

# 我国莱姆病的流行病学和病原学研究

张哲夫 万康林 张金声 朱桂凤 窦桂兰  
李牧青 郑理 梁军钢 侯学霞 王宏英

**摘要** 1987~1996 年对 22 个省(市、区)的 60 个县、区进行了莱姆病的调查研究。血清流行病学证实 22 个省(市、区)林区人群均存在莱姆病感染,感染率平均为 5.06% (1724/34104)。病原学证实 17 个省(市、区)存在莱姆病自然疫源地。11 个省(市、区)有典型病例存在。东北林区患病率为 1%~4%。全沟硬蜱是我国北方林区莱姆病螺旋体的主要生物媒介,南方的粒形硬蜱和二棘血蜱在传播中可能起重要作用。姬鼠属可能是莱姆病螺旋体的主要贮存宿主。从病人、蜱或动物中分离出 130 株莱姆病螺旋体,中国菌株 SDS-PAGE 蛋白图形、质粒谱和 DNA 限制性内切酶谱与北美菌株显著不同。rRNA 基因多态性分析,中国菌株可被分为三个基因种,其中第一基因种 (*B. burgdorferi sensu stricto*) 在亚洲是首次发现。

**关键词** 莱姆病 莱姆病螺旋体 基因种

**Studies on Epidemiology and Etiology of Lyme Disease in China** Zhang Zhe-fu, Wan Kang-lin, Zhang Jin-sheng, et al. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

**Abstract** From 1987 to 1996, an investigation and study on Lyme disease was conducted in sixty counties and districts of twenty-two provinces (autonomous region, municipality). Seroepidemiological findings indicated that some residents from forest areas of twenty-two provinces had a high antibody titer for *Borrelia burgdorferi* with positive rate 5.06% (1724/34104). Endemic foci of Lyme disease were discovered in seventeen provinces by etiological evidence. Typical cases of Lyme disease were diagnosed in eleven provinces. Prevalence rate of Lyme disease in forest region of northeast China was 1% - 4%. *Ixodes persulcatus* played a leading role in the transmission of *Borrelia burgdorferi* to human in northern part of China. *Ixodes granulatus* and *Haemaphysalis bispinosa* might serve as principal vector of *Borrelia burgdorferi* in the southern region. Genus *apodemus* might serve as a major reservoir for *B. burgdorferi*. A total number of 130 isolates of *B. burgdorferi* were recovered from patients, ticks or animals. Isolates from China were obviously different from the ones isolated in North America in SDS - PAGE protein profile, plasmid and REA. The analysis of rRNA gene restriction patterns indicated that the Chinese isolates were divided in three genospecies. Genospecies I (*B. burgdorferi sensu stricto*) was firstly discovered in Asia.

**Key words** Lyme disease *Borrelia burgdorferi* Genospecies

1987~1996 年,我们与地方有关单位协作,在 22 个省(市、区)开展莱姆病的调查研

究。流行病学研究表明,莱姆病在我国分布相当广泛,东北和内蒙古林区是主要疫区。病原学研究表明,中国菌株异质性较大,至少可分为三个基因种。

作者单位:中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206

本研究由卫生部科学研究基金和国家自然科学基金资助

## 材料与方 法

一、调查点:1987~1996 年先后在黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、北京、新疆、宁夏、青海、河南、湖北、湖南、广东、山东、江苏、浙江、江西、福建、安徽、云南、贵州、四川等 22 个省(市、区)的 60 个县、区开展莱姆病调查研究。根据地理环境、植被,选择有代表性的调查点,按统一表格进行流行病学调查。

二、血清学:在调查点,采用整群抽样法,选择若干林场或大队,采集人群血清,进行间接荧光抗体试验(IFA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)。IFA 用 B<sub>31</sub> 代表株制备抗原片,抗体效价 IgM $\geq$ 1:64, IgG $\geq$ 1:128, 或双份血清抗体效价有 4 倍升高者为阳性。ELISA 用 B<sub>31</sub> 代表株制备超声波抗原,以 20 $\mu$ g/ml 包被酶联反应板。将 1 000 份健康人血清稀释为 1:500,测定其抗 B<sub>31</sub> 抗体吸光度(A),计算平均数和标准差。被检血清 A 值 $\geq$ 平均数 + 3 个标准差,为阳性<sup>[1]</sup>。全部血清标本均用 IFA 检测,部分血清标本同时用 IFA 和 ELISA 检测。用以上方法判定的阳性血清标本均进行钩体显凝试验和梅毒USR 试验。

