

从中哈边境亚洲璃眼蜱中检测到弗朗西斯氏菌样内共生体核酸

尹小平¹, 赵姗姗², 刘丹², 田延河¹, 巴特尔¹, 程天立¹, 张江国¹, 王远志²

摘要:目的 对中哈边境铁路线区域的亚洲璃眼蜱中弗朗西斯菌属及内共生体检测。方法 2015年在中哈边境采集的游离蜱进行形态学与分子学鉴定后,扩增弗朗西斯菌属及共生体 16S rRNA 和 *sdhA* 基因,对阳性产物测序后进行 Blast 分析,用 Mega 6.0 构建分子遗传进化树。**结果** 对 243 只游离蜱经形态学与分子学鉴定为亚洲璃眼蜱后,经 PCR 病原学检测及测序得到 35 份(只)阳性,阳性率为 14.4%。分析得到两株(Seq1 和 Seq2)不同基因型的序列,遗传进化树显示,这两株弗朗西斯菌属内共生体聚到 1 支,未检测到土拉弗朗西斯菌。**结论** 在中哈边境铁路线区域亚洲璃眼蜱中首次检测到弗朗西斯菌样核酸。

关键词:亚洲璃眼蜱;PCR;弗朗西斯菌;中哈边境

中图分类号:R378 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2017)02-0170-03

First detection of *Francisella-like endosymbionts in Hyalomma asiaticum asiaticum* from China-Kazakhstan border

YIN Xiao-ping¹, ZHAO Shan-shan², LIU Dan², TIAN Yan-he¹, BA Te-er¹,
CHENG Tian-li¹, ZHANG Jiang-guo¹, WANG Yuan-zhi²

(1. *ala shan kou inspection and quarantine bureau Ala shan kou*, 833418, *Shihezi, shihezi university*, 832000)
2. *Shihezi University, Shihezi 832000*)

Abstract: We conducted the detection the *Francisella* spp. nucle acid from *Hyalomma asiaticum asiaticum* that main distribution is on railway line area from China-Kazakhstan border. The free-living ticks were collected and then identified by morphological and molecular methods. After species identification, they were detected by PCR targeting 16S rRNA and *sdhA* of *Francisella* spp. The amplified products were sequenced and the sequences was analyzed by using the Blast. A phylogenetic tree was constructed using MEGA 6 software. A total of 243 fleas were identified as *H. asiaticum asiaticum*. Only 35 samples were detected for *Francisella* spp. positive and the positive rate was 14.4%. Sequence analysis showed that two different sequences (seq1 and seq2) and all belong to *Francisella*-like endosymbionts (FLEs). Phylogenetic analyses showed that two FLEs were belong to the same cladd. This is first detection of FLEs nucleic acid from *H. asiaticum* Railway line area of China-Kazakhstan border.

Keywords: *Hyalomma asiaticum asiaticum*; PCR; *Francisella* spp.; China-Kazakh border

General administration of quality supervision, inspection and quarantine technology fund project (2016 lk264)

Corresponding author: Wang Youn-zhi, Email: wangyouzhi621@126.com

弗朗西斯氏菌科包括弗朗西斯氏菌属以及弗朗西斯氏菌样内共生体(*Francisella-like endosymbionts*)。

目前已知弗朗西斯氏菌可以感染大约 150 种脊椎动物,在自然环境中也与无脊椎动物相关,并且它可以在水或者泥土中至少一年。因为这种宿主的广泛性阻碍了人们对它的生态学与流行病学认识^[1-2]。土拉弗朗西斯菌(*F. tularensis*, 土拉菌),作为弗朗西斯氏菌属一种,因为具有较强传染性的胞内寄生菌,能够引起人和动物土拉热,也叫

国家质检总局科技基金项目(No. 2016lk264)资助

通讯作者:王远志,Email: wangyouzhi621@126.com

作者单位:1. 中华人民共和国阿拉山口出入境检验检疫局,阿拉山
833418;

2. 石河子大学,石河子 832000

野兔热,是一种自然疫源性疾病,并呈世界性分布^[3]。该菌具有传播途径多样性(主要通过媒介节肢动物,如蜱等在哺乳动物和人之间传播)、感染计数低、致病性强的特征,因此被列为与鼠疫、炭疽等同的A类恐怖病原。中哈边境线全长约1700 km,均与哈萨克斯坦东部、巴尔喀什湖的东南部大沙鼠鼠疫自然疫源地毗邻^[4],也是各类蜱种的高发分布区。目前主要有7个口岸分别行使国家相关主权。为保障国家“一带一路”战略的实施与安全,近年来阿拉山口检验检疫局采用PCR检测技术,已在蜱类中检测出多种病原。但其是否携带弗朗西斯氏菌、土拉弗朗西斯菌的情况不清,因此本研究对该地区采集的游离蜱进行了该病原的核酸检测,以期预测、评估该区疫情存在的危害风险。

