

· 现场调查 ·

大兴安岭林区蜱和鼠中莱姆病螺旋体感染及其基因分型研究

褚宸一 何静 王剑波 哈森高娃 张泮河 吴晓明 赵秋敏 蒋宝贵 高燕 曹务春

【摘要】 目的 了解内蒙古大兴安岭林区蜱和鼠中伯氏疏螺旋体的感染及基因分型情况。方法 应用巢式PCR扩增蜱和鼠中伯氏疏螺旋体5S~23S rRNA 间隔区片段,对阳性产物进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析和单链构象多态性(SSCP)分析,RFLP分析显示特殊带型的样本测序分析。结果 检测全沟硬蜱 1336 只,293 只阳性,阳性率为21.93%;森林革蜱 144 只,6 只阳性,阳性率为4.17%;嗜群血蜱 144 只,未发现有伯氏疏螺旋体感染。检测鼠 9 种 145 只,感染伯氏疏螺旋体的 4 种 5 只,感染率为3.45%;其中检测 8 只棕背鼯,2 只阳性。RFLP分析及序列分析显示蜱中有 *B. garinii* 20047 亚型、*B. garinii* NT29 亚型、*B. afzelii* 基因型以及不同基因型或亚型伯氏疏螺旋体的混合感染;鼠感染的伯氏疏螺旋体包括 *B. garinii* 20047 亚型和 *B. garinii* NT29 亚型。SSCP 分析结果显示带型多于 36 种。结论 大兴安岭林区蜱及鼠中均存在伯氏疏螺旋体的感染,其中全沟硬蜱的感染率较高;*B. garinii* 型为主要基因型,且该地区伯氏疏螺旋体存在遗传多态性。单只蜱中存在同时感染不同基因型伯氏疏螺旋体的情况,人和宿主动物是否存在不同基因型伯氏疏螺旋体混合感染尚待进一步研究。全沟硬蜱和棕背鼯分别是该林区伯氏疏螺旋体的主要媒介和主要储存宿主。

【关键词】 伯氏疏螺旋体;基因型;蜱;鼠

Investigation on *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks and rodents collected in Da Xing-An Mountains Forest areas of China CHU Chen-yi*, HE Jing, WANG Jian-bo, HASEN Gao-wa, ZHANG Pan-he, WU Xiao-ming, ZHAO Qiu-min, JIANG Bao-gui, GAO Yan, CAO Wu-chun. *Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing 100071, China

Corresponding author: CAO Wu-chun, Email: caowc@nic.bmi.cn

【Abstract】 Objective To detect and study the types of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks and rodents from Da Xing-An Mountains Forest areas of China. **Methods** Nested PCR was performed to amplify 5S-23S rRNA intergenic spacer of *B. burgdorferi*. Positive products were analysed by restriction fragment length polymorphism(RFLP) and single strand conformation polymorphism(SSCP), specimens showing unique RFLP profile were sequenced and analysed. **Results** 1336 *Ixodes persulcatus*, 144 *Dermacento silvarum*, 144 *Haemaphysalis concinna* and 145 rodents of 9 species were collected from 16 sections of Da Xing-An Mountains Forest areas of China. Specific fragments were amplified from 293 *I. persulcatus* and 6 *D. silvarum* and 5 rodents of 4 species. *B. burgdorferi* was not detected in *H. concinna*. Among the positively tested *I. persulcatus*, 209 contained *B. garinii* genospecies and 45 contained *B. afzelii* genospecies based on RFLP. Moreover, *B. garinii* genospecies consisted of *B. garinii* 20047 and *B. garinii* NT29. 17 adult *I. persulcatus* were simultaneously infected with *B. garinii* 20047 and *B. garinii* NT29. Nine adult *I. persulcatus* were simultaneously infected with *B. garinii* 20047 and *B. afzelii*. Four adult *I. persulcatus* were simultaneously infected with *B. garinii* 20047 and *B. garinii* NT29 and *B. afzelii*. Two *D. silvarum* were infected with *B. garinii* 20047, 1 *D. silvarum* with *B. garinii* 20047, 2 *D. silvarum* with *B. afzelii*. 3 rodents were infected with *B. garinii* 20047 while 2 rodents were infected with *B. garinii* NT29. Mixed infection was not found in *D. silvarum* and rodents. In addition, nine *I. persulcatus* and one *D. silvarum* specimens showed unique RFLP pattern. Data from sequential analysis showed that they all belonged to *B. garinii*. PCR-SSCP profiles of 5S-23S rRNA intergenic spacer of *B. burgdorferi* in the positive specimens exceeded

