

河南信阳地区蜱及蜱寄生宿主血清病原体调查分析

张群芝^{1,2}, 罗海澜¹, 李新伟¹, 董自梅²

(1. 漯河医学高等专科学校 基础医学部, 河南 漯河 462000; 2. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453002)

摘 要:为调查河南省信阳市蜱及蜱宿主血清病原体种类,选择该市蜱密度较大的商城县采样区,对该县25个行政村的犬、羊、牛等288头家畜采用体表检蜱法进行调查,并利用实时荧光定量PCR、普通PCR和免疫检测方法对这些家畜寄生蜱虫及蜱虫宿主携带病原体进行分析。结果表明:该地区寄生蜱主要为长角血蜱,有少量的血红扇头蜱和微小牛蜱;这些蜱虫携带蜱媒发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)及嗜吞噬细胞无形体(HGA)病原体;蜱虫宿主血清内检出发热伴血小板减少综合征病毒及嗜吞噬细胞无形体。这与该地区流行病的发生存在相关性,不排除家畜传播人的可能。该调查为进一步研究豫南蜱虫病防治提供基础资料。

关键词:蜱;宿主;血清;病原体

中图分类号:S852.7

文献标志码:A

蜱是人畜共患疾病的重要传播媒介和储存宿主^[1],2009年以来河南省信阳地区常有“发热伴血小板减少综合征”及无形体感染病例的报道,病人多数为山林地区的农民,大多数病人被蜱虫叮刺过^[2-5]。从地理位置看,河南省信阳地区位于亚热带和暖温带的交界处,以丘陵地带为主,地形复杂且植被丰富,适宜蜱虫的生长和繁殖。从生产方式上,种植和养殖是该地区的经济支柱产业,当地农户家畜中的犬、牛、羊多采用放养模式。蜱是一种常见的,分布广泛专性吸血的体外寄生物^[6],常见家畜犬、羊、牛是蜱虫寄生的主要宿主,为进一步研究河南省信阳地区家畜携带蜱虫及蜱媒发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)、嗜吞噬细胞无形体(HGA)的感染情况,选择该地区近年来蜱扰报道较多的商城县进行寄生蜱活动调查,本研究共选取了河南省信阳地区商城县25个行政村,对246家农户家养动物寄生蜱虫情况及蜱虫寄生宿主血清携带SFTSV、HGA情况展开调查,以期为进一步研究河南信阳地区蜱媒流行性疾病防治提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

寄生蜱虫标本采集地点选取近年来蜱媒病原体病高发的河南省信阳市商城县,以该县五个乡25个行政村的246家农户家放养的犬、羊、牛作为调查对象,采用体表检蜱法,对放养家畜的体表寄生蜱虫进行采集。采用无菌操作法抽取蜱虫寄生宿主血液进行检测。采集器材应用有害生物采集包,采集包配备:标本管、标本盒、镊子、采血器等。

1.2 方法

1.2.1 蜱虫标本采集

2015年1月-12月期间,在河南省商城县选择固定采集点,于每个月10号到20号之间选取无雨天气,采用体表检蜱法分别采集当地农户家养犬、羊及牛体表寄生蜱虫,重点检查动物的耳、腋窝、颈、眼周、胸部、四肢根部等部位;对采集的犬、羊、牛宿主分组编号,在2015年1月-12月之间每个月对采集蜱虫的宿主动

收稿日期:2016-01-06;修回日期:2016-07-10.

基金项目:河南省科技发展计划基础与前沿科研课题(142300410430)

第1作者简介:张群芝(1968-),女,河南叶县人,漯河医学高等专科学校副教授,研究方向为医学生物学, E-mail: 124627169@qq.com.

通信作者:董自梅,教授,博士, E-mail: dzmhjx@163.com.

