

# 黑龙江边境地区蜱虫携带病原体调查

王倩莹<sup>1</sup> 刘凤明<sup>3</sup> 付士红<sup>1</sup> 李樊<sup>1</sup> 滕世荣<sup>3</sup> 陈晓菁<sup>1</sup> 殷启凯<sup>1</sup> 王东强<sup>4</sup> 刘文婧<sup>1</sup> 雷雯雯<sup>1</sup> 何英<sup>1</sup> 梁国栋<sup>1</sup> 李浩<sup>2</sup> 包名家<sup>3</sup> 王环宇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒性脑炎室 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206; <sup>2</sup>中国疾病预防控制中心办公室, 北京 102206; <sup>3</sup>佳木斯市疾病预防控制中心 154007; <sup>4</sup>桦南县疾病预防控制中心 154007

王倩莹和刘凤明对本文有同等贡献

通信作者: 李浩, Email: lihao@chinaacdc.cn, 电话: 010-58900360; 包名家, Email: cdcbmj@126.com, 电话: 0454-8785611; 王环宇, Email: wanghy@ivdc.chinaacdc.cn, 电话: 010-58900838

**【摘要】** 目的 了解黑龙江省边境地区蜱类携带病原体情况。方法 2009—2018 年分别在黑龙江省伊春市、大兴安岭地区、佳木斯市采集蜱虫标本, 共处理 2 530 只蜱虫, 其中全沟硬蜱 800 只, 森林革蜱 1 730 只。采用 real time RT-PCR 法对采集的全部蜱虫开展蜱传脑炎病毒 (tick-borne encephalitis virus, TBEV)、发热伴血小板减少综合征病毒 (severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)、鄂木斯克出血热病毒 (omsk hemorrhagic fever virus, OHFV)、兰格特病毒 (langat virus, LGTV)、波瓦生病毒 (powassan virus, POWV) 检测, 采用 PCR 法对采集自佳木斯地区的蜱虫开展伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, B.b.s.l)、斑点热群立克次体 (spotted fever group rickettsia, SFGR) 检测。结果 全部的蜱类标本中蜱传脑炎病毒、发热伴血小板减少综合征病毒、鄂木斯克出血热病毒、兰格特病毒、波瓦生病毒的检测结果均为阴性。佳木斯地区斑点热群立克次体和伯氏疏螺旋体, 检出率分别为 59.5% 和 8.9%。结论 黑龙江省边境地区蜱虫中斑点热群立克次体和伯氏疏螺旋体携带率高。

**【关键词】** 蜱; 病毒; 螺旋体; 立克次体

**基金项目:** 国家科技重大专项 (2018ZX10711001, 2018ZX10101-002); 传染病预防控制国家重点实验室重点项目 (2015SKLID505); 国家重点研发计划 (2017YFC1200505)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.05.013

## Investigation of tick-borne pathogens in Heilongjiang border area

Wang Qianying<sup>1</sup>, Liu Fengming<sup>3</sup>, Fu Shihong<sup>1</sup>, Li Fan<sup>1</sup>, Teng Shirong<sup>3</sup>, Chen Xiaojing<sup>1</sup>, Yin Qikai<sup>1</sup>, Wang Dongqiang<sup>4</sup>, Liu Wenjing<sup>1</sup>, Lei Wenwen<sup>1</sup>, He Ying<sup>1</sup>, Liang Guodong<sup>1</sup>, Li Hao<sup>2</sup>, Bao Mingjia<sup>3</sup>, Wang Huanyu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; <sup>2</sup>Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; <sup>3</sup>Jiamusi Center for Disease Control and Prevention, Jiamusi 154007, China; <sup>4</sup>Huanan Center for Disease Control and Prevention, Huanan 154400, China

Wang Qianying and Liu Fengming are contributed equally to the article

Corresponding author: Li Hao, Email: lihao@chinaacdc.cn, Tel: 0086-10-58900360; Bao Mingjia, Email: cdcbmj@126.com, Tel: 0086-454-8785611; Wang Huanyu, Email: wanghy@ivdc.chinaacdc.cn, Tel: 0086-10-58900838

**【Abstract】** **Objective** To understand the situation of ticks carrying pathogens in border areas of Heilongjiang province. **Methods** From 2009 to 2018, tick specimens were collected in Yichun, Daxing'anling area and Jiamusi in Heilongjiang province. A total of 2 530 ticks were studied, including 800 *Ixodes persulcatus* and 1 730 *Dermacentor silvarum*. Tick-borne encephalitis virus (TBEV), severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV), omsk hemorrhagic fever virus (OHFV), langat virus (LGTV), powassan virus (POWV) were detected by real-time RT-PCR. Spotted fever group rickettsia (SFGR) and

