

新疆北疆部分地区硬蜱伯氏疏螺旋体基因型研究

张璘 王远志 陈创夫 李永祥 张科 杜景云 张亚丽 车召堂

【摘要】 目的 调查和鉴定新疆北疆石河子市、沙湾县、伊宁县和察布查尔县媒介蜱,并确定其携带的莱姆病螺旋体的基因型。方法 选择4县市6个牧区为调查点,采集羊源寄生硬蜱,结合形态学与16S rRNA进行蜱种鉴定;采用BSK-H培养基对莱姆病螺旋体分离培养,并用硝酸银染色和巢式PCR法进行病原检测,阳性产物测序结果比对,并与11种GenBank参考序列比对,确定莱姆病螺旋体的基因型。结果 6个调查点共采集寄生硬蜱900多只,经形态学与16S rRNA鉴定分别为图兰扇头蜱、刻点血蜱、亚洲璃眼蜱和边缘革蜱;从中分别选取样本硬蜱共102只,分24管,分离培养后结合巢式PCR和硝酸银染色共获得16管阳性培养物。5S~23S rRNA基因间隔区测序比对分析表明,所有菌株为伯氏疏螺旋体与国际报道的*B. burgdorferi* Sensu Stricto(B31)基因型具有高度同源性,同源性为98.6%~99.5%;OspC基因型分析与上述结果一致。结论 4县市分离获得伯氏疏螺旋体,基因型为*B. burgdorferi* Sensu Stricto,且存在生物多样性。从图兰扇头蜱中分离到伯氏疏螺旋体为我国首次报道。

【关键词】 伯氏疏螺旋体;基因型;硬蜱

Isolation of *Borrelia burgdorferi* in ixodes from four counties, in North Xinjiang Zhang Lin¹, Wang Yuanzhi¹, Chen Chuangfu², Li Yongxiang¹, Zhang Ke², Du Jingyun¹, Zhang Yali¹, Che Zhaotang². 1 Laboratory of Infectious Diseases, College of Medicine, 2 Department of Veterinary Medicine, College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China
Corresponding authors: Wang Yuanzhi, Email: wuzshz@sina.com; Chen Chuangfu, Email: ccf-xb@163.com

This work was supported by grants from the International Cooperation in Science and Technology (No.2013DFA32380), the National Natural Science Foundation of China (No. 31060334) and the National Science and Technology Pillar Program (No. 2013BAI05B05).

【Abstract】 Objective To identify ticks and determine the *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi* genotype from four counties of northern Xinjiang. **Methods** Sheep ticks were collected from 6 surveillance sites in four counties including Shihezi, Shawan, Yining and Chabuachaer. All ticks were initially screened out based on morphological methods and 16S rRNA sequence analysis. *B. burgdorferi* was detected and cultivated with BSK-H medium. Combined with nested PCR, silver nitrate staining was employed to detect *B. burgdorferi*. Genotype of isolated *B. burgdorferi* was determined by Sequencing and phylogenic analysis based on 11 conference sequences. **Results** *Hyalomma asiaticum asiaticum*, *Haemaphysalis punctata*, *Dermacentor marginatus* and *Rhipicephalus turanicus* were identified from more than 900 ticks. Out of 24 tubes from 102 representative tick specimens, 16 tube were positive for *B. burgdorferi*. Sequencing of 5S-23S rRNA intergenic spacer showed 98.6%-99.5% identities to *B. burgdorferi* Sensu Stricto (B31). Results from the analysis of OspC genotype showed consistent with that of 5S-23S rRNA intergenic spacer. **Conclusions** 16 strains of *B. burgdorferi* Sensu Stricto were isolated in four counties, from northern Xinjiang. Additionally, *B. burgdorferi* Sensu Stricto was isolated from *Rhipicephalus turanicus* first time in China.

