

DOI:10.13350/j.cjpb.230207

• 论著 •

甘肃河西走廊沿线地区 Q 热媒介及分子特征研究*

张芳**,王小恒,于国伟

(西北民族大学医学部,甘肃兰州 730030)

【摘要】 目的 Q 热由贝氏柯克斯体引起,呈全球分布,我国目前已有 20 多个省(市)自治区有该病的相关报道。为了解甘肃河西走廊沿线地区贝氏柯克斯体宿主动物自然感染情况,采集沿线 3 个地区野外放养的骆驼血液标本和骆驼体表寄生的蜱标本,分别进行血清学检测及贝氏柯克斯体分子生物学检测。方法 采用捡拾法收集骆驼体表寄生的蜱标本,采用形态学方法进行蜱种鉴定。采用研磨加试剂盒抽提法提取蜱 DNA,应用巢式 PCR 扩增贝氏柯克斯体 23S rRNA,对扩增产物进行测序并与 NCBI 数据库中序列信息进行比对。采用间接免疫荧光法检测骆驼血清抗贝氏柯克斯体抗体,分析骆驼贝氏柯克斯体感染情况。结果 共采集 528 只未吸血成蜱,经形态学鉴定分为两个蜱种,其中草原革蜱 248 只,亚洲璃眼蜱 280 只。PCR 扩增蜱标本贝氏柯克斯体 23S rRNA,阳性 88 只,阳性率为 16.67%,其中草原革蜱阳性率为 14.24% (41/248),亚洲璃眼蜱为 16.78% (47/280),二者阳性率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.006, P > 0.05$)。采集散养骆驼血液标本 48 份,间接免疫荧光法检测抗贝氏柯克斯体抗体 9 份阳性,阳性率 18.75%。阳性骆驼中有 7 头其体表寄生蜱亦检出贝氏柯克斯体感染。23S rRNA 系统进化树显示,测试中的 10 株贝氏柯克斯体居于同一分支,与北京株(CP035112.1 C)、美国株(NR_104916.1)和法国株(LK937696.1)同源性较高。结论 甘肃河西走廊沿线地区至少有两个蜱种携带贝氏柯克斯体,野外放养的骆驼亦存在贝氏柯克斯体感染。提示应在上述地区开展深入调查,以应对可能出现的 Q 热的发生。

【关键词】 Q 热;河西走廊;蜱;分子流行病学

【中图分类号】 R384.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)02-0158-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Feb;18(2):158-161.]

Study on Q termal medium and molecular characteristics along Hexi Corridor in Gansu Province

ZHANG Fang, WANG Xiao-heng, YU Guo-wei (Northwest Minzu University, Lanzhou, 730030, China)

【Abstract】 **Objective** Q fever has been reported worldwide. In China, Q fever has been identified from more than 20 provinces. In order to explore the occurrence of *C. burnetii* in camels and ticks which collected from camels' bodies from Gansu province, a molecular epidemiology study was carried in Hexi Refion. **Methods** Ticks were collected from camels' body. After species identification, DNA of *Coxiella burnetii* was isolated from ticks and detected by nested PCR targeting 23S rRNA of *Coxiella burnetii*. An indirect immunofluorescent assay (IFA) was carried out to test antibodies (IgG) against *Coxiella burnetii*. **Results** A total of 617 adult ticks which included 275 *Dermacentor nuttal* and 342 *Hyalomma asiaticum* and 48 camels' blood were collected from Hexi region. 528 unfed adult ticks were examined using nested PCR. 48 sera were analyzed by IFA test. The total positive rate was 16.67% in ticks. The positive rate in *D. nuttal* was 14.24% (41/248) and 19.63% (47/280) in *Hy. asiaticum* respectively. There was no difference in positive rate among two tick species. 9 of 48 camels were seropositive for *C. burnetii*, although *C. burnetii* DNA was not detected in any of the camels. The same branch of Q ReCox system was selected for sequencing, which has high homology with Beijing strain (CP035112.1 C), American strain (NR_104916.1) and French strain (LK937696.1). **Conclusion** These findings indicate that two tick species *Dermacentor nuttal* and *Hyalomma asiaticum* collected from camels in Gansu province carried *C. burnetii*. Serological method identified infection of *C. burnetii* among local main ecomic animals: camels. All these findings, for first time in Gansu Province, indicate the need for an in-depth assessment of the *C. burnetii* occurrence in hosts and humans at risk of infection in the future.