基金项目: 国家科技攻关计划课题资助项目(2003BA712A05-01); 全军“十一五”计划重大专项资助项目(06D006-1)

作者单位: 100071 北京, 军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室(褚宸一、何静、张泮河、吴晓明、赵秋敏、蒋宝贵、高燕、曹务春); 内蒙古自治区牙克石林业防疫站(王剑波、哈森高娃)

通讯作者: 曹务春, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

36 types; *B. garinii* 20047 showed 16 types while *B. garinii* NT29 showing 11 types, *B. afzelii* showing 9 types. SSCP profiles of the specimens coinfecting with multiple *B. burgdorferi* was relatively complex.

Conclusion The infection of *B. burgdorferi* was found in the ticks and rodents in Da Xing-An Mountains Forests areas. The infection rate of *I. persulcatus* was high. *B. garinii* was predominant genospecies, and the population of *B. burgdorferi* was heterogeneous in the area. Mixed infections of different *B. burgdorferi* genospecies in ticks were found. *I. persulcatus* and *Clethrionomys rufocanus* were possibly served as major vector and major host for *B. burgdorferi*, respectively, suggesting that further study is needed to confirm the coinfection in humans and animals in this region.

【Key words】 *Borrelia burgdorferi* sensu lato; Genospecies; Tick; Rodent

莱姆病的病原体——伯氏疏螺旋体是通过某些硬蜱的吸血活动在动物间循环传播,某些小型动物是其重要宿主动物。伯氏疏螺旋体具有高度的遗传异质性,至少可分为 11 个基因型,其中 4 个基因型对人类有致病性^[1]。流行病学和病原学研究证实大兴安岭林区是莱姆病的主要疫区之一^[2]。为详细了解该林区蜱及鼠中伯氏疏螺旋体的感染及其基因分型情况,我们在该林区进行了选点调查研究。

材料与方 法

1. 标本来源:2004 年和 2005 年的 5-7 月间在内蒙古自治区大兴安岭林区的 16 个林业局,用布旗法在针阔混交林中采集游离成蜱,同时用诱捕法采集野鼠,分类、鉴定及保存待用。

2. 伯氏疏螺旋体 DNA 提取:分别采用煮沸法和 Trizol 法提取蜱及鼠脾脏中伯氏疏螺旋体 DNA。

3. 伯氏疏螺旋体的检测:采用巢式 PCR 检测蜱及鼠的带菌情况。参考文献[3],从 5S~23S rRNA 基因间隔区保守区设计引物,进行巢式 PCR 检测;PCR 反应总体积为 20 μ l,包括 2 μ l 模板,10 \times PCR 缓冲液 2 μ l,引物浓度为 12.5 μ mol/l, dNTP 为 10 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.4 μ l (2.5 U/ μ l)。第一轮和第二轮扩增的退火温度分别为 55 $^{\circ}$ C、59 $^{\circ}$ C。取 PCR 产物 5 μ l,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,于紫外灯下观察结果。每次实验都设立空白(水)对照,并采取严格措施以避免污染。

4. 限制性片段长度多态性(RFLP)分析:取阳性标本的 PCR 产物 5 μ l,用限制性内切酶 Mse I (10 000 U/ml; New England Biolabs)参照产品说明酶切。酶切产物用 20% 聚丙烯酰胺凝胶于 80 V 电压下电泳 10 h;电泳结束后,硝酸银染色,照相后保存。

5. 单链构象多态性(SSCP)分析:取 3 μ l PCR 产物与等体积甲酰胺变性液,99 $^{\circ}$ C 变性 10 min,取出后迅速加入 Excel Gel 预制胶上样孔中,200 V 电压下

