

舟山海岛地区蜱媒病原体多样性及其基因同源性分析

李科峰 梁思慧 戴亚欣 刘洁楠 仝振东
舟山市疾病预防控制中心传防科, 舟山 316021
通信作者: 李科峰, Email: 107923738@qq.com

【摘要】目的 了解舟山海岛地区蜱类所携带的病原体多样性及其基因同源性。**方法** 2020 年 4—11 月, 采用布旗法收集舟山海岛地区发热伴血小板减少征病例居住地周围环境中的游离蜱, 采用畜体检查法采集家畜身上的寄生蜱。蜱样本提取 RNA 或 DNA 进行荧光 RT-PCR 检测, 以嗜吞噬细胞无形体、立克次体、查菲埃里克体、新型布尼亚病毒、汉坦病毒、汉城病毒、沃尔巴克体、山羊无形体为引物进行 PCR 扩增初筛。扩增序列测序后进行同源性分析, 以邻接法构建系统进化树。**结果** 共采集蜱样本 99 只, 其中游离蜱样本 39 只, 寄生蜱样本 60 只。在蜱样本中检出嗜吞噬细胞无形体、立克次体、沃尔巴克体和山羊无形体核酸阳性。此次检出的沃尔巴克体与日本报道的沃尔巴克体 (AB025965) 同源性为 98.70%; 立克次体与中国云南立克次体 03 (KY433580)、日本立克次体 LA16 同源性为 99.83%; 嗜吞噬细胞无形体有 2 个进化分支: 一个进化分支与安徽桐城 (MK045683) 及韩国济州岛 (GU064903) 的嗜吞噬细胞无形体同源性为 100.00%, 另一个进化分支与安徽金寨的嗜吞噬细胞无形体 (MK045694) 同源性为 99.70%。**结论** 舟山海岛地区是嗜吞噬细胞无形体、山羊无形体和日本立克次体的自然疫源地, 暴露居民存在感染风险。

【关键词】 蜱; 蜱媒病原体; 核酸检测; 基因序列比对; 同源性

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20211125-00225

Diversity and gene homology analysis of tick-borne pathogens in Zhoushan island

Li Kefeng, Liang Sihui, Dai Yaxin, Liu Jienan, Tong Zhendong

Department of Infectious Disease Prevention and Control, Zhoushan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhoushan 316021, China

Corresponding author: Li Kefeng, Email: 107923738@qq.com

【Abstract】Objective To understand the diversity and gene homology of pathogens carried by ticks in Zhoushan island. **Methods** From April to November, 2020, free ticks were collected by cloth flag method from the surrounding environment of the residence of patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome in Zhoushan island, and parasitic ticks on livestock were collected by livestock examination. RNA or DNA of ticks was extracted for fluorescence RT-PCR detection, and the target genes of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia*, *Chaffeerici*, novel *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Seoul virus*, *Wolbachia* and *Anaplasma capra* were screened for PCR amplification. The amplified sequence was sequenced for homology analysis, and the phylogenetic tree was constructed by adjacency method. **Results** A total of 99 ticks were collected, including 39 free ticks and 60 parasitic ticks. Nucleic acids of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Anaplasma capra* were positive by PCR detection. The homology between *Wolbachia* and *Wolbachia* reported in Japan (AB025965) was 98.70%. And the homology between *Rickettsia* and *Rickettsia* 03 (KY433580) in Yunnan or *Rickettsia* LA16 in Japan was 99.83%. The genetic evolution of *Anaplasma phagocytophilum* was divided into two branches, one of which was highly homologous with *Anaplasma phagocytophilum* from Tongcheng, Anhui Province (MK045683) and Jeju island, Korea (GU064903) with the homology of 100.00%, and the other of which was highly homologous with *Anaplasma phagocytophilum* from Jinzhai, Anhui Province (MK045694) with the homology of 99.70%. **Conclusions** Zhoushan island is a natural foci of tick-borne pathogens such as *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma capra* and *Rickettsia japonica*. Exposed residents are at

risk of infection.