【Key words】 Q fever; hexi region; tick; molecular epidemiology

*** Q 热是由贝氏柯克斯体 (*Coxiella burnetii*, Cb) 引起的一种自然疫源性疾病^[1], 患者可出现发热、畏寒和、头痛等症状, 后期可发展为慢性疾病, 并发心内膜炎、间质性肺炎和慢性肝炎等^[2]。贝氏柯克斯体也可感染野生动物和家畜。Q 热是通过感染动物产生

* **【基金项目】** 西北民族大学人才引进项目 (No. xbmuyjr202234)。

** **【通讯作者(简介)】** 张芳(1976-), 女, 甘肃天水人, 博士, 副主任医师。研究方向: 新发传染病分子流行病学。
E-mail: fang_z760@sohu.com

的气溶胶进行病原传播的^[3]。动物感染后多数无明显症状,但在雌性动物孕期可发生流产、死胎和不育等生殖障碍^[4]。目前已报道的 Q 热疫区遍及全球几乎所有国家,成为当前分布最广的人畜共患病之一^[5-6]。Q 热被证实是一种重要的蜱传疾病,其病原体贝氏柯克斯体亦被列为一种重要的生物战剂而备受关注。贝氏柯克斯体还可与其他病原体共同致病,从而使得治疗更加棘手。在我国目前至少有超过 20 个省(市)自治区有该病报道,四川、云南、内蒙古、及新疆出现了暴发^[7-8]。人群血清流行病学调查发现甘肃部分地区人群存在 Q 热感染的现象^[9]。为了解甘肃河西走廊地区 Q 热流行情况,本研究从媒介动物及宿主动物两个方面展开调查,以期明确河西走廊沿线地区可能存在的自然疫源地,为当地 Q 热的防治提供参考。

材料与方 法

1 材 料

1.1 主要仪器 BSC-1360 II B2 生物安全柜,北京东联哈尔滨仪器厂生产;GeneAmp PCR System 2700 型 DNA 扩增仪,美国 PE 公司生产;CHEF-DR III 脉冲场凝胶电泳仪,美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 主要试剂 DNA 提取试剂盒,购于天根生化科技(北京)有限公司;rTaq DNA 聚合酶,dNTPs 及其他 PCR 反应试剂购于宝生物工程(大连)有限公司。

2 方 法

2.1 采样点选择 采样点选在嘉峪关、酒泉、张掖 3 个地区(图 1)。3 个调查点均为农牧区,为农村与戈壁结合地域,属于半荒漠和荒漠地区。



图 1 河西走廊沿线调查采集点
Fig. 1 Study sites along Hexi Corridor

2.2 标本采集 骆驼体表蜱标本的采集采用捡拾法。检查每只骆驼的脖子、腹部及腹股沟部分,收集寄生的蜱标本置于采样管中,保持湿度及通气(图 2)。采集野外放养的双峰骆驼静脉血 5 ml,分离血清,分装后-

20 °C 保存待用。



图 2 骆驼体表蜱标本
Fig. 2 Ticks collected from camels

2.3 DNA 提取 将采集的蜱标本置于显微镜下,根据形态学特征进行鉴定分类,鉴定完毕的蜱标本经体表消毒后取单只置于 EP 管中,采用电动组织研磨器于生物安全柜中充分研磨,采用天根公司生产的 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取,置-20 °C 保存待用。

2.4 贝氏柯克斯体 23S rRNA 基因检测与测序 针对 Cb 的 23S rRNA 基因序列设计 PCR 引物。第 1 对引物为 Cb23S IVSF/R。Cb23S IVSF: 5'-CTTTAAAGAAAGCCTAATAG-3'; Cb 23S IVSR: 5'-TTACTTTATGTCAGCAT TCG-3'。第 2 对引物为 CbIVSF/R。Cb IVSF:5'-TCACT GGTCGAGT CGTC-3'; Cb IVSR:5'-ATTGCACTTCTGATAC C-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。第 1 轮 PCR 反应体系:rTaq DNA 聚合酶 1.25 μl,dNTPs 4 μl,DNA 模版 4 μl,PCR buffer 4 μl,上、下游引物各 1 μl,无菌去离子水补充至 25 μl。第 1 轮 PCR 反应条件:94 °C 3 min;94 °C 60 s,55 °C 60 s,72 °C 60 s,共 30 个循环;72 °C 5 min。第 2 轮 PCR:取第 1 轮产物 2 μl 为模板进行第 2 轮扩增,扩增条件同上。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后染色,凝胶成像仪观测结果。选取 10 株贝氏柯克斯体 PCR 扩增产物进行双向测序(由上海生工生物工程股份有限公司完成),测序结果与 NCBI 数据库中已公布的贝氏柯克斯体基因序列信息进行比对。采用 Bioedit 软件对基因序列进行拼接,采用软件 MEGA5.0 绘制种系发生树,采用邻位相临法构建进化树。

