

## · 实验研究 ·

用聚合酶链方法对北京林区莱姆病疫源地及  
莱姆病病原体基因型的探索性研究

李建民 曹务春 张习坦 吴晓明 张泮河 赵秋敏 杨红 董振英 蔡胜利

【摘要】目的 进一步明确北京林区是否存在莱姆病的自然疫源地及其分布。方法 基于莱姆病螺旋体外膜蛋白 A 基因建立半巢式聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法, 对从北京 6 个林区采集的蜱和鼠进行检测和基因分型, 选择阳性标本进行克隆和序列测定, 与已知序列进行同源性比较。间接免疫荧光法检测抗莱姆病螺旋体 IgG 抗体, 从长角血蜱中分离莱姆病螺旋体。结果 从门头沟区东灵山采集的标本中检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段, 3 只游离全沟硬蜱, 1 只检测阳性, 57 只寄生全沟硬蜱若蜱中 1 只检测阳性; 119 只野鼠中 9 只检测阳性, 其中 8 只 *B. garinii* 阳性, 1 只 *B. afzelii* 阳性。50 份野鼠血清有 5 份莱姆病螺旋体 IgG 抗体阳性, 采集的 160 只长角血蜱 (20 只/组) 未分离到莱姆病螺旋体菌株。结论 北京门头沟区东灵山可能存在莱姆病的自然疫源地, 包括两个基因型, 全沟硬蜱可能是莱姆病的传播媒介, 野鼠可能是贮存宿主。

【关键词】莱姆病; 蜱类; 鼠类; 流行病学; 分子

Exploratory study on natural focus and its causative agent of genotype of Lyme disease by polymerase chain reaction in the forest areas of Beijing LI Jianmin\*, CAO Wuchun, ZHANG Xitan, WU Xiaoming, ZHANG Panhe, ZHAO Qiumin, YANG Hong, DONG Zhenying, CAI Shengli.  
\*Institute of Microbiology and Epidemiology of Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

【Abstract】Objective To learn the existance of natural focus of Lyme disease and its distribution. Methods A semi-nested polymerase chain reaction (PCR) method was developed for detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* on basis of outer surface protein A (OspA) gene. Ticks and mice collected from 6 forest areas in Beijing were detected with above methods. The positive PCR products were cloned and sequenced. The sequences were compared with published sequences for homology. IFA as used to detect IgG antibody on *Borrelia burgdorferi*. Lyme disease spirochete were isolated from *H. longicornis* were also attempted. Results *B. Burgdorferi sensu lato* were detected from 939 ticks and 250 mice specimens collected from above 6 study sites using primer pairs OA<sub>1</sub>/OA<sub>4</sub> and SL/OA<sub>4</sub>. Only the specimens collected from Dongling mountain showed positive amplification. One in three adult *Ixodes persulcatus* with one of 57 nymph *Ixodes persulcatus* showed positive while 9 of 119 (7.56%) mice specimens showed positive, of which 8 were *B. grinnii* and one *B. afzelii*. In this study, we attempted to isolate *B. burgdorferi sensu lato* strains from 160 *H. longicornis* ticks (20/group) but failed. Serological survey showed a 9.1% (5/55) infection rate with *B. burgdorferi sensu lato* in the mice of Dongling mountain forest areas. Conclusions The natural focus of Lyme disease including *B. garinii* and *B. afzelii* might have existed in Dongling mountain of Mentougou district, Beijing. *Ixodes persulcatus* and mice may serve as vectors and reservoirs, respectively.