【Key words】 *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto; Genotype; Ixodidae

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.03.010

基金项目:国际科技合作项目(2013DFA32380);国家自然科学基金(31060334);国家科技支撑计划(2013BAI05B05)

作者单位:832000 石河子大学医学院病原生物学与免疫学教研室(张璘、王远志、李永祥、杜景云、张亚丽),动物科技学院人兽共患病研究室(陈创夫、张科、车召堂)

通信作者:王远志, Email: wuzshz@sina.com; 陈创夫, Email: ccf-xb@163.com

莱姆病螺旋体是莱姆病的病原体,其传播媒介为蜱。新疆是我国莱姆病自然疫源地之一,平均感染率为35.49%^[1],远高于全国平均感染率(5.06%)^[2]。因此研究蜱类及其携带莱姆病螺旋体具有重要公共卫生安全及经济学意义。本研究于2013年4—5月于新疆北疆地区的石河子市、沙湾县、伊宁县和察布查尔县(4市县)通过蜱种采集和鉴定、莱姆病螺旋体培养和基因型检测,探讨上述地区优势蜱种莱姆病螺旋体的携带情况。

材料与方 法

1. 调查点选择:石河子市与沙湾县相邻,位于天山北麓中段、准噶尔盆地南缘,东经84°45′~86°40′,北纬43°20′~45°20′;伊宁县与察布查尔县相邻,位于天山西麓、伊犁河谷盆地伊犁河中南岸,西与哈萨克斯坦接壤,分别为东经80°13′~82°42′,北纬43°35′~44°29′和东经80°31′~81°43′,北纬43°17′~43°57′,两县境内的伊宁口岸与都拉塔口岸是伊犁地区重要的贸易口岸。

2. 实验材料:

(1) 蜱:2013年4—5月从4市县6个采集点、8个羊群(每群绵羊>30只,均未药浴)采集其体表寄生硬蜱,共获900余只,置潮湿阴暗处饲养。

(2) 主要试剂:BSK-H培养基购置于丹麦Nunc公司;莱姆病螺旋体病原参考株(编号35210)购置于美国菌种保藏中心(ATCC);PCR所用试剂购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA提取试剂盒(BacteriaGen DNA Kit)购自北京康为世纪生物科技有限公司;其他所用试剂均为分析纯。

3. 实验方法:

(1) 蜱种鉴定:普通解剖显微镜下将900余只蜱进行形态学鉴定,初步分类后,从中选取157只用配备数码照相功能的解剖显微镜(LEICA M165 C)拍摄图片,并测量长度^[3],从中选取具有代表性的55只硬蜱进行16S rRNA扩增与测序最终确定蜱种类型,结合此结果将剩余的102只按蜱种分类,饱血同种硬蜱每3只放置于1管,非饱血蜱每5只1管,置10 ml的Eppendorf管中,共获得24管,于22~24℃、相对湿度75%~85%温箱内饲养。

(2) 莱姆病螺旋体分离培养:将上述24管活蜱分别置75%乙醇内浸泡10~15 min,无菌滤纸吸干,灭菌双蒸水洗涤数次,于无菌环境下剖解,取蜱中肠接种于6 ml BSK-H培养基中,置33℃温箱中培养,并每周常温下离心更换培养基,培养至4周后进行

莱姆病螺旋体检测及测序分型。

(3) 莱姆病螺旋体检测及测序分型:①硝酸银染色:取上述培养菌液2 ml,12 000 r/min离心收集菌体,灭菌双蒸水重悬菌体,涂片,自然风干后硝酸银染色(0.02 g/ml),吹干,封片,油镜镜检。②5S~23S rRNA巢式PCR扩增:取上述培养菌液3 ml,12 000 r/min离心收集菌体,灭菌PBS缓冲液洗涤,按照DNA提取试剂盒使用说明提取螺旋体基因组DNA,置于-20℃保存用于5S~23S rRNA基因间隔区PCR扩增^[4]。借助primer 5.0软件,设计以下引物(表1),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。巢式PCR扩增条件:第一轮PCR反应体系(25 μl):模板1.5 μl(约50 ng),上游和下游引物各0.75 μl(75 pmol),50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3),1.5 mmol/L MgCl₂,1单位Taq DNA聚合酶;PCR反应循环参数为:94℃预变性5 min,92℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环,72℃终延伸8 min。第二轮PCR反应体系(25 μl):模板(首轮PCR产物)1.5 μl(约50 ng),上游和下游引物各0.75 μl(75 pmol),50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3),1.5 mmol/L MgCl₂,1单位Taq DNA聚合酶;PCR反应循环参数为94℃预变性5 min,92℃变性30 s,59℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环,72℃终延伸8 min。扩增片段经凝胶回收后送上海生工生物工程技术有限公司测序。③OspC巢式PCR扩增:参考文献[5]设计OspC引物并扩增,扩增片段经凝胶回收后送上海生工生物工程技术有限公司测序。④测序分型:结合GenBank登录的11个莱姆病螺旋体的参考序列,将本研究PCR扩增的16条阳性产物序列测序结果与参考序列比对,运用ClustalX和Mega 4.0软件分析,确定其基因型。

