

中国-哈萨克斯坦边境阿拉山口口岸鼠体蚤及游离蜱感染巴尔通体调查

尹小平¹, 赵姗姗², 田延河¹, 巴特¹, 张江国¹, 程天利¹, 王远志²

1 阿拉山口出入境检验检疫局, 新疆 阿拉山口 833418; 2 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000

摘要: 目的 对中国-哈萨克斯坦(中哈)边境阿拉山口口岸地区捕获的野生鼠类体表寄生蚤与游离蜱进行巴尔通体核酸检测, 为该地区鼠传疾病提供风险预警和依据。方法 于 2016 年 1—9 月采集鼠类体表蚤及游离蜱, 进行形态学鉴定, 提取蚤类全基因组, 采用 PCR 扩增巴尔通体 *gltA*、*ITS* 和 *ribC* 基因, 阳性产物进行 Blast 分析, 利用 Mega 6.0 软件构建分子遗传进化树。结果 共采集蚤 2 139 匹, 隶属于 6 属 7 种, 其中臀突客蚤为优势蚤种; 采集游离蜱 243 只, 均为亚洲璃眼蜱。其中臀突客蚤、叶状切唇蚤突高亚种和后弯怪蚤均检测到巴尔通体 DNA 片段, 蜱中未检测到巴尔通体阳性片段。通过测序得到 3 株不同基因的巴尔通体序列, *gltA*、*ITS* 和 *ribC* 的 DNAMAN 同源性分别为 93.61%、52.54% 和 86.72%。Blast 比对和进化树分析结果与 *Bartonella* sp. AL01、02、04 相同。结论 中哈边境阿拉山口口岸地区 3 种鼠体寄生蚤均携带巴尔通体。

关键词: 巴尔通体; 蚤; 蜱; 聚合酶链式反应; 阿拉山口口岸; 中国-哈萨克斯坦边境

中图分类号: R384.3; R37 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-8280(2017)04-0350-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2017.04.011

Detection of *Bartonella* from rodent-harboring fleas and free-living ticks at Alashankou pass, China-Kazakhstan border

YIN Xiao-ping¹, ZHAO Shan-shan², TIAN Yan-he¹, BA Te¹, ZHANG Jiang-guo¹, CHENG Tian-li¹, WANG Yuan-zhi²

1 Alashankou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Alashankou 833418, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 2 College of Animal Science and Technology, Shihezi University

Corresponding author: WANG Yuan-zhi, Email: wangyuanzhi621@126.com

Supported by the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China Scientific Research Subject (No. 2016IK264)

Abstract: Objective To detect *Bartonella* spp. nucleic acid from main ectoparasite fleas in rodents and free-living ticks from Alashankou pass, China - Kazakhstan border. **Methods** Collected fleas and ticks were then identified by morphological features. After species identification, genome DNA was extracted and detected by PCR targeting *gltA*, *ITS* and *ribC* of *Bartonella* spp. The amplified products were sequenced and the sequences analyzed using the Blast. A phylogenetic tree was constructed using Mega 6.0 software. **Results** A total 2 139 fleas (7 species, 6 genera) were identified. *Xenopsylla minax* was the predominant species. A total of 243 free-living ticks were identified as *Hyalomma asiaticum*. Only *X. minax*, *Coptopsylla lamellifer ardua*, and *Parddopsyllus repandustested* positive for *Bartonella* spp. and all the ticks were negative. Sequence analysis showed that three different sequences, DNAMAN homology were 93.61%, 52.54%, and 86.72%, respective, *gltA*, *ITS*, and *ribC*. Blast and phylogenetic analyses showed that this three *Bartonella* and *Bartonella* sp. AL01, 02, 04 were same sequence. **Conclusion** *Bartonella* nucleic acid was detected in three different wild rat-flea species at Alashankou pass.