【Key words】Lyme disease; Ticks; Murids; Epidemiology, molecule

北京的部分林区(同时又是自然风景区), 旅游资源丰富, 吸引着大批的游客。然而这些地区的地

理景观及植被分布非常适合蜱类滋生, 又有许多宿主动物活动, 很有可能存在蜱媒传染病的自然疫源地, 值得进行流行病学调查研究。自 20 世纪 70 年代未发现莱姆病, 现已有近 40 个国家报告有本病或自然疫源地存在, 许多地区的感染率和发病率都很高, 在美国有“第二艾滋病”之称, 因此, 投入了大量的人力和物力进行研究<sup>[1]</sup>。北京缺乏全面、可靠的

基金项目 北京市自然科学基金资助项目(7992029)

作者单位: 100071 北京, 军事医学科学院微生物流行病学研究所流行病学研究室(李建民、曹务春、张习坦、吴晓明、张泮河、赵秋敏、杨红); 北京市疾病预防控制中心流行病科(董振英); 北京市怀柔县卫生防疫站流行病科(蔡胜利)

流行病学资料,故本研究选择有代表性的林区进行莱姆病疫源地的调查。

### 材料与方 法

#### 一、材料

1. 蜱和野鼠脏器标本 :于 1998 年 4 月至 1999 年 3 月和 2000 年 4~10 月从北京的林区(延庆县松山森林公园,房山县十渡,门头沟区东灵山,怀柔县青龙峡、汤河口,密云县黑龙潭)采集。

2. 人群和野鼠血清标本 :人群血清标本于 2000 年 7 月采自怀柔县汤河口镇林区的乡村医生,共 57 人份。野鼠血清从 1998 年 8 月至 1999 年 8 月在门头沟区东灵山捕获的野鼠。

3. 试验用菌株 :由军事医学科学院微生物流行病学研究所相关实验室提供。

4. 纯培养莱姆病螺旋体抗原片及荧光标记抗体 :由军事医学科学院微生物流行病学研究所制备。

5. 对比用参照菌株 :通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)BLAST 操作平台收集 GenBank 中相关序列,所用序列的注册号分别为 X14407、M57248、S88693、X68059;X62387、X65599、X70365、X85439、X29087;X62624、X65598、X65600、X85440、X85441、X80254、X63412、M88764、J29660。

#### 二、方法

1. 蜱标本和菌株 DNA 模板的提取 :见参考文献 2 ]

2. PCR 扩增 :见参考文献 3、4 ],借助 Goldkey 和 Oligo 4.0 软件设计了 6 条引物(表 1)。PCR 反应体积为 30 μl,包括 3 μl 模板 DNA,3 μl 10 倍的 PCR 反应缓冲液,100 μmol/L DNTP,5 μmol/L 引物,1 U Taq DNA 聚合酶。

表1 用于 PCR 扩增的引物

名称	序 列	长度	位置
OA <sub>1</sub>	5'-AATAGGTCTAAATATAGCTTAAATAGC-3'	27	21-47
OA <sub>4</sub>	5'-TTATTTTAAAGCGT[G]I[C]TTT-3'	18	805-822
SL	5'-GGAAAAGCTAAAGAG[A]GTTTAAAA-3'	24	466-489
SS	5'-AACTTAATGACACTGACAGTAGTGCT-3'	26	599-624
BG	5'-TGATAAAAAACAACGGTTCTGGAAC-3'	24	201-224
BA	5'-GGAAAAGTAGCTAAATGATAAAGT-3'	23	493-515

PCR 反应参数(PE2400):第一轮 94℃ 3 min,接着扩增 40 个循环,每个循环包括 94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,最后 72℃ 7 min。扩增产物 100 倍稀释后,取 3 μl 用于第二轮扩增,引物 SL/OA<sub>4</sub> 循环参数同上。反应产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行

电泳。阳性标本用 SS/OA<sub>4</sub>、BG/OA<sub>4</sub>、BA/OA<sub>4</sub> 进行检测。不同引物连接温度分别为 54℃、52℃、52℃。

3. 半巢式 PCR 用于莱姆病螺旋体的检测和基因分型的评价 :用莱姆病螺旋体菌株检验方法的可行性,选择 PCR 扩增产物进行克隆与序列测定,与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行最大同源性比较,证实上述方法的可靠性。用斑点热立克次体(康氏立克次体 *R. conorii*)、小蛛立克次体(*R. akari*)和西伯利亚立克次体(*R. sibirica*)、梅毒螺旋体检验方法的特异性。