[Key words] Ticks; Tick-borne pathogens; Nucleic acid testing; Gene sequence alignment; Homology

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20211125-00225

蜱属体外寄生生物,寄生于两栖类、鸟类、爬行类和哺乳类等动物,部分种类可侵袭人类,传播多种病原体。研究表明,蜱的整个生命周期均可携带病原体^[1-2],其造成的危害仅次于蚊类^[3-4]。据报道,全球以发热伴血小板减少综合征为代表的蜱媒传染病(TBD)发病率不断上升^[5-6]。舟山市蜱密度高,有学者在岱山采集到的长角血蜱中检测出无形体和一种新的埃立克体病原体^[7]。本研究采集舟山各县区环境中的游高蜱或者动物身上的寄生蜱,开展 TBD 病原体的检测,了解其分布,为舟山市 TBD 防控提供科学依据,现报告如下。

材料与方 法

一、蜱样本的采集与分类

2020年4—11月采集舟山各县区不明原因发热伴血小板减少征病例居住环境中的游离蜱及家畜身上的寄生蜱。选用布旗法,采集野外草地上的游离未吸血蜱;选用畜体检查法,采集家畜身上的寄生蜱,于实验室解剖显微镜下进行分类。

二、试剂与仪器

一步法实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒(RR064A)、一步法 RT-PCR 试剂盒(RR055A)、PCR 试剂盒(RR902A)均购自宝生物工程(大连)有限公司,新布尼亚病毒、腹地病毒、流行性出血热病毒(汉城型)、流行性出血热病毒(汉滩型)、嗜吞噬细胞无形体的实时荧光定量 RT-PCR 的引物、探针、测序用引物以及阳性重组质粒委托宝生物工程(大连)有限公司合成与构建。嗜吞噬细胞无形体与查菲埃立克体巢式 PCR 引物委托第三方生物技术公司合成。

主要仪器有Ⅱ级生物安全柜(美国 LABCONCO 公司)、ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)、普通 PCR 仪(美国 ABI 公司)、成像仪(美国 ABI 公司)、LEGEND MICRO 冷冻高速离心机(德国 Thermo

公司)、MM400 混合球磨仪(德国 Retsch 公司)。

三、核酸制备

将采集的蜱样本根据体型大小选取 3~6 只为 1 组,放入 2 mL EP 管中,用 25%酒精消毒蜱体表 1 min 后,去除上清液。加入 1 mL 2-甲氧基乙氧基甲基氯(MEM)涡旋清洗,8 000 转/min 离心(离心半径 8.4 cm),5 min 去除上清液,反复 3 次。加入 500 μL MEM 后,于低温下在 MM400 混合球磨仪中以 50 Hz 研磨 2 min,反复 2 次。8 000 转/min 低温离心 5 min 后(离心半径 8.4 cm),取上清液 200 μL 提取 RNA 进行荧光 RT-PCR 检测。余下 300 μL 上清液,其中 200 μL 用于复核,100 μL 用于病毒分离。

四、核酸检测

实时荧光定量 RT-PCR 检测发热伴血小板减少综合征病毒(SFTS)RNA 参照《发热伴血小板减少综合征防治指南(2010 版)》^[8]检测方案,荧光 RT-PCR 引物探针序列参考中国 CDC 提供的序列^[9];巢式 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体 DNA 参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准—国境口岸蜱类携带嗜吞噬细胞无形体的 PCR 检测方法(SN/T 4009-2014);巢式 PCR 检测查菲埃立克体 DNA 参照湖北省 CDC 张令要等^[10]报道方法,运用 PCR 对采集的蜱样本进行嗜吞噬细胞无形体 16S rRNA 基因片段进行扩增和序列分析。蜱样本中嗜吞噬细胞无形体与立克次体通用引物 PCR 电泳阳性条带者再用特异引物进行电泳。荧光 RT-PCR 引物探针和巢式 PCR 引物详见表 1 和表 2。