*Borrelia burgdorferi sensulato* (B.b.s.l) were detected by PCR in ticks collected from Jiamusi area. **Results** All tick specimens collected were negative for TBEV, SFTSV, OHFV, LGTV and POWV. Tick specimens from Jiamusi carried SFGR and B.b.s.l. with positive rates of 59.5% and 8.9%. **Conclusions** The ticks in border areas of Heilongjiang province carry spotted fever group rickettsia and *Borrelia burgdorferi*, and the carrying rate of spotted fever group rickettsia is high. The monitoring and control of ticks and tick-borne diseases should be strengthened.

**【Key words】** Tick; Virus; Sensulato; Rickettsia

**Fund programs:** Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China (2018ZX10711001, 2018ZX10101-002); Development Grant of the State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (2015SKLID505); National Key Research and Development Program of China (2017YFC1200505)

DOI: 10. 3760/ema.j.issn.1003-9279. 2019. 05. 013

蜱虫作为专性吸血节肢动物,是一种在我国分布广泛的携毒媒介生物<sup>[1]</sup>,其携带并传播的病原体大多数可造成自然疫源性疾病,因而被认为是非常重要的医学媒介昆虫。

黑龙江省作为我国东北地区的边境省份,不仅具有适宜蜱虫生存及蜱传病原体传播的自然环境,还频繁的周边贸易活动和人员往来<sup>[2]</sup>,也使得该省边境地区蜱传疾病的感染及传入风险随之增加。因此,及时掌握黑龙江省边境地区的蜱虫携带病原体情况具有重大公共卫生意义。

本研究选取黑龙江省大兴安岭地区、伊春市、佳木斯市的部分地区作为调查点进行蜱虫标本采集,并对蜱虫标本有无携带蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBEV)、发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)、鄂木斯克出血热病毒(omsk hemorrhagic fever virus, OHFV)、兰格特病毒(langat virus, LGTV)、波瓦生病毒(powassan virus, POWV)、斑点热群立克次体(spotted fever group rickettsia, SFGR)、伯氏疏螺旋体(*borrelia burgdorferi sensulato*, B.b.s.l)的情况进行调查,了解这些地区蜱媒病原本底背景,为黑龙江省边境地区进一步开展蜱传疾病监测和防控提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 蜱标本来源** 所使用蜱虫标本共 2 530 只,包括人工布旗法采集于 2009 年 5 月伊春市嘉荫县的森林革蜱 305 只、2015 年 4 月大兴安岭森林公园的全沟硬蜱 160 只、2016 年 4 月大兴安岭东风实业园内的森林革蜱 240 只、2017 年 4 月大兴安岭地区加格达奇市的森林革蜱 640 只、2018 年佳木斯市桦南县七星峰的全沟硬蜱 640 只,以及家畜体表拾捡法采集于佳木斯市桦南县孟家岗铁铃村羊圈内的森林

革蜱 140 只、佳木斯市汤原县林场牛圈内的森林革蜱 405 只。蜱虫标本采集地点见图 1。



图 1 标本采集地点(斜线区域为采集城市)

Fig.1 Map of sample collection sites (inclined area is collecting city)

**1.2 蜱虫处理及 DNA/RNA 制备** 根据采集地点和蜱种将蜱标本 5 只 1 组进行分组,使用组织研磨仪 TissueLyser (Qiagen 公司)对蜱虫进行研磨。取蜱标本研磨上清,按照天隆科技有限公司的核酸提取试剂盒(磁珠法)ZTLJB-Y64(苏州天隆科技有限公司)说明书进行核酸提取。

**1.3 Real-time RT-PCR 检测** 使用美国 ABI 公司 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents 试剂盒及表 1 列出的引物、探针针对全部已提取好的蜱虫核酸进行 Real-time RT-PCR 扩增,反应体积为 25  $\mu$ l,包括:2 $\times$ RT-PCR 缓冲液 12.5  $\mu$ l,无核酸酶的水 7.5  $\mu$ l,上游和下游引物(浓度 10 pmol/ $\mu$ l)1  $\mu$ l, *TaqMan* 探针(浓度为 5 pmol/ $\mu$ l)1  $\mu$ l,酶混合物 1  $\mu$ l,病毒 RNA 模板 1  $\mu$ l。反应条件为:45  $^{\circ}$ C 1 min(1 个循环),95  $^{\circ}$ C 10 min(1 个循环),95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1 min(40 个循环)。阳性对照包括:TBEV、LGTV、POWV 的体外转录 RNA(本实验室保存),SFTSV、OHFV 的体外转录 RNA(中国疾病预防控制中心病毒病所出血热室惠赠)。

