

## · 实验室研究 ·

# 黑龙江省旅游区蜱伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体复合感染的动态调查

唐琨 左双燕 李颖 郑元春 霍秋波 于季红 张圆 倪雪冰 姚囡囡 谭红专

**【摘要】** 目的 了解黑龙江省旅游区蜱伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体复合感染的动态变化。方法 运用PCR方法检测2010年捕获蜱中两种病原感染状况并测序进行序列分析。结果 在威虎山和镜泊湖景区采集点捕获蜱标本共849只。两地优势蜱种分别为全沟硬蜱和嗜群血蜱,其中伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体感染率分别为26.15%、10.05%和0.00%、13.33%,提示全沟硬蜱复合感染。两地优势蜱种活动高峰分别出现在7月和6月上旬,蜱携带病原率因时间差异而不同。序列分析显示旅游区伯氏疏螺旋体有3种基因型,除*B. garinii*型、*B. afzelii*型外,首次在东北地区发现*B. valaisiana*-like group型。对斑点热群立克次体序列分析表明,所得两序列分别与*Rickettsia* sp. HL-93和*Rickettsia* sp. H820,其同源性为100%。结论 两旅游区蜱中存在伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体复合感染,且携带的基因类型存在多样性;动态调查显示蜱种、蜱密度的分布以及蜱携带病原状况因生境、时间和人群的不同而有差异。

**【关键词】** 伯氏疏螺旋体; 斑点热群立克次体; 复合感染; 序列分析

**Dynamic investigation on the co-infection status of two pathogens in ticks from tourist point in Heilongjiang province** TANG Kun<sup>1</sup>, ZUO Shuang-yan<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, ZHENG Yuan-chun<sup>3</sup>, HUO Qiu-bo<sup>3</sup>, YU Ji-hong<sup>4</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, NI Xue-bing<sup>1</sup>, YAO Nan-nan<sup>3</sup>, TAN Hong-zhuan<sup>1</sup>. 1 Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China; 2 School of Architecture and Urban Environment, Soochow University; 3 Forestry Center Hospital of Mudanjiang; 4 Department of Infection Management and Disease Control, Chinese PLA General Hospital

Corresponding author: TAN Hong-zhuan. Email: tanhz99@qq.com

This work was supported by a grant from the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2010CB530201).

**【Abstract】** **Objective** To monitor the co-infection status of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.b.s.l*) and spotted fever group *Rickettsia* (SFGR) in tourist areas of Heilongjiang province. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the 5S-23S rRNA intergenic spacer of *B.b.s.l* and ompA of SFGR in ticks, dynamically collected from tourist areas of Heilongjiang province in 2010. Amplification products from positive ticks were sequenced, and phylogenetic analysis was conducted by Mega 5.0 software package. **Results** 849 ticks were collected from two tourist points, with the dominant ticks in Tiger Mountain and Jingpo Lake were *Ixodes persulcatus* and *Haemaphysalis concinna*. Regarding the *Ixodes persulcatus* from Tiger Mountain, the infection rates of *B.b.s.l* and SFGR were 26.15% and 10.05%. The infection rate of SFGR was 13.33% in *Haemaphysalis concinna* and the *B.b.s.l* was undiscovered in the same ticks from Jingpo Lake. However, the co-infection could only be detected in *Ixodes persulcatus* of both tourist areas. Surveillance data showed that the major ticks were more likely to be appeared in July at Tiger Mountain and in June at Jingpo Lake. Data from the sequence analysis on *B.b.s.l* showed that the *B.b.s.l* in tourist areas could be classified into three different genotypes, other than *B. garinii* and *B. afzelii*. We first detected *B. valaisiana*-like group genotype in northeast of China. Results from the sequence analysis of SFGR positive products showed that the two DNA sequences of newly detected agents were completely the same as *Rickettsia* sp. HL-93 which was detected in Hulin and *Rickettsia* sp. H820 found in northeast, China. **Conclusion** The co-infection of *B.b.s.l* and SFGR was detected in ticks from the tourist areas

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.05.015

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2010CB530201)

作者单位:410078 长沙,中南大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(唐琨、左双燕、张圆、倪雪冰、谭红专);苏州大学城市学院(李颖);黑龙江省牡丹江林业中心医院(郑元春、霍秋波、姚囡囡);解放军三〇一医院感染与疾病控制科(于季红)

通信作者:谭红专, Email: tanhz99@qq.com

of Heilongjiang province, and data from the sequencing of specific fragment showed that various kinds of genotypes existed in this area. However; the rates of co-infectionitis-different according to environment, time and population that contributed to the kinds of and the index of ticks existed in the surveys points, also the infection rate of the ticks was studied.