表1 巢式PCR扩增设计引物

扩增片段	引物名称	引物序列(5′~3′)	片段长度(kb)
rrf(5S)~	rrf-O F	CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC	412
rrl(23S)	rrl-O R	TAAGCTGACTAATACTAATTACCC	254
	rrf-I F	TCCTAGGCATTCACCATA	
	rrl-I R	CTGCGAGTTCGCGGGAGA	

结 果

1. 蜱种鉴定:结合形态学鉴定与16S rRNA测序结果,在察布查尔县采集的蜱种均为刻点血蜱(*Haemaphysalis punctata*)(48♂/58♀),伊宁县蜱种均为图兰扇头蜱(*Rhipicephalus turanicus*)(173♂/168♀),而石河子市、沙湾县蜱种较多,先后获得刻点血蜱

(125 ♂/88 ♀)、亚洲璃眼蜱 (*Hyalomma asiaticum asiaticum*) (50 ♂/36 ♀) 与边缘革蜱 (*Dermacentor marginatus*) (112 ♂/58 ♀), 其形态学结构见图1。16S rRNA 测序结果表明, 相同蜱种间亦存在生物多样性, 所得序列已登录 GenBank (KF547980、KF547984、KF547987、KF547989、KF547992、KF547986)。

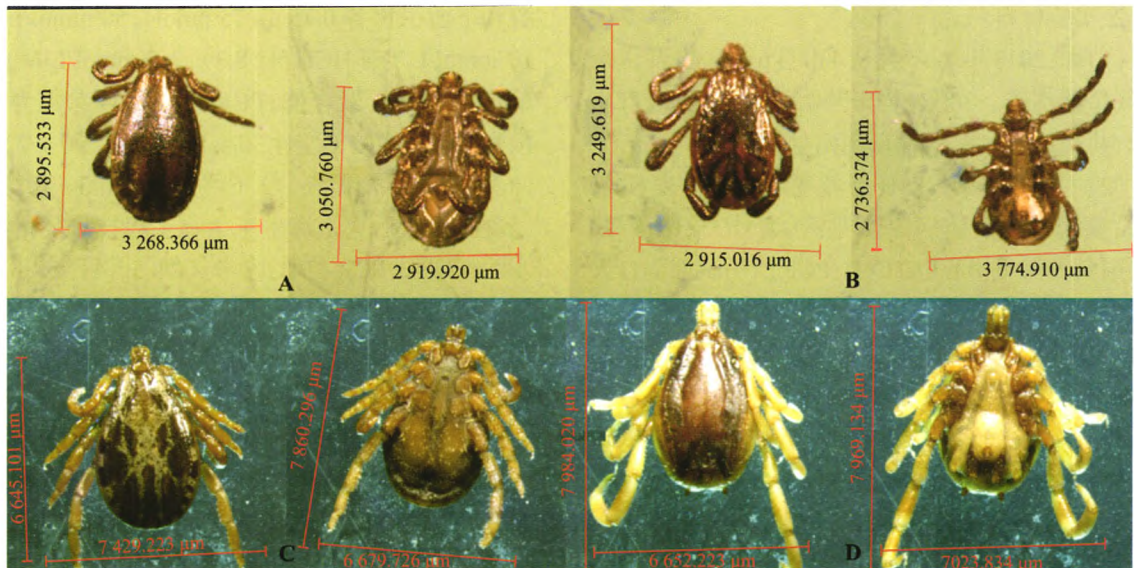
2. 莱姆病螺旋体检测与分型: 巢式PCR扩增莱姆病螺旋体 5S ~ 23S rRNA 基因间隔区基因, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 24 管培养物中有 16 管在 250 bp 左右出现条带, 与预期片段大小相符。经统计, 察布查尔县 3 管中获得阳性培养物 2 管, 伊宁县 5 管中获得阳性培养物 3 管, 石河子市和沙湾县 16 管中共获得 11 管阳性培养物 (图 2)。5S ~ 23S rRNA 基因间隔区测序分析获得 3 种不同序列, 同源性 98.6% ~ 99.5%, 并登录 GenBank, 登录号分别为 KF547996、KF547997 和 KF547998。结合 GenBank 登录的 11 个莱姆病螺旋体参考序列, 运用 ClustalX 和 Mega 4.0 软件进行多重序列比对, 遗传进化树证实所有菌株为伯氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*) 与国际