4. DNA 同源性比较和聚类分析 :测得的外膜蛋白(AcOspA)基因序列,通过 Internet 网进入 NCBI 站点,用 BLAST 工具对 GenBank 检索。并收集代表性菌株的 OspA 基因序列,用 CLUSTAL X(1.8) 软件进行同源位排列,删除无定位碱基,留下同源位碱基,用 DNASTar 软件做核苷酸序列间的两两比较和聚类分析。

5. 莱姆病螺旋体的分离 :用 BSK 培养基分离培养螺旋体。

6. 血清标本的检测方法 :用间接免疫荧光法。

### 结 果

一、OspA 基因的莱姆病螺旋体检测及基因分型方法的建立

1. 半巢式 PCR 对国际标准株和我国部分菌株的基因分型 :对 14 株国内分离的莱姆病螺旋体菌株(黑龙江分离株 VL1、VL、VL2,内蒙古分离株 NM2、NM3、NMS-4、NM5,吉林分离株 JL2、JL3、JL-8,辽宁分离株 411、LHC,新疆分离株 XY2,北京分离株 SZ22)和 3 株国际标准株 B31(*B. burgdorferi sensu stricto*)、20047(*B. garinii*)、VS461(*B. afzelii*)进行检测,上述 17 株莱姆病螺旋体菌株全部阳性。用半巢式 PCR 进行基因分型,其中 B31 属于 *B. burgdorferi sensu stricto*,20047、JL3、JL2、XY2、VL1、VL、VL2、411、NMS-4、NM5、JP-8 属于 *B. garinii*,VS461、NM2、NM3、SZ22、LHZ 属于 *B. afzelii*。上述检测方法对梅毒螺旋体、斑点热群立克次体无扩增,表明其特异性良好。

2. 半巢式 PCR 分型结果与 DNA 序列测定结果的比较 :选择 NMS-4、SZ22 的 357 bp 的扩增产物进行克隆和 DNA 序列测定,与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行最大同源性比较,NMS-4 与 *B. garinii* 基因型的同源性为 90%~96%,而与其他

基因型的同源性小于 83% ,确定其分类学位置为 *B. garinii* ,SZ22 与 VS461 标准株序列的同源性为 94% ,而与其他基因型同源性小于 90% ,确定其分类学位置为 *B. afzelii* ,OspA 基因序列同源性检索结果与 OspA 基因分型结果吻合。

二、北京林区采集的部分蜱类、鼠类莱姆病螺旋体 DNA 的检测

1. 蜱类的检测 :939 只被检测的蜱标本中 ,3 只游离全沟硬蜱(北京东灵山采集)中有 1 只检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段 ,57 只全沟硬蜱、若蜱或幼蜱(从东灵山捕获的野鼠体表检获)中有 1 只检测阳性 ,其他蜱标本未检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段。

2. 鼠类的检测 :检测从北京林区捕获野鼠的脏器标本 250 份(206 只) ,结果 ,北京东灵山捕获 119 只野鼠的脏器标本中有 9 只检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段 ,阳性率为 7.56%。其中 8 只 *B. garinii* 阳性 ,1 只 *B. afzelii* 阳性 ,其他鼠脏器标本未检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段。

3. 野鼠脏器 OA<sub>1</sub>/OA<sub>4</sub> 和 SL/OA<sub>4</sub> 阳性扩增产物的克隆与序列测定 :选择东灵山捕获的 1 只野鼠的脏器 SL/OA<sub>4</sub> 阳性扩增产物(命名为 BJ226) ,进行核酸序列测定 ,与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行最大同源性检索 ,与 *B. garinii* 基因型的 T25

