

## · 现场调查 ·

吉林省琿春地区蜱中伯氏疏螺旋体与  
斑点热群立克次体复合感染研究

黄海楠 丁壮 何静 吴晓明 蒋宝贵 高燕 褚宸一 詹琳  
赵秋敏 王玉福 曹务春

**【摘要】** 目的 了解吉林省琿春地区伯氏疏螺旋体与斑点热群立克次体的复合感染情况。方法 运用 PCR 方法对吉林省琿春地区采集的蜱标本,进行伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 间隔区基因与斑点热群立克次体外膜蛋白 A(ompA) 基因的检测。测序并用 PHYLIP 软件进行序列分析。结果 全沟硬蜱中伯氏疏螺旋体感染率为 36.0%,在全沟硬蜱中检测到了斑点热群立克次体的感染,其感染率为 2.0%。二者的复合感染率为 2.0%;森林革蜱中伯氏疏螺旋体感染率 30.9%,斑点热群立克次体感染率 29.1%,二者的复合感染率 16.8%。伯氏疏螺旋体的序列分析显示吉林地区的伯氏疏螺旋体都属于 *B. garinii* 基因型,同源性较高。对斑点热阳性片段序列分析表明新测序序列与斯洛伐克新发现的 IRS3 株和 IRS4 株核苷酸序列同源性为 97%。结论 吉林省琿春地区全沟硬蜱及森林革蜱中检测到伯氏疏螺旋体与斑点热群立克次体的感染,并检测到 2 种病原体的复合感染情况。

**【关键词】** 斑点热群立克次体;伯氏疏螺旋体;序列分析;复合感染

**Study on the coinfection status of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and spotted fever group *Rickettsia* in ticks from Hunchun, Jilin province** HUANG Hai-nan\*, DING Zhuang, HE Jing, WU Xiao-ming, JIANG Bao-gui, GAO Yan, CHU Chen-yi, ZHAN Lin, ZHAO Qiu-min, WANG Yu-fu, CAO Wu-chun. \*State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

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

**【Abstract】 Objective** To understand the coinfection status of *Borrelia burgdorferi sensu lato* (B. b. s. l) and spotted fever group *Rickettsia* (SFGR) in Hunchun of Jilin province, China. **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 collected in Hunchun, Jilin province. The amplification products of positive ticks were sequenced, and phylogenetic analysis was conducted by PHYLIP software package. **Results** The infection rate of B. b. s. l was 36.0% in *Ixodes persulcatus* ticks and the SFGR was discovered in *I. persulcatus* ticks, with an infection rate of 2.0%. The coinfection rate of both agents was 2.0%. In 327 *Dermacentor silvarum* ticks, the positive rates of B. b. s. l and SFGR were 30.9% and 29.1% respectively. 55 ticks (16.8%) were coinfecting with the two pathogens. The sequence analysis of B. b. s. l showed that the B. b. s. l in Jilin area, which were highly homologous, all belonged to *B. garinii* genotypes. The sequence analysis of SFGR positive products showed that the DNA sequence of the newly detected agent (JL-95) was close to the two previously described rickettsiae which were detected in *I. ricinus* from Slovakia (called IRS3 and IRS4). Phylogenetic relationships inferred from the comparison of these sequences with those of other genus *Rickettsia* indicated that JL-95, IRS3 and IRS4 constituted a new rickettsial genotype and formed a separate cluster among the spotted fever group *Rickettsia*. **Conclusion** Coinfection of B. b. s. l and SFGR existed in Hunchun, Jilin province. The sequencing of specific fragment confirmed a new SFGR which was different from other rickettsiae known in China.

**【Key words】** Spotted fever group *Rickettsia*; *Borrelia burgdorferi sensu lato*; Sequence analysis; Coinfection

基金项目: 国家科技攻关计划课题资助项目(2003BA712A05-01)

作者单位: 100071 北京, 军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室(黄海楠、何静、吴晓明、蒋宝贵、高燕、褚宸一、詹琳、赵秋敏、曹务春); 吉林大学畜牧兽医学院重要病原与疫病研究室(丁壮); 吉林省畜牧兽医总站(王玉福)

通讯作者: 曹务春, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn.

