

湖北孝感某地蜱虫及人感染蜱媒病原体现状调查

夏先波¹ 刘曙平² 张琳³ 戴曼¹ 张景辉⁴ 朱淮民^{5*}

【摘要】目的 了解驻湖北孝感某部营区蜱虫及蜱媒病原体感染现状,为防治蜱媒病对人群健康危害提供科学依据。**方法** 2012 年对某营区的仓库及训练场开展蜱虫调查,采集营区警犬饲养员及离营区 20 km 医院发热待查患者血样、警卫犬体表及营区草地上的蜱虫,分别提取其基因组 DNA,PCR 方法检测分析测定病原体基因分型。**结果** 累计收集患者血 110 份,将血样混合分组,共 7 组;警犬饲养员血 1 份。患者血样检出巴尔通体和肺炎军团菌分别为 3 组和 1 组,最大似然估计(maximum likelihood estimate, MLE)感染率分别为 27.77%(4/110),8.52%(1/110);警犬饲养员血液检测到巴尔通体。从警犬身上、营区草地上分别采集蜱虫 6 只、20 只。警卫犬体表蜱虫和营区草地蜱虫均检测到巴尔通体和立克次体。营区警犬饲养员及医院发热待查患者血样与营区警犬体表蜱虫检测到的巴尔通体基因型不同,分别为牛巴尔通体(*B. bovis* USAMRIID-000002),杆菌巴尔通体(*B. birtlesii* USAMRIID-000020),伊莉莎白巴尔通体(*B. elizabethae* USAMRIID-000008 或 *B. grahamii* USAMRIID-000026),巴尔通体变形菌(*B. grahamii* USAMRIID-000026);而警卫犬体表蜱虫携带的为巴尔通伯格霍夫亚种(*Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*)基因型 III。不同来源的样本检测的巴尔通体基因型不同。**结论** 该调查点蜱虫易见,蜱媒病原体感染率高,应采取蜱虫防控措施。

【关键词】 蜱虫; 人; 犬; 蜱媒病原体; 感染

Tick infestation and tick-borne pathogen infection in human and ticks in a military camp and nearby area in Xiaogan, Hubei Xia Xianbo¹, Liu Shuping², Zhang Lin³, Dai Man¹, Zhang Jinghui⁴, Zhu Huaimin^{5*}.

¹Clinic of Xiaogan Military Sub-area, Xiaogan 432100, China ²The First People's Hospital in the City of Xiaogan, Xiaogan 432100, China ³The Huimin Hospital in Xiaogan District, Xiaogan 432100, China ⁴The Military Hospital of Unit 92866, PLA, Qingdao 266400, China ⁵Department of Microbiology and Parasitology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

*Corresponding author: Zhu Huaimin, Email: hmzhu@hotmail.com

Supported by the National Science and Technology Major Program (2012ZX10004-220); Army logistics research projects (CWS12BJ06); the Special Fund for Health Research in Public Interest (201202019)

【Abstract】Objective To investigate the prevalence of ticks in a military camp, the tick-borne pathogens infection of ticks and human in Xiaogan, Hubei, to provide scientific proof for prevention and treatment of the tick infestation and tick-borne diseases. **Methods** A total of 110 of human blood samples were collected, Among them, One were sampled from a police dog breeder in military camp, and the other samples were from the out patients who had unknown fever in a hospital apart from 20 km away. Twenty-six ticks were sampled, 6 came from the guard dogs and 20 from the camp lawn. Samples were mixed into groups and detected by PCR-mass spectrum methods to check the pathogens and their gene types. **Results** Three and one out of seven groups of blood from outpatients were detected as positive of *Bartonella* spp. and *Legionella pneumophila*, respectively. The minimum infection rates were 27.77% and 8.52%, respectively. *Bartonella* spp. was detected from the dog breeder blood sample. The ticks from the police dogs and from the camp grassland were detected as positive of *Bartonella* and *Rickettsia*, individually. *Bartonella* genotypes were different among the blood samples from the dog breeder and the patients and the ticks from the police dog.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2015.06.007