报道的 *B. burgdorferi* Sensu Stricto (B31) 基因型有高度同源性 (图 3)。OspC 测序比对分析结果与 5S ~ 23S rRNA 基因间隔区遗传进化分析结果一致。

讨 论

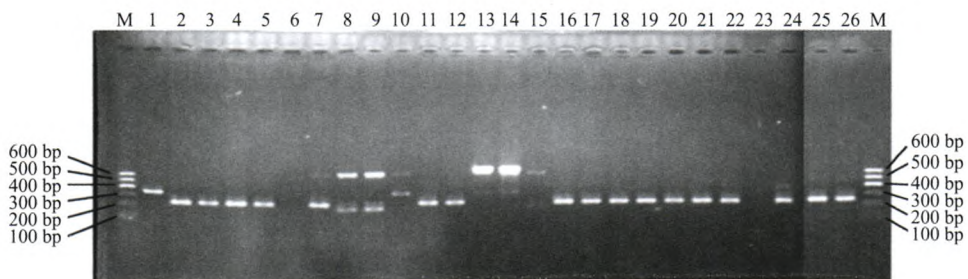
新疆是莱姆病的自然疫源地^[6]。曹有祥等^[7]首次从玛纳斯县天山北麓林间全沟硬蜱 (*Ixodes persulcatus*) 中分离到伯氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*)。石胜刚等^[8]在采集到的中华革蜱 (*Dermacentor sinicus*)、森林革蜱 (*Dermacentor silvarum*)、银盾革蜱 (*Dermacentor niveus*)、残缘璃眼蜱 (*Hyalomma detritum*) 和盾糙璃眼蜱 (*Hyalomma scupense*) 中分离到病原体 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 两种基因型。孙响等^[9]在南疆地区的亚洲璃眼蜱、短小扇头蜱 (*Rhipicephalus pumilio*) 也分离到 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 两种基因型。

本次调查从察布查尔县刻点血蜱、伊宁县图兰扇头蜱及石河子市、沙湾县刻点血蜱、亚洲璃眼蜱和边缘革蜱中皆分离到莱姆病螺旋体, 经 5S ~ 23S



注: A: 刻点血蜱; B: 图兰扇头蜱; C: 边缘革蜱; D: 亚洲璃眼蜱

图1 蜱种形态学(背面和腹面)鉴定



注: 1 ~ 3: 察布查尔县样本; 4 ~ 8: 伊宁县样本; 9 ~ 22、25、26: 石河子市、沙湾县样本; M: DNA Marker; 23: 阴性对照; 24: 阳性对照

