DOI:10.16016/j.1000-5404.202103029

甘肃河西走廊沿线地区蜱携带病原体分子流行病学研究

张 芳,王小恒 730030 兰州,西北民族大学医学部西北民族地区环境生态与人群健康国家民委重点实验室

[摘要] **目的** 考察、研究甘肃河西走廊沿线地区现存的蜱媒病原体。**方法** 于2020年3、9月分两次采用动物体表捡蜱、农户圈舍捡拾及布旗法采集不同环境下的各类蜱标本,保持存活状态下带回实验室进行形态鉴定,确定蜱标本种类;提取病原体DNA,采用(巢式)PCR法进行病原体扩增;对于莱姆病螺旋体检测阳性的标本采用RFLP方法进行基因型别判定;土拉弗菌检测阳性标本采用亚种判定引物(C6/C8)进行扩增,判定亚种。**结果** 采集到3个蜱种共计2 123只蜱标本,其中亚东璃眼蜱814只、草原革蜱567只、波斯锐缘蜱742只,不同蜱种采集地点不同:草原革蜱、亚东璃眼蜱采自野外放养的骆驼体表及其生活的环境中;波斯锐缘蜱采自农户的圈舍内。所有蜱标本中,共计有54只莱姆病螺旋体检测阳性,分型显示病原体属于两种致病基因型:*Borrelia garinii* 及 *Borrelia afzelii* 基因型;32份标本土拉弗菌阳性,属于B亚种;122只Q热柯克斯体检测阳性。在调查点内发现的波斯锐缘蜱检测发现携带土拉弗菌及Q热柯克斯体。所有蜱中,共检测到15只来自野外放养骆驼体表的亚东璃眼蜱存在复合感染的现象,10只为土拉弗氏菌与Q热柯克斯体体感染,5只为莱姆病螺旋体与Q热柯克斯体感染。**结论** 甘肃河西调查点内存在至少3个不同的蜱种,蜱携带莱姆病螺旋体、土拉弗菌及Q热柯克斯体;蜱标本中存在复合感染的现象。

[关键词] 莱姆病螺旋体;土拉弗菌;Q热柯克斯体;蜱;分子流行病学
[中图法分类号] R181.39;R384.4 [文献标志码] A

Molecular epidemiology of tick-borne pathogens along Hexi Corridor of Gansu Province

ZHANG Fang, WANG Xiaoheng Key Laboratory of Environmental Ecology and Population Health in Northwest Minority Areas, Medicine Depantment, Northwest Minzu University, Lanzhou, Gansu Province, 730030, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the possible tick-borne pathogens along the Hexi Corridor of Gansu Province. **Methods** Ticks were collected from animal surfaces, residents' livestock barns and by dragging a cloth over vegetation, and brought back alive to our laboratory for morphological and species identification. Pathogenic DNA was extracted from the tick samples and amplified by nested PCR. Positive specimens of Lyme disease spirochetes were further analyzed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) to determine their genotypes; Subspecies determination primers (C6/C8) were adopted to amplify the positive samples of *Francisella tularensis* for subspecies identification. **Results** There were 3 species of ticks finally identified and totally 2 123 tick samples collected, including 814 *Hyalomma asiaticum*, 567 *Dermacentor nuttalli* and 742 *Argas persicus*. Different tick species were collected at different sites: *Hyalomma asiaticum* and *Dermacentor nuttalli* were picked up from the surface of wild free-range camels and their living environment, while *Argas persicus* from residents' barn. Among all the tick specimens, 54 samples were tested positive for Lyme disease spirochetes, and RFLP analysis indicated that the pathogen in the samples belonged to 2 genotypes: either *Borrelia garinii* or *Borrelia afzelii*. In addition, 32 heads were positive for *Francisella tularensis*, belonging to *Francisella tularensis*. subsp. holarctica (type B), and 122 heads were positive for

[基金项目] 甘肃省自然科学基金面上项目(20JR5RA502)
[通信作者] 张 芳,E-mail:fang_z760@sohu.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Coxiella burnetii. *Argas persicus* were found to carry both *Francisella tularensis* and *Coxiella burnetii*. Coinfection also existed in 15 *Hyalomma asiaticum* gathered from wild free-range camels, 10 of which were infected with *Francisella tularensis* and *Coxiella burnetii*, and the other 5 with Lyme disease spirochetes and *Coxiella burnetii*. **Conclusion** There are at least 3 different tick species in Hexi Corridor, Gansu Province, and the tick-borne pathogens include Lyme disease spirochetes, *Francisella tularensis* and *Coxiella burnetii*. Coinfection exists in the tick specimens.

