

## 浙江省衢州地区鼠类携带莱姆病螺旋体研究

张建民, 占炳东, 陈旭富, 曹国平, 王双青, 吕磊, 杨瑞军, 叶承华

**摘要:**目的 了解衢州市鼠类携带莱姆病螺旋体状况以及莱姆病螺旋体基因型。方法 采用针对莱姆病螺旋体 5S~23S 基因间隔区的巢式 PCR 方法检测鼠脾标本, 对阳性样本进行基因测序及分析, 构建系统发育树。结果 在 378 份鼠标本中检出莱姆病螺旋体核酸阳性 57 份, 阳性率 15.08%。有 *Borrelia garinii* (B.g) 基因型、*Borrelia valaisiana* (B.v) 基因型 *Borrelia spielmanii* (B.sp) 基因型。结论 衢州境内鼠类存在至少 3 个型别莱姆病螺旋体感染, 应加强该病原体的检测和莱姆病的防制。

**关键词:**伯氏疏螺旋体; 鼠类; 衢州地区

中图分类号: R377

文献标志码: A

文章编号: 1002-2694(2021)11-1053-04

### Study of *Borrelia burgdorferi* in rodents in Quzhou area

ZHANG Jian-min, ZHAN Bing-dong, CHENG Xu-fu, CAO Guo-ping,  
WANG Shuang-qing, LYU Lei, YANG Rui-jun, YE Cheng-hua

(Quzhou Center for Disease Control and Prevention, Quzhou 324000, China)

**Abstract:** In order to understand the nature of infection and genotypes of *Borrelia burgdorferi* in rodents in Quzhou City, Zhejiang Province, nested PCR was used to amplify 5S-23S rRNA spacer fragments of *B. burgdorferi* from rodent spleen samples. The positive PCR products were sequenced and a phylogenetic tree was constructed. A total of 57 rodents were positive among 378 samples tested, with a prevalence of 15.08%. Sequence analysis of the amplification products showed identification of *Borrelia garinii*, *Borrelia valaisiana* and *Borrelia spielmanii*. The infection with at least three *B. burgdorferi* genotypes in rodents was confirmed in the Quzhou area. The findings of this study are necessary for the implementation of monitoring and prevention of Lyme disease.

**Keywords:** *Borrelia burgdorferi*; rodents; Quzhou area

Supported by the Project of the Medical and Health Science and Technology Plan of Zhejiang Province (No. 2018KY881) and the Scientific & Technological Guidance Project of Quzhou City (No. 20172091, No. 20172092)

Corresponding author: Zhang Jian-min, Email: qzzjm2003@163.com

莱姆病是一种全球性的蜱媒传染病, 由经蜱叮咬传播的伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 感染所致<sup>[1]</sup>。20 世纪 70 年代该病在美国首次发现, 1982 年 Burgdorfer 从蜱类及感染患者的体内分离出伯氏疏螺旋体<sup>[2]</sup>。

我国于 1985 年首次在黑龙江林区内发现莱姆病患者, 迄今全国各省/自治区/直辖市 (含台湾地

区) 均有莱姆病病例报告<sup>[3]</sup>, 同时也从可疑莱姆病病人血清中检测出抗体阳性<sup>[4]</sup>。衢州市目前尚无典型莱姆病病例报告, 但有明确的血清抗体阳性的疑似病例报道, 人群中存在莱姆病感染<sup>[5]</sup>, 并且衢州市有明确的蜱及蜱媒传染病分布<sup>[6]</sup>报道。

为深入研究莱姆病螺旋体在我市鼠类中的感染情况, 间接评估莱姆病的感染风险, 我们采集衢州市部分县区的鼠类标本开展莱姆病螺旋体核酸检测。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 标本采集 2014—2017 年, 在柯城、开化乡

浙江省医药卫生科技计划项目 (No. 2018KY881); 衢州市科学技术局科技计划项目 (No. 20172091, No. 20172092)

通讯作者: 张建民, Email: qzzjm2003@163.com;

ORCID: 0000-0002-1530-4264

作者单位: 浙江省衢州市疾病预防控制中心, 衢州 324000

镇的农田、山林处捕获鼠类,经无菌解剖后,取鼠脾置于无菌冻存管中,于-80℃存放。

1.1.2 试剂 TIANGEN 血液/组织/基因组 DNA 提取试剂盒 (cat # DP304-03); DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) 预混反应体系 (Thermo K1082)。

1.1.3 仪器 宁波新芝 Scientz-48 高通量组织破碎仪, Eppendorf5425 高速离心机, BIO-Rad 扩增仪, BIO-Rad HE-120en 电泳仪, BIO-Rad Chemi Doc™ XRS+ 凝胶成像系统。