**【Key words】** *Borrelia burgdorferi* sensu lato; Spotted fever group *Rickettsiae*; Co-infection; Sequence analysis

莱姆病和斑点热在我国流行较为广泛,现今已从血清学和病原学证实全国多个省份存在自然疫源地<sup>[1]</sup>。随着我国经济建设与交通事业的发展,旅游业也方兴未艾,由此影响了景区生态环境,改变蝉的分布格局,也大大增加了人群接触蝉的概率,严重威胁人群健康。黑龙江省森林资源丰富,一直是我国蝉媒病研究的重点地域。为此,本研究以黑龙江省旅游区为调查点,对该区的莱姆病、斑点热及其复合感染情况开展动态研究,为人群有效预防蝉媒病和旅游区合理开发提供参考依据。

### 材料与方法

1. 蝉的采集:根据不同生境和人群活动选择威虎山影视城(W区)和镜泊湖景区(J区)为调查点,于2010年4—8月每月至少一次采用布旗法采集游离蝉并记录。蝉密度为2人4h捕获蝉虫只数。

2. DNA提取:75%乙醇浸泡蝉标本体表消毒,然后用生理盐水清洗,烘干。将单只蝉放入1.5 ml离心管中,经组织研磨器充分粉碎,采用TIANamp Genomic DNA Kit提取DNA, -20℃保存,备用。

#### 3. 病原检测:

(1)引物:所用引物根据参考文献[2,3]分别从伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi* sensu lato, *B.b.s.l*) 5S~23S rRNA 基因间隔区的保守区段及斑点热群立克次体(spotted fever group *Rickettsiae*, SFGR) 190 000 (*M.*)外膜蛋白A(*OmpA*)基因5'端的合成。

(2)反应体系及条件:①反应体系:*B.b.s.l*:聚合酶链反应(PCR)扩增体系总体积均为20 μl,第一轮PCR反应液包括2 μl模板(第二轮为1 μl模板,其余试剂不变,补水至20 μl),10×PCR缓冲液2 μl,浓度为10 μmol/L的引物0.4 μl,浓度为2.5 mmol/L的dNTP Mixture 0.8 μl, Taq DNA聚合酶(5 U/μl) 0.2 μl; SFGR:PCR反应总体积为20 μl,体系同*B.b.s.l*第一轮反应。②反应条件:*B.b.s.l*:第一轮PCR反应中退火温度为55℃,时间为30 s,第二轮退火温度为59℃,时间为30 s,其余反应条件相同,均为94℃预变性5 min,94℃变性30 s,72℃延伸40 s,35个循环,72℃后延伸7 min。SFGR:94℃预变性5 min,94℃变性15 s,54℃退火30 s,70℃延伸30 s,35个

循环,70℃延伸7 min。

(3)凝胶电泳:取PCR产物5 μl,于1.2%含EB的琼脂糖凝胶中电泳观察结果。

4. 测序与序列分析:随机抽样部分PCR扩增阳性核酸片段送商业测序,双向测序并应用NCBI提供的BLAST程序进行比对。使用Mega 5.0程序,Bootstrap分析重复数为1000,采用Jukes-cantor距离模式,选用Maximum Likelihood(ML)建树方法构建系统发育树。

5. 质量控制:为避免标本污染引起的假阳性反应,DNA模板的提取、PCR反应体系的配制和扩增以及产物电泳均在不同的房间进行,加样移液器分开专用,检测中皆应用阴、阳性对照。

6. 统计学分析:用SPSS 13.0软件进行统计分析,率的比较用 $\chi^2$ 检验。

### 结 果

1. 蝉鉴定:2个旅游区共采集蝉849只,分为1科3属3种,包括硬蜱属的全沟硬蜱、血蜱属的嗜群血蜱和革蜱属的森林革蜱(表1)。两地蝉种构成差异有统计学意义( $\chi^2=228.409, df=2, P=0.000$ ),W区和J区的优势蝉种分别为全沟硬蜱和嗜群血蜱。