Key words: *Bartonella*; Flea; Tick; Polymerase chain reaction; Alashankou pass; China-Kazakhstan border

巴尔通体(*Bartonella*)是世界广泛分布的革兰阴性、营养条件要求苛刻的兼性细胞内寄生需氧杆菌。其通过吸血节肢动物(如蚤、蜱和虱等)在脊椎动物间传播^[1]。目前,全世界已报道巴尔通体达 30

余种和一些未定种,截至 2009 年已有 13 种为人致病菌,主要有杆菌状巴尔通体(*B. bacilliformis*)、五日热巴尔通体(*B. quintana*)、汉赛巴尔通体(*B. henselae*)、伊丽莎白巴尔通体(*B. elizabethae*)、克氏巴尔通体

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2016IK264)

作者简介:尹小平,男,副研究员,主要从事口岸医学媒介监测工作,Email: yxpciq@163.com

通信作者:王远志,Email: wangyuanzhi621@126.com

网络出版时间:2017-06-12 16:23 网络出版地址: http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

(*B. clarridgeiae*)、格拉范姆巴尔通体(*B. grahamii*)和文氏巴尔通体的 2 个亚种(*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*、*B. vinsonii* subsp. *arupensis*)等,可引起人类卡里翁病、战壕热、猫抓病、心内膜炎、杆菌性血管瘤和肝脾肉芽肿等,临床表现复杂多样,几乎危及全身各个器官和系统^[2]。

近年来,国内有报道从鼠、蚤和蜱中分离到巴尔通体,从临床患者血液中检测到巴尔通体已超过 12 种^[3]。中国-哈萨克斯坦(中哈)边境阿拉山口口岸是第二座亚欧大陆桥中国段西部的桥头堡,该区物种丰富,小型哺乳动物和病媒生物种类不断被发现,截至 2008 年已报道蚤类 5 科 12 属 22 种^[4],蜱类达 8 种之多^[5],但主要传播媒介是否携带巴尔通体不详,存在疫情的跨境传播和潜在隐患,不利于风险预警。因此,应对该地区的主要传播媒介蚤、蜱类进行巴尔通体病原体分子流行病学调查。本研究采用 PCR 检测中哈边境阿拉山口口岸通道、城、郊、野外及边境线区鼠体表蚤和游离蜱的巴尔通体携带及分布情况,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本采集 于 2016 年 1—9 月,在中哈边境阿

拉山口口岸出入境通道、城、郊、野外及边境线 5 个监测区捕获鼠类并采集其体表寄生蚤,按不同宿主分装于含 70%乙醇瓶中;2016 年 5—9 月,在中哈边境火车站和艾比湖沿岸边采集游离蜱,带回实验室进行分类鉴定和计数并登记,待检。

1.2 DNA 提取 将蚤按不同种、雌、雄、宿主和采集区域,以每个无菌 EP 管放入 2~15 匹、蜱单只单管进行分装。采用不同溶液(90%、70%、50%、30%乙醇、无菌蒸馏水)依次清洗 30 min,后取出放置于无菌滤纸吸取多余无菌蒸馏水。最后置于无菌 EP 管中,按 DNA 提取试剂盒〔天根生化科技(北京)有限公司〕说明书提取蚤基因组 DNA,置-20℃保存备用。

1.3 PCR 及产物检测 反应体系 25 μl:模板 DNA 加 2 μl,12.5 μl Per mix(广州东盛生物科技有限公司),引物 1 μl,加去离子水至 25 μl,反应用引物及循环参数见表 1。取 2.5 μl 扩增产物至 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳至凝胶 2/3 处,利用凝胶成像系统观察并拍照。为避免标本污染引起假阳性反应,标本处理、反应液制备、PCR 扩增及产物分析分别在不同区域进行,加样移液器分开专用,PCR 同时设立空白对照(去离子水)及阳性对照〔前期 PCR 在臀突客蚤(*Xenopsylla minax*)上检测到的阳性样本〕。

表 1 PCR 反应条件
Table 1 The PCR reaction conditions

引物	序列(5'~3')	退火温度(℃)	扩增片段大小(bp)	参考文献
BhCS.781p	GGGGACCAGCTCATGCTGG	48	380	[2]
BhCS.1137n	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA			
Bh.311p	CTCTTTCTTCAGATGATGATCC			
Bh.452n	AACCAACTGAGCTACAAGCCCT	48	100~300	[2]
ribC-BARTON-F	TAACCGATATTGTTGTGTGAAG			
ribC-BARTON-R	TAAAGCTAGAAAGTCTGGCAACATAACG	51	588	[6]

1.4 PCR 测序与系统进化树分析 选取阳性样本送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果录入 GenBank 进行 Blast 分析,利用 Mega 6.0 软件构建遗传进化树。