1.1.4 巢式 PCR 扩增引物靶序列 莱姆病螺旋体核糖体 5s-23s 基因间隔区 (第 1 轮 23s3/23sa, 第 2 轮 23s5/23s6)。见表 1。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequence

| 引物   | 核苷酸序列(5'-3')             |
|------|--------------------------|
| 23s3 | CGACCTTCTTCGCCCTTAAAGC   |
| 23sa | TAAGCTGACTAATACTAATTACCC |
| 23s5 | CTGCGAGTTCGCGGGAGA       |
| 23s6 | TCCTAGGCATTCACCATA       |

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取鼠脾 10 mg 左右,采用组织破碎仪破碎后制成细胞悬液,按 TIANGEN (cat # DP304-03) 提取试剂盒说明书对样品进行 DNA 提取。-40℃保存,备用。

1.2.2 巢式 PCR 检测 采用 30 μL 反应体系,第 1 轮反应体系: 2×Mix 15 μL, 上游引物(10.0 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物(10.0 μmol/L) 0.8 μL, 模板 3.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.4 μL, 总体积 30.0 μL 体系。第 2 轮反应体系: 2×Mix 15 μL, 上游引物(10.0 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物(10.0 μmol/L) 0.8 μL, 模板 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 12.4 μL, 总体积 30.0 μL 体系。反应条件: 第 1 轮 PCR 为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 35 s, 35 个循环后; 72℃ 延伸 10 min; 然后降温到 4℃ 保存。第 2 轮 PCR 反应为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环后; 72℃ 延伸 10 min; 然后降温到 4℃ 保存。

1.2.3 PCR 产物检测 巢式 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶 140 V 电泳 30~40 min, 在凝胶成像仪成像拍照。阳性片段为 253 bp 左右。

1.2.4 测序及序列分析 将 PCR 产物送生工生物上海有限公司测序, 使用 Lasergen 软件经序列分析并在 NCBI 网站应用 Blast 对序列进行比对。与下载的同源性高且正式发表的序列用 MUSCLE(v3.8.31) 软件对提供的核酸序列进行多重比对。将比对后的序列采用 fastree(version 2.1.11) 软件中的 Maximum Likelihood 法构建系统发育树, 对系统发育树分支的可靠性进行验证(bootstrap, 1 000 replications)。

## 2 结果

2.1 鼠类分布 2014—2017 年在柯城区、开化县两个采集点共捕鼠 378 只, 其中, 黑线姬鼠 127 只、褐家鼠 88 只、黄胸鼠 67 只、社鼠 49 只、针毛鼠 33 只、臭鼬 5 只、白腹巨鼠 3 只、黄鼬 2 只、青毛鼠 2 只、东方田鼠 2 只, 分别占捕获总数的 33.59%、23.28%、17.72%、12.96%、8.73%、1.32%、0.79%、0.53%、0.53% 和 0.53%。黑线姬鼠、褐家鼠和黄胸鼠为优势种, 占总数的 74.6%。

2.2 巢式 PCR 对采集的 378 份鼠脾标本用 TIANGEN 血液/组织/基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后, 用 23 s 3/23 s a 和 23 s 5/23 s 6 两组引物进行两轮 PCR 检测。在 59 份标本中获得阳性结果。不同年份、不同鼠种莱姆病核酸阳性结果见表 2、表 3。

表 2 2014—2017 年莱姆病螺旋体核酸阳性结果  
Tab.2 Positive nucleic acid results of *Borrelia burgdorferi* from 2014 to 2017

| 年份   | 标本数 | 莱姆病螺旋体 |       |
|------|-----|--------|-------|
|      |     | 阳性数/份  | 阳性率/% |
| 2014 | 120 | 48     | 40.00 |
| 2015 | 98  | 9      | 9.18  |
| 2016 | 80  | 1      | 1.25  |
| 2017 | 80  | 1      | 1.25  |
| 合计   | 378 | 59     | 15.61 |

表 3 不同鼠种莱姆病螺旋体核酸阳性结果

Tab.3 Positive nucleic acid results of *Borrelia burgdorferi* from different rodent species

| 鼠种   | 数量  | 莱姆病螺旋体 |       |
|------|-----|--------|-------|
|      |     | 阳性数/份  | 阳性率/% |
| 黑线姬鼠 | 127 | 0      | 0.00  |
| 褐家鼠  | 88  | 33     | 37.50 |
| 黄胸鼠  | 67  | 17     | 25.37 |
| 社鼠   | 49  | 5      | 10.20 |
| 针毛鼠  | 33  | 4      | 12.12 |
| 臭鼯鼠  | 5   | 0      | 0.00  |
| 白腹巨鼠 | 3   | 0      | 0.00  |
| 黄鼯   | 2   | 0      | 0.00  |
| 青毛鼠  | 2   | 0      | 0.00  |
| 东方田鼠 | 2   | 0      | 0.00  |
| 合计   | 378 | 59     | 15.61 |

