR 阳性产物中挑选 1 份进行测序,序列用 MegAlign 软件进行聚类分析。结果显示,贵州省蜱中莱姆病螺旋体序列 GZtick1.seq 和湖南省蜱中莱姆病螺旋体序列 HNTick1.seq 与 *Borrelia valaisiana* 基因型标准菌株 UK 的序列较为接近;而吉林、青海、甘肃和山西省的蜱中莱姆病螺旋体序列与 *Borrelia garinii* 基因型标准菌株 20047 的序列较为接近(图 2)。本研究第一次在湖南省蜱中发现 *Borrelia valaisiana* 型莱姆病螺旋体、在山西省蜱中发现 *Borrelia garinii* 型莱姆病螺旋体。

讨 论

通过巢式 PCR 方法从 6 省不同地区检测到莱姆

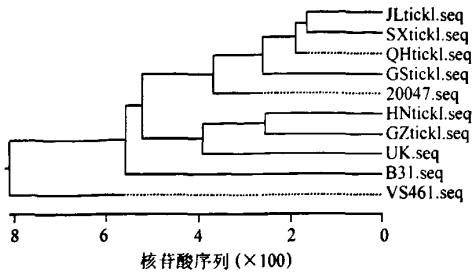


图2 中国6省莱姆病螺旋体阳性PCR产物序列的进化树分析

病螺旋体的特异片段,吉林、青海和贵州省山林地区蜱的带菌率最高,不同地区地理环境及气候条件差异会影响蜱的种类^[8,9],而莱姆病带菌率主要受蜱种差异的影响,不同蜱种携带的莱姆病螺旋体不同^[10]。经比对显示,吉林、青海、甘肃和山西省存在 *Borrelia garinii* 基因型,贵州和湖南省存在 *Borrelia valaisiana* 基因型。吉林、贵州、甘肃、湖南省的莱姆病螺旋体基因型同已报道的莱姆病螺旋体基因型相符^[11,12]。山西和湖南省是第一次对蜱中莱姆病螺旋体进行检测,发现山西省存在 *Borrelia garinii* 基因型螺旋体,湖南省存在 *Borrelia valaisiana* 基因型螺旋体,本研究可以为当地莱姆病疫源地的发现和提供证据,但由于本研究是从6省各选取2个调查点采样,尚不能代表全省的情况。

参 考 文 献

[1] Bunikis J, Tsao J, Luke CJ, et al. *Borrelia burgdorferi* infection in a natural population of *Peromyscus leucopus* mice: a longitudinal study in an area where Lyme borreliosis is highly endemic. *J Infect Dis*, 2004, 189(8): 1515-1523.

[2] Campbell GL, Paul WS, Schriefer ME, et al. Epidemiologic and diagnostic studies of patients with suspected early Lyme disease, Missouri, 1990-1993. *J Infect Dis*, 1995, 172(2): 470-480.

[3] Baranton G, Marti Ras N, Postic D. Molecular epidemiology of the aetiological agents of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr*, 1998, 110(24): 850-855.

[4] An JY, Zhou GP, Yao GL, et al. Morphological observation of *haemaphysalis concicornis* and *Borrelia burgdorferi* in the Tick's body in Xishan mountain in Beijing. *Chin J Vector Biol Control*, 2002, 13(4): 282-285. (in Chinese)
安京媛, 周国萍, 姚桂玲, 等. 北京西山地长角血蜱及体内伯氏疏螺旋体实验观察. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2002, 13(4): 282-285.

[5] Smith RP, Schoen RT, Rahn Dw, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. *Ann Intern Med*, 2002, 136(6): 421-428.

[6] Gao Y, He J, Wang JB, et al. Genotyping of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolated from Northeastern forest areas of China. *Chin J Microbiol Immunol*, 2006, 26(5): 404-408. (in Chinese)
高燕, 何静, 王剑波, 等. 我国东北林区蜱中伯氏疏螺旋体的分离及分型鉴定. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26(5): 404-408.

[7] Huang HN, Ding Z, He J, et al. Investigation on *Borrelia burgdorferi* infection in ticks and animal from a forest area of Jilin province. *Chin J Zoonoses*, 2006, 22(8): 785-788. (in Chinese)
黄海楠, 丁壮, 何静, 等. 吉林林区动物莱姆病螺旋体感染的调查研究. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(8): 785-788.

[8] Pichon B, Rogers M, Egan D, et al. Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2005, 5(2): 172-180.

[9] Donovan BJ, Weber DJ, Rublein JC, et al. Treatment of tick-borne disease. *Ann Pharmacother*, 2002, 36(10): 1590-1597.

[10] Maraspin V, Cimperman J, Lotric-Furlan S, et al. Solitary borreliolymphocytoma in adult patients. *Wien Klin Wochenschr*, 2002, 114(13-14): 515-523.

[11] Glöckner G, Lehmann R, Romualdi A, et al. Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(20): 6038-6046.

[12] Hao Q, Liu Y, Geng Z, et al. Preliminary investigation on reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* in the area of Tianjin. *Chin J Nat Med*, 2007, 9(6): 461-463. (in Chinese)
郝琴, 刘义, 耿震, 等. 我国天津地区莱姆病螺旋体宿主动物的初步调查. *中国自然医学杂志*, 2007, 9(6): 461-463.

(收稿日期: 2010-03-24)

(本文编辑: 王玉立)