物跟踪,共选取了商城县 246 家农户的家畜,其中犬 124 只,羊 103 只,牛 61 头进行蜱虫检测。

1.2.2 宿主血清标本采集

对有蜱虫寄生的动物按采集地点及动物类型分组编号,2015 年 1 月~12 月每月采集寄生蜱虫同时,对有蜱寄生的每只动物跟踪采血,选蜱活动活跃的 5 月、6 月、7 月对每只宿主动物采血 3 次,采集蜱寄生动物静脉血液,实验室离心后取血清,分组编号,置于 1.5 mL 离心管-20 °C 保存。共采集蜱寄生宿主犬血清 234 份,蜱寄生宿主羊血清 183 份,蜱寄生宿主牛血清 84 份。

1.2.3 蜱虫标本病原体检测

1) DNA 及 RNA 提取

DNA 提取采用 TaKaRa DNA Extraction 试剂盒(宝生物),操作步骤按说明书进行;RNA 提取利用 Trizol 试剂,操作过程如下:对蜱标本进行处理:取无菌保存管内采集的蜱标本,用双蒸水冲洗,放 40 °C 烘箱中烘干,蜱标本放入预冷无菌研钵中,加液氮研磨至粉末状,加入 1 mL Trizol 试剂,继续研磨至匀浆。将蜱标本匀浆转移至 1.5 mL 的离心管中 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,取上清加入 200 μL 氯仿,用力震荡使其充分混匀,静置 5 min,然后 12 000 r·min⁻¹,离心 5 min,取上清液移入新离心管中重复上述步骤。转移上清液约 300 μL 于新的离心管中,加入等量预冷的异丙醇,混匀,室温静置 10 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, RNA 沉淀于离心管底,收集离心液,获得标本 RNA。

2) 将提取的蜱虫 RNA 逆转录为 cDNA

按照试剂盒(大连宝生物公司 rimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit, CatN0. D6110S)说明书进行逆转录:配制反应液,离心,振荡后放置于 25 °C 室温下 10 min,在 42 °C 水浴锅中放置 1h;再冰浴 2 min,收集逆转录产物 cDNA。

3) PCR 扩增

SFTSV 核酸检测采用 Real-time PCR,根据文献[7-9]以往的研究方法^[10]选取 S 片段的高度保守区作为靶区域;嗜吞噬细胞无形体以 16 SrRNA 基因部分序列为靶序列,进行 PCR 扩增与电泳。实验所用特异性引物用 Primer 5.0 软件设计,由北京金唯智公司合成。引物序列见表 1

表 1 实验所用引物及探针序列

目标病原体	引物名称	引物序列
SFTSV	Forward Primer	5'-TAAACTTCTGTCTTGCTGGCTCC-3'
	Reverse Primer	5'-TGGCAAGATGCCTTCACCA-3'
	Taqman MGB Probe	5'-CGCATCTTCACATTGAT-3'
HGA	GE9f	5'-AACGGATTATTCCTTATAAGCTTGCT-3'
	GE10r	5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC-3'
	Ehr521	5'-TGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAG-3'

Real-time PCR 扩增采用 Quanti Tect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN Cat. No:204445)。反应体系为 20 μL 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;接着 94 °C 变性 40 s;60 °C 退火 45 s;72 °C 延伸 1 min,设置为 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。60 °C 45 s 处收集荧光信号,CT 值小于 35 判为阳性。

4) PCR 产物的克隆序列测定及比对分析

将所得 PCR 产物进行纯化回收,连招 T 载体后转化宿主菌,挑取阳性菌落扩大培养,提取重组质粒 DNA 送上送北京金唯智公司测序。将测序相应序列输入到 NCBI 中的 BLAST 进行 DNA 序列同源性比对。

1.2.4 宿主血清病原体检测

对采集的宿主血清按照试剂盒说明进行 SFTSV、HGA 抗体检测,SFTSV、HGA 抗体检测试剂盒购自北京索来宝科技有限公司。对抗体阳性血清进行核酸检测,宿主血清标本直接进行 PCR 检测病原体,引物序列及检测步骤同上述蜱标本 PCR 扩增及 PCR 产物的克隆序列测定及比对分析步骤。