2.3 测序结果和基因型 选取典型的 37 条序列分别通过 NCBI 网站中的 blastn 软件进行比对,发现它们与 GenBank 中伯氏疏螺旋体菌株的 5S~23S rRNA 基因间隔区序列具有高度同源性。在 37 份样本扩增序列中,有 26 份阳性样本为 *Borrelia garinii* (B.g) 基因型;有 8 份阳性样本为 *Borrelia valaisiana* (B.v) 基因型;有 3 份阳性样本为 *Borrelia spielmanii* (B.sp) 基因型。其中,2014 年柯城区采集的样本全部为 B.g 基因型,2015 年开化县采集的样本有 B.v 基因型和 B.g 基因型,2016、2017 年度开化县采集的样本均为 B.v 基因型。不同年份、地点采集的样本基因型见表 4。

2.4 系统发育树重构 对本次检测阳性样本,选取 37 条典型的序列用 MUSCLE(v3.8.31) 软件进行多重比对。将比对后的序列采用 fastree(version 2.1.11) 软件中的 Maximum Likelihood 法构建系统发育树,对系统发育树分支的可靠性进行验证(bootstrap,1000 replications),结果见图 1。

表 4 不同年份地点莱姆病螺旋体基因型

Tab.4 Genotypes of *Borrelia burgdorferi* in different years and locations

| 年份   | 采集地点    | 样本数 | 分析阳性<br>样本数 | 基因型                     |                            |                            |
|------|---------|-----|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
|      |         |     |             | <i>Borrelia garinii</i> | <i>Borrelia valaisiana</i> | <i>Borrelia spielmanii</i> |
| 2014 | 柯城区万田乡  | 120 | 15          | 15                      | 0                          | 0                          |
|      | 柯城区姜家山乡 |     | 11          | 11                      | 0                          | 0                          |
| 2015 | 开化县音坑乡  | 98  | 6           | 0                       | 5                          | 1                          |
|      | 开化县汶山乡  |     | 3           | 0                       | 1                          | 2                          |
| 2016 | 开化县音坑乡  | 80  | 1           | 0                       | 1                          | 0                          |
| 2017 | 开化县马金镇  | 80  | 1           | 0                       | 1                          | 0                          |
|      | 合计      | 378 | 37          | 26                      | 8                          | 3                          |

### 3 讨论

莱姆病作为近年来新发的蜱媒传染病,已成为全球公共卫生问题<sup>[7]</sup>。

莱姆病螺旋体的贮存宿主较多,鼠类是其重要的贮存宿主之一。检测鼠类莱姆病螺旋体病原体伯氏疏螺旋体感染情况,对防控人莱姆病具有重要意义。目前为止,世界上所分离到的伯氏疏螺旋体菌株不断增加,2009 年报道有 14 个基因型<sup>[8]</sup>,目前已报道至少有 22 个基因型<sup>[3]</sup>,其中已确定对人有致病性的有 4 个基因型<sup>[9]</sup> *Borrelia burgdorferi sensu stricto*、*Borrelia garinii*、*Borrelia afzelii* 及 *Borrelia spielmanii*。而 *Borrelia valaisiana* 基因型莱姆病螺旋体的致病性也有不同的报道,部分研究认

为 *Borrelia valaisiana* 基因型莱姆病螺旋体也有致病性<sup>[10]</sup>。

本次采用巢式 PCR 方法检测莱姆病螺旋体,灵敏度、特异度均比较高<sup>[11-12]</sup>。378 份鼠脾标本莱姆病螺旋体核酸阳性 59 份,阳性率为 15.61%,在对选取的 37 条序列通过 blastn 软件比对,发现衢州地区的莱姆病螺旋体有 3 个型别,其中 *Borrelia garinii* 型占 70.3%,*Borrelia valaisiana* 型占 21.6%,*Borrelia spielmanii* 型占 8.1%。在不同年份、地点采集的鼠标本中,莱姆病螺旋体的基因型各不相同,在 2014 年柯城区采集的样本中检出的均为 *Borrelia garinii* 型,2015—2017 年开化县采集的样本中检出的为 *Borrelia valaisiana* 型和 *Borrelia spiel-*