(表 2) 菌株的 OspA 序列同源性最高 ,为 91% ,确定其分类学位置为 *B. garinii*。

三、OspA 核苷酸序列的同源性比较和聚类分析  
OspA 核苷酸序列分析已被用于伯氏疏螺旋体分类<sup>[4-7]</sup>。对本研究测得的 3 个 OspA 基因序列和从 GenBank 中收集的 18 个代表性菌株的序列 ,用方法 4 获得序列间遗传相似度(表 2)和聚类树(图 1)。从表 2 看出 ,NMS-4 与 K48、TIS1、DK29、B29、PTROB、WABSOU、PHEI、BJ226、T25(*B. garinii* 菌株)的同源性分别为 95.4%、95.4%、94.8%、94.1%、91.6%、86.0%、85.0%、84.0%、82.1% ,与其他基因型 HO14、19857、VS461、B31 的同源性分别为 62.0%、61.6%、79.4%、76.9% ,显示了同基因型序列间高的同源性 ,不同基因型之间同源性较低 ,因此 ,支持 NMS-4 属于 *B. garinii* 的推断。SZ22 与 PGAU、PKO、IP3、PLUD、VS461(*B. afzelii* 菌株)的同源性均达到 98% ,而与其他基因型同源性均低于 83% ,因此 ,支持 SZ22 属于 *B. afzelii* 基因型的推断。同样可以推断 BJ226 属于 *B. garinii*。从图 1 可以看出 ,21 个序列可分为 5 个群 ,I 群包括 K48、TIS1、DK29、B29、PTROB、WABSOU、PHEI、BJ226、T25 和 NMS-4 ,属于 *B. garinii* ;II 群包括 PGAU、PKO、IP3、PLUD、VS461 和 SZ22 ,

表2 伯氏疏螺旋体 OspA 基因 327 个同源性碱基序列比较

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
T25.SEQ	1	77.9	79.9	78.6	72.3	72.9	72.9	73.2	72.6	73.2	60.3	74.1	79.6	72.6	82.1	73.2	82.1	64.2	82.9	80.6	82.6	
PTROB.SEQ	2	20.8		91.6	88.5	79.8	83.8	83.5	84.1	83.2	83.5	65.7	84.4	90.7	80.1	80.1	82.9	91.6	59.2	81.9	91.6	81.6
K48.SEQ	3	20.6	6.9		96.9	78.2	81.0	80.7	81.3	80.4	80.7	63.5	81.9	98.8	78.5	81.5	80.1	95.4	62.0	88.8	98.8	88.5
B29.SEQ	4	20.3	8.3	1.6		76.0	77.6	77.3	77.9	77.3	77.3	61.0	78.8	96.6	76.3	80.5	77.9	94.1	60.1	86.6	96.9	85.7
N40.SEQ	5	26.3	22.0	22.0	23.0		79.1	78.8	79.4	79.4	79.4	66.3	85.7	77.6	99.7	74.5	78.8	76.6	59.2	74.1	78.2	73.8
PKO.SEQ	6	28.2	16.7	17.5	19.6	22.8		99.1	99.7	98.8	99.7	65.7	84.4	79.8	79.1	76.9	98.4	79.8	56.4	76.6	80.7	76.9
VS461.SEQ	7	28.1	17.1	17.9	20.0	23.2	0.9		99.4	98.4	98.8	65.4	83.8	79.4	78.8	76.6	98.1	79.4	56.4	76.3	80.4	76.0
PLUD.SEQ	8	27.7	16.3	17.1	19.2	22.3	0.3	0.6		99.1	99.4	66.0	84.7	80.1	79.4	77.3	98.8	80.1	56.7	76.9	81.0	76.6
PGAU.SEQ	9	28.6	17.5	18.3	20.4	22.3	1.3	1.6	0.9		98.4	65.1	83.5	79.1	79.4	76.3	97.8	79.1	55.8	75.7	80.1	75.4
IP3.SEQ	10	27.7	17.1	17.9	20.0	22.3	0.3	1.3	0.6	1.6		65.4	84.1	79.4	79.4	76.6	98.8	79.4	56.1	76.6	80.4	76.9
19857.SEQ	11	40.9	35.0	37.3	39.1	33.5	35.0	35.0	34.5	36.0	35.5		65.4	62.5	67.3	61.6	64.8	61.6	72.4	64.4	63.5	64.1
25015.SEQ	12	26.4	16.5	17.2	18.9	15.2	16.7	17.1	16.3	17.5	17.1	34.9		81.6	86.0	78.5	83.5	80.7	59.5	76.9	81.9	76.6
DK29.SEQ	13	21.1	7.9	1.3	1.9	22.9	19.2	19.6	18.8	20.0	19.6	38.4	17.6		77.9	80.9	78.8	94.8	61.7	88.2	98.1	87.9
B31.SEQ	14	25.9	21.6	21.6	22.5	0.3	22.8	23.2	22.3	22.3	22.3	33.0	14.8	22.5		74.8	78.8	76.9	59.5	74.5	78.5	74.1
BJ226.SEQ	15	16.2	17.2	17.0	16.6	23.2	21.6	22.0	21.1	21.9	22.0	38.2	19.6	17.8	22.8		77.3	84.0	61.1	83.2	81.8	82.9
SZ22.SEQ	16	26.8	17.9	18.8	19.2	23.2	1.6	1.9	1.3	2.2	1.3	36.6	17.9	20.4	23.2	21.2		80.1	55.5	76.6	80.4	75.7
NMS-4.SEQ	17	18.2	6.9	4.8	4.5	23.3	19.1	19.5	18.7	19.9	19.5	39.9	18.4	5.5	22.9	15.0	18.7		62.0	86.0	95.4	85.0
HO14.SEQ	18	36.8	40.4	37.8	38.0	42.8	42.3	42.2	41.7	43.3	42.9	26.0	42.3	38.4	42.2	38.3	42.9	38.9		62.0	60.7	62.3
WABSOU.SEQ	19	15.2	13.1	8.2	9.0	20.9	19.3	19.7	18.9	20.1	19.3	35.2	18.9	9.0	20.5	12.5	19.3	11.1	39.4		88.5	99.1
TIS1.SEQ	20	19.8	7.2	1.3	1.6	22.5	18.4	18.8	17.9	19.1	18.8	37.8	17.6	1.9	22.0	16.6	18.8	4.8	39.5	8.6		87.5
PHEI.SEQ	21	15.6	13.5	8.6	10.0	21.4	18.9	20.1	19.3	20.5	18.9	35.8	19.3	9.3	20.9	12.9	20.6	12.2	38.8	0.9	9.7	