结 果

一、蜱样本采集及检测情况

共采集蜱样本 99 只,其中游离蜱样本 39 只,寄生蜱样本 60 只。根据是否游离蜱进行分组,分为 20 组,每组 3~6 只蜱虫,1~7 组为游离蜱(共 7 组),8~20 组为寄生蜱(共 13 组)。

表 1 五种病原体实时荧光定量 RT-PCR 检测引物探针序列

病原体名	引物探针名称	碱基序列(5'→3')	靶标基因	产物长度	登录号
腹地病毒	HRTV-NF	CAGCATTCTCCTTCAGCTCATA	HRTV-S	103 bp	KJ740146
腹地病毒	HRTV-NR	CACYAGAGGGAACAAGATAGTG	HRTV-S		KJ740146
腹地病毒	HRTV-NP	HEX-AGCCAGGTTTGTATCCTCTCAGC-BHQ1	HRTV-S		KJ740146
新布尼亚病毒	SFTSV-NF	GGGTCCCTGAAGGAGTTGTAAA	SFTSV-S	74 bp	AB678789
新布尼亚病毒	SFTSV-NR	TGCCTTACCAAGACTATCAATGT	SFTSV-S		AB678789
新布尼亚病毒	SFTSV-NP	FAM-TTCTGTCTTCTGGCTCCGGCC-TAMRA	SFTSV-S		AB678789
汉城型出血热病毒	EHFV-MF	TGTCCCTCTCTGGACAGATAAT	EHFV-M	95 bp	MK360788
汉城型出血热病毒	EHFV-MR	ACTTAGARCTAGATGGCAAAGAAA	EHFV-M		MK360788
汉城型出血热病毒	EHFV-MP	VIC-TCATGGCGTTGGGAGTGTTCCTAT-BHQ1	EHFV-M		MK360788
汉滩型出血热病毒	EHFV-MF	RCTTGAAGGTGGTGGTCTAATA	EHFV-M	117 bp	KP970566
汉滩型出血热病毒	EHFV-MR	CCTGGRAACTCAGGGCATAAA	EHFV-M		KP970566
汉滩型出血热病毒	EHFV-MP	FAM-ACATGTCATTTGGYGACCCAGGAGA-TAMRA	EHFV-M		KP970566
嗜吞噬细胞无形体	MenF	GGTGGWCCGGGATATTTCTATG	msp-3	90 bp	KC430333
嗜吞噬细胞无形体	MenF	TCTCTCCGTTACTCTCCCTTATA	msp-3		KC430333
嗜吞噬细胞无形体	MenF	FAM-TGTYTTGGATTACAGTCCAGCCTT-BHQ3	msp-3		KC430333

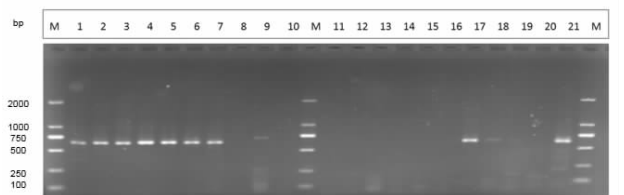
表 2 嗜吞噬细胞无形体与相关体巢式 PCR 外套引物序列

病原体名	引物名称	碱基序列(5'→3')	靶标基因	产物长度	登录号
无形体+立克次体	OUT-WF	TTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACC	16SrRNA	653 bp	
无形体+立克次体	OUT-WR	CACCTCTACACTAGGAATTCGGCTATC	16SrRNA		
嗜吞噬细胞无形体	HGA-NF	GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTG	16SrRNA	395 bp	KC128828
嗜吞噬细胞无形体	HGA-NR	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAC	16SrRNA		
查菲埃立克体	HME-NF	CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT	16SrRNA	395 bp	MN368552
查菲埃立克体	HME-NR	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	16SrRNA		