[**Key words**] Lyme disease spirochetes; *Francisella tularensis*; *Coxiella burnetii*; tick; molecular epidemiology

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Gansu Province (20JR5RA502). Corresponding author: ZHANG Fang, E-mail: fang_z760@sohu.com

蜱属于蛛形纲、蜱螨亚纲、寄型目、蜱总科,包括硬蜱科、软蜱科和纳蜱科,世界已知约 1 000 余种,其中硬蜱约占 80%,软蜱约占 20%。我国记录的硬蜱科有 120 余种,软蜱科 10 种[1]。不同蜱种的分布与气候、地势、土壤、植被和宿主等多种因素有关。大多数蜱的宿主非常广泛,并可侵袭人类,在流行病学上有重要意义。蜱的危害性包括直接危害和传播疾病。直接危害是蜱在钉刺吸血时可造成局部充血、水肿、急性炎症反应,还可引起继发性感染。蜱传播的病原体是人和家畜众多疾病的重要来源,还包括一些严重危害人类健康的疾病。已知蜱可携带 83 种病毒、14 种细菌、17 种回归热螺旋体、32 种原虫,所致疾病大多为重要的感染性疾病和人兽(畜、禽)共患病[2],因此蜱传疾病的研究具有重大的兽医学、医学及经济学价值。甘肃省河西走廊地区属于半荒漠、荒漠草原、戈壁荒漠区,这里不仅自然环境复杂多样,存在着适合多种病原体生存和流行的多种动物宿主和适宜的地理景观,而且也是重要的交通枢纽,人员流动交往密集且复杂,但有关新发虫媒传染病研究较少。以往有学者在河西走廊地区进行调查发现:调查点内不仅蜱种丰富,而且人群、家畜被蜱叮咬的现象普遍,甚至有些家庭深受其害[3]。但人们对蜱的危害及传播的相关疾病并不清楚,有些出现不适反应甚至疾病也搞不清楚是什么原因。为了解甘肃河西走廊地区蜱携带病原体种类,我们在河西走廊沿线地区进行相关调查,现报告如下:

1 材料与方法

1.1 调查时间与地点

2020 年 3 月及 9 月,分别两次在河西走廊沿线进行现场调查及标本采集。调查点为武威、张掖、酒泉及嘉峪关。武威调查点为天祝旦马乡县土塔村;张掖调查点为乌江镇敬依村;酒泉调查点为酒泉市肃州区银达镇西坝村;嘉峪关调查点为新城镇移民村。所选调查点均为农牧区,农田均为多年由戈壁荒滩及盐碱地改造而成,村庄及农田周围多为戈壁荒滩,属于半荒漠及半荒漠草地地区。

1.2 标本的采集

布旗法采集游离蜱:布旗由 60 cm×100 cm 白绒布制成,采集人员身着防护衣帽在草地或荒漠中、灌木丛等可行走的兽道上边走边拖拉布旗,每行走 20~30 m 检查布旗,用镊子收集布旗两面黏附的蜱,同时注意收集采集人员衣、裤、帽上的蜱。家畜动物体表采用捡蜱法:深入走访村民,进行仔细摸排,检查动物的颈、耳背、股内侧等部位,收集寄生的蜱。圈舍内蜱标本采集:直接用镊子收集地面及墙缝等地爬行的游离蜱。所有采集的蜱标本装入透气并有一定湿度的标本管中保存,带回实验室分类鉴定。

1.3 蜱标本中病原体 DNA 的提取

蜱标本带回实验室,显微镜下进行形态学分类鉴定[1,4-5]:以检索表为依据,观察蜱标本的假头部基部形状、背面是否覆盖有盾板、肛沟位置、气门板形状、有无眼等形态特征,进行形态学鉴定,整理并记录。鉴定完毕的蜱标本用 75%酒精浸泡 20 min 进行杀灭及体表消毒,用无菌滤纸吸干,再用生理盐水,漂洗 3 次,用无菌滤纸吸干蜱体表水分后备用。取单只、未吸血成年蜱置 EP 管中,加入提取缓冲液 200 μL,研磨器充分研磨后置沸水中煮 10 min,使用 TIANGEN 公司 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取病原体 DNA,具体操作按照说明书进行。