1 材料与方法

1.1 标本采集与鉴定 2015年3~9月在中哈边境铁路线两侧区选择3个地段监测点,用人工诱捕法采集游离蜱,将活体蜱装入透析的试管瓶中带回实验室。用体式显微镜参照《新疆蜱类志》进行种类鉴定。

1.2 DNA 提取 每只蜱一管,采用梯度酒精(90%、70%、50%、30%、无菌蒸馏水)清洗30 min,随后取出放置在无菌滤纸上吸取多余的无菌蒸馏水。最后放置在无菌EP管中研磨后按DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]说明书,提取基因组DNA,置于-20℃保存备用。

1.3 分子学检测与系统进化树分析 PCR扩增蜱16S rRNA基因^[5]。根据弗朗西斯菌特异性引物Fr153/Fr1281PCR扩增部分16S rRNA基因,阳性进一步扩增弗朗西斯菌部分sdhA基因^[1-2]。选取阳性样本送上海生工有限公司进行测序。将测序结果进行Blast分析,用Mega 6.0构建遗传进化树分析。

2 结果

2.1 蜱种鉴定:共采集243只游离蜱,经形态学与分子学鉴定为亚洲璃眼蜱,见图1。



图1 亚洲璃眼蜱

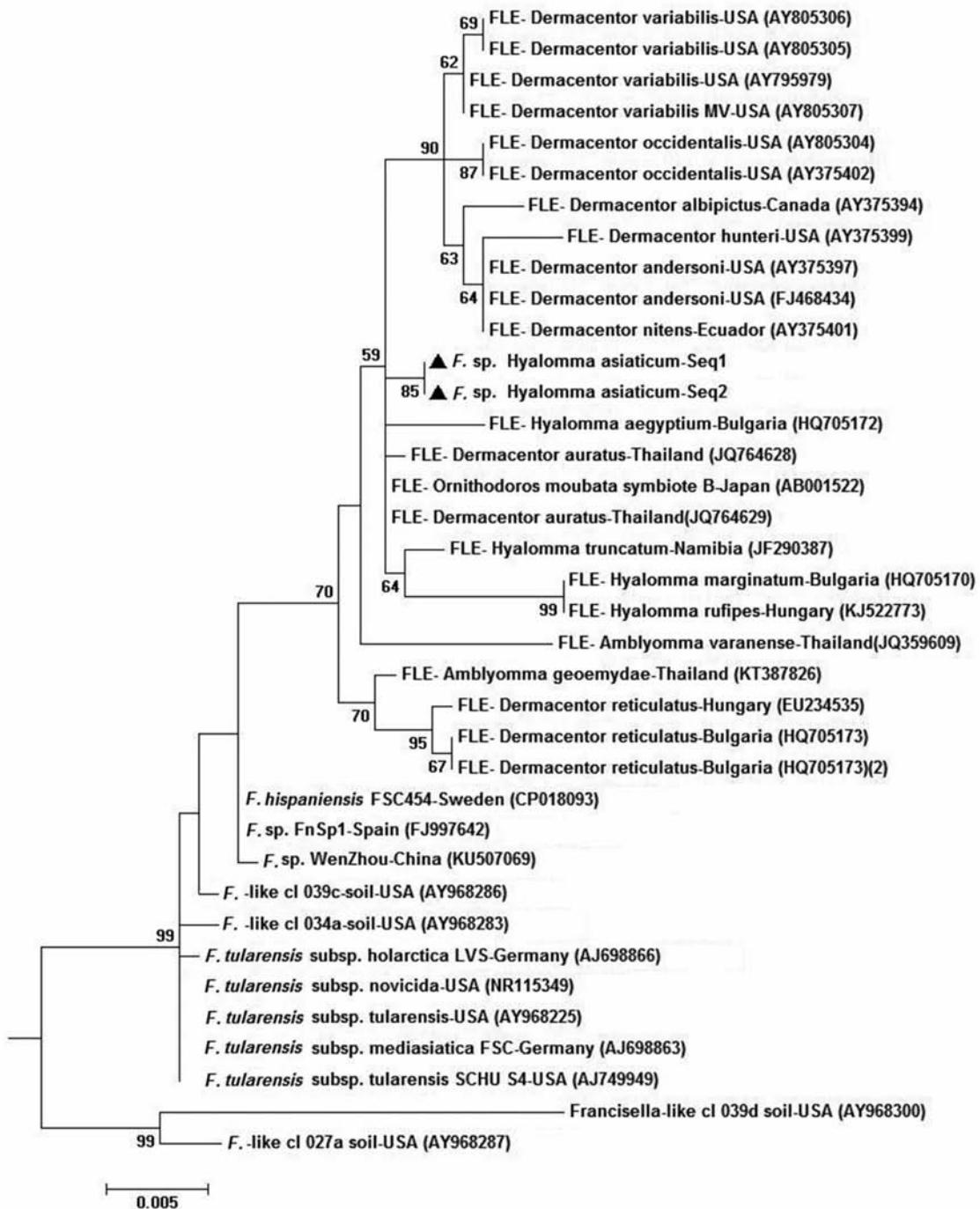
Fig. 1 *H. asiaticum asiaticum*

2.2 分子学检测:经PCR扩增,游离蜱243只中有35份检测到弗朗西斯菌16S rRNA和sdhA阳性片段,阳性率为14.4%(35/243)。测序DNAMAN分析得到两株(Seq1和Seq2)基因型不同的序列,16S rRNA的同源性为99.9%和sdhA的同源性为99.7%。Blast分析16S rRNA基因显示Seq1与Seq2,分别与来自日本钝缘蜱属中的*Ornithodoros moubata*(AB001522)同源性最高为99.4%(1162/1169)和99.5%(1163/1169);sdhA基因显示Seq1与Seq2分别与来自埃塞俄比亚的璃眼蜱属*Hyalomma rufipes*(KJ864964)的同源性最高为98.3%(285/290)和98.6%(286/290)。基于16S rRNA遗传进化树显示,来自中哈边境铁路线铁路线区的亚洲璃眼蜱中的弗朗西斯菌单独聚为一支,并且与来自其他国家蜱中检测的弗朗西斯菌样内共生体聚在同一支上(图2)。所有序列已上传至GenBank,16S rRNA: KX852464、KX852466和sdhA: KX852472、KX852473。

3 讨论