**1.4 PCR 扩增** 使用 Promega 公司的 Go Taq® Green Master Mix 试剂及参考文献中以 B.b.s.l 5S-23SrRNA 间隔区两侧基因保守区合成的巢氏 PCR 扩增引物 2 对<sup>[3]</sup>、以 SFGR 相对分子质量 ( $M_r$ ) 190×10<sup>3</sup> ompA 基因合成的引物 1 对<sup>[4]</sup>(见表 2)对已提取好的佳木斯地区采集的蜱虫核酸进行 PCR 扩增。反应体系为 25 μl,包括 Go Taq® Green Master Mix (2X) 12.5 μl,无核酸酶的水 9 μl, 10 μmol/L 的上下游引物各 1 μl, DNA 模板 1.5 μl。PCR 扩增条件<sup>[8]</sup>。

**1.5 测序及序列分析** 将 PCR 阳性产物送北京擎科生物科技有限公司测序,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 RrompA 的序列和 5S-23SrRNA 间隔区进行同源性比较,并选用 Neighbor-Joining (NJ) 法构建进化树。

**2 结果**

**2.1 Real-time RT-PCR 检测 5 种病毒** 2 530 只蜱虫中 TBEV、SFTSV、OHFV、POWV、LGTV 均为阴性。

**2.2 RT-PCR 检测 B.b.s.l SFGR** 佳木斯地区采集的 1 185 只蜱虫 237 个检测组,有 141 只蜱虫携带 SFGR,感染率为 59.5%,21 组蜱虫携带 B.b.s.l,感染率为 8.9%,SFGR 和 B.b.s.l 均为阳性的有 15 只,复合感染率为 6.3%。其中,全沟硬蜱中携带 B.b.s.l 的蜱虫有 15 只,感染率为 11.7%,携带 SFGR 的蜱虫有 99 只,感染率为 77.3%;森林革蜱中携带 B.b.s.l 的蜱虫有 6 只,感染率为 5.5%,携带 SFGR 的蜱虫有 42 只感染率为 16.5%;两种病原体在全沟硬蜱和森林革蜱中的共感染率分别为 38.5% 和 1.8% (见表 3)。

表 1 用于检测病毒的引物及探针

Tab.1 Primers and probes for detecting viruses

| 病毒名称  | 引物/探针名称        | 序列(5'-3')                  | 末端修饰             |
|-------|----------------|----------------------------|------------------|
| TBEV  | TBEV_F_11054   | GGGCGGTTCCTGTTCTCC         |                  |
|       | TBEV_R_11121   | ACACATCACCTCCTGTGCAGACT    |                  |
|       | TBEV-probe     | TGAGCCACCATCACCCAGACACA    | 5'6-FAM, 3'TAMRA |
| SFTSV | SFTSV_F        | GGGTCCCTGAAGGAGTTGTAA      |                  |
|       | SFTSV_R        | TGCCTTACCAAGACTATCAATGT    |                  |
|       | SFTSV_Probe    | TTCTGTCTTGCTGGCTCCGCGC     | 5'6-FAM, 3'TAMRA |
| OHFV  | OHFV_F         | TCGAGGCTACAGACTCACACAAC    |                  |
|       | OHFV_R         | AAGCGTTCCTCCGTGGT          |                  |
|       | OHFV_Probe     | CGCAGCCACCTCTCCACTCGTAGC   | 5'6-FAM, 3'TAMRA |
| POWV  | POWV_NS5_8741  | ATGAGAGCTGTGAGTACTGGCT     |                  |
|       | POWV_NS5_8837  | TGGACCTCACCTTCGCTATGAA     |                  |
|       | POWV_Probe_NS5 | GCCGAGCCAAGGTGAGGATGTGTAC  | 5'6-FAM, 3'TAMRA |
| LGTV  | LGTV_NS3_9040  | AGAGAAAAAGCTTGGTGAATTTGG   |                  |
|       | LGTV_NS3_9133  | GAGGGCCTCAAACCTCCAGGA      |                  |
|       | LGTV_Probe_NS5 | AGCAGGGCCATCTGGTACATGTGGCT | 5'6-FAM, 3'TAMRA |