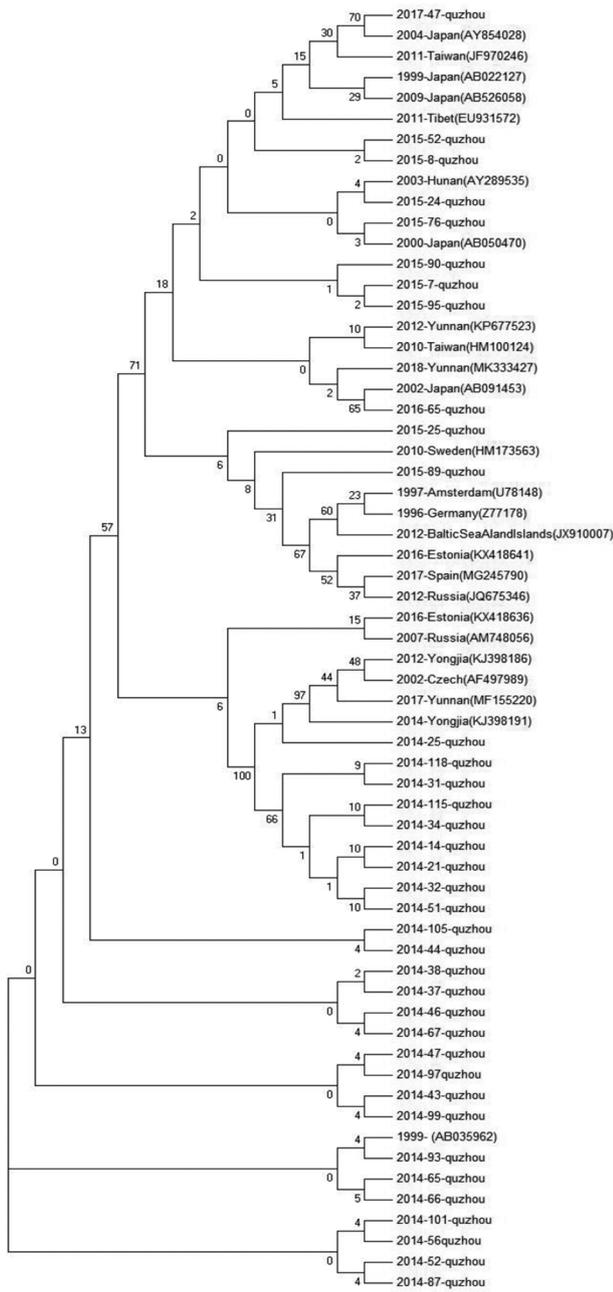


图1 浙江省衢州地区鼠类携带莱姆病螺旋体的系统进化树  
 Fig.1 Phylogenetic tree of *Borrelia burgdorferi* in rodents in Quzhou area, Zhejiang

*manii* 型。提示衢州地区的莱姆病螺旋体类型相对比较丰富,这也与衢州地区低山丘陵地形为主以及开化县打造国家公园,拥有大片的原始森林,森林覆盖率达到 80% 以上有关,是一个天然的生物基因

库,宿主动物和媒介生物种类繁多,病原体的基因型与媒介、宿主之间的关系有待今后继续探究。

随着经济的发展,这些地区的外来人员增多,完全无免疫力的人员进入,可能会对人群健康构成威胁,应引起高度重视。

利益冲突:无

引用本文格式:张建民,占炳东,陈旭富,等.浙江省衢州地区鼠类携带莱姆病螺旋体研究[J].中国人兽共患病学报,2021,37(11):1053-1056. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.149

参考文献:

[1] 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,2015,25(5):1072-1081.  
 [2] Burgdofer W, Barbour AG, Hayes SF, et al. Lyme disease a tick borne spirochetosis[J]. Science, 1982, 216 (4552): 1371-1319.  
 [3] 郝琴.莱姆病的流行现状及防控措施[J].中国媒介生物学及控制杂志,2020,31(6):639-642. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2020.06.002  
 [4] 李静,宝福凯,柳爱华. 莱姆病临床表现研究进展[J]. 现代预防医学,2014,22(41):4181-4183.  
 [5] 龚震宇,姜理平,王臻,等.浙江省莱姆病血清流行病学初步调查[J].疾病监测,2005,20(10):510-512.  
 [6] 凌锋,龚震宇,柴程良,等.浙江省蜱媒传染病监测研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2013,24(1):19-23.  
 [7] 李静,梁张,宝福凯,等. 莱姆病流行病学研究进展[J].中国热带医学,2013,13(8):1035-1038.  
 [8] Natalia R, Maryna G, Libor G, et al. *Borrelia carolinensis* sp. Nov, a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States [J]. Clin Microbiol, 2009, 7(1): 134-141.  
 [9] 刘志云,郝琴,万康林.莱姆病的免疫学研究进展[J].中国人兽共患病学报,2010,26(10):960-962.  
 [10] 李永学,刘敏,王树声,等.广西莱姆病的初步调查研究[J].中国人兽共患病学报,2013,29(12):1225-1228. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2013.12.021  
 [11] 张刘丽,侯学霞,耿震,等.巢式PCR用于疑似莱姆病患者血清标本检测的研究[J].中国预防兽医学报,2013,24(1):8-10.  
 [12] 全彩玲,李培英,周金林.莱姆病诊断技术研究进展[J]. 中国动物传染病学报,2009,17(3):76-80.

收稿日期:2021-03-12 编辑:张智芳