2.5 血清学检测 采用间接免疫荧光法检测骆驼血清抗贝氏柯克斯体抗体,抗原片由兰州兽医研究所提供。取血清用 PBS(0.01 mol/L,pH7.4)从 1:20 开始倍比稀释,然后滴加于抗原片孔中,37 °C 孵育 45

min,用PBS及蒸馏水冲洗,晾干;滴加 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体,37 °C 孵育 45 min,冲洗,晾干后置荧光显微镜下观察,血清效价 ≥ 1 : 80 者判为血清抗体阳性。

2.6 统计学分析 统计学分析采用 SPSS 26.0 软件,率的比较采用 χ^2 检验。

结 果

1 骆驼寄生蜱种及贝氏柯克斯体感染情况

从 50 头双峰骆驼体表采集蜱标本 617 只,均为成蜱,骆驼平均带蜱数为 12.34 只。617 只蜱中,有 89 只为吸(饱)血蜱,不适合做检测,舍弃。528 只未吸血成蜱经形态学鉴定分为两个蜱种,其中草原革蜱 248 只,亚洲璃眼蜱 280 只。蜱标本中有 88 只贝氏柯克斯体 23S rRNA 检测阳性,阳性率为 16.67%。其中草原革蜱阳性率为 16.53% (41/248),亚洲璃眼蜱为 16.78% (47/280),两蜱种贝氏柯克斯体 23S rRNA 阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.006, P > 0.005$)。嘉峪关、酒泉、张掖采样点蜱贝氏柯克斯体 23S rRNA 阳性率分别为 16.0%、16.67% 和 17.36%,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.0528, P > 0.05$)。

2 骆驼血清学检测结果

免疫荧光法检测采自散养骆驼的血清标本 48 份,有 9 份抗贝氏柯克斯体抗体阳性,阳性率为 18.75%。抗贝氏柯克斯体抗体阳性的 9 头骆驼中有 7 头其体表寄生蜱亦检出病原体 DNA 片段。

3 贝氏柯克斯体系统进化分析

基于贝氏柯克斯体 23S rRNA 构建系统发生树,结果如图 3。测试中的 10 株贝氏柯克斯体居于同一分支,与北京株 (CP035112.1 C)、美国株 (NR_104916.1) 和法国株 (LK937696.1) 同源性较高。

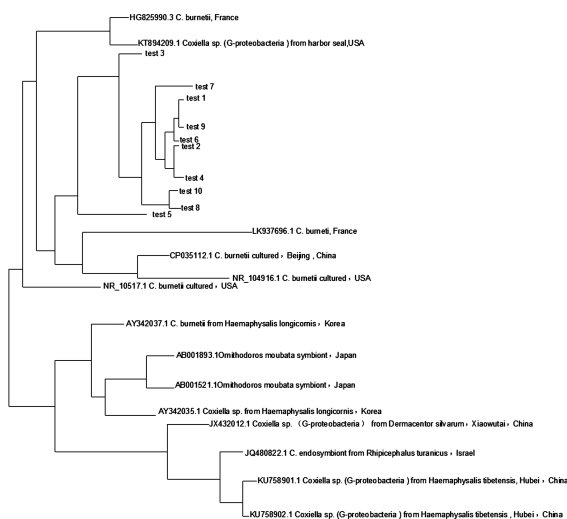


图 3 贝氏柯克斯体 23S rRNA 基因系统发生树

Fig. 3 The cluster analysis based on 23S rRNA of *Coxiella burnetii*

讨 论

Q 热于 1935 年在澳大利亚昆士兰被首次发现,自此 Q 热疫区几乎遍及全球所有国家,已经成为当前分布最广的人兽共患病之一^[10]。该病对人类公共卫生健康所表现的意义在于当前反生物恐怖,已将其列入生物战剂名录,作为生物战剂其具有毒力强,一个菌即可使人感染的特点,因而备受世界各国关注^[11-12]。在我国,Q 热疫源地分布广泛,其中四川、内蒙、新疆、云南及西藏地区已出现过暴发疫情。但由于其并不是法定报告传染病,因此一直未受到重视,临床误诊率高,同时对 Q 热的相关研究也较少,其流行情况尚不清楚。