注: F:上游引物;R:下游引物;P:探针

Note: F: Forward primer; R: Reverse primer; P: Probe

表 2 用于伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体 PCR 检测的引物

Tab.2 Primers for PCR detection of Borrelia burgdorferi sensulato and spotted fever group ricettsia

| 病原体名称    | 引物名称            | 引物序列(5'-3')              | 位置(bp)    | 文献  |
|----------|-----------------|--------------------------|-----------|-----|
| 伯氏疏螺旋体   | 23S3(+)         | CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC    | 3084-3104 | [3] |
|          | 23Sa(-)         | TAAGCTGACTAATACTAATTACCC | 3495-3472 |     |
|          | 23S6(+)         | TCCTAGGCATTCACCATA       | 3105-3122 |     |
|          | 23S5(-)         | CTGCGAGTTCGCGGGAGA       | 3358-3341 |     |
| 斑点热群立克次体 | OmpA190 70p(+)  | ATGGCGAATATTTCTCCAAAA    | 70-90     | [4] |
|          | OmpA190 70In(-) | GTTCCGTTAATGGCAGCATCT    | 701-681   |     |

表 3 伯氏疏螺旋体、斑点热群克次体检测结果

Tab.3 Detection results of B.b.s.l and SFGR

| 蜱种   | 检测组 | 伯氏疏螺旋体 (%) | 斑点热群立克次体 (%) | 复合感染 (%) |
|------|-----|------------|--------------|----------|
| 全沟硬蜱 | 128 | 15(11.7)   | 99(77.3)     | 13(10.2) |
| 森林革蜱 | 109 | 6(5.5)     | 42(38.5)     | 2(1.8)   |

B.b.s.l 在全沟硬蜱中的感染率为 11.7%，高于在森林革蜱中的感染率 5.6% ( $\chi^2 = 14.425, P < 0.05$ )；SFGR 在全沟硬蜱中的感染率为 77.3%，高于在森林革蜱中的感染率 38.5% ( $\chi^2 = 36.798, P < 0.05$ )；全沟硬蜱中两个病原体的复合感染率 10.2% 高于森林革蜱中的复合感染率 1.8% ( $\chi^2 = 6.876, P < 0.05$ )。

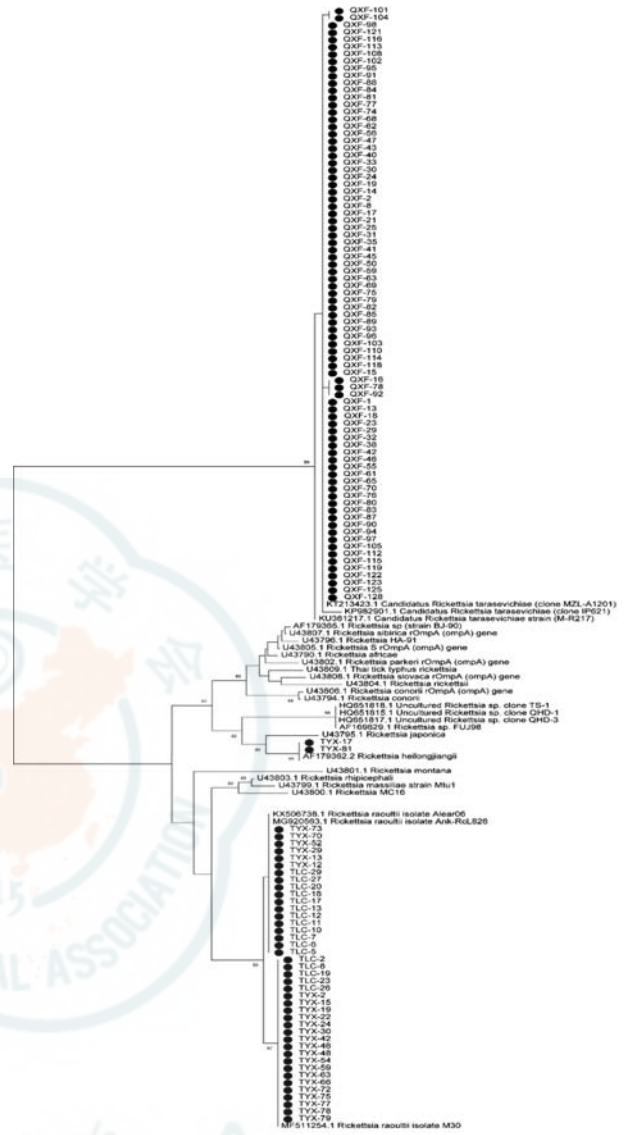
**2.3 序列测定及系统进化分析** 系统进化分析显示：SFGR 阳性标本中，99 份标本序列与 *Candidatus R. tarasevichiae* 基因型同源性高；41 份标本序列与 *R. raoultii* 基因型同源性高；2 份标本序列与 *R. heilongjiangensis* 基因型同源性高(图 2)。检测的 B.b.s.l 阳性标本中 13 份标本序列与 *B. garinii* 基因型同源性高，8 份标本序列与 *B. afzelii* 基因型同源性高(见图 3)。