注 :黑体字为相似百分比 ,白体字为差异性

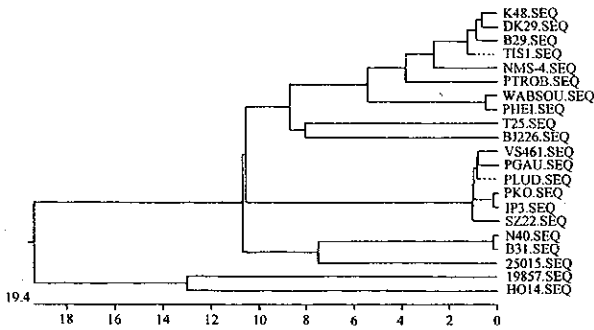


图1 伯氏疏螺旋体的聚类分析结果  
〔根据 *OspA* 基因序列(327 bp)的同源性〕

属于 *B. afzelii* ;Ⅲ群包括 B31、N40、25015 属于 *B. burgdorferi sensu stricto* ;Ⅳ群为 19857 现认为属于 *B. andersonii*<sup>[8]</sup> ;Ⅴ群包括 HO14 ,属于 *B. japonica* 。可以看出 I 群具有较大的异质性 ,可能包括几个亚型 结合核苷酸序列间的两两比较 ,参考文献[ 9 ]可以将 I 群分为 5 个亚型 ,亚型 I 包括 K48、TIS1、DK29、B29、NMS-4 ;亚型 II 包括 PTROB ;亚型 III 包括 WABSOU 和 PHEI ;BJ226、T25 分属亚型Ⅳ、Ⅴ。

四、病原体分离结果

对 1999 年 8 月采自北京东灵山的 160 只长角血蜱(雌雄各半)每 20 只为一组 ,用 BSK II 培养基分离病原体 结果未分离到莱姆病螺旋体。

五、人群和野鼠血清抗莱姆病螺旋体 IgG 抗体的检测

东灵山采集的 55 份野鼠血清标本中 5 份检测阳性 怀柔采集的 57 份人血清标本中全部检测阴性。

讨 论

*OspA* 氨基酸序列分析表明 :N 端和 C 端序列保守 ,中间区段为高变区。本研究根据 *OspA* 基因的两侧保守区和中间高变区分别设计种特异性引物和基因型特异性引物 ,建立半巢式 PCR 方法 ,直接对生物标本进行莱姆病螺旋体检测和基因分型 ,实验表明本方法简单可靠且特异性良好 ,有望用于现场流行病学调查。