2 结果

2.1 家畜蜱虫携带情况

对所选家畜携带蜱虫检测结果为:犬 78 只体表寄生有蜱虫,蜱虫携带率为 63%;羊 58 只体表寄生有蜱虫,蜱虫携带率为 56%;牛 28 只体表寄生有蜱虫,蜱虫携带率为 47%。共采集蜱虫标本 476 只,寄生蜱虫标本存放于采集管中,按采集地点及宿主动物类型分组编号。

2.1 寄生蜱虫检测结果

对 476 只蜱虫品种鉴定,其中长脚血蜱 462 只,占 97.06%,微小牛蜱 11 只占 2.31%,血红扇头蜱 3 只,占 0.63%;蜱虫分布随季节气温变化呈现消长(表 2),即 5 月—9 月份蜱虫较多,特别是在温度较高的 6 月—8 月份所检蜱虫最多,而在温度较低的 1、2、11 和 12 月份无蜱虫检出。经特异性 PCR 扩增,扩增出 2 种蜱媒病原体特异性 DNA 片段,利用 NCBI 网站上的 BLAST 服务器进行核苷酸序列同源性比对,结果为 SFTSV 与 HGA;其中有 11 个蜱虫标本检出 SFTSV 阳性,阳性率为 2.31%,23 个蜱虫标本检出 HGA,阳性率为 4.83%。

表 2 寄生蜱虫分布表

月份	犬寄生蜱虫数量	羊寄生蜱虫数量	牛寄生蜱虫数量	合计	
				数量	比例/%
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	2	1	0	3	0.06
4	4	4	2	10	2.10
5	22	17	8	47	9.87
6	41	40	21	102	21.43
7	43	48	25	126	26.47
8	45	47	20	112	23.53
9	27	24	13	64	13.45
10	4	5	3	12	2.52
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0

2.2 蜱虫寄生宿主血清检测结果

对 501 份蜱虫寄生动物血清抗体检测,其中犬蜱寄生宿主犬血清 234 份,蜱寄生宿主羊血清 183 份,蜱寄生宿主牛血清 84 份。查出 SFTSV 阳性 21 份,阳性率 4.19%;HGA 阳性 48 份,阳性率 9.58%。各种宿主 SFTSV、HGA 阳性见表 3(犬、羊、牛血清标本 SFTSV、HGA 阳性分布情况表)。对 SFTSV 阳性血清和 HGA 阳性血清分别进行核酸检测,结果显示:SFTSV 阳性血清 Real-time PCR 结果为阳性;HGA 阳性血清中扩增出特异性 DNA 片段,序列比对结果为 HGA。

表 3 犬、羊、牛血清标本 SFTSV、HGA 阳性分布情况表

宿主类型	血清标本数	SFTSV 阳性数	SFTSV 阳性率/%	HGA 阳性数	HGA 阳性率/%
犬	234	9	3.85	21	8.97
羊	183	6	3.28	15	8.2
牛	84	6	7.14	12	14.29

3 讨论

蜱类是多种病原体的储存宿主,能传播多种感染性疾病,目前已发现 217 种病原体感染性疾病与蜱有关。特别是近年来新发现的一些传染性疾病,如埃立克体病、巴贝西原虫病、莱姆病和斑点热群立克次体等,均属于蜱媒传染病^[11-12]。依照 2011—2012 年国家传染病监测系统显示的数据,河南省关于 SFTS 所测得病例数为全国总报告病例数的 48%^[13],其中信阳地区病例数占全省总病例数的 98.75%^[14]。信阳大多地区为丘陵地带,生态环境中布满杂草与灌木,温暖湿润的环境有利于蜱虫的滋生。丰富的植被资源也为该地区畜牧养殖创造了良好条件,长角血蜱、微小牛蜱、血红扇头蜱均是林区中常见的蜱虫种类,成蜱主要寄生于多种动物如牛、马、犬、羊、猪等的体表,幼蜱和若蜱主要寄生于鸟类和啮齿类等动物身体表面,而且该三种蜱虫均为河南省常见种^[15]。本研究对河南信阳地区商城县的 124 只犬,103 只羊,61 头牛蜱虫携带情况调查结果为:

犬蜱虫携带率为63%;羊蜱虫携带率为56%;牛蜱虫携带率为47%,并且在温度较高的5月—8月携带率明显高于其他时间.因此认为河南省信阳地区蜱虫可寄生于犬、羊、牛等动物,并且携带率随季节变化呈现消长,与自然环境中蜱虫随季节变化而消长相一致,这与赵奇、高丽君等人研究结果一致^[15].本研究对象中的宿主动物都是放养,与自然环境中杂草灌木接触密切,不排除动物身上寄生蜱虫来源于自然环境的可能.本研究中寄生蜱标本经特异性PCR扩增,扩增出SFTSV与HGA两种蜱媒病原体特异性DNA片段;对501份蜱虫寄生动物血清抗体检测,SFTSV阳性率4.19%,HGA阳性率9.58%,研究结果显示寄生蜱虫携带有发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)与嗜吞噬细胞无形体(HGA),提示该地区蜱是SFTSV、HGA的传播媒介,这与2014年对该地区蜱虫的发热伴血小板减少综合征诱因的研究相一致^[14],也与刘洋等在河南省信阳、济源两地对长角血蜱(寄生于羊)携带SFTSV^[16]研究结果相一致.且寄生有蜱虫的动物血清中也查到了同源的发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)与嗜吞噬细胞无形体(HGA),说明宿主动物携带的发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)与嗜吞噬细胞无形体(HGA)与蜱虫携带的该病原生物体存在相关性,不排除该地区“发热伴血小板减少综合征”与“无形体病”由蜱虫及蜱虫寄生动物传播的可能.通过本文研究结果提示:应在河南省信阳地区加强自然疫源性及其动物源性疾病预防知识的教育.开展疫区居民蜱防治知识教育,科学认识蜱类和蜱媒传染病的分布和传播,加强动物管理,合理使用杀虫剂,降低动物蜱携带率.总之,通过蜱活动特点及蜱媒病原体生物学特性的进一步研究,探讨蜱媒病原体疾病预防、诊断和治疗的有效途径.

4 结 论

豫南信阳地区放养动物犬、羊、牛携带蜱虫呈季节消长,寄生蜱虫与自然环境中蜱虫优势品种相类似,寄生蜱虫与自然环境中蜱虫存在相关性,寄生动物与寄生蜱虫携带有相同病原体,该地区“发热伴血小板减少综合征”与“无形体病”存在蜱虫及蜱虫寄生动物传播的可能,对蜱虫宿主能否传播“发热伴血小板减少综合征”与“无形体病”有待进一步研究.

参 考 文 献

- [1] 赵俊伟,王环宇.中国蜱传病原体分布研究概况[J].中国媒介生物学及控制杂志,2012,23(5):445-448.
- [2] 张磊,张严峻.浙江省首次发现新型布尼亚病毒感染病例及分离病毒分子鉴定[J].中华微生物学和免疫学杂志,2011,31(12):1107-1111.
- [3] 许汴利.新布尼亚病毒感染致发热伴血小板减少综合征的发现、认识与启示[J].中华预防医学杂志,2012,46(2):99-102.
- [4] 康凯,唐晓燕,许汴利,等.河南省2007-2011年发热伴血小板减少综合征流行特征分析[J].中华预防医学杂志,2012,46(2):106-109.
- [5] 吴涛,郭喜玲,彭海燕.羊及其体表蜱中SFTSV的分离培养与全基因序列分析[J].江苏预防医学,2013,24(6):7-10.
- [6] 陆宝麟,吴永中.重要医学昆虫分类与鉴别[M].郑州:河南科学技术出版社,2003,652-713.
- [7] 孙响,张桂林,刘晓明,等.新疆和硕地区主要蜱类及蜱媒病原体调查[J].中国媒介生物学及控制杂志,2013,2(24):5-10.
- [8] 单军,唐震,崔仑标,等.江苏省发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒的核酸检测及全基因组序列分析[J].现代预防医学,2013,40(14):2686-2689.
- [9] 姚娜,陈创夫,于强,等.3株嗜吞噬细胞无形体AnkA蛋白原核表达及免疫原性差异性研究[J].中国人兽共患病学报,2013,29(2):111-116.
- [10] 张群芝,窦会娟,郭嘉林,等.豫南地区蜱类分布及蜱媒病原体调查与分析[J].现代预防医学,2015,42(19):3578-3580.
- [11] 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.
- [12] 郑寿贵,叶晓东,郑海鸥,等.金华地区部分蜱媒传染病感染状况调查研究[J].中国预防医学杂志,2008,9(1):8-12.
- [13] Liu Q, He B, Huang S Y, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis[J]. Lancet Infect Dis, 2014,14:70718-70720.
- [14] 王黎源,杨振东,孙毅,等.长角血蜱携带发热伴血小板减少综合征病毒调查及基因特征分析[J].中国病原生物学杂志,2014,7(9):629-632.
- [15] 赵奇,高丽君,唐振强,等.河南省蜱虫种类和地理分布及季节消长调查[J].中国媒介生物学及控制杂志,2015,26(1):75-77.
- [16] 刘洋,黄学勇,燕华,等.河南发热伴血小板减少综合征流行区蜱类分布及媒介携带新布尼亚病毒状况调查[J].中华预防医学杂志,2012,46(6):500-503.