3 讨论

中国东北地区有远东型蜱传脑炎病毒的流行<sup>[5-7]</sup>，因此对东北地区的蜱虫进行 TBEV 的监测十分有必要。SFTSV 引起的发热伴血小板减少综合征多以散发病例的形式出现在呈丘陵地貌的农村地区，黑龙江有 SFTS 的病例报道<sup>[8]</sup>，OHFV、LGTV、POWV 是 3 种在我国尚未被报道发现的蜱传病毒，加强对于此类在国内尚未被发现的蜱媒传播病毒的监测，可以降低新发蜱传疾病对我国人民健康造成的威胁。斑点热和莱姆病相继于 1962 年和 1986 年在我国黑龙江省被发现，该省被证实存在这两种疾病的自然疫源地，对该地区的 B.b.s.l 和 SFGR 开展持续监测可预防斑点热和莱姆病的大流行。

本次采集所使用到的蜱虫共计 2 530 只，分为森林革蜱和全沟硬蜱两个蜱种，数量比例约为 2:1，主要以布旗法在林间草地采集的游离蜱为主。从数量上看，森林革蜱为采集地区的优势蜱种，造成这种优势蜱种差异的原因可能与生境和蜱类的生活习性息息相关。

5 种病毒核酸的检测结果均为阴性，可初步说明该地区的蜱虫中病毒的自然携带率低。但不能完



注：黑色圆点代表本研究分离株

图 2 斑点热群立克次体 ompA 核苷酸序列系统进行分析

Note: Black dots indicate levere isolated from this study

Fig.2 Phylogenetic analysis of spotted fever group Rickettsia ompA nucleotide sequence

全排除这几处蜱虫采集点存在感染以上 5 种蜱传病原体的可能性，病原体的检出率与检测样本量的大小有着密切的联系，调查点所采集的蜱虫种类单一、数量有限，无携带上述部分病毒的优势蜱种，因而可能会影响到整体病毒检出率。

蜱虫标本中感染 B.b.s.l、SFGR 的情况非常普遍。全沟硬蜱和森林革蜱 2 种蜱中均检测到了 B.b.s.l 和 SFGR 的感染，其中，伯氏疏螺旋体和斑点热群立克次体在全沟硬蜱中的感染率高于在森林革蜱中的感染率，这与先前研究得出全沟硬蜱是莱姆病

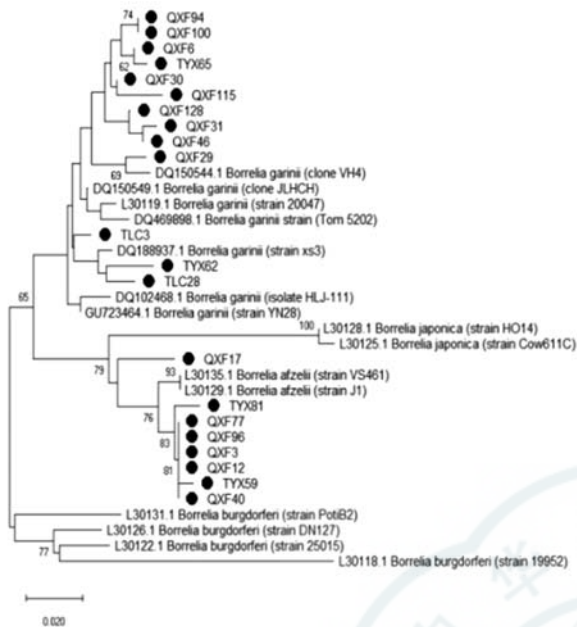


图 3 伯氏疏螺旋体 5S-23S rRNA 间隔区域核苷酸序列系统进化分析

**Fig.3** Phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* 5S-23S rRNA interval area nucleotide sequence (Balck dots lvere isolated from this study)