长角血蜱是北京的优势蜱种 ,但本研究从长角血蜱中未检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段 ,可能是长角血蜱只是一过性的携带莱姆病螺旋体 ,带菌时间较短 ,传播实验证实长角血蜱只是一过性感染莱姆病螺旋体。全沟硬蜱是我国北方莱姆病的主要传

播媒介 ,调查发现 ,北京西部山区(东灵山、十渡)有此蜱存在 ,且从东灵山捕获的野鼠体表检获的蜱类主要为全沟硬蜱 ,并从中检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段。血清学和病原学调查证实 ,黑线姬鼠和棕背是莱姆病的重要贮存宿主 ,本研究从东灵山捕获的野鼠脏器检测到莱姆病螺旋体 DNA 片段 ,血清中检测到莱姆病螺旋体 IgG 抗体 ,选择一份 PCR 阳性扩增产物进行克隆与序列测定 ,与 GenBank 中注册的核苷酸序列进行最大同源性比较 ,确定其分类位置为 *B. garinii* ,而对分离自北京长角血蜱的菌株经过 *OspA* 基因型 PCR 初步基因分型和克隆序列测定分析 ,确定为 *B. afzelii* 与梁军刚等<sup>[10]</sup> 报道的此菌株为 *B. burgdorferi sensu stricto* 的结果不一致 ,其分类学地位值得进一步研究。研究还表明 ,北京存在 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 两个基因型 ,这与我国北方存在的莱姆病螺旋体的基因型分布是一致的。

参 考 文 献

- 1 Vander FK. Everything you need to know about Lyme disease and other tick-borne disorders. New York. NY Jhon Wiley & Sons Inc , 1997. 20-47.
- 2 林万明. PCR 在莱姆病研究中的应用. PCR 技术操作和应用指南. 北京 :人民军医出版社 ,1995. 238-240.
- 3 Vasilias V , Herzer P , Rossler D , et al. Heterogeneity of borrelia burgdorferi sensu lato demonstrated by an *OspA* type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. Med Microbiol Immunol , 1998 , 187:97-102.
- 4 Demaerschalck I , Messaoud AB , Kesel MD , et al. Simultaneous presence of different borrelia burgdorferi genospecies in biological fluids of Lyme disease patient. J Clin Microbiol , 1995 33:602-608.
- 5 Will G , Heipke SJ , Schwab E , et al. Sequence analysis of *OspA* genes shows homogeneity within borrelia burgdorferi sensu stricto and borrelia strains but reveals major subgroups within the borrelia garinii species. Med Microbiol Immunol , 1995 , 184:73-80.
- 6 Norris DE , Johnson BJ , Piesman J , et al. Population genetic and phylogenetic analysis of colorado borrelia burgdorferi. Am J Trop Med Hyg , 1999 , 60:699-707.
- 7 Wilske B , Mursic VP , Gobel UB , et al. An *OspA* serotyping system for borrelia burgdorferi based on reacting with monoclonal antibody and *OspA* sequence analysis. J Clin Microbiol , 1993 , 31: 340-350.
- 8 Belfaiza J , Postic D , Bellenger E , et al. Identification of novel insertion elements , RFLP patterns and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochete : phylogenetic analysis group21038 (*Borrelia andersonii* . sp. nov) isolated. J Clin Microbiol , 1995 , 33:2427-2431.
- 9 Liveris D , Wormser GP , Nowakowsri J , et al. An *OspA* serotyping system for borrelia burgdorferi based on reacting with monoclonal antibody and *OspA* sequence analysis. J Clin Microbiol , 1993 31:340-343.
- 10 梁军刚 张哲夫. 中国莱姆病螺旋体 rRNA 基因多态性分析. 中华微生物和免疫学杂志 ,1996 , 16:359-362.

(收稿日期 2001-11-30)  
(本文编辑 :段江媚)