基金项目: 国家科技重大专项 (2012ZX10004-220, 2008ZX10004-011); 军队后勤科研项目 (CWS12BJ06); 卫生行业科研专项经费资助项目 (201202019)

作者单位: ¹432100 孝感, 湖北省孝感军分区卫生所; ²432100 孝感, 孝感市第一人民医院; ³432100 孝感, 孝感市孝南区惠民医院; ⁴266400 青岛, 92866 部队医院; ⁵200433 上海, 第二军医大学病原生物学教研室

*通信作者: 朱淮民, Email: hmzhu@hotmail.com

Blood samples contain *B. bovis* USAMRIID-000002, *B. birtlesii* USAMRIID-000020, *B. elizabethae* USAMRIID-000008 or *Bartonella grahamii* USAMRIID-000026, *Bartonella grahamii* USAMRIID-000026, while the ticks sample carry *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* genotype III. Different *Bartonella* genotypes were detected from different sample sources. The gene types of *Bartonella* detected differed from each other.

Conclusion In our research area, there were heavy ticks infestation. And the infection rate of tick-borne pathogens in outpatients who had unknown fever was high. Preventive measures should be taken.

【Key words】 Tick; Human; Dog; Tick-borne pathogens; Infection

蜱是一些人畜共患病的传播媒介和贮存宿主, 是许多重大传染性疾病的重要传播媒介^[1]。2010年我国局部地区发生一种不明原因、以发热伴血小板减少为主要表现的严重传染病, 少数重症患者死亡, 经病原学和流行病学证实, 该病为一种新型布亚病毒科白蛉病毒属引起的经蜱类传播的虫媒病毒病^[2]。布亚病毒科是虫媒病毒中种类最多的一组病毒, 包括350种。蜱还能传播森林脑炎、新疆出血热、蜱媒回归热、莱姆病、Q热、布氏杆菌病、巴贝虫病、埃利希氏病等^[1,3-7]。2012年, 驻湖北孝感某部发现大量蜱虫, 遂邀请专家及相关部门进行实地考察。为了解该部蜱虫感染状况, 对营区部分人员及附近居民、仓库警卫犬及训练场开展了蜱虫与感染情况调查。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采集某营区警卫犬管理员静脉血, 收集距离营区20 km的医院发热待查患者门诊检查血常规剩余的血样110份(手指采血), 登记和编号, 于4℃冰箱内保存待检。警卫犬体表逆毛拭检蜱并获取蜱虫6只, 营区草地和训练场等地用人工小时布旗法^[8]: 1 m×1 m白色绒布旗进行定时拖扫获取蜱20只, 分别置入洁净的采集瓶, 保湿送实验室待检。

1.2 主要试剂

QIAamp 血液DNA提取试剂盒购于德国QIAGEN公司; ExTaq酶购于大连宝生物公司; 50×Tris乙酸电泳缓冲液(TAE)、无菌去离子水及核酸染料Goldview购于北京索来宝科技有限公司。

1.3 血液DNA提取

按照试剂盒说明方法, 用血液试剂盒提取样品血液DNA。

1.4 蜱DNA提取

每份血样取30 μl, 不足量则全取, 视血量随机

合并, 合并后一组血液总量约300 μl, 共有7组。取混合血样200 μl; 警卫犬管理员血200 μl, 分别抽提基因组DNA; 从警卫犬体表摘取的吸血蜱和野外采集的蜱虫分别各取2只置于1.5 ml离心管中, 用消毒蒸馏水清洗, 用眼科剪将蜱组织剪碎。用Qiagen 51304 QIAamp DNA Mini Kit试剂盒提取DNA作为模板。用上海复旦大学医学院病原生物学教研室的PCR质谱仪(Roche公司), 按照操作规程检测蜱媒病原体。