三、病人:对疑似病人进行个案调查。蜱叮咬后皮肤出现直径 $\geq$ 5cm 的游走性红斑,或在蜱叮咬后数周、数月或数年出现心脏异常症状、神经系统损伤、骨关节病及慢性萎缩性皮炎等临床表现之一者,加上血清学证据,可确定为莱姆病患者。

四、媒介昆虫:在黑龙江、吉林、辽宁、新疆、宁夏、河北、内蒙古、北京、湖北、湖南、广东、山东、安徽、江苏、福建、云南、贵州、四川等省、市用布旗法在林间草地采集蜱,少部分从鼠、兔、狗和牛体上采集。对蜱进行分类鉴定后,用直接荧光抗体法检测蜱的中肠带菌情况,用 BSK II 培养基从蜱分离螺旋体。

五、动物:在黑龙江、辽宁、内蒙古、湖北、湖南、广东、四川、江苏、福建等省林区草地放鼠笼,捕捉活鼠,从鼠的眼球后取血,用间接

荧光抗体法检测抗体,排除钩体感染后,抗体效价 $\geq$ 1:64,为阳性。无菌解剖取肝肾放入 BSK II 培养基,进行病原分离。在黑龙江省牡丹江林区和四川省南川县林区,采集 1 岁以上狗的血清,用间接荧光抗体法检测抗体,排除钩体感染后,抗体效价 $\geq$ 1:64,为阳性。

## 六、病原分离和鉴定:

1. 病原分离:BSK II 培养基由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所制备。取蜱的中肠组织,取鼠的肝肾,取病人的皮肤红斑组织,血液、脑脊液接种培养基,33 $^{\circ}$ C 培养,每周检查一次,连续检查 2 个月。

2. 超微结构:用中国 M<sub>7</sub> 株和美国 B<sub>31</sub> 株,进行电镜检查并进行比较。

3. 单克隆抗体反应:应用单克隆抗体 H5332、H6831 和 H9724 对中国菌株进行间接荧光抗体试验。上述单克隆抗体由美国 Schwan 博士赠送。

4. 选用 21 株中国代表菌株、北美代表株 B<sub>31</sub>、及俄罗斯代表株 IP<sub>21</sub> 进行 SDS-PAGE 蛋白图形、质粒谱和限制性内切酶分析。SDS-PAGE 蛋白图形,用不连续丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,考马斯亮兰染色。质粒谱<sup>[2]</sup>,提取质粒,琼脂糖凝胶浓度为 0.2%,电泳缓冲液为 0.5 $\times$  TBE。限制性内切酶分析<sup>[3]</sup>,提取全细胞和染色体 DNA,用 Hind III 和 EcoR I 消化,0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

5. rRNA 基因多态性分析<sup>[4]</sup>:选用 45 株中国代表株和 6 株不同基因种的国外代表株,提取上述菌株染色体 DNA,用 Hind III 和 EcoRV 消化,电泳,转膜。用地高辛标记大肠杆菌 16 + 23S rRNA 基因为探针,进行 Southern 杂交。

## 结 果

### 一、莱姆病的分布:

1. 人群感染情况:在 22 个省(市、区)共采集血清 34 104 人份,1 724 血清标本呈阳性反应,阳性率平均为 5.06%。上述省(市、

区)林区人群均存在莱姆病感染。感染率在10%以上有黑龙江和内蒙古,在5%~10%之间有吉林、辽宁、湖北、河南、山东、安徽、江西、四川、贵州、云南和宁夏,在5%以下有河北、北京、新疆、青海、湖南、广东、江苏、浙江和福建。其中新疆、浙江二省区血清标本少于500人份,缺乏代表性,其他省区可反映出人群感染状态。各年龄组对莱姆病普遍易感,以青壮年人群感染率较高,50岁以上感染率呈下降趋势。男女感染率差别不显著。职业分布,以野外工作者感染率较高,特别是伐木工人。