表1 2010年黑龙江省2个旅游区游离蝉捕获数

旅游区	全沟硬蜱	嗜群血蜱	森林革蜱	合计
W	696	33	4	733
J	40	75	1	116
合计	736	108	5	849

2. PCR检测:在不同区域内的全沟硬蜱中存在不同程度的*B.b.s.l*和SFGR复合感染,而嗜群血蜱未发现复合感染现象,捕获的5只森林革蜱仅发现1只感染SFGR(表2)。W区内嗜群血蜱中*B.b.s.l*的感染率(Fisher's 检验,  $P=0.027$ )以及全沟硬蜱中复合感染率( $\chi^2=4.104, P=0.043$ )均高于J区。此外,W区中*B.b.s.l*在全沟硬蜱中的感染率高于其在嗜群血蜱中的感染率( $\chi^2=4.841, P=0.028$ );而J区中*B.b.s.l*在全沟硬蜱中的感染率高于嗜群血蜱的感染率(Fisher's 检验,  $P=0.001$ ),同时该区全沟硬蜱的复合感染率高于嗜群血蜱(Fisher's 检验,  $P=0.013$ )。

3. 序列分析:随机抽取蜱*B.b.s.l*和SFGR中PCR

扩增阳性片段 97 份和 29 份测序。

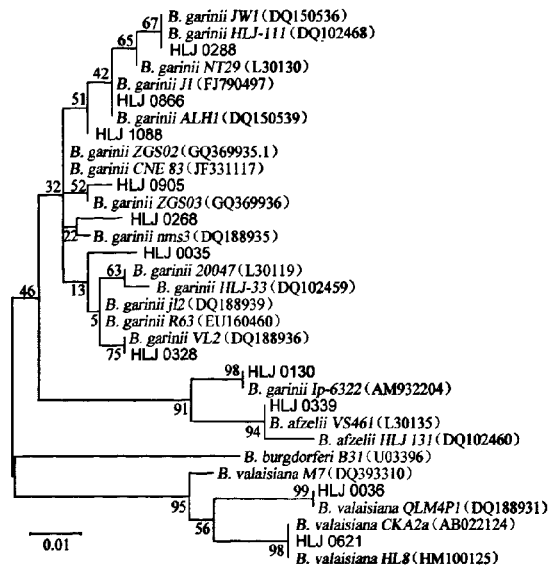
表 2 PCR 检测蜱标本感染病原状况

蜱种	检测只数	感染病原只数及构成比(%)		
		<i>B.b.s.l</i>	SFGR	复合感染
<b>W 区</b>				
全沟硬蜱	696	182(26.15)	70(10.05)	25(3.59)
嗜群血蜱	33	3(9.09)	3(9.09)	0(0.00)
森林革蜱	4	0	1	0
<b>J 区</b>				
全沟硬蜱	40	6(15.00)	5(12.50)	4(10.00)
嗜群血蜱	75	0(0.00)	10(13.33)	0(0.00)
森林革蜱	1	0	0	0

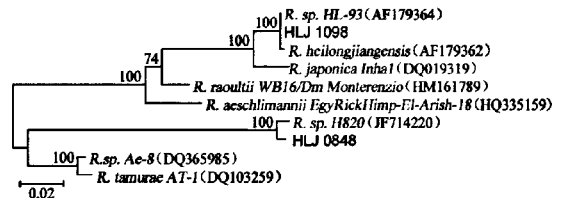
(1) *B.b.s.l*: 经 Blast 和 Mega 5.0 软件比对分析后, 将 *B.b.s.l* 97 份阳性序列归类为 11 种不同基因亚型, 各代表序列分别以该地区蜱捕获编号命名为 HLJ 0035、HLJ 0036、HLJ 0130、HLJ 0268、HLJ 0288、HLJ 0328、HLJ 0339、HLJ 0621、HLJ 0866、HLJ 0905 和 HLJ 1088, 所占构成比分别为 1.03%、3.09%、6.18%、7.22%、7.22%、17.52%、9.28%、1.03%、39.17%、3.09% 和 5.15%, 其中 HLJ 0328 和 HLJ 0866 为优势基因型。所测序列与 GenBank 中序列进行同源性比较并构建系统发育树。由图 1 所示其分型包括伽氏疏螺旋体 (*B. garinii*)、嘎氏疏螺旋体 (*B. afzelii*) 和一个未分类的基因群 (*B. valaisiana-like group*)。 *B. garinii* 型为优势基因型, 比例高达 86.59%; 其次是 *B. afzelii* 型占 9.27%; 首次在东北地区发现 *B. valaisiana-like group* 型, 所占比例为 4.12%。研究序列有 8 种不同的 *B. garinii* 亚型, 其中 6 类与已知的 *B. garinii* 亚型同源性为 100%, 以 HLJ 0035 和 HLJ 0268 为代表的两亚型分别与接受号为 JF331117 (碱基突变位置: 40、81、127) 和 JF331076 (碱基突变位置: 90、108、144) 存在个别碱基突变; 而样本中检测出的 *B. afzelii* 型同标准株 *B. afzelii* VS461 同源性为 100%; 此外还在该地区新发现的属于 *B. valaisiana-like group* 新型 *B.b.s.l* 可归为两类, 分别与台湾和贵州地区发现的亚型同源性为 100%。