黄海楠与丁壮同为第一作者

莱姆病和斑点热都是蜱传的人畜共患传染病。病原体分别是伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体。我国于 1962 年和 1986 年首次在黑龙江省发现斑点热和莱姆病,并证实黑龙江省存在自然疫源地<sup>[1,2]</sup>。吉林省珲春地区的气候、自然环境及蜱种与黑龙江省的疫源地极为相似,但蜱传疾病的研究资料匮乏,本文对该地区的莱姆病、蜱传斑点热及其复合感染情况进行了研究。

材料与方 法

1. 标本采集及生境:珲春位于吉林省东部,其东部与俄罗斯的滨海地区接壤,属于东北界东北区长白山亚区,该地区位于北纬 43°25'~48°21',东经 130°7'~131°34',海拔高度 40~1100 m 不等。气候属于半湿润季风气候区,年平均气温 2.3℃~3.9℃,平均降雨量为 530 mm,平均湿度 67%,无霜期 151~152 天。2005 年 4 月末、5 月初在吉林省珲春林区针阔混交林以及灌木丛中用布旗法采集游离蜱,同时从当地家畜及野鼠的体表收集蜱。

2. 模板 DNA 的制备:将采集的蜱标本用 75% 的酒精浸泡体表消毒,然后用生理盐水洗 3 次,滤纸吸干。将单只蜱放入一个 1.5 ml 离心管中,加入 TE 50 μl,研碎后 100℃ 煮 10 min,5000 r/min 离心 5 min 取上清 -20℃ 储存备用。

3. 聚合酶链反应(PCR)扩增:

(1)引物:伯氏疏螺旋体参照文献[3]采用巢式 PCR 扩增,以伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 间隔区两侧基因保守区合成以下内外引物 2 对。斑点热群立克次体参照文献[4]根据立克次体相对分子质量 ( $M_r$ ) $190 \times 10^3$  ompA 基因合成的引物(引物均由北

京三博远志生物技术有限责任公司合成)引物序列及位置如表 1。

(2)PCR 反应体系:伯氏疏螺旋体:20 μl 反应体系中含 10× 缓冲液(含 15 mmol/L  $Mg^{2+}$ ) 2 μl,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 0.4 μl, dNTP(10 mmol/L) 0.4 μl, 上下游引物(12.5 mmol/L) 各 0.4 μl, TaqDNA 聚合酶 1 U, 模板 2 μl。斑点热群立克次体:20 μl 反应体系中含 10× 缓冲液(含 15 mmol/L  $Mg^{2+}$ ) 2 μl, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μl, 上下游引物(10 mmol/L) 各 0.4 μl, TaqDNA 聚合酶 1 U, 模板 1 μl。

(3)PCR 扩增条件见表 2。

4. 测序及序列分析:将 PCR 阳性产物送上海英骏生物技术有限公司测序,双向测通并应用 NCBI 网站中的 BLAST 操作平台,将所测序列与 GenBank 中注册的 5S~23S rRNA 间隔区和 RrompA 的序列进行同源性比较,选择代表性的参照菌株,用 CLUSTALx 1.83 软件对目标序列进行比对排列,然后运行 PHYLIP 3.63 软件中 SEQBOOT 程序,Bootstrap 分析重复数为 1000,采用 Jukes-cantor 距离模式,选用 Neighbor-Joining(NJ)建树方法,依次运行 DNADIST、NEIGHBOR 和 CONSENSE 程序得到系统进化树。

结 果

1. 蜱类构成:共采集 427 只蜱标本,其中饱血蜱 35 只,游离蜱 392 只。所获蜱经分类鉴定分属于革蜱属的森林革蜱和硬蜱属的全沟硬蜱。其中全沟硬蜱 100 只占 23.4%,森林革蜱 327 只占总数的 76.6%,为优势种群。

2. PCR 检测结果:全沟硬蜱中伯氏疏螺旋体感

表1 用于检测复合感染的引物

病名	引物名称	序 列	长度(bp)	位置(bp)
莱姆病	23S3(+)	5'-CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC-3'	21	3084~3104
	23Sa(-)	5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'	24	3495~3472
	23S6(+)	5'-TCCTAGGCATTACCCATA-3'	18	3105~3122
	23S5(-)	5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3'	18	3358~3341
斑点热	ompA190 70p(+)	5'-ATGGCGAATATTCTCCAAAA-3'	21	70~90
	ompA190 701n(-)	5'-GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3'	21	701~681