电泳 5 h,硝酸银染色后照相保存。

6. 序列测定和分析:RFLP 分析中与已有带型不同的样品进行碱基序列测定和分析。

结 果

1. 蜱及鼠中伯氏疏螺旋体的检测:分别在大兴安岭林区的北部、南部、中东部和中西部的 16 个地区采集标本,北部包括满归、阿龙山、金河和得尔布尔;南部包括卓源和卓尔;中东部包括阿里河、吉文、毕拉河和大杨树;中西部包括伊图里河、图里河、库都尔、乌尔旗汗、牙克石和免渡河,其中只在西部图里河,中部毕拉河,东部大杨树采集鼠标本。检测全沟硬蜱 1336 只,293 只阳性,阳性率为 21.93%;森林革蜱 144 只,6 只阳性,阳性率为 4.17%;嗜群血蜱 144 只,未发现伯氏疏螺旋体感染。统计学检验表明,3 种蜱的带菌率差异有统计学意义($\chi^2 = 62.355, P < 0.05$);此外,雌性和雄性全沟硬蜱带菌率差异有统计学意义($\chi^2 = 15.64, P < 0.05$),雌性全沟硬蜱的带菌率(26.11%)高于雄性的带菌率(17.05%);不同地区全沟硬蜱的带菌率也有差异($\chi^2 = 150.371, P < 0.05$),南部地区全沟硬蜱带菌率(45.61%)高于其他三个地区(中东部全沟硬蜱带菌率为 14.61%,中西部全沟硬蜱带菌率为 13.94%,北部全沟硬蜱带菌率为 13.06%)(表 1)。检测鼠 9 种 148 只,感染伯氏疏螺旋体的有棕背鼯、黑线姬鼠、花鼠和褐家鼠 4 种 5 只,感染率为 3.45%(表 2)。4 种鼠的感染率差异有统计学意义($\chi^2 = 4.427, P < 0.05$),而中部、东部、西部三个地区鼠的感染率差异无统计学意义($\chi^2 = 4.427, P = 0.208$)。

2. 蜱及鼠中伯氏疏螺旋体的基因型:

(1) RFLP 分析及序列分析:RFLP 分析结果显示,全沟硬蜱感染的伯氏疏螺旋体包括 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 两种基因型, *B. garinii* 又包括 *B. garinii* 20047 和 *B. garinii* NT29 两种亚型;30 只全沟硬蜱发生混合感染,感染率为 2.25%;另有 9 份

标本显示特殊带型, 序列测定分析表明属于 *B. garinii* 基因型。森林革蜱感染的伯氏疏螺旋体也包括 *B. garinii* 20047 亚型、*B. garinii* NT29 亚型和 *B. afzelii* 基因型, 而且有 1 份标本带型特殊, 序列测定分析表明属于 *B. garinii* 基因型。详细结果见表 3。5 只带菌鼠均感染 *B. garinii* 基因型伯氏疏螺旋体, 其中黑线姬鼠、花鼠和褐家鼠各 1 只均感染 *B. garinii* 20047 亚型, 2 只棕背鼯均感染 *B. garinii* NT29 亚型(表 3, 图 1)。

表1 大兴安岭林区蜱感染伯氏疏螺旋体的情况

采集地	全沟硬蜱				森林革蜱			
	雌性		雄性		雌性		雄性	
	检测只数	阳性只数	检测只数	阳性只数	检测只数	阳性只数	检测只数	阳性只数
北部	135	16(11.85)	156	22(14.10)	-	-	-	-
中东部	47	7(14.89)	42	6(14.29)	8	0	4	0
中西部	309	52(16.83)	307	34(11.07)	91	6(6.59)	41	0(0.00)
南部	228	113(49.56)	112	43(38.39)	-	-	-	-
合计	719	188(26.15)	617	105(17.02)	99	6(6.06)	45	0(0.00)

注: 括号内数据为阳性率(%); - 表示该采集地未采到此种标本

表2 大兴安岭林区鼠感染伯氏疏螺旋体的情况

鼠种	大杨树		毕拉河		图里河	
	检测只数	阳性只数	检测只数	阳性只数	检测只数	阳性只数
黑线姬鼠	34	1(2.94)	11	0	-	-
莫氏田鼠	34	0	-	-	-	-
花鼠	6	1	1	0	1	0
褐家鼠	11	1	1	0	-	-
红背鼯	13	0	-	-	-	-
棕背鼯	2	0	3	1	3	1
大林姬鼠	5	0	-	-	1	0
黑线仓鼠	6	0	4	0	-	-
小家鼠	-	-	9	0	-	-
合计	111(2.70)	3	29	1(3.45)	5	1