本研究未检出查菲埃立克体、新型布尼亚病毒、汉坦与汉城病毒。在 7 组游离蜱样本和 13 组寄生蜱样本中, 分别有 3 组和 1 组检测出嗜吞噬细胞无形体。此外, 在游离蜱样本中, 分别有 2 组和 1 组检测出立克次体和沃尔巴克体; 在寄生蜱样本中检测出 1 组山羊无形体。其余组别的病原体检出均阴性。蜱虫样本 PCR 检测结果见图 1 和图 2。

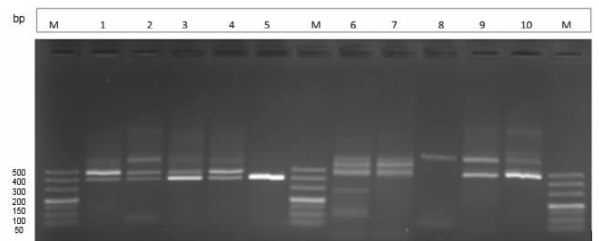
二、序列分析结果

巢式 PCR 检测阳性结果经 16S rRNA^[11]基因测序显示, 2 号组样本为沃尔巴克体, 与日本报道的沃尔巴克体(AB025965)同源率为 98.70%, 与无形体 16S rRNA 基因序列相似率为 88.50%~88.70%。3 和 6 号组样本为立克次体, 与中国云南立克次体 03(KY433580)、日本立克次体 LA16^[12] 同源率为 99.83%, 与无形体 16S rRNA 基因序列相似率高达 82.60%~83.90%。4、5、7、18 号组为嗜吞噬细胞无形体(同源率为 97.74%~99.75%), 在基因进化中可分为 2 个分支, 5 和 18 号组为一个进化分支与安徽桐城(MK045683)及韩国济州岛(GU064903)的嗜吞噬



注: M:DNA 标准分子量; 1~20 表示 1~20 组; 21: 阳性对照, 分子量为 653 bp; 使用的是无形体+立克次体通用引物, 在 653 bp 处显示一个条带

图 1 舟山海岛地区蜱样本中嗜吞噬细胞无形体与立克次体通用引物 PCR 电泳图



注: M:DNA 标准分子量; 泳道号/样本号; 1 道为 18 号组, 2 道为 2 号组, 3 道为 4 号组, 4 道为 5 号组, 5 道为 7 号组, 6 道为 3 号组, 7 道为 6 号组, 8 道为 3 号组, 9 道为 6 号组, 10 道为 17 号组; 按图 1 通用引物结果, 选取通用引物在 653 bp 位置有条带的样本, 对其进行嗜吞噬细胞无形体和立克次体 PCR 检测, 其中 6 道(3 号组)与 7 道(6 号组)为立克次体扩增产物; 嗜吞噬细胞无形体特异扩增条带为 395 bp