2 结果

2.1 鼠、蚤、蜱捕获情况 共捕获鼠类 1 科 2 属 3 种 111 只,分别为大沙鼠(*Rhombomys opimus*) 102 只、怪柳沙鼠(*Meriones tamariscinus*) 3 只和红尾沙鼠(*M. erythrourus*) 6 只,大沙鼠为优势种,主要分布在城郊、野外及边境线区。在鼠体表采集蚤类 2 139 匹,经鉴定隶属于 6 属 7 种,其中臀突客蚤是该地区的优势蚤种,占总蚤数的 73.59%(1 574/2 139),主要宿主为大沙鼠,也是其他野栖和家栖多种鼠类的寄生蚤;叶状切唇蚤突高亚种(*Coptosylla lamellifer ardua*)、后弯怪蚤(*Paradoxopsyllus repandus*)和秃病

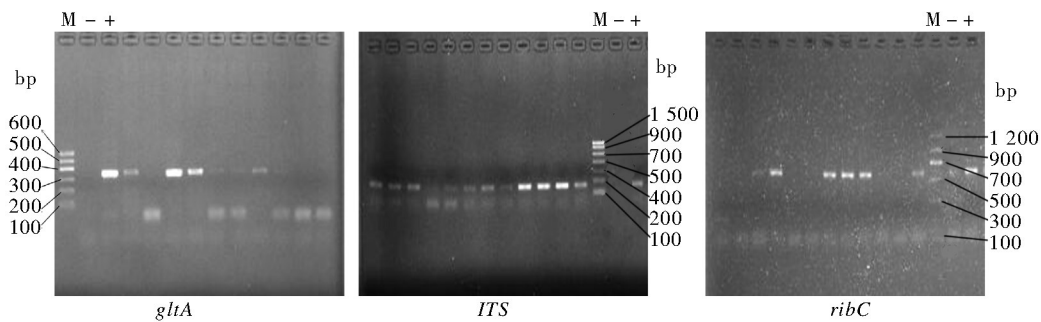
蚤指名亚种〔*Nosopsyllus (Gerbillophilus) laeviceps laeviceps*〕分别为 66、209 和 80 匹,也以大沙鼠为主要宿主,并寄生于怪柳沙鼠和红尾沙鼠;长吻角头蚤(*Echidnophaga oschanini*) 121 匹,是大沙鼠等多种鼠形动物的寄生蚤;同型客蚤指名亚种(*Xenopsylla conformis conformis*) 77 匹,主要宿主为红尾沙鼠;宽臂纤蚤(*Rhadinopsylla cedestis*) 12 匹,主要宿主为怪柳沙鼠,见表 2。采集游离蜱 243 只,经鉴定全部为亚洲璃眼蜱(*Hyalomma asiaticom*)。

2.2 PCR 扩增和测序结果 将全部蚤分为 199 组,按同种、同点 2~15 匹/组分装于无菌 EP 管中分批逐一进行研磨和核酸提取。243 只蜱每只均经消毒、研磨、核酸提取后,利用引物 BhCS.781p-BhCS.1137n、Bh.311p-Bh.452n 和 ribC-BARTON-F-ribC-BARTON-R 进行 PCR,分别扩增出巴尔通体 *gltA* 约 379 bp、16S~23S rRNA 基因间隔区(intergenic spacer, ITS)

5'-末端约 200 bp 和 *ribC* (riboflavin synthase gene) DNAMAN 比对分析 3 株巴尔通体的同源性分别为约 588 bp 片段。经测序得到 3 株不同的巴尔通体, 93.61%、52.54%和 86.72%(图 1)。

表 2 中哈边境阿拉山口地区鼠类体表染蚤情况
Table 2 Alashankou China-Kazakhstan border region rats body catch fleas