的主要传播媒介结论<sup>[9]</sup>相符,但与我国革蜱是斑点热的主要传播媒介的结论并不完全一致,分析其原因可能是受地理生态环境、蜱种分布及捕蜱季节等条件的影响。2种病原体在部分全沟硬蜱和森林革蜱中存在复合感染的情况,表明一只蜱虫可以同时携带2种病原体并同时传播,这与蜱虫在生长过程中不断更换宿主并吸食宿主血液有关。携带多种病原体的蜱虫单次叮咬即可导致人畜多重感染的现象提示我们可进一步调查动物和人群复合感染这两种病原体的情况。蜱标本中斑点热群立克次体的感染率较高,由此可见此地易出现斑点热的流行,应积极向当地居民、林区人群宣传介绍此病并采取相应的预防措施。

我国东北地区的 SFGR 存在 5 个种或基因型(*R. heilongjiangensis*、*R. raoultii*、*R. sibirica*、*Candidatus R. hebeii* 和 *Candidatus R. tarasevichiae*)<sup>[10]</sup>, 本次检测出的 SFGR 共 3 种,分别为塔拉塞维奇立克次体、黑龙江立克次体和拉欧蒂立克次体。伯氏疏螺旋体在我国北方地区以 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 型别占优势,本次也仅检测出了这两种型别的伯氏疏螺旋体,与上述研究结论相符。

近年来,随着我国蜱媒传染病自然疫源地的扩

大与变迁,蜱传疾病的发病人数逐年攀升,并且存在新发病原感染的潜在威胁。下一步我们不仅需要继续监测黑龙江边境地区媒介蜱携带病原体的情况,从病原学的角度研究疾病的发生与传播,还应从宿主动物、易感人群、环境气候等多方面入手,多角度探讨不同的影响因素与病原体传播及相关疾病流行的关系,减少蜱传病原体带来的危害。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王倩莹、刘凤明、陈晓菁、殷启凯、刘文婧、李樊、雷雯雯:实验操作;付士红、何英、滕世荣、王东强:实验技术指导;王倩莹:论文撰写;梁国栋、李浩、包名家、王环宇:研究指导,论文修改

### 参考文献

- [1] Alpern J D, Dunlop S J, Dolan B J, et al. Personal Protection Measure Against Mosquitoes, Ticks, and Other Arthropods [J]. *Med Clin North Am*, 2016, 100(2):303-316. DOI: 10.1016/j.mcna.2015.08.019.
- [2] 叶楠楠,裴希超,孙善华.黑河口岸地区蜱类调查及研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(8):761-767. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.128.
- [3] Lee S H, Kim B J, Kim J H, et al. 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 [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(2):857-863. DOI: 10.1099/00207713-50-2-857.
- [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]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(9):2058. DOI: 10.1007/978-94-011-5782-7\_12.
- [5] 王倩莹,李樊,付士红,等.2014年中国蜱传脑炎流行病学特征[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2018, 32(6):602-606. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2018.06.009.
- [6] He X, Zhao J, Fu S, et al. Complete Genomic Characterization of Three Tick-Borne Encephalitis Viruses Detected Along the China-North Korea Border, 2011 [J]. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, 2018, 18(10):554-559. DOI: 10.1089/vbz.2017.2173.
- [7] Lu Z, Bröker M, Liang G. Tick-borne encephalitis in mainland China. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008, 8:713-720. DOI: 10.1089/vbz.2008.0028.
- [8] 李昱,杨明,牟笛,等.2010—2017年全国发热伴血小板减少综合征流行特征分析[J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2018, 13(11):1076-1079.
- [9] Nadelman RB, Wormser GP. Lyme borreliosis [J]. *Lancet*, 1998, 352(9127):557-565. 10.Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. [J]. *Lancet*, 2001, 358(9275):16-18. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)05250-8.
- [10] 王卓,王建伟,于淼,等.东北地区蜱传斑点热群立克次体的分子流行病学研究[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2018, 29(4):344-347. DOI:10.11853/j.issn.1003.8280.2018.04.005.

(收稿日期:2019-01-13)

(本文编辑:陈培莉)