1.4 病原体扩增

巢式 PCR 法扩增 Q 热病原体(贝氏柯克斯体,*Coxiella burnetii*, *C. burnetii*)、野兔热病原体(土拉弗菌,*Francisella tularensis*, *F. tularensis*)、莱姆病病原体(莱姆病螺旋体,*Borrelia burgdorferi*, *B. burgdorferi*)目的病原体 DNA 片段。Q 热病原体针对病原体的 23S rRNA 基因序列,引物及扩增条件参考文献[6]进行。莱姆病病原体针对病原体 5S~23S rRNA 基因间隔区进行扩增[7]。土拉弗菌针对病原体 fopA 基因扩增[8]。检测所用引物及扩增条件详见表 1。

表 1 研究中所用引物及扩增条件

病原体	引物名称	序列(5′-3′)	扩增条件
土拉	FNA8L	CGAGGAGTCTCAATGTACTAAGGTTTGCCC	95 ℃ 3 min,95 ℃ 15 s, 55 ℃ 15 s72 ℃ 30 s, 35 个循环,72 ℃ 10 min
	FNA2L	CACCATTATCCTGGATATTACCAGTGTCAT	
弗菌	FNA7L	CTTGAGTCTTATGTTTCGGCATGTGAATAG	
	FNA1L	CCAACTAATTGGTTGTACTGTACAGCGAAG	
	C1	TCCGGTTGGATAGGTGTTGGATT	94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s, 64 ℃ 30 s 72 ℃ 30 s, 30 个循环,72 ℃ 10 min
	C4	GCGCGGATAAATTTAAATTC	
贝氏柯克斯体	23S IVSF	CTTTAAAGAAAGCCTAATAG	94 ℃ 3 min,94 ℃ 60 s, 55 ℃ 60s, 72 ℃ 60 s, 30 个循环, 72 ℃ 5 min
	23S IVS R	TTACT TTATGTCAGCATTCG	
	IVSF	TCACTGGTCGAGTCGTC	
	IVS R	ATTCGCACTTCTGATACC	
莱姆病螺旋体	23S3	CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC	96 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30s, 72 ℃ 40 s, 30 个循环, 72 ℃ 5 min
	23Sa	TAAGCTGACTAATACTAATTACCC	
	primer 1	CTGCGAGTTCGCGGGAGA	96 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s, 59 ℃ 30s, 72 ℃ 40 s, 30 个循环, 72 ℃ 5 min
	primer 2	TCCTAGGCATTCACCATA	

1.5 病原体基因型别分析

对莱姆病病原体检测阳性的标本进行基因分型,采用 RFLP 法[7]:用限制性内切酶 *Mse* Ⅰ(10 000 U/mL; New England Biolabs)于 37 ℃酶切 9 h,酶切后 65 ℃灭活 20 min,酶切产物进行电泳分离片段。土拉弗菌检测阳性标本,采用 C1/C4 引物进行扩增区分亚种[8-9],反应条件为:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s, 64 ℃ 30 s 72 ℃ 30 s, 30 个循环。

2 结果

2.1 蜱标本采集情况

河西 4 个调查点共采集 3 个蜱种约 5 000 余只蜱,其中 2 123 只为成蜱,未吸血蜱。2 123 只蜱在不同采样点的分布见表 2。其中,亚东璃眼蜱(*Hyalomma asiaticum*),采自农户野外放养的骆驼体表(图 1A),草原革蜱(*Dermacentor nuttalli*)采自骆驼体表及野外拖蜱获得;波斯锐缘蜱(*Argas persicus*)采自农户家中圈舍(图 1B)。



A:野外放养的骆驼;B:农户圈舍

图 1 蜱标本采集现场

2.2 蜱内莱姆病螺旋体感染情况及其基因型

2 123 只蜱中,共计有 54 只检测阳性,阳性率 2.54%,其中亚东璃眼蜱 43 只,草原革蜱 11 只,波斯锐缘蜱中未检出。54 份阳性标本中 48 份标本成功分型。阳性标本使用 *Mse* Ⅰ酶切进行基因型别判定,共产生 3 种片段大小(bp)不同组合的酶切带型,其中属于 *Borrelia garinii*(*B. garinii*)基因型的两种:107,95,51、107,57,51,38;属于 *Borrelia afzelii*(*B. afzelii*)基因型一种:107,68,51,20。48 份标本中 37 份属于 *B. garinii* 基因型,占 77.08%,11 份为 *B. afzelii* 基因型,不同蜱种不同病原体检测结果见表 3。莱姆病螺旋体基因型别的分布见表 4。