图 2 舟山海岛地区蜱样本中嗜吞噬细胞无形体与立克次体特异引物 PCR 电泳图

细胞无形体同源性为 100%;4 和 7 号组与安徽金寨的嗜吞噬细胞无形体 (MK045694) 同源性为 99.70%。详见图 3 和 4。

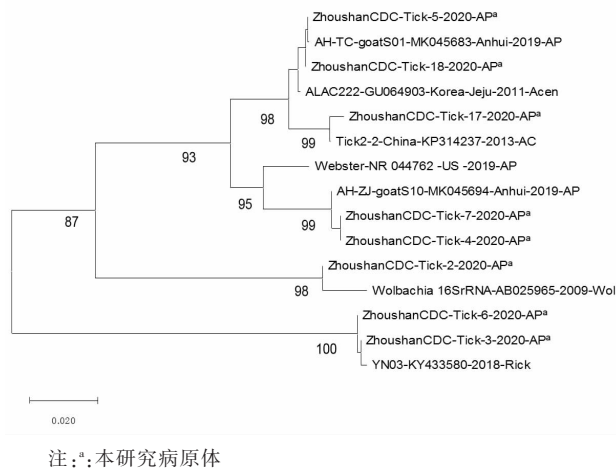


图 3 舟山海岛地区无形体、立克次体与沃尔巴克 16SrRNA 基因进化树

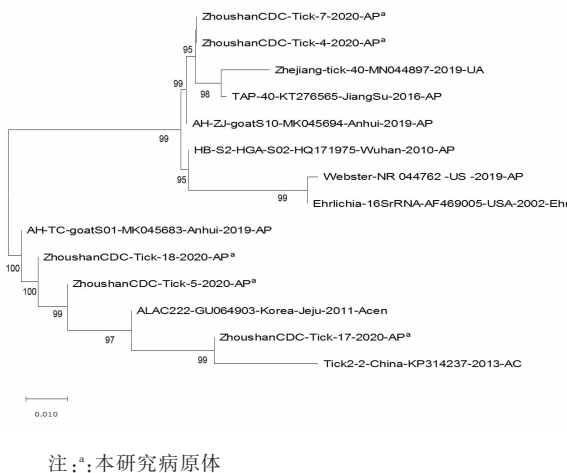


图 4 舟山海岛地区无形体 16S rRNA 基因进化树

讨 论

自 2011 年舟山市首次报告发热伴血小板减少综合征病例以来,疫情逐年上升,一度成为浙江省发热伴血小板减少综合征发病率最高的地区^[13]。在监测中发现,每年均有部分有蜱叮咬史的病例检测新型布尼亚病毒呈阴性,分析原因可能携带其他病原体。在本次研究中,我们首次在舟山海岛地区蜱发现携带日本立克次体、嗜吞噬细胞无形体、山羊无形体、沃尔巴克体等病原体,提示舟山居民有多种 TBD 病原体的暴露风险,为当地 TBD 的防控提

供科学依据,为其他地区相关研究提供参考。

无形体感染会引起无形体病,该病是一种以发热伴白细胞血小板减少和多脏器功能损害为主要临床表现的人畜共患自然疫源性疾病^[14-15]。立克次体属分斑点热群和斑疹伤寒群,是一类能引起人感染而引发斑点热的细菌,其中日本立克次体可引起日本斑点热。浙江省学者曾在杭州临安区的病例中分离到日本立克次体^[12]。本文作者在舟山捕获的游离蜱样本中检测出嗜吞噬细胞无形体、日本立克次体和沃尔巴通体 3 种病原体,在寄生蜱中检出山羊无形体和嗜吞噬细胞无形体 2 种病原体,其中立克次体与中国云南立克次体 03(KY433580)、日本立克次体 LA16^[12]同源性为 99.83%;检出的嗜吞噬细胞无形体其中一个进化分支与安徽桐城(MK045683)及韩国济州岛(GU064903)的嗜吞噬细胞无形体同源性达 100.00%,主要为游离蜱;另外一支与安徽金寨的嗜吞噬细胞无形体 (MK045694)同源性为 99.70%,包括游离蜱和寄生蜱。以上结果提示舟山市是嗜吞噬细胞无形体、山羊无形体和日本立克次体的自然疫源地,暴露居民存在感染风险。虽然本研究在捕获的蜱虫中未检出新型布尼亚病毒核酸,但舟山市是发热伴血小板减少综合征的疫区,仍需要高度重视。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李科峰:课题设计、研究、论文撰写;梁思慧、戴亚欣:数据分析、论文修改;刘洁楠、仝振东:蜱虫捕获、检测

参 考 文 献

- Labuda M, Nuttall PA. Tick-borne viruses[J]. Parasitology, 2004,129 Suppl: S221-S245. DOI: 10.1017/s0031182004005220.
- Libíková H, Rajčáni J. Experimental mixed infection with two tick-borne viruses and interferon-mediated interference[J]. Acta Virol, 1975,19(1):1-9.
- Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks [J]. Parasitology, 2004,129 Suppl:S3-S14. DOI: 10.1017/s0031182004005967.
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives[J]. Vet Parasitol, 2011,182(1):14-21. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.07.012.
- Rodino KG, Theel ES, Pritt BS. Tick-borne diseases in the United States[J]. Clin Chem, 2020,66(4):537-548. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa040.