表2 检测复合感染的 PCR 扩增条件

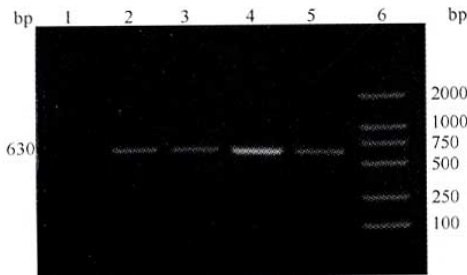
引物	预变性(℃, min)	变性(℃, s)	退火(℃, s)	延伸(℃, s)	循环数	最后延伸(℃, min)	扩增片段(bp)
23S3/23Sa	96, 2	94, 30	55, 30	72, 40	30	72, 7	412
23S6/23S5	96, 2	94, 30	59, 30	72, 40	30	72, 7	254
ompA	95, 3	94, 15	54, 30	70, 30	35	70, 7	632

染率36.0%，斑点热群立克次体的感染率为2.0%。二者的复合感染率为2.0%；森林革蜱中伯氏疏螺旋体感染率30.9%，斑点热群立克次体感染率29.1%，二者的复合感染率16.8%（表3）。伯氏疏螺旋体在全沟硬蜱中的感染率36.0%，高于在森林革蜱中的感染率30.9%，但差异没有统计学意义( $\chi^2 = 0.699, P = 0.403$ )；斑点热群立克次体在森林革蜱中的感染率29.1%显著高于在全沟硬蜱中的感染率2.0% ( $\chi^2 = 30.4, P < 0.05$ )；森林革蜱中的复合感染率16.8%，显著高于全沟硬蜱中的复合感染率2.0% ( $\chi^2 = 13.287, P < 0.05$ )。其中全沟硬蜱中检测到的2个斑点热群立克次体都存在着复合感染。具有一定的意义，因此选这2个斑点热为代表进行测序。伯氏疏螺旋体是随机选2个阳性标本进行测序。PCR产物电泳结果见图1和图2。

表3 PCR 检测结果

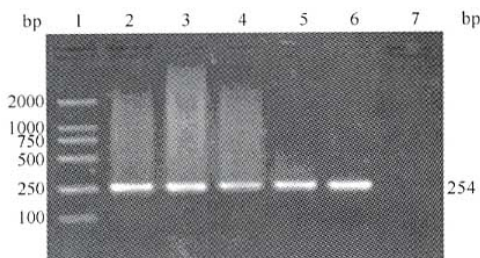
蜱种	只数	B. b. s. l (%)	SFGR (%)	复合感染率 (%) (B. b. s. l/SFGR)
全沟硬蜱	100	36(36.0)	2(2.0)	2(2.0)
森林革蜱	327	101(30.9)	95(29.1)	55(16.8)
合计	427	137(32.1)	97(22.7)	57(13.3)

注：括号外数据为阳性只数，括号内数据为阳性率



1: 阴性对照; 2, 3: 全沟硬蜱中斑点热阳性标本; 4, 5: 森林革蜱中斑点热阳性标本; 6: MarkerDL2000

图1 斑点热 PCR 扩增产物电泳结果

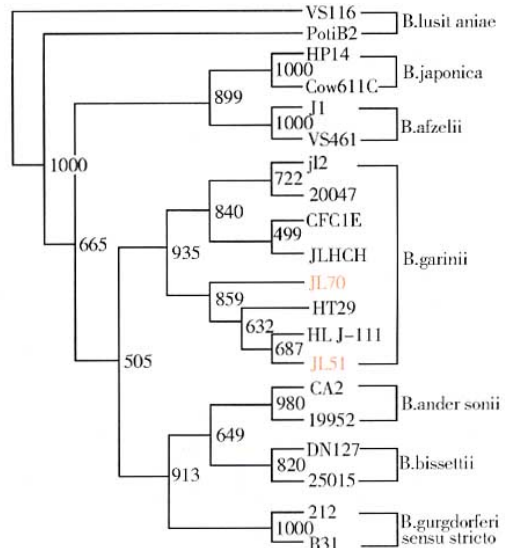


1: MarkerDL2000; 2~4: 全沟硬蜱中莱姆病阳性标本; 5, 6: 森林革蜱中莱姆病阳性标本; 7: 阴性对照

图2 莱姆病 PCR 扩增产物电泳结果

3. 序列测定结果与同源性比较:

(1)伯氏疏螺旋体:测序获得2个DNA序列分别命名为 JL51、JL70, 与 GenBank 中的 5S~23S rRNA 间隔区核苷酸序列进行同源性比较如图3所示。所测序列 JL51 与本室近几年从黑龙江省蜱中扩增出的 HLJ-111 (DQ102468) 同源性 100%, 与从吉林省珲春分离的菌株 JLHCH (DQ150549) 同源性为 98.4%, 与从吉林省长白山地区分离的菌株 j12 (DQ188939) 的同源性为 98.0%, 与国际标准株 NT29 同源性 99.6%。JL70 与 HLJ-111 同源性为 97.6%, 与 JLHCH 同源性为 97.6%, 与 j12 的同源性为 97.2%, 与 NT29 同源性 98.0%。JL70 与 JL51 之间的同源性为 97.6%。

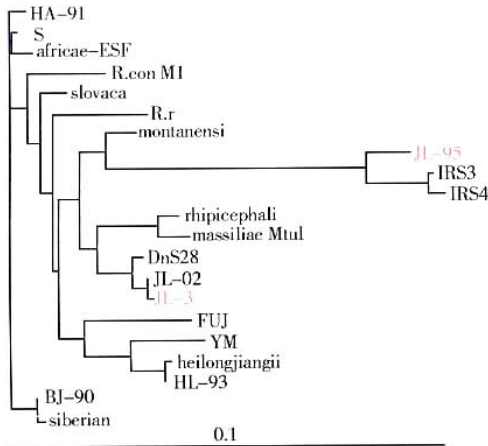


序列号: VS116 (L30134), PotiB2 (L30131), HO14 (L30128), Cow611C (L30125), J1 (L30129), VS461 (L30135), j12 (DQ188939), 20047 (L30119), CFC1E (AB178379), JLHCH (DQ150549), NT29 (L30130), HLJ-111 (DQ102468), CA2 (L30123), 19952 (L30118), DN127 (L30126), 25015 (L30122), 212 (L30121), B31 (L30127)

图3 莱姆病螺旋体 5S~23S rRNA 间隔区核苷酸序列同源性比较

(2)斑点热群立克次体:测序获得2个斑点热群立克次体DNA片段,分别命名为 JL-3 (DQ188830) 和 JL-95 (DQ188831)。去掉两端引物与 GenBank 中的 ompA<sub>M</sub> 190 × 10<sup>3</sup> 的核苷酸序列进行同源性比较并做聚类分析图(图4)。JL-3 与郝永建等<sup>[5]</sup>从吉林省长白山地区蜱中扩增出的 JL-02 序列同源性为 99.8%, 与 Rydkina<sup>[6]</sup> 等从西伯利亚地区分离的一株立克次体 DnS28 株同源性为 99.3%。JL-95 与

Sekeyova 等<sup>[7]</sup>从斯洛伐克分离的 IRS3 株和 IRS4 株同源性最高为 97.0%。图中看到我国的黑龙江省立克次体、HL-93、福建省立克次体以及日本立克次体组成一支;而本研究所测序列 JL-3 在由前苏联所测序列 DnS28 株和 JL-02 组成的分支上;JL-95 与斯洛伐克新发现的 IRS3 株和 IRS4 株在一个分支上,并且与其他分支距离较远。



序列号: S(U43805), africaeESF(U83436), R. conM1(U43794), montanensi(U43801), IRS4(AF141911), IRS3(AF141909), rhhipicephali(U43803), massiliaeMtul(U43799), DnS28(AF120018), JL-02(AY093696), FUJ(AF169629), YM(U43795), HL-93(AF179364), heilongjiangii(AF179362), slovaca(U43808), R. r(U43804), HA-91(U43796), siberian(U43807), BJ-90(AF179365)