宿主	总蚤数和池数 (匹/池)	臀突客蚤		同型客蚤指名亚种		长吻角头蚤		叶状切唇蚤突高亚种		宽臂纤蚤		后弯怪蚤		秃病蚤指名亚种	
		蚤数 (匹)	池数	蚤数 (匹)	池数	蚤数 (匹)	池数	蚤数 (匹)	池数	蚤数 (匹)	池数	蚤数 (匹)	池数	蚤数 (匹)	池数
大沙鼠	1 896/173	1 460	102	47	4	98	8	66	24	0	0	177	33	48	2
怪柳沙鼠	108/19	56	11	1	2	0	0	0	0	12	2	18	2	12	2
红尾沙鼠	135/15	58	6	20	2	23	2	0	0	0	0	14	2	20	3
合计	2 139/207	1 574	119	77	8	121	10	66	24	12/2	2	209	37	80	7



注: M. DNA 分子质量标准; +. 阳性对照; -. 阴性对照; 其他泳道为部分样本 PCR 结果

图 1 巴尔通体 *gltA*、*ITS* 和 *ribC* 基因 PCR 扩增结果
Figure 1 The PCR amplification of *gltA*, *ITS*, *ribC* genes

2.3 鼠体表蚤巴尔通体核酸检测 仅臀突客蚤、叶状切唇蚤突高亚种和后弯怪蚤中检出巴尔通体阳性。大沙鼠体表的臀突客蚤、叶状切唇蚤突高亚种和后弯怪蚤巴尔通体阳性率分别为 66.67%(68/102)、70.83%(17/24)和 72.73%(24/33);怪柳沙鼠体表臀突客蚤和后弯怪蚤巴尔通体阳性率分别为 36.36%(4/11)和 50.00%(1/2);红尾沙鼠体表臀突客蚤巴尔通体阳性率为 33.33%(2/6)。其他蚤和全部亚洲璃眼蜱均未检出巴尔通体阳性片段。

2.4 进化树分析 Blast 比对分析发现, *Bartonella*-1、*Bartonella*-2 和 *Bartonella*-3 与前期在阿拉山口地区检测的 *Bartonella* sp. AL01 (KX572889、KX572893、KX572897)、02 (KX572890、KX572894、KX572898) 和 04 (KX572892、KX572896、KX572900) 同源性均达 100%;与 *B. rochalimae*、*B. grahamii* 和 *B. elizabethae* 的同源性分别为 97.22%~98.89%、93.73%~98.68% 和 92.65%~100%, 分别与 *B. rochalimae*、*B. grahamii* 和 *B. elizabethae* 聚为一支, 见图 2。

3 讨论

巴尔通体为人兽共患性病媒生物性传播疾病的病原体,其培养困难,菌落表型无明显特异性,主要依靠以 PCR 为基础的分子生物学技术及血清学方法进行检测鉴别。同时,该病原体地理分布广泛,受世界各地关注,尤其是蚤、白蛉、体虱和蜱等传播媒

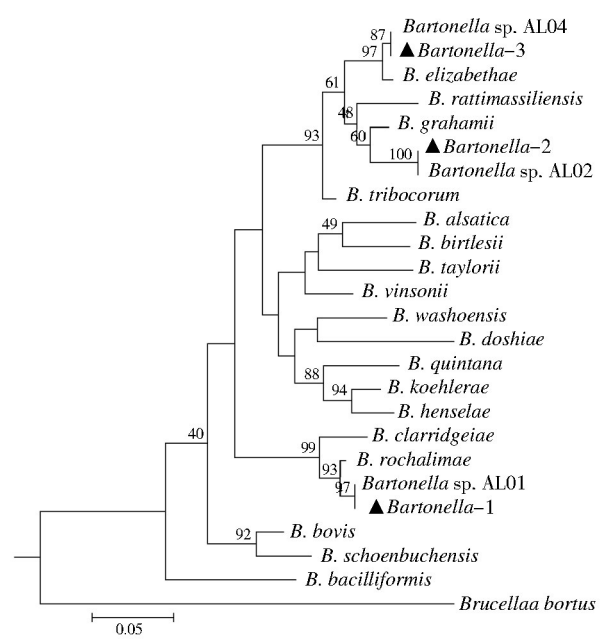


图 2 基于 *gltA*-*ITS*-*ribC* 基因构建的分子遗传进化树
Figure 2 Phylogenetic tree based on *gltA*-*ITS*-*ribC* gene of *Bartonella*