表 2 不同调查点不同蜱种的分布情况

蜱标本采集点	蜱种(只)			合计
	亚东璃眼蜱	波斯锐缘蜱	草原革蜱	
张掖	55	742	43	840
武威	256	…	135	391
酒泉	503	…	…	503
嘉峪关	…	…	389	389
合计	814	742	567	2 123

表 3 不同蜱种不同病原体分布情况

蜱种	检测阳性数(只)			合计
	莱姆病螺旋体	土拉弗菌	Q 热柯克斯体	
亚东璃眼蜱	43	18	62	123
草原革蜱	11	5	36	52
波斯锐缘蜱	—	9	24	33
合计	54	32	122	208

表 4 莱姆病螺旋体不同基因型在蜱种的分布情况

基因型	酶切片段组合(bp)	蜱种(只)		合计
		亚东璃眼蜱	草原革蜱	
B. garinii	107,95,51	26	3	29
	107,57,51,38	6	2	8
B. afzelii	107,68,51,20	7	4	11
合计		39	9	48

2.3 蜱内土拉弗菌感染情况及病原体基因型

共检测到阳性标本 32 只,阳性率为 1.51%,其中亚东璃眼蜱 18 只,波斯锐缘蜱中 5 只,草原革蜱 9 只。32 只阳性标本经分型判定均属于土拉弗菌 B 亚种(表 2)。

2.4 蜱体内 Q 热柯克斯体检测结果

共检测到阳性标本 122 只,阳性率为 4.61%,其中亚东璃眼蜱 62 只,草原革蜱 36 只,波斯锐缘蜱 24 只(表 3)。

2.5 复合感染情况

共检测到 15 只来自野外放养骆驼体表的亚东璃眼蜱存在复合感染的现象,复合感染率为 0.71%,其中 10 只为土拉弗氏菌与 Q 热柯克斯体共感染,5 只为莱姆病螺旋体与 Q 热柯克斯体共感染。

3 讨论

甘肃省地处青藏高原、蒙新高原和黄土高原的交汇处,全境分为六个不同的自然景观区,地形地貌多样,气候变化明显,动物种类繁多。本研究以河西走廊半荒漠、荒漠草原、戈壁荒漠区为调查地区,采集不同生境下的蜱标本进行研究。调查发现,调查点内的媒介蜱种有:亚东璃眼蜱、草原革蜱及波斯锐缘蜱。其中亚东璃眼蜱采自野外放养的骆驼体表,草原革蜱采自野外及野外放养的骆驼体表,这两种蜱在家养的牲畜及其圈舍内未发现,这一结果与三十年前康新民[10]等的调查结果一致;波斯锐缘蜱只是在农户的圈舍内发现,野外环境下未采集到。这与不同蜱种的生活习性有关,但其是否会有宿主选择偏好目前并不清楚,今后需进一步研究。

研究发现,调查区域内蜱携带有莱姆病螺旋体、土拉弗菌及 Q 热柯克斯体,其中莱姆病螺旋体基因型别为致病基因型,土拉弗菌亦属于致病类型(B 亚种),Q 热柯克斯体属于感染性极强的病原体,但由于此类疾病在我国并非法定报告传染病,人们对此类疾病了解较少,因此当地人群中是否存在患者目前尚不清楚,今后开展血清流行病学调查将可能了解此类疾病在人群中感染的情况。值得一提的是,本研究将首次在张掖发现的波斯锐缘蜱[3]纳入检测,发现土拉弗菌及 Q 热柯克斯体 DNA 目的片段,该蜱种是否只是携带上述病原体,能否作为这两种病原体传播媒介尚需做传播动力学实验加以验证,今后在调查点内针对该蜱种进行详细的流行病学调查十分有必要。