Survey on Thicks and Pathogens in the Serum of its Host in Xinyang City, Henna Province

ZHANG Qunzhi^{1,2}, LUO Hailan¹, LI Xinwei¹, DONG Zimei²

(1. Department of Basic Medicine, Luohe Medical College, Luohe 462000, China; 2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: 288 in total number of dogs, sheep and cattle were investigated by picking up ticks in the surface in Shangcheng County, Henna Province, where the tick's activity is dense. The real-time quantitative PCR, normal PCR and immune detection methods were used to analyze the parasitic ticks and pathogens which they are carrying. The results showed that the parasitic ticks in this area are mainly of the *Haemaphysalis longicornis* and there are also a small amount of *Rhipicephalus sanguineus* and *Boophilus microplus*; These ticks carry SFTSV and HGA pathogens; the fever with thrombocytopenia syndrome virus and non-form of phagocytic cells were detected in the serum of the ticks host. This is related to the occurrence of epidemic in this region and does not exclude the possibility of its spread from livestock to human. This study provides basic data for further research on the prevention and treatment of tick disease in South Henan Province.

Keywords: tick; host; serum; pathogen

(上接第 125 页)

- [16] Oliveira R F, Almada V C. Sexual dimorphism and allometry of external morphology in *Oreochromis mossambicus*[J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, 46(6):1055-1064.
- [17] 张红坡, 张海锋. SPSS 统计分析实用宝典[M]. 北京: 清华大学出版社, 2012: 106-110.
- [18] 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应[J]. *水生生物集刊*, 1983, 8(1): 1-13.

Sexual Dimorphism of Pharyngeal Bone of Qihe River *Carassius Auratus*

TIAN Huaxiang, WANG Fengchan, DUO Tian, HU Fengxia, ZHAO Xiaojin

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Sexual dimorphism of the pharyngeal bone in *Carassius auratus* from Qihe river was studied in the present study. The specimens of pharyngeal bone consisting of 58 adult individuals, including 24 females and 34 males (weight range: $(200 \pm 49)g$), were selected. Three variables of external morphology, four variables of pharyngeal bone and three variables of ratios were measured. The data were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0. For the population of Qihe *Carassius auratus*, the variables of external morphology was statistically significant ($P < 0.05$), with morphology variables being smaller for males than for females; While there was no significant difference in sexual dimorphism between males and females for the variables of pharyngeal bone and variables of ratios. The result from PCA showed that seven variables of pharyngeal bone are extracted three factors that explained 88.05% of the variance of the original variables. Compared to sex determination of pharyngeal bone, there were significant sex differences in the variables of external morphology. Few factors which were extracted from pharyngeal bone could be explained by independent variables.

Keywords: Qihe *Carassius auratus*; pharyngeal bone; sexual dimorphism; factor analysis