1.5 PCR-质谱检测

用PCR-电喷雾电离质谱技术(PCR electrospray ionization mass spectrometry, PCR-ESI/MS)(简称PCR-质谱)进行检查。将抽提的DNA送上海复旦大学医学院病原生物学教研室, 用AbbottPLEX-ID的蜱传病原体试剂盒自动化检测、分析。

1.6 统计学分析

计算蜱媒病原体的感染率采用最大似然估计法^[9-10]。采用美国CDC媒介控制署推荐的蚊媒监测软件自动计算混合样本检测的感染率^[11]。

2 结果

2.1 外周血检测结果

检测110份门诊发热患者血样, 多数自指尖采集数微升, 因而每组的血样份数不等, 共合并为7组。7组发热患者血中共有3组检测到巴尔通体, 1组检出肺炎军团菌(表1)。最大似然法估计感染率分别为27.77‰(3/110)、8.52‰(1/110)(表2)。警卫犬管理员血液检出巴尔通体。

2.2 蜱虫病原体

警卫犬体表检测2只蜱虫, 为巴尔通体(*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* genotype III)阳性, 而营区草地采集的蜱虫为贝氏立克次氏体(*Rickettsia bellii*)阳性。

2.3 蜱媒病原体的基因型

警卫犬管理员和距离营区20 km的医院发热待查患

表1 混合样本及警犬管理员血液PCR-质谱检测结果

Table 1 PCR-ESI-MS detection on pooled samples and blood from police dog breeder

分组 Pool group	混合样本数 Pool size	阳性 Positive	可信度 Confidence	比对相似的路原体 Pathogens match
1	5	0	-	-
2	18	0	-	-
3	46	0	-	-
4	3	0	-	-
5	17	1	0.97	巴尔通体 <i>Bartonella elizabethae</i> USAMRIID-000008 or <i>B. grahamii</i> USAMRIID-000026
6	17	1	0.78	牛巴尔通体 <i>B. bovis</i> USAMRIID-000002
6	17	1	0.90	军团菌 <i>Legionella pneumophila</i> Corby
7	4	1	0.97	杆菌样巴尔通体 <i>B. birtlesii</i> USAMRIID-000020
B ^a	1	1	0.97	伊莉萨白巴尔通体 <i>B. elizabethae</i> USAMRIID-000008 or <i>B. grahamii</i> USAMRIID-000026

a: 警犬管理员血样, a: Blood from police dog breeder

表2 混合样本检测统计结果

Table 2 Statistical result of IR with MLE

感染率 (%) Infection rate (%)		感染率差异 Infection rate difference	下限 Lower limit	上限 Upper limit	点估计方法 Point est method	可信限方法 CI method
巴尔通体 <i>Bartonella</i>	军团菌 <i>Legionella</i>					
27.77	8.52	19.25	-17.15	67.74	偏差校正 MLE bias-corrected MLE	Skew-corrected Score

MLE: 最大似然估计, MLE: Maximum likelihood estimate

者血液, 所采集的样品中大多查到巴尔通体, 其基因型也不尽相同, 分别为: 牛巴尔通体 (*B. bovis* USAMRIID-000002), 杆菌样巴尔通体 (*B. birtlesii* USAMRIID-000020), 伊莉萨白巴尔通体 (*B. elizabethae* USAMRIID-000008 or *B. grahamii* USAMRIID-000026), 巴尔通体变形菌 (*B. grahamii* USAMRIID-000026); 而警犬体表蜱虫携带巴尔通伯格霍夫亚种 (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*) 基因型 III。除巴尔通体外, 还有贝氏立克次氏体。