[6] 任祥春, 刘本付, 王枫, 等. 一起发热伴血小板减少综合征聚集性疫情特征[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2021, 48(2): 150-152. DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200522-00172.

[7] 刘建伟. 发热伴血小板减少综合征病毒传播机制及人源单克隆抗体研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.

[8] 中华人民共和国卫生部. 发热伴血小板减少综合征防治指南(2010 版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(4): 193-194. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2011.04.001.

[9] 宫连凤, 姜梅, 韩文清, 等. 2011 年山东省胶东地区四种动物感染新型布尼亚病毒情况的调查[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(1): 85-86. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2013.01.021.

[10] 张令要, 李静, 詹发先, 等. 湖北省长角血蜱携带嗜吞噬细胞无形体的调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(12): 1148-1150. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2010.12.017.

[11] 陆群英, 孙继民, 顾时平, 等. 浙江省啮齿动物、牛和羊感染的无形体种属[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(4): 330-336. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.053.

[12] Lu Q, Yu J, Yu L, et al. *Rickettsia japonica* infections in humans, Zhejiang Province, China, 2015[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(11): 2077-2079. DOI: 10.3201/eid2411.170044.

[13] 吴昊澄, 徐校平, 吴晨, 等. 浙江省 2011-2015 年发热伴血小板减少综合征发病空间预测[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(11): 1485-1490. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.11.011.

[14] 王宁. 中国北方部分地区鼠类和媒介蜱携带蜱媒病原体调查研究[D]. 牡丹江: 牡丹江师范学院, 2021.

[15] 张丽娟. 中国嗜吞噬细胞无形体及无形体病研究进展[J]. 疾病监测, 2014, 29(5): 409-414. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2014.05.019.

(收稿日期: 2021-11-25)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊可直接使用的缩略语

下列缩略语为本刊常用词汇, 第一次出现时, 可以不标注中文, 它们是:

- | | | |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| 甲胎蛋白 (AFP) | 乙型肝炎病毒 (HBV) | 核因子- κ B (NF- κ B) |
| 艾滋病 (AIDS) | 乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) | 自然杀伤细胞 (NK 细胞) |
| 碱性磷酸酶 (ALP) | 乙型肝炎病毒表面抗体 (抗-HBs) | 外周血单核细胞 (PBMC) |
| 丙氨酸转氨酶 (ALT) | 乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) | 磷酸盐缓冲液 (PBS) |
| 抗原提呈细胞 (APC) | 乙型肝炎病毒 e 抗体 (抗-HBe) | 血小板 (PLT) |
| 天冬氨酸转氨酶 (AST) | 乙型肝炎病毒核心抗体 (抗-HBc) | 结核菌素试验 (PPD) |
| 共价闭合环状 DNA (cccDNA) | 血红蛋白 (Hb) | 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) |
| 四氯化碳 (CCl ₄) | 肝细胞癌 (HCC) | 严重急性呼吸道综合征 (SARS) |
| 疾病预防控制中心 (CDC) | 丙型肝炎病毒 (HCV) | 结核 (TB) |
| 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) | 人类免疫缺陷病毒 (HIV) | 总胆红素 (TBil) |
| 树突细胞 (DC) | 人乳头状瘤病毒 (HPV) | 总胆固醇 (TC) |
| 弥漫性血管内凝血 (DIC) | 重症监护病房 (ICU) | 甘油三酯 (TG) |
| 酶联免疫吸附试验 (ELISA) | 干扰素 (IFN) | 辅助性 T 淋巴细胞 (Th) |
| γ -谷氨酰转氨酶 (γ -GT) | 白细胞介素 (IL) | 肿瘤坏死因子 (TNF) |
| 高效抗逆转录病毒治疗 (HAART) | 主要组织相容性复合体 (MHC) | 白细胞 (WBC) |
| 甲型肝炎病毒 (HAV) | 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) | 世界卫生组织 (WHO) |