注: 同表 1

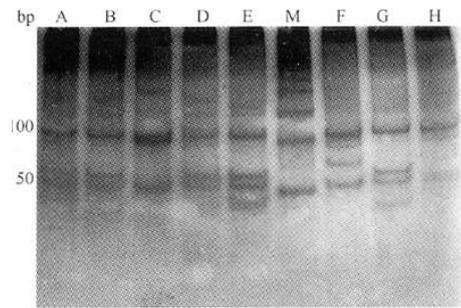
表3 大兴安岭林区蜱中伯氏疏螺旋体基于 PCR/RFLP 分析的基因分型情况

标本种类	基因(亚)型						N
	A	B	C	A+B	A+C	A+B+C	
全沟硬蜱	117	92	45	17	9	4	9
森林革蜱	2	1	2	0	0	0	1
合计	119	93	47	17	9	4	10

注: A 为 *B. garinii* 20047 亚型; B 为 *B. garinii* NT29 亚型; C 为 *B. afzelii* 基因型; N 为 RFLP 分析中显示的特殊带型

(2) SSCP 分析: *B. garinii* 20047 亚型显示 16 种带型, *B. garinii* NT29 亚型显示 11 种带型, *B. afzelii* 基因型显示 9 种带型。不同基因型和

(或)不同亚型间的混合感染显示多种带型。



M: 50 bp Marker; A: *B. garinii* 20047 亚型和 *B. garinii* NT29 亚型的混合感染; B, D, E 和 G: *B. garinii* NT29 亚型; C: *B. garinii* 20047 亚型; F 和 H: *B. garinii* NT29 亚型和 *B. afzelii* 基因型的混合感染

图1 大兴安岭林区蜱和鼠中伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析图谱

讨论

大兴安岭林区全沟硬蜱的带菌率(21.93%)高于森林革蜱的带菌率(4.17%), 未检测出嗜群血蜱有带菌情况, 3 种蜱的带菌率差异有统计学意义, 且全沟硬蜱是东北林区的优势蜱种, 证实全沟硬蜱是该林区莱姆病的主要传播媒介。雌性全沟硬蜱带菌率(26.11%)高于雄性全沟硬蜱的带菌率(17.05%)。伯氏疏螺旋体在蜱体内可经卵传播, 提示雌性全沟硬蜱在疫源地的维持和扩大方面有重要意义。大兴安岭南部分为次生林, 蜱和野鼠较多, 南部林区全沟硬蜱的带菌率高于其他林区, 提示南部林区和动物发生莱姆病感染的危险性较大。共检测到棕背鼯、花鼠、黑线姬鼠、褐家鼠 4 种鼠感染莱姆病螺旋体, 提示该林区可作为伯氏疏螺旋体宿主动物的鼠类相对多样。4 种鼠的感染率差异有统计学意义, 5 只阳性鼠中 2 只是棕背鼯, 而且检测的棕背鼯共有 8 只, 提示棕背鼯可能是主要储存宿主。褐家鼠是室内外常见的鼠种, 与人接触密切, 因此控制鼠患在莱姆病的防治中有重要意义。东部、中部、西部鼠的感染率差异无统计学意义, 此结果与三地相似的生态环境吻合。

PCR/RFLP 分析及序列测定分析结果显示, 大兴安岭林区蜱感染的伯氏疏螺旋体包括 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 两种基因型以及不同基因型和(或)不同亚型间的混合感染, 其中单纯 *B. garinii* 基因型感染占 74.25%; 鼠感染的伯氏疏螺旋体均为 *B. garinii*

基因型。提示该林区伯氏疏螺旋体以 *B. garinii* 基因型为主。与蜱相比,鼠感染的伯氏疏螺旋体无 *B. afzelii* 基因型,推测可能是鼠的样本量太小,也可能是在我国大兴安岭林区鼠更趋向于感染 *B. garinii* 基因型伯氏疏螺旋体。Klaus 等^[4]研究发现不同基因型伯氏疏螺旋体在自然界通过鼠、蜱和鸟-蜱两个不同的传播圈循环传播,Dania 等^[5]报道在欧洲鼠趋向于感染 *B. afzelii* 基因型伯氏疏螺旋体,推测大兴安岭林区 *B. afzelii* 基因型伯氏疏螺旋体可能经鸟-蜱传播圈传播。我国不同种类的宿主动物对不同基因型伯氏疏螺旋体的选择性和适应性尚待进一步研究。