介的相关研究已引起广泛关注,在美国、法国、秘鲁、荷兰和意大利等国家均有报道应用 PCR 法扩增出蚤、蜱的巴尔通体基因^[6]。栗冬梅等^[7]采用 PCR 法证实猫栉首蚤 (*Ctenocephalides felis*) 和缓慢细蚤 (*Leptopsylla segnis*) 可感染巴尔通体,并在猫栉首蚤和微小牛蜱 (*Boophilus microplus*) 中分离培养出巴尔

通体,为蚤、蜱作为巴尔通体传播媒介提供了线索。

本研究应用 3 对巴尔通体特异性引物对蚤类样本进行 PCR,结果显示,中哈边境阿拉山口地区臀突客蚤、叶状切唇蚤突高亚种和后弯怪蚤中均扩增出巴尔通体阳性条带,经测序发现,3 种巴尔通体均有致病性,尤其在臀突客蚤中检测到 2 种致病巴尔通体且具有极高的阳性率。臀突客蚤不仅可以寄生在野栖鼠体表,也可寄生于家栖鼠〔如褐家鼠(*Rattus norvegicus*)〕^[8]。该蚤可叮咬人吸血,其在宿主中的交换转移及叮吸人血的习性可能增加人群感染的风险,应引起高度关注^[9]。本研究虽证实 3 种蚤类均携带巴尔通体,但对其潜在风险和传播作用应进行流行病学和传播实验等研究。亚洲璃眼蜱虽未检测到巴尔通体阳性核酸,但作为该区域的优势蜱种,其携带病原体的潜在风险仍不能忽视。

随着国家“一带一路”战略的深入和持续发展,阿拉山口口岸地区是中哈两国的必经要道,两国边境除铁丝网外无自然屏障,该地区的啮齿动物及体表蚤、蜱等媒介生物可随宿主动物通过铁丝网自由地跨入窜出。同时,各类交通工具、货物及贸易的流通为多种媒介生物的传入提供了便利。因此,应高度关注和加强对中哈边境地区巴尔通体等病原体的检测,为防止其传入传出提供风险预警和依据。

参考文献

[1] 栗冬梅,刘起勇,俞东征,等. 蚤、蜱中巴尔通体的分离培养及检测鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21 (12) : 1052–1058, 1074.

[2] Pérez-Martínez L, Venzal JM, González-Acuña D, et al. *Bartonella rochalimae* and other *Bartonella* spp. in fleas, Chile [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(7): 1150–1152.

[3] Liu QY, Eremeeva ME, Li DM. *Bartonella* and *Bartonella* infections in China: from the clinic to the laboratory [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2012, 35(2): 93–102.

[4] 尹小平,彭定希,李东,等. 阿拉山口口岸地区蚤类区系调查及动态分析[J]. 地方病通报, 2008, 23(1): 33–36.

[5] 尹小平,叶志辉,骄娃,等. 阿拉山口口岸地区蜱类区系调查及宿主动物染带关系监测分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(4): 375–377.

[6] Johnson G, Ayers M, McClure SCC, et al. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*) [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1069–1072.

[7] 栗冬梅,刘起勇,俞东征,等. 用 PCR 方法检出蚤类携带巴尔通体[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2005, 16(1): 5–8.

[8] 尹小平,叶志辉,彭定希,等. 臀突客蚤重要生态学调查与流行病学意义的探讨[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(2): 124–127.

[9] 尹小平,叶志辉,叶瑞玉,等. 臀突客蚤的生活史及其叮吸人血试验[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(1): 61–62.

收稿日期: 2017-04-27

· 信 息 ·

《中国媒介生物学及控制杂志》发表论文可直接使用的
英文缩写名单

本刊发表论文可直接使用的英文缩写如下。

DDT	滴滴涕	IHA	间接血凝试验
DDVP	敌敌畏	IFA	间接免疫荧光试验
DEET	避蚊胺	RBPT	虎红平板凝集试验
OR	比值比	SAT	试管凝集试验
CI	可信区间	PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
RR	相对危险度	PFGE	脉冲场凝胶电泳
DNA	脱氧核糖核酸	Ct 值	每个反应管内荧光信号达到设阈值时所经历的循环数
RNA	核糖核酸	A 值	吸光度值
PCR	聚合酶链式反应	GMT	几何平均滴度
RT-PCR	反转录聚合酶链式反应	CDC	疾病预防控制中心
ELISA	酶联免疫吸附试验	WHO	世界卫生组织