2. 病人发现和流行情况:经流行病学调查、临床检查,结合血清学和病原学综合诊断,黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、新疆、河北、湖北、四川、福建、安徽和北京等11个省(市、区)有病例发现和流行。内蒙古和东北林区莱姆病流行比较严重。例如黑龙江省牡丹江林区,在调查的2718个居民中,发现莱姆病患者74例。不同地理环境的居民,其患病率不同,这与蜱叮咬的机会有关,不同的居民点,其患病率分布在1%~4.5%之间。在牡丹江林业医院观察170例莱姆病患者,其临床主要表现为慢性游走性红斑、面神经麻痹、脑膜脑炎、末梢神经炎、关节炎等,还有少数几例表现为老年性痴呆和精神异常。四川省南川县35例患者中,关节炎13例,面神经麻痹7例,慢性游走性红斑7例,多发性神经炎5例,脑膜炎2例,心脏异常1例。1995~1996年,在北京地区观察了53例莱姆病患者,其中80%是神经系统受损伤,临床主要表现为面神经麻痹、脑膜炎、脑炎、脊髓炎、多发性神经炎和神经根炎。皮肤红斑、萎缩性皮炎和关节炎占20%。

二、生物媒介:1987~1996年,共采集蜱约15000只;其中有全沟硬蜱、粒形硬蜱、锐跗硬蜱\*、卵形硬蜱、森林革蜱、边缘革蜱、嗜群血蜱、二棘血蜱、长角血蜱、亚洲璃眼蜱和微小牛蜱。从全沟硬蜱、粒形硬蜱、锐跗硬蜱、嗜群血蜱、二棘血蜱和长角血蜱分离

出112株莱姆病螺旋体,其中89株是从全沟硬蜱分离的。在东北、西北和华北,采集蜱9000余只,其中全沟硬蜱占总数的80%。全沟硬蜱中肠带菌率为20%~45%。

三、贮存宿主:从黑龙江、辽宁、内蒙古、四川、江苏、福建、湖北、湖南、广东等省捕获啮齿动物,其中有黑线姬鼠、大林姬鼠、棕背鼯、花鼠、莫氏田鼠、白腹鼠、白腹巨鼠、社鼠、针毛鼠、褐家鼠和华南兔。从黑线姬鼠、棕背鼯、花鼠、白腹鼠、社鼠、褐家鼠和华南兔分离出10株莱姆病螺旋体,特别是从黑线姬鼠胎鼠分离出莱姆病螺旋体具有重要意义。血清学结果表明,黑线姬鼠感染率较高。黑龙江海林县和四川南川县狗的感染率分别为38.5%(52/135)和60%(12/20)。

四、病原分离和鉴定:从黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、新疆、宁夏、山东、安徽、江苏、福建、四川、贵州、湖北、湖南、广东和北京等省(市、区)的病人、蜱或动物中分离出130株莱姆病螺旋体,其中病人8株、动物10株、蜱112株。

1. 超微结构:电镜比较中国M<sub>7</sub>和美国B<sub>31</sub>菌株,两者基本形态和结构相同,但鞭毛数量有所区别,B<sub>31</sub>菌株具有7和11根鞭毛组成的疏螺旋体,而M<sub>7</sub>菌株至少有7和12根鞭毛。

2. 单克隆抗体反应:85%中国菌株对H5332呈阳性反应,19%中国菌株对H6831呈阳性反应,全部中国菌株对H9724呈阳性反应。而北美菌株对三个单克隆抗体均呈阳性反应。

3. SDS-PAGE 蛋白图形:中国菌株主要蛋白呈高度多态性,主要外表蛋白OspA和OspB分子量偏高,其中OspA多在31.5~32KDa, OspB多在35.5~36KDa之间,中国部分菌株还具有OspC(20~23KDa)。仅有几个中国菌株与北美菌株蛋白图形一样。北美菌株主要蛋白图形比较一致(OspA为

\* 以前曾误定为壤塘硬蜱。

31KDa, OspB 为 34KDa)。

4. 质粒谱: 中国菌株具有 3~7 条可见质粒带, 大小在 15~53Kb。与北美菌株比较, 中国菌株最大线形质粒为 53Kb, 而北美菌株的最大线形质粒为 49Kb。

5. 限制性内切酶分析: 用 HindIII 酶切中国菌株全细胞 DNA 产生的片段较多, 可分辨出 20 余条带。根据带的模型分析, 只有几个中国菌株与北美菌株一致。大部分中国菌株与北美菌株不同。