单只全沟硬蜱同时感染 *B. garinii* 20047 亚型和 *B. garinii* NT29 亚型伯氏疏螺旋体的居多;另外有 4 只全沟硬蜱同时感染 *B. garinii* 20047 亚型、*B. garinii* NT29 亚型和 *B. afzelii* 基因型伯氏疏螺旋体。森林革蜱未发现混合感染发生,可能是样本量小所致。蜱经历幼虫、若虫两个发育阶段,每个阶段叮咬宿主动物吸血一次发育成成虫,可以推测单只蜱感染两种基因型或亚型伯氏疏螺旋体可能是蜱在一次吸血中从同一宿主动物感染不同的伯氏疏螺旋体,也可能是蜱在两次吸血中从不同的宿主动物感染不同的伯氏疏螺旋体;单只蜱发生三重混合感染的结果表明蜱至少在一次吸血中从同一宿主动物感染不同的伯氏疏螺旋体。同时感染不同伯氏疏螺旋体的蜱叮咬人和宿主动物可能使其感染,尽管混合感染率(2.25%)很低,结果仍提示人和宿主动物有同时感染不同基因型或亚型伯氏疏螺旋体的可能。由于人感染不同基因型伯氏疏螺旋体表现出的临床症状不同,并且伯氏疏螺旋体的基因型还与诊断抗原的抗原性有关,因此,在莱姆病的诊断、治疗和预防方面应考虑不同基因型伯氏疏螺旋体混合感染的存在,以采取相应的方法和措施。国外已有宿主动物和人类同时感染不同基因型伯氏疏螺旋体的报道^[6,7],而本次研究未发现鼠有混合感染的情况发生,可能是样本量较小所致。大兴安岭林区宿主动物和人类是否存在同时感染不同基因型伯氏疏螺旋体的情况尚待进一步研究。

PCR/SSCP 分析显示带型多于 36 种,提示该林区伯氏疏螺旋体具有遗传多态性。

基于伯氏疏螺旋体的 5S~23S rRNA 基因间隔区的 PCR/RFLP 分析快速简便,已广泛用于伯氏疏螺旋体的基因分型研究。但只能在基因种的水平上进行基因分型,而且不能判断与已有酶切带型不同的伯氏疏螺旋体的基因型^[8]。而 SSCP 分析能够检测同一基因型内不同伯氏疏螺旋体间的差异,甚至能检测到单个碱基的变异^[9]。本次研究结果也证实这一结论。只是 PCR/SSCP 分析中混合感染的标本显示的带型较为复杂,仅根据带型难以判断具体是哪几种伯氏疏螺旋体的混合感染。但 PCR/SSCP 分析简便、快捷,适用于伯氏疏螺旋体的基因多态性分析和基因分型研究。

参 考 文 献

- 1 Hengge UR, Tannapfel A, Tying SK, et al. Lyme borreliosis. *Infect Dis*, 2003, 3:489-500.
- 2 张哲夫,万康林,张金声,等.我国莱姆病的流行病学和病原学研究. *中华流行病学杂志*, 1997, 18:8-11.
- 3 Dionsios L, Gary PW, John N, et al. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 1306-1309.
- 4 Klaus K, Mick P, Sjoerd GTR, et al. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64:1167-1174.
- 5 Dania R, Birte K, Andrew S, et al. Adaptation of diverse Lyme disease spirochetes in a natural rodent reservoir host. *Infect Immun*, 2004, 72:2442-2444.
- 6 Minoru N, Kenji M. Mixed infection of different *Borrelia* species among *Apodemus speciosus* mice in Hokkaido, Japan. *J Clin Microbiol*, 1995, 33:490-492.
- 7 Isabelie D, Abdeloyahid BM, Myriam DK, et al. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol*, 1995, 33:602-608.
- 8 王定明,郝琴,蔡星和,等.贵州省伯氏疏螺旋体的核糖体基因分型研究. *中华流行病学杂志*, 2003, 24: 1129-1131.
- 9 Markéta D, Lorenza B, Branislav P, et al. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand-conformation polymorphism analysis of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69:509-516.

(收稿日期:2005-10-21)

(本文编辑:张林东)