图4 斑点热群立克次体 *ompA* 核苷酸序列聚类分析

## 讨 论

莱姆病螺旋体 PCR 扩增的引物是以伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 间隔区两侧基因保守区设计的。与其他细菌相比,莱姆病螺旋体 rRNA 基因的排列和结构比较独特,它含有 2 个拷贝的 *rrl*(23S) 和 *rrf*(5S),而只有 1 个拷贝的 *rrs*(16S)。*rrf* 和 *rrl* 以 *rrlA-rrfA-rrlB-rrfB* 的形式纵向排列并先后复制。*rrfA* 和 *rrlB* 之间存在 1 个 182 bp(B31) 的间隔区,它位于两保守的 *rrl* 和 *rrf* 基因间,本身却是高变的,较编码序列积累了更多的型间序列变异,这使其成为分析遗传变异的理想目标片段。5S~23S rRNA 基因间隔区的树状图分析能对我国莱姆病螺旋体进行基因种的鉴定。

斑点热群立克次体 PCR 扩增的引物是根据立克次体  $M_1$   $190 \times 10^3$  外膜蛋白 A 基因(*ompA*)序列设计的。*ompA* 基因是斑点热群立克次体特有的基

因<sup>[8]</sup>,由于该蛋白参与斑点热群立克次体的致病及免疫过程,因此可用作该群内种的鉴定。而且针对其抗原决定簇的免疫血清可以与所有斑点热立克次体发生交叉反应,提示此种蛋白及其基因存在于所有斑点热群立克次体中<sup>[9]</sup>,因此选择该序列片段设计引物具有较好的特异性;而且能够辨别出斑点热群立克次体基因型或基因亚型之间的差别,并利用该差别进行基因型或亚型的鉴定和分类研究。

Rr190.70p/Rr190.701n 是 *ompA* 基因用于序列分析最有效的一段序列。扩增片段长度为 629~632 bp,可以涵盖更多种类的斑点热群立克次体,还可以准确的把握斑点热群立克次体的变异,具有重要的分类学意义。

从珲春地区全沟硬蜱及森林革蜱中都检测到伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体的感染。伯氏疏螺旋体在全沟硬蜱中的感染率虽高于在森林革蜱中的感染率但没有显著差异。分析可能因为我国森林革蜱的分布同全沟硬蜱具有一定的重叠性,即使森林革蜱并不具备经期传播伯氏疏螺旋体的能力,但因为与全沟硬蜱共同吸血感染而使森林革蜱对螺旋体的保持能力增强,带菌率也就有所提高<sup>[10,11]</sup>,对莱姆病的传播也起到一定的促进作用。由于森林革蜱在珲春地区是优势蜱种,因此我们可以推断莱姆病在吉林地区的流行有增强的趋势,更应该采取相应的预防措施。

在吉林地区的全沟硬蜱中检测到 2 例斑点热群立克次体,并且都存在伯氏疏螺旋体的复合感染,因为国内未见全沟硬蜱携带斑点热群立克次体的报道,所以是否只有当斑点热群立克次体与伯氏疏螺旋体同时感染同一只全沟硬蜱时才能被检测出来也只能做为推断,还需要进一步的工作来证实。但研究表明,全沟硬蜱能作为斑点热群立克次体的携带者在其传播过程中起到一定的作用。斑点热群立克次体在全沟硬蜱中的感染率显著低于在森林革蜱中的感染率,说明在吉林地区森林革蜱是斑点热的主要传播媒介。这与我国革蜱是斑点热群立克次体的主要传播媒介的结论相一致<sup>[12]</sup>。

在全沟硬蜱和森林革蜱中都检测到了 2 种病原体的复合感染,其中森林革蜱中的复合感染率显著高于全沟硬蜱中的复合感染率。这可能与伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体的传播媒介在蜱种上的差异有关。检测到的复合感染证明在自然界中,2 种病原体可以由同一种蜱媒传播,而且存在于流行地