(2) SFGR: 所测 29 份 SFGR 序列经分析归为 2 类, 同理命名为 HLJ 0848 和 HLJ 1098, 构成比分别为 72.41% 和 27.59%。从 GenBank 选取部分 SFGR 序列构建发育树 (图 2)。HLJ 0848 与我国虎林地区分离到的 *Rickettsia* sp. HL-93 序列完全一致<sup>[4]</sup>, 而 HLJ 1098 与我国东北地区 (未发表) 发现的 *Rickettsia* sp. H820 的同源性为 100%。

4. 优势蜱种监测: W 区全沟硬蜱自 5 月出现, 逐渐上升至 7 月出现高峰, 8 月蜱虫数下降; J 区嗜群血



注: 括号内为序列号; 黑体字为本研究序列  
图 1 基于 *B.b.s.l* 的 5S ~ 23S rRNA 片段构建系统发育树



注: 同图 1  
图 2 基于 SFGR 的 *OmpA* 基因片段构建系统发育树

蜱 5 月出现, 6 月上旬出现高峰, 之后逐渐回落, 7 月鲜见, 8 月未能捕获到蜱虫 (图 3)。W 区全沟硬蜱在其流行季节开始时感染 *B.b.s.l* 的比例较高, 6 月回落, 至 8 月其感染率一直在小范围内波动, 经统计学检验, 不同时间段感染率差异无统计学意义; SFGR 感染率在不同时间段的差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 12.638, P = 0.005$ )。J 区嗜群血蜱可感染 SFGR 但未见其感染莱姆病螺旋体, 该旅游区中优势蜱种 SFGR 感染率同 W 区在不同时间段出现波动, 但差异无统计学意义 (图 3)。

### 讨 论

本研究显示不同生境中蜱密度以及蜱种有明显不同<sup>[5]</sup>, 再次证实生境对蜱分布有影响, 全沟硬蜱多栖息于以针阔混交林为主的 W 区, 而嗜群血蜱则生活在以落叶林和草坡为主的 J 区。全沟硬蜱可自然感染和携带 *B.b.s.l*、SFGR 两种病原, 且感染率均明显高于嗜群血蜱, 其传播作用不容轻估; 嗜群血蜱也感染上述两种病原, 但感染率较低; 而捕获的森林

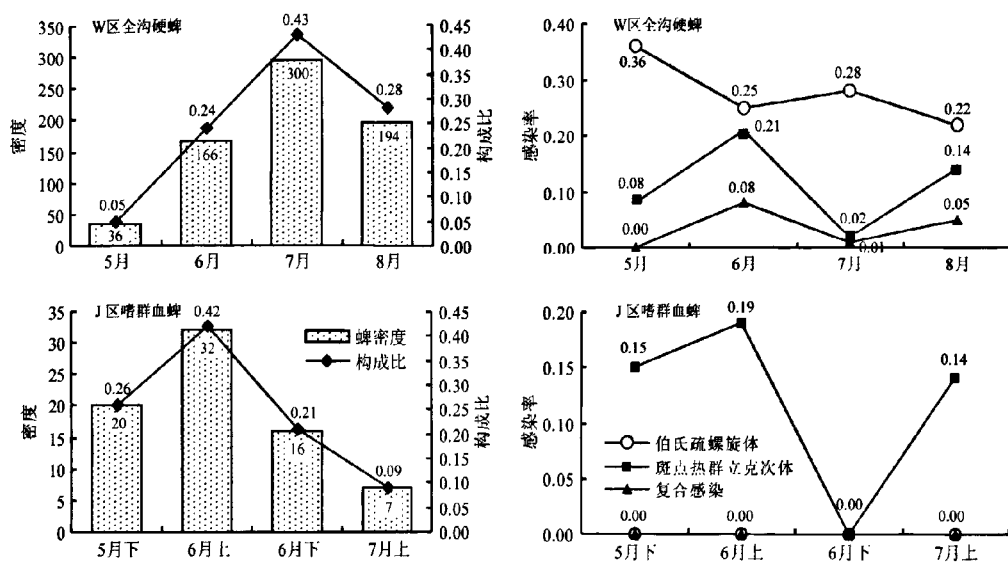


图3 2010年黑龙江省两旅游区优势蜱种分布及其感染病原状况监测

革蜱,在所调查生境中处于劣势,其相关意义还有待研究。优势蜱种监测表明,全沟硬蜱(游离蜱)活动高峰出现在7月,而嗜群血蜱(游离蜱)则是6月底,与其他研究结果一致<sup>[6]</sup>。除季节消长外,昼夜变化对蜱活动亦存在明显影响<sup>[6,7]</sup>,且蜱活动规律因种类不同而有差异,蜱的昼夜活动规律亦与当地气候密切相关。