Q 热是一种重要的自然疫源性疾病,其在自然界中的宿主种类广泛,包括野生及家养哺乳动物,鸟类及多种节肢动物。而在动物间的传播媒介主要为蜱,且可经卵传播,从而形成自然疫源地长期存在^[13-14]。相关研究显示,目前至少有 40 种蜱可在自然状态下感染贝氏柯克斯体^[15]。本研究从传播媒介及宿主动物两个方面同时开展调查,结果显示草原革蜱、亚洲璃眼蜱在河西走廊沿线地区分布较广泛,成为当地双峰骆驼的主要寄生蜱种,且两个蜱种均携带贝氏柯克斯体。调查发现当地养殖双峰骆驼的农户较多,骆驼多采用野外放养的模式,骆驼在野外到处游荡觅食,因此调查中的骆驼及其所携带的蜱可以反映自然状态下的感染情况。一般认为贝氏柯克斯体的自然循环未包括人类,人类被认为是偶然宿主,而牛、绵羊和山羊常被确定为人类感染的来源。大多数情况下人类通过直接接触受感染的牲畜或吸入受污染的气溶胶而被感染。2021 年,我国首次报道了一例由蜱叮咬确诊的 Q 热病例^[16],因此不能忽视蜱在 Q 热传播中的作用。

在我国,不同地区的不同家畜贝氏柯克斯体感染率不同。冯淑萍等^[4]报道家畜贝氏柯克斯体感染率为 12.9%~61.33%。本研究采用血清学方法检测甘肃河西走廊地区骆驼贝氏柯克斯体感染率为 18.75%。23S rRNA 系统发生树显示,骆驼体表蜱感染的 10 株贝氏柯克斯体属于同一分支,与北京株 (CP035112.1 C)、美国株 (NR_104916.1) 和法国株 (LK937696.1) 同源性较高。结合收集的蜱检测结果进行分析,骆驼作为宿主动物参与疾病的自然循环,即河西地区存在 Q 热的自然疫源地,但尚不清楚当地人群感染情况。然而,当地居民饲养骆驼非常普遍,Q 热的症状又不十分明确,往往造成诊断延迟或误诊。

本研究在甘肃河西走廊沿线地区从媒介及其寄生的宿主两个方面开展调查,证实该地区为 Q 热的疫源地,当地居民存在感染的风险。贝氏柯克斯体具有强

毒性,在外部环境中生存周期长,易于保菌存活和传播,被世卫组织列为潜在的恐怖主义和生物战剂。因此,应加强对我国 Q 热的防治。

【参考文献】

[1] Eldin C, Melenotte C, Mediannikov O, et al. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change [J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(1):115-190.

[2] Melenotte C, Million M, Raoult D. . New insights in *Coxiella burnetii* infection: diagnosis and therapeutic update [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2020, 18(1):75-86.

[3] de Lange MMA, van der Hoek W, Schneeberger PM, et al. High *Coxiella burnetii* seroconversion rate in veterinary students, the Netherlands, 2006-2010 [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(12):3086-3088.

[4] 冯淑萍, 张培培, 李春英, 等. 广西四个地市 2020 年牛、羊 Q 热流行病学调查与分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2021(3):42-44.

[5] Sander WE, King R, Graser W, et al. *Coxiella burnetii* in 3 species of turtles in the Upper Midwest, United States [J]. Emerg Infect Dis, 2021, 27(12):3199-3202.

[6] Long CM, Beare PA, Cockrell DC, et al. Comparative virulence of diverse *Coxiella burnetii* strains[J]. Virulence, 2019, 10(1):133-150.

[7] 鲍翔宇. 湖南牛场蚊虫携带血液寄生虫和人畜共患病原的调查分析[D]. 长沙:湖南农业大学, 2021.

[8] 孙素荣, 王思远, 史深, 等. 新疆乌苏天山山地南坡草原革螨中立

克次体感染调查及遗传进化分析[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 2020, 37(2):190-196.

[9] 张芳, 刘增加. 我国西北部分地区 Q 热分子流行病学调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(3):183-185.

[10] Newton P, Thomas DR, Reed SCO, et al. Lysosomal degradation products induce *Coxiella burnetii* virulence [J]. Proc Natl AcadSci U S A, 2020, 117(12):6801-6810.

[11] Basanisi MG, LA BG, Nobili G, et al. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in sheep and goat milk and dairy products by droplet digital PCR in south Italy [J]. Int J Food Microbiol, 2022(366):109583.

[12] Vynograd N. Natural foci diseases as a stable biological threat [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014, 62(6):445-447.

[13] Cordsmeier A, Wagner N, Luhrmann A, et al. Defying death-how *Coxiella burnetii* copes with intentional host cell suicide [J]. Yale J Biol Med, 2019, 92(4):619-628.

[14] Hartelt K, Pluta S, Oehme R, et al. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming[J]. Parasitol Res, 2008(103):109-116.