蜱是一类吸血的节肢动物,属寄螨目、蜱总科。目前世界上已知蜱类应为895种,包括软蜱科Argasidae 189种、硬蜱科Ixodidae 705种、纳蜱科Nuttalliellidae 1种,中国已知蜱类119种,包括软蜱科13种(锐缘蜱属Argas 7种、败蜱属Carios 4种、钝缘蜱属Ornithodoros 2种)、硬蜱科104种(硬蜱属Ixodes 24种、花蜱属Amblyomma 8种、血蜱属Haemaphysalis 44种、异扇蜱属Anomalohimalaya 2种、璃眼蜱属Hyalomma 7种、革蜱属Dermacentor 12种、扇头蜱属Rhipicephalus 8种)。新疆至1995年已发现2科9属45种(亚种),其中璃眼蜱属包括麻点璃眼蜱、小亚璃眼蜱、嗜驼璃眼蜱、亚洲璃眼蜱、亚东璃眼蜱、残缘璃眼蜱和盾糙璃眼蜱7种^[6]。亚洲璃眼蜱广泛分布于新疆荒漠或半荒漠地区为三宿主蜱,也是中哈边境地区广泛分布的优势种,并也寄生于家畜与小型哺乳动物体表的重要种类^[4]。现已从该蜱中检测到多种病原体,如新疆出血热、Q热、北亚蜱媒斑点热、蜱媒脑炎、鼠疫、流行性斑疹伤寒、布鲁氏菌病、立克次体、莱姆病、巴贝斯虫等,具有重要的医学意义。

本次在亚洲璃眼蜱中首次检测到的弗朗西斯菌样内共生体,该菌广泛分布在蜱中,根据GenBank数据库发现在革蜱属、璃眼蜱属、硬蜱属、钝缘蜱属以及花蜱属均有报道,并且分布范围,除大洋洲与南极洲外均见报道,如泰国、日本、美国、加拿大、厄瓜



注:▲本区阳性株

图 2 弗朗西斯氏菌属及弗朗西斯氏菌样内共生体的 16S rRNA 遗传进化树
 Fig. 2 *Francisella* and *Francis endosymbiont* of 16 S rRNA genetic evolutionary tree

多尔、纳米比亚、埃塞俄比亚、保加利亚、匈牙利以及法国^[2]。基与 16S rRNA 遗传进化树显示在亚洲璃眼蜱中检测到的弗朗西斯菌样内共生体单独聚为一支,与其他蜱中检测到的内共生体存在差异,显示该菌的多样性及与宿主间的相互进化关系。目前,由于 *sdhA* 还未广泛应用于 FLE 的研究,所以没有关于该基因的综合的分析,有待进一步研究。本次在

亚洲璃眼蜱中虽未检测到土拉弗朗西斯菌,但该菌在新疆地区分布广泛,曾在边缘革蜱以及草原革蜱中分离出病原^[7-8]。血清学的调查发现新疆西北地区多个县包括博乐地区,人及家畜都存在该病原的抗体血清阳性的报道^[8]。目前在美国、日本、俄罗斯、土耳其、西班牙、瑞士、瑞典、德国等国家均有报

(下转第 177 页)