蜱携带和传播的病原体种类数量繁多,且其在自然界中宿主动物分布广泛、流行环节多样,这就使得几种蜱传疾病可以共存于同一疫源地,甚至一种蜱或一只蜱可同时携带多种病原体,这些因素都会增加宿主动物及人类感染的机会[11-13]。本研究发现在野外放养的骆驼身上至少有两种蜱,同时从 15 只亚东璃眼蜱体内检测到两种病原体的 DNA,这也提示我们,当地居民们可能会有复合感染的可能,尤其是对从事剪驼毛的牧民们。今后详细进行相关调查,掌握可能有的媒介蜱种及其所携带的病原体种类对于防控此类疾病至关重要。

参考文献:

[1] 刘增加, 罗芳. 西北地区重要医学动物与疾病[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2013: 688-745.
LIU Z J, LUO F. Important medical animals and diseases in Northwest China[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2013: 688-745.

[2] SHI J, HU Z, DENG F, *et al*. Tick-borne viruses[J]. Virol Sin, 2018, 33(1): 21-43. DOI: 10.1007/s12250-018-0019-0.

[3] 王和平, 甘军, 李璐, 等. 甘肃河西地区蜱类初步调查[J]. 中华卫生杀虫药械, 2018, 24(4): 288-290.
WANG H P, GAN J, LI L, *et al*. Preliminary investigation on ticks in Hexi region of Gansu Province[J]. Chin J Hyg Insect Equip, 2018, 24(4): 288-290.

[4] 陆宝麟, 吴厚永. 中国重要医学昆虫分类与鉴别[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2003: 652-679.
LU B L, WU H Y. Classification and identification of important medical insects in China[M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2003: 652-679.

[5] 刘增加. 中国西北地区病媒生物物种名录[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2011: 193-204.
LIU Z J. List of Vector Species in Northwest China[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2011: 193-204.

[6] 陈荣, 温博海, 张雪, 等. 套式 PCR 和 DNA 探针技术检测 Q 热立克次体[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(1): 28-30, 44. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2001.

01.008.
CHEN R, WEN B H, ZHANG X, *et al*. Detection of Coxiella burnetti by nested PCR and DNA probe[J]. Chin J Zoonoses, 2001, 17(1): 28-30, 44. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2001.01.008.

[7] LIVERIS D, WORMSER G P, NOWAKOWSKI J, *et al*. Molecular typing of Borrelia burgdorferi from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(5): 1306-1309. DOI: 10.1128/jcm.34.5.1306-1309.1996.

[8] FULOP M, LESLIE D, TITBALL R. A rapid, highly sensitive method for the detection of Francisella tularensis in clinical samples using the polymerase chain reaction[J]. Am J Trop Med Hyg, 1996, 54(4): 364-366. DOI: 10.4269/ajtmh.1996.54.364.

[9] DE LA PUENTE-REDONDO V A, DEL BLANCO N G, GUTIÉRREZ-MARTÍN C B, *et al*. Comparison of different PCR approaches for typing of Francisella tularensis strains [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1016-1022. DOI: 10.1128/jcm.38.3.1016-1022.2000.

[10] 康新民, 朱道宏, 王红红, 等. 甘肃河西三地区骆驼寄生蜱调查[J]. 中国兽医科技, 1991(4): 19-20. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.1991.04.010.
KANG X M, ZHU D H, WANG H H, *et al*. Investigation of camel parasitic ticks in three areas of Hexi, Gansu[J]. Chin Vet Sci Tech, 1991(4): 19-20. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.1991.04.010.

[11] 周磊. 内蒙古林区媒介携带病原体的调查研究[D]北京:军事医学科学院,2017.
ZHOU L. Investigation of pathogens carried by vectors in Inner Mongolia forest area[D] Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2017.

[12] 赵俊伟, 王环宇, 王英. 中国蜱传病原体分布研究概况[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(5): 445-448.
ZHAO J W, WANG H Y, WANG Y. Regional distribution profiles of tick-borne pathogens in China[J]. Chin J Vector Biol Control, 2012, 23(5): 445-448.

[13] 于志军,刘敬泽. 蜱传疾病及其媒介蜱类研究进展[J]. 应用昆虫学报,2015, 52(5): 1072-1081.
YU Z J, LIU J Z. Progress in research on tick-borne diseases and vector ticks[J], Chin J Appl Entomol, 2015, 52(5): 1072-1081. DOI: 10.7679/j.issn.2095-1353.2015.128.

(**收稿**:2021-03-03;**修回**:2021-06-01)
(编辑 邓强庭)