6. rRNA 基因多态性分析: 表明中国菌可分属于三个基因种, 即 Genospecies I (*B. burgdorferi sensu stricto*), Genospecies II (*B. garinii*) 和 Genospecies III (*B. afzelii*)。其中 *B. burgdorferi sensu stricto* 基因种在亚洲菌株中是首次发现。一个中国菌株 HB<sub>18</sub> 基因谱与国内外其他菌株不同。

## 讨 论

通过 9 年多的流行病学和病原学研究, 证明我国 22 个省(市、区)林区人群存在莱姆病感染, 并从 17 个省(市、区)的病人、蜱或动物分离出莱姆病螺旋体。以上结果表明, 莱姆病在我国分布相当广泛。大兴安岭、小兴安岭、长白山、燕山和天山林区是全沟硬蜱主要分布地区, 是莱姆病的主要疫区, 每年至少上万新发病例, 莱姆病对人群危害极大, 除皮肤损伤外, 神经系统损伤和骨关节病, 可使病人有不同程度的活动障碍和肢体瘫痪。重视对莱姆病的防治和研究是我国政府和广大医务工作者面临的重要课题。全沟硬蜱是我国北方莱姆病螺旋体的主要生物媒介<sup>[5]</sup>。南方的主要生物媒介是粒形硬蜱或二棘血蜱需要进一步研究。姬鼠属可能是莱姆病螺旋体的主要贮存宿主, 从黑线姬鼠胎鼠分离出莱姆病螺旋体, 对该病疫源地维持机理可能有重要意义。中国莱姆病螺旋体表型和基因型研究表明, 中国菌株表型的多样性和遗传基因差异性较大。蛋白分析、质粒分析和限制性内切酶分析存在着十分紧密的相关性,

可将中国菌株分为三个组<sup>[6,7]</sup>, 4 株中国菌株和北美 B<sub>31</sub> 分在第一组。大部分中国菌株在第二和第三组。Postic 用 rRNA 基因多态性分析将莱姆病螺旋体分为四个基因种<sup>[8]</sup>。我们研究结果表明, 中国菌株至少可分为三个基因种<sup>[9]</sup>, 北方以 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 居多, 而南方以 *B. burgdorferi sensu stricto* 为主。基因种的研究在流行病、临床、诊断和预防上有重要的指导意义。

(参加本工作的还有尚振忠、潘亮、张方振、李优良、阎大成、谢杏初、杨秀峰、张德才、沈壮、田万春、史良才、王子敏、宋孝禄、王丽娟、肖国玲、李林村、张立新、张韶声、马海滨、翁超然、樊伟方、周全彦、郝瑞峰、李志刚、贾文春等为代表的协作单位)

## 参 考 文 献

- 1 Russell H, Sampson JS, Schmid GP, et al. Enzyme-linked immuno-fluorescence assay for Lyme disease. *J Infect Dis*, 1984, 149:465.
- 2 Barbour AG. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol*, 1988, 26:475.
- 3 Lefebver RB, Lane RS, Perng GC, et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolates by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, 1989, 27:636.
- 4 Baranton G, Postic D, Girons IS, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov, and Group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Inter J Syst Bacteriol*, 1992, 42:378.
- 5 张哲夫, 窦桂兰, 张金声, 等. 中国莱姆病螺旋体生物媒介的初步调查. *中华流行病学杂志*, 1992, 13:271.
- 6 李牧青, 王建辉, 张哲夫. 中国莱姆病螺旋体流行菌株的蛋白分析. *中国人兽共患病杂志*, 1994, 10:14.
- 7 Li Muqing, Wang Jianhui, Zhang Zhefu, et al. Phenotypic and genotypic analysis of Chinese *Borrelia burgdorferi* from various sources, Lyme borreliosis, Edited by Axford JS and Rees DHE, Plenum Press, New York, 1994, 217-225.
- 8 Postic D, Assous M, Grimont PAD, et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf(5S) - rrl(23S) intergenic spacer amplicons. *Inter J Syst Bacteriol*, 1994, 44:743.
- 9 梁军钢, 张哲夫. 中国莱姆病螺旋体 rRNA 基因多态性分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1996, 16:359.

(收稿:1996-09-23 修回:1996-10-11)