区共同的传递链中。这一研究为动物复合感染伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体的可能提供了初步依据。本研究在病原学上发现了蜱中伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体复合感染的线索。但吉林地区是否存在 2 种病原体复合感染的病例,尚待进一步调查。这次进行蜱中伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体复合感染的调查对于媒介控制和保护旅游人群、林区人群的健康具有重要的流行病学和现实意义。

伯氏疏螺旋体同源性比较显示 JL51 和 JL70 与本室近几年在吉林地区分离出来的菌株的同源性较高,且同属于伯氏疏螺旋体的 *B. garinii* 基因型,提示吉林地区的伯氏疏螺旋体 5S~23S rRNA 间隔区序列的变异不大,这一结果为吉林地区莱姆病疫苗开发研制的可能提供了初步依据。并且可以根据 *B. garinii* 基因型主要引起的是神经系统的症状来帮助临床诊断,减少误诊和漏诊现象的发生。斑点热群立克次体 JL-3 和 JL-95 两者之间的同源性为 88.0%, 差异较大。其中 JL-3 与前苏联的斑点热群立克次体 DnS28 株以及 JL-02 株同源性达 99.0%, 可以推测属于同一型。JL-95 与 Sekeyova 等 2000 年从斯洛伐克菟子硬蜱中分离到的独立于其他所有立克次体以外的斑点热群立克次体的新成员: IRS3 株、IRS4 株最为接近,同源性为 97.0%。在图 3 中显示 JL-95、IRS3 株和 IRS4 株这一分支和其他立克次体的关系都非常远,同源性低于 87.0%。JL-95 可能是我国东北地区新发现存在的近缘于斯洛伐克 IRS3 株、IRS4 株的斑点热群立克次体,也可能是斑点热群立克次体的新成员。其准确的分类地位还有待于进一步的研究。

综上所述,在吉林地区蜱中存在斑点热群立克次体和伯氏疏螺旋体的复合感染,应引起人们的注意,对复合感染的诊断应结合病例的蜱暴露史、临床表现、实验室检查结果及是否来自或去过流行区或疫源地,仅血清学诊断是不够的,最确切的诊断依据是分离出 2 种病原体。对于多种蜱媒病存在或流行地区的一些蜱咬后发热待查或不明原因发热患者进行诊断时,应考虑到多种蜱媒病复合感染的可能。

进行经验性抗菌治疗时,应选用多种蜱媒病原体敏感的广谱抗生素。

### 参 考 文 献

- 1 艾承绪,温玉欣,张永国,等.黑龙江海林地区发现一种新的蜱传螺旋体病——莱姆病(Lyme disease).中国公共卫生(基础版),1987,2(6):6.
- 2 Fan MY,Zhang JZ,Chen M,et al. Spotted fever group rickettsioses in China. *Rickettsiae* and rickettsial diseases all the turn of the third millennium, edited by D. Raoult, P. Brouqui, eds, Elsevier, Paris, 1999. 247-257.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 郝永建,曹务春,高淑萍,等.吉林省长白山山区斑点热立克次体自然疫源地调查.中华流行病学杂志,2003,24:1126-1128.
- 6 Rydkina E, Roux V, Rudakov N, et al. New *Rickettsiae* in ticks collected in territories of the former soviet union. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5: 811-814.
- 7 Sekeyova Z, Fournier PE, Roux V, et al. Characterization of a new spotted fever group *rickettsia* detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. *J Med Entomol*, 2000, 37: 707-713.
- 8 Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group *Rickettsiae* by study of outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48: 839-848.
- 9 Bernard LAscola, Raoult D. Laboratory diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 2715-2727.
- 10 孙毅,许荣满,郭天宇,等.森林革蜱、草原革蜱感染和经期传播莱姆病螺旋体的实验研究.昆虫学报,2002,45:578-582.
- 11 Oliver JH Jr, Chandler FW, James AM. Natural occurrence of the Lyme disease spirochetes *Borrelia burgdorferi* in cotton rats (*Sigmodon hispidus*) from Georgia and Florida. *J Parasitol*, 1995, 81: 30-36.
- 12 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,1998,9:366-368.

(收稿日期:2005-09-02)

(本文编辑:尹廉)