图2 莱姆病螺旋体 5S ~ 23S rRNA 基因间隔区巢式 PCR 结果

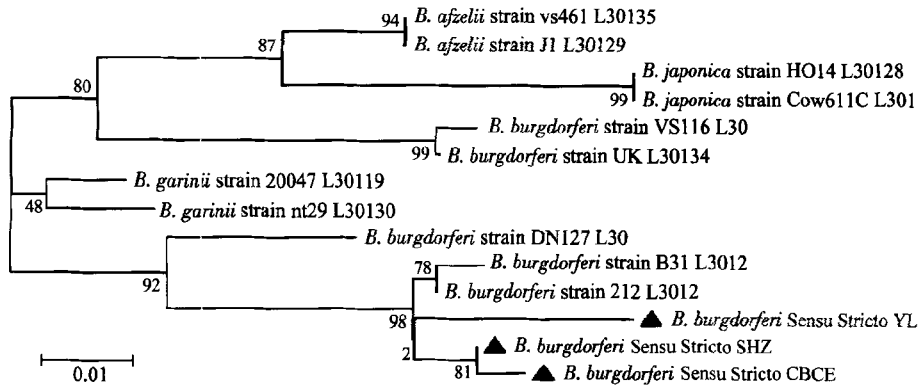


图3 莱姆病螺旋体5S~23S rRNA基因间隔区的系统进化树

rRNA基因间隔区测序表明:①16管阳性培养物5S~23S rRNA基因间隔区序列与*B. burgdorferi* Sensu Stricto具有高度同源性,同源性为98.6%~99.5%;②在不同监测点分离获得的菌株序列存在5S~23S rRNA基因间隔区多态性。该结论经OspC进一步测序分析表明:OspC基因型分析结果与5S~23S rRNA基因间隔区遗传进化分析结果一致。迄今尚未见从新疆刻点血蜱、图兰扇头蜱和边缘革蜱中分离到伯氏疏螺旋体的相关报道,此外从图兰扇头蜱中分离到伯氏疏螺旋体尚属我国首次报道。由于本次分离获得的莱姆病螺旋体的基因型皆为*B. burgdorferi*,并非本国优势基因型*B. garinii*,其原因还有待进一步调查和验证。

(感谢中国疾病预防控制中心传染病预防控制所郝琴研究员在莱姆病螺旋体培养和鉴定中给予的大力支持)

参 考 文 献

- [1] Tan YH, Liu Y, Sun H, et al. Surveillance of Lyme disease in Xinjiang Uygur Autonomous Region during 2000-2004 [J]. Chin J Chin Neurosci, 2007, 15(2): 158-161. (in Chinese)
谭毓绘, 刘勇, 孙荷, 等. 2000至2004年新疆维吾尔自治区莱姆病的监测[J]. 临床神经科学杂志, 2007, 15(2): 158-161.
- [2] Zhang ZF, Wan KL, Zhang JS, et al. Studies on epidemiology and etiology of Lyme disease in China [J]. Chin J Epidemiol, 1997, 18(1): 8-11. (in Chinese)
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[J]. 中华流行病学杂志, 1997, 18(1): 8-11.
- [3] Danta-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, et al. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds [J]. Parasit Vectors, 2013, 6: 213
- [4] Postic D, Assous MV, Grimont PA, et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons [J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 743-752.
- [5] Dustin B, Daniel ED. ospC diversity in *Borrelia burgdorferi*: different hosts are different niches [J]. Gen Soc Am, 2004, 168 (2): 713-722.
- [6] Zhang QE, Zhang PH. Investigation of Lyme disease focus of natural infection in some areas of Xinjiang [J]. J Prev Med Chin PLA, 1990, 8(4): 364-367. (in Chinese)
张启恩, 张泮河. 新疆某地区莱姆病自然疫源地调查[J]. 解放军预防医学杂志, 1990, 8(4): 364-367.
- [7] Cao YX, Zhang XT, Ma J, et al. *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes persulatus* in Xinjiang [J]. Endem Dis Bull, 1988, 3(4): 13. (in Chinese)
曹有祥, 张习坦, 马静, 等. 从新疆全沟硬蜱中分离出莱姆病原体的报告[J]. 地方病通报, 1988, 3(4): 13.
- [8] Shi SG, Zhang F, Liu ZJ. Molecular epidemiological studies on *Borrelia Burgdorferii* in ticks collected from several provinces and autonomous regions of northwestern China [J]. Chin J Zoonoses, 2011, 27(5): 461-463. (in Chinese)
石胜刚, 张芳, 刘增加. 西北新疆等4省区蜱感染莱姆病螺旋体的分子流行病学调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(5): 461-463.
- [9] Sun X, Zhang GL, Liu XM, et al. Investigation of tick species and tick-borne pathogens in Hoxud county of Xinjiang Uygur Autonomous Region, China [J]. Chin J Vector Biol Control, 2013, 24(1): 5-10. (in Chinese)
孙响, 张桂林, 刘晓明, 等. 新疆和硕地区主要蜱类及蜱媒病原体调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(1): 5-10.

(收稿日期: 2013-09-09)

(本文编辑: 张林东)