本研究检测出 11 种 *B.b.s.l* 基因亚型和 2 类 SFGR。表明我国蜱中 *B.b.s.l* 有多多样性,以 *B. garinii* 为优势型。研究中检测出一类 *B. garinii* 亚型(HLJ 0130)在发育树上形成以独立分支,该分支与其他亚型 *B. garinii* 所在的分支较远,但与 *B. afzelii* 亚型形成的分支较近。有研究指出这种不典型的亚型基因序列可能是 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 部分片段重组的结果<sup>[8]</sup>。此外,首次在东北地区全沟硬蜱中检测出 2 株 *B. valaisiana*-like group, 分别与我国贵州和台湾地区检测到的菌株完全一致,提示在东北地区发现的 *B. valaisiana*-like group 亚型很可能是从外省带入。由于蜱类自身活动范围十分有限,认为上述亚型的出现与宿主动物活动密切相关,特别是蜱可借助候鸟类宿主向远方扩散;其次是人群活动,蜱虫多通过叮咬感染外来人群而后更换宿主实现蜱媒传染病的远距离扩散。该地区 *B.b.s.l* 基因型多样性是否与环境变化等因素有关联需进一步探索。SFGR 序列分析显示该两种类型均与我国已发现的 SFGR 同源性为 100%,未发现新型。

黑龙江省两旅游区蜱类中存在 *B.b.s.l* 和 SFGR 的复合感染,且蜱中感染病原的基因型丰富多样;监测显示不同生境、不同时间其蜱种、蜱密度以及蜱携

带病原状况均有所不同,旅游区可根据季节消长特征和环境管理采取合理方法,制定有效防治措施。

参 考 文 献

- [1] Wan KL, Zhang ZF, Zhang JS, et al. Preliminary investigation on Lyme disease in animals in 20 provinces, cities and autonomous regions of China. Chin J Vector Biol Control, 1998, 9(5): 366-368. (in Chinese)  
万康林,张哲夫,张金声,等.中国20个省、区、市动物莱姆病初步调查研究.中国媒介生物学及控制杂志,1998,9(5):366-368.
- [2] Lee SH, Kim BJ, Kim JH. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from Korea by 16S rDNA sequence analysis and PCR-RFLP analysis of *rrf* (5S) -*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. Int Syst Evol Micro, 2000, 50: 857-863.
- [3] Roux V, Fournier PE, Raoult D. Differentiation of spotted fever group *Rickettsiae* by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. J Clin Microbiol, 1996, 34: 2058-2065.
- [4] Zhang JZ, Fan MY, Wu YM, et al. Genetic classification of '*Rickettsia heilongjiangii*' and '*Rickettsia hulunii*' two Chinese spotted fever group rickettsiae. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3498-3501.
- [5] Yang LW, Hou Y, Li M, et al. Study of tick-borne pathogens at Heilongjiang Port. Chin Frontier Health Quarant, 2007, 30(2): 77-82. (in Chinese)  
杨丽炜,侯咏,李明,等.黑龙江口岸蜱类及其携带病原体状况的初步研究.中国国境卫生检疫杂志,2007,30(2):77-82.
- [6] Meng YC, Li CP, Liang GG. Acarology and human diseases. Beijing: Press of University of Science and Technology of China, 1995: 66-67. (in Chinese)  
孟阳春,李朝品,梁国光. 蜱螨与人类疾病.北京:中国科学技术大学出版社,1995:66-67.
- [7] Li CP. Medical Acarology. Beijing: People's Military Medical Press, 2006: 75. (in Chinese)  
李朝品. 医学蜱螨学.北京:人民军医出版社,2006:75.
- [8] Mediannikov OY, Ivanov L, Zdanovskaya N, et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russian Far East. Microbiol Immunol, 2005, 49: 191-197.

(收稿日期:2011-11-28)

(本文编辑:张林东)