3 讨论

本研究使用PCR-质谱法检测蜱媒病原体, 其原理是用通用引物PCR高通量技术进行多位点分子检测微生物 (multiplex molecular detection), 扩增待检样品中微生物和某些寄生虫的核酸片段, 与ESI/MS技术耦联成为PCR-ESI/MS技术, 测定扩增产物的碱基序列, 并自动分析碱基序列差异, 与已有的序列比较, 检测病原体及其分型。该方法在病原体检测方面越来越显示出其高通量、准确、快速的优点, 国内也已经在病毒性疾病的检测中运用该技术 [12-13]。

混合样本检测已经在病原体感染的流行病学调查中广为使用。由于样本量大, 感染率低, 为了节省时间和人力、财力, 利用高通量检测技术, 将样本混合后检测, 可解决上述问题。对感染率的计算, 大多采用最小感染率 (minimum infection rates,

MIR), 即阳性组与总样本量的比值[14-17]。MIR适用于感染率很低的情况, 而对于感染率相对较高, 组间样本量不等的情况, MIR计算误差较MLE相对大[18]。故本研究采用MLE表示感染率大小。

营区地处乡镇, 为丘陵地, 杂草及灌木丛生, 周围为稻田, 农村人口稠密, 习惯养鸡、鸭、牛、猫、犬等禽类和动物, 离营区500 m有小规模猪和鸭养殖企业各1个, 且野鼠和田鼠较易见。当地属亚热带, 气候较温暖, 是很好蜱虫的孳生地 [1]。调查发现, 营房墙壁上、犬体表、草地、训练场均检出蜱虫和病原体, 不同来源的样本检出的病原体基因型不同, 表明当地的蜱虫种群密度高、动物种类及数量大, 已有病原体在人-蜱虫-动物之间形成了完整的传播链, 人和犬受到了不同程度的蜱虫及蜱媒病原体感染。

当地医院门诊发热患者检测蜱媒病原体, 检测到巴尔通体和军团菌, 7组发热患者血中共有3组检测到巴尔通体, 1组检出肺炎军团菌, 其最大似然感染率分别为27.77%, 8.52%。1份警犬管理员血液检出巴尔通体。虽然随机抽取的附近医院门诊发热待查患者血样中的病原体感染可能与本营区的感染无关联, 但可以说明当地蜱虫较为多见。该医院虽然地处市区, 但多数患者来自农村。城市人群的感染可能来源于宠物如猫、犬等, 农村人群的感染同样来源于家养动物以及野鼠等, 由蜱虫在不同

种类动物间传播。说明该地区蜱虫存在巴尔通体等蜱媒病原体感染,且具有感染人的风险,现状不容乐观。

此外,当地蜱虫来源及病原体较为复杂。不同人感染巴尔通体的基因型不尽相同,说明当地蜱媒病原体—巴尔通体的流行有较为复杂的传染来源及传播历史。

蜱媒病被公认为人畜共患病,由于人们野外活动很容易被蜱虫叮咬,因此预防措施在控制该病发生与流行中尤为重要^[19]。(1)新闻媒体要加强对蜱虫的生物学特性、致病原因、危害和防制知识的宣传,让大家有防范蜱虫的知识,增强自防自救能力。(2)地方政府要加大对规模养殖场基础设施投入、改善养殖条件。加快新农村建设步伐,合理规划,改善农民居住环境。(3)畜牧监督部门应加强畜、禽养殖场管理,定期对养殖业人员进行专业知识及卫生知识培训,提高养殖专业知识和卫生意识。(4)卫生部门要统筹兼顾,疾控部门不仅应进一步加大防范力度,尤其在农村,结合农业和卫生害虫防治、科学地采取措施,消灭人和动物居住场所的蜱虫,还要调查媒介蜱的种类、蜱传病原体种类,并建立快速鉴定和检测方法,探索当地蜱传病原的机制。加强医务人员和疾控人员的培训,提高他们的治疗和疫情控制能力,预防控制疾病流行。(5)部队卫生部门要与驻地相关部门形成联络机制、信息共享机制,借助地方优势防疫资源做好营区内防疫工作。还应在营区内加强室内外环境卫生治理和个人防护措施,灭鼠常态化。蜱虫的防制重点是宿主的管理^[20],定期对警犬蜱虫寄生情况进行检查和清除,必要时可定期进行药浴除蜱、对犬舍进行清理和灭蜱。进入有蜱地域要在颈、手等外露体表涂抹避蚊胺或邻苯二甲酸二甲酯等驱避剂^[21-22]。对检出阳性感染的人和犬应积极治疗。采取综合防控措施,携手并肩打好灭蜱防病的攻坚战持久战。