[15] Kulakova NV, Khasnatinov MA, Sidorova EA, et al. Molecular identification and phylogeny of *Dermacentor nuttalli* (Acari: Ixodidae)[J]. Parasitol Res, 2014, 113(5):1787-1793.

[16] 吴嘉文, 赵倩倩, 马继军, 等. 儿童急性 Q 热一例[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(9):569-570.

【收稿日期】 2022-09-24 【修回日期】 2022-12-01

(上接 157 页)

[9] 张满英, 吴春城, 毛乾国, 等. 以肝功能损害为主要表现的 EV71 感染 1 例报道 [J]. 医学信息, 2021, 34(19):187-188.

[10] Chen MY, He SZ, Yan Q, et al. Sporadic hand, foot, and mouth disease cases associated with non-C4 enterovirus 71 strains in Xiamen, China, from 2009 to 2018 [J]. Arch Virol, 2021, 166(8):2263-2266.

[11] XZ, QX, ZH, et al. Viral shedding in patients with hand, foot and mouth disease induced by EV71, CA16, or CA6: A protocol for systematic review and meta analysis [J]. Medicine, 2020, 99(29):e21258.

[12] 曾洁媛, 殷绿洲, 王雷, 等. EV71 灭活疫苗适龄接种儿童 CVA6 血清中和抗体变化分析 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(10):1216-1221, 1226.

[13] 王希峰, 朱大伟, 袁莎莎. EV71 疫苗对中国大陆地区儿童手足口病发病率影响间断时间序列分析 [J]. 中国公共卫生, 2021, 37(9):1418-1420.

[14] 周湧超, 徐志刚, 杨澜, 等. 小鼠抗 EV71 衣壳蛋白 VP1 单克隆抗体的制备 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(5):462-468.

[15] Luo J, Huo CL, Qin H, et al. Chimeric enterovirus 71 virus-like particle displaying conserved coxsackievirus A16 epitopes elicits potent immune responses and protects mice against lethal EV71 and CA16 infection [J]. Vaccine, 2021, 39(30):4135-4143.

[16] 于伟, 王伶, 雷露, 等. 2008-2018 年辽宁省肠道病毒 71 型流行特征与 VP1 区基因特征分析 [J]. 公共卫生与预防医学, 2019, 30(4):37-41.

[17] Kim YI, Song JH, Kwon BE, et al. Pros and cons of VP1-specific maternal IgG for the protection of Enterovirus 71 infection [J]. Vaccine, 2015, 33(48):6604-6610.

[18] Li P, Yu J, Hao F, et al. Discovery of Potent EV71 Capsid Inhibitors for Treatment of HFMD [J]. ACS Med Chem Lett, 2017, 8(8):841-846.

[19] Chang CK, Wu SR, Chen YC, et al. Mutations in VP1 and 5'-UTR affect enterovirus 71 virulence [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):6688.

[20] Li XH, Huang Y, Sun MH, et al. Honeysuckle-encoded microRNA2911 inhibits Enterovirus 71 replication via targeting VP1 gene [J]. Antiviral Res, 2018(152):117-123.

[21] Wu CY, Yu SL, Chen YT, et al. The mature EV71 virion induced a broadly cross-neutralizing VP1 antibody against subtypes of the EV71 virus [J]. PLoS One, 2019, 14(1):e0210553.

[22] Sun HY, Gao M, Cui DW. Molecular characteristics of the VP1 region of enterovirus 71 strains in China [J]. Gut Pathog, 2020, 12:38.

[23] Tee KK, Lam TT, Chan YF, et al. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene [J]. J Virol, 2010, 84(7):3339-3350.

[24] 汤华萍. 国产肠道病毒 71 型疫苗上市后免疫效果、安全性、接种意愿及其免疫策略研究进展 [J]. 中国实用医药, 2021, 16(23):201-203.

[25] 韦跃, 谢友军, 陈月华, 等. EV71 灭活疫苗预防适龄儿童重症手足口病效果研究 [J]. 公共卫生与预防医学, 2022, 33(3):37-40.

[26] Aswathyraj S, Arunkumar G, Alidjinou EK, et al. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy [J]. Med Microbiol Immunol, 2016, 205:397-407.

[27] 李晓楠, 赵忠鹏, 段跃强, 等. EV71 型 vP1 蛋白表达、纯化及免疫原性的初步评价 [J]. 免疫学杂志, 2010, 26(3):187-190, 196.

[28] 黄薇园, 李建军, 陈旺生, 等. EV71 临床毒株分离及其 VP1 单克隆抗体制备 [J]. 中国热带医学, 2019, 19(6):512-515.

【收稿日期】 2022-10-23 【修回日期】 2022-12-15