志谢:感谢上海复旦大学医学院病原生物学系程训佳教授、付永峰老师为本研究做PCR-质谱检测。

参 考 文 献

- [1] 孙毅,许荣满. 蜱虫//吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2013: 937-950.
- [2] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel Bunya virus in China[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [3] 张海林. 新发和再肆虐虫媒病毒是当前面临的重要公共卫生问题[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(2): 101-102.
- [4] 陶文元,陶欣. 新型布尼亚病毒感染致发热伴血小板减少综合征8例报告[J]. 江苏大学学报(医学版), 2011, 21(1): 91-92.
- [5] 乔岩,彭恒,朱淮民,等. 广西1例人田鼠巴贝虫感染巢式PCR鉴定及其同事感染调查[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2015, 42(3): 152-155.
- [6] Feldmann H. Truly emerging: A new disease caused by a novel virus[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16): 1561-1563.
- [7] 张丽娟,任军,徐建国. 无形体与人粒细胞无形体病[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(2): 189-191.
- [8] 周光智. 蜱类//姜志宽,郑智民,王忠灿. 卫生害虫管理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011: 173-183.
- [9] Chiang CL, Reeves WC. Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations[J]. Am J Hyg, 1962, 75(3): 377-391.
- [10] Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ. Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size [J]. Am J Epidemiol, 1980, 112(1): 124-128.
- [11] Biggerstaff, Brad J. PooledInfRate, Version 4.0: a Microsoft® Office Excel® Add-In to compute prevalence estimates from pooled samples. [DB/OL] Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, CO, U.S.A., 2009 [2015-09-17]. <http://www.cdc.gov/westnile/resourcepages/mosqSurvSoft.html>
- [12] Lin Y, Fu YF, Xu MH, et al. Evaluation of a PCR/ESI-MS platform to identify respiratory viruses from nasopharyngeal aspirates[J]. J Med Virol, 2015, 87(11):1867-1871.
- [13] Wang X, Fu YF, Wang RY, et al. Identification of clinically relevant fungi and prototheca species by rRNA gene sequencing and multilocus PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. Plos One, 2014, 9(5): e98110.
- [14] 顾卫东. 混合样本方法估测媒介感染率[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16(1):29-33.
- [15] Kline RL, Brothers TA, Brodmeyer R, et al. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(7): 1449-1452.
- [16] 孙庆文,宋茂还,朱淮民,等. 基于孢子阳性率和混合样本对疟疾进行早期预警时的临界感染率检验[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(5): 465-469.
- [17] 孙庆文,朱淮民,陆柳,等. 混合样本检测蚊子孢子阳性率的再研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20(6): 351-354.
- [18] Gu WD, Lamoman R. Problems in estimating mosquito infection rates using minimum infection rate [J]. J Med Entomol, 2003, 40(5): 595-596.
- [19] 马广鹏,孙传范,赵娜,等. 中国蜱传病主要流行趋势及防控科技对策[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 105-109.
- [20] 陈式明,唐仕雄,徐海涛,等. 某战备仓库蜱虫危害调查与控制[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(2): 169-171.
- [21] 黄卫东,张楠. 蜱虫的诊治进展[J]. 中华危重症学杂志, 2010, 3(4): 222-227.
- [22] 汪诚信. 有害生物防治(PCO)[M]. 武汉: 武汉出版社, 2002: 5.

(收稿日期: 2015-07-14)

(本文编辑: 孙雅雯, 陈勤)