

海南省东北部地区某类就诊患者莱姆病抗体检测结果分析

李沙¹, 张琳², 李欢¹, 侯学霞², 陈婷¹, 苗广青², 符晓莹¹, 陈海¹, 郝琴², 朱雄¹

1. 三亚市人民医院, 海南 三亚 572000; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

摘要: **目的** 了解海南省东北部地区人群莱姆病感染状况, 为临床医生诊断莱姆病提供参考, 为本省莱姆病的流行病学调查提供可靠的理论依据。 **方法** 收集海南省东北部地区三家医院 1 334 例有关节症状和(或)神经症状的患者血清, 采用两步法检测莱姆病抗体, 使用间接免疫荧光法(indirect fluorescent antibody test, IFA)初筛血清, 对 IFA 检测阳性血清用免疫印迹法(Western blot, WB)确证。 **结果** IFA 法筛查海南省东北部地区 1 334 例患者莱姆病抗体阳性 60 例, 阳性率 4.50%。海口、文昌和琼海地区的三家医院该类就诊患者莱姆病抗体阳性率分别为 4.25%、1.40%和 8.28%(IFA)。三家医院阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 25.640, P < 0.05$)。按不同性别、年龄分组海南省东北部地区三家医院莱姆病抗体阳性率比较差异均无统计学意义($\chi^2 = 2.306, P > 0.05$; $\chi^2 = 1.015, P > 0.05$)。WB 法确证莱姆病抗体阳性 28 例, 其抗体以 31 KD 的外膜蛋白 A、33 KD-36 KD 外膜蛋白 B、39 KD 膜脂蛋白、41 KD 鞭毛蛋白和 60 KD 热休克蛋白抗体为主。

结论 海南省东北部地区存在人群感染莱姆病, 应加强当地疾病预防和监测。

关键词: 莱姆病; 血清抗体; 抗体检测

中图分类号: R514 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2020)09-1068-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.09.012

Test results for detection of antibody against Lyme disease in certain patients in the northeast of Hainan province

LI Sha¹, ZHANG Lin², LI Huan¹, HOU Xue-xia², CHEN Ting¹, MIAO Guang-qing², FU Xiao-ying¹, CHEN Hai¹, HAO Qin², ZHU Xiong¹

1. The People's Hospital of Sanya City, Sanya, Hainan 572000, China;

2. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding authors: HAO Qin, E-mail: haoqin@icdc.cn; ZHU Xiong, E-mail: zhuxiong6@163.com

基金项目: 海南省重点研发项目(ZDYF2017163); 十三五重大专项(2018ZX10714-002-001); 海南省医药卫生科研项目(16A200051)

作者简介: 李沙(1985-), 女, 江西南昌人, 硕士, 主管技师, 主要从事微生物与免疫研究工作。

通信作者: 郝琴, E-mail: haoqin@icdc.cn; 朱雄, E-mail: zhuxiong6@163.com。

- [8] 王毅, 周万明, 樊静, 等. 绵阳市不同寻找性伴场所男男性行为者 HIV 感染状况及社会行为特征[J]. 中国热带医学, 2019, 19(8): 747-751.
- [9] 朱军礼. 年轻 MSM 社会网络特征及其 HIV 危险行为同伴干预研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2008.
- [10] 孙扬. MSM 人群高危性行为、生存质量与社会支持状况研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2015.
- [11] 邵冰, 宋波, 杜娟, 等. 哈尔滨市 HIV 阳性 MSM 生存质量和社会支持状况调查[J]. 中国艾滋病性病, 2015, 21(9): 777-781.
- [12] 王毅, 李六林, 张光贵, 等. 绵阳城区男男性行为者社会支持现状研究[J]. 实用预防医学, 2016, 23(4): 399-401.
- [13] Brown MJ, Serovich JM, Kimberly JA. Depressive symptoms, substance use and partner violence victimization associated with HIV disclosure among men who have sex with men[J]. AIDS Behav, 2016, 20(1), 184-192.
- [14] Stahlman S, Grosso A, Ketende S, et al. Depression and social stigma among MSM in Lesotho: implications for HIV and sexually transmitted infection prevention[J]. AIDS Behav, 2015, 19(8): 1460-1469.
- [15] Su X, Zhou AN, Li J, et al. Depression, loneliness, and sexual risk-taking among HIV-negative/unknown men who have sex with men in China[J]. Arch Sex Behav, 2018, 47(7): 1959-1968.
- [16] Sarafian I. Process assessment of a peer education programme for HIV prevention among sex workers in Dhaka, Bangladesh: a social support framework[J]. Soc Sci Med, 2012, 75(4): 668-675.
- [17] 曾澄波, 刘聪, 乔佳颖, 等. 广州市 HIV/AIDS 病人亲密度社会支持与抑郁的结构方程模型分析[J]. 中国艾滋病性病, 2017, 23(11): 1050-1053.
- [18] 肖敏, 黄金, 王红红, 等. HIV 阳性男男性行为者医学应对方式和社会支持的相关性研究[J]. 中国艾滋病性病, 2019, 25(5): 476-479.
- [19] Kapadia F, Siconolfi DE, Barton S, et al. Social support network characteristics and sexual risk taking among a racially/ethnically diverse sample of young, urban men who have sex with men[J]. AIDS Behav, 2013, 17(5): 1819-1828.

收稿日期: 2019-09-30

Abstract: Objective To investigate the prevalence of Lyme disease among people in the northeast of Hainan province so as to provide references for clinicians' diagnosis and a reliable theoretical basis for epidemiological investigation of Lyme disease in Hainan province. **Methods** We collected 1,334 serum samples from patients with arthritis and/or neurological symptoms in three hospitals in the northeast of Hainan province. Firstly, indirect fluorescent antibody (IFA) test was used to detect serum antibodies against Lyme disease, and secondly, the positive samples detected by IFA test were confirmed by Western blot (WB) test. **Results** Among the 1,334 patients detected by IFA test in the northeast of Hainan province, 60 cases were positive for antibodies against Lyme disease, and the positive rate was 4.50%. The positive rates of Lyme disease antibodies detected by IFA in the 1,334 patients from the three hospitals in Haikou, Wenchang and Qionghai were 4.25%, 1.40% and 8.28%, respectively, showing statistically significant differences among the three hospitals ($\chi^2 = 25.640, P < 0.05$). No statistically significant differences were found in the positive rates of antibodies to Lyme disease between different genders and among age groups ($\chi^2 = 2.306, P > 0.05; \chi^2 = 1.015, P > 0.05$). WB test showed that 28 cases were confirmed to be positive for antibodies to Lyme disease, which mainly included 31 KD outer surface protein A, 33 KD-36 KD outer surface protein B, 39 KD *Borrelia burgdorferi* membrane protein A, 41 KD flagellin and 60 KD heat shock protein. **Conclusions** There exists Lyme disease infection among people in the northeast of Hainan province; and hence, local disease prevention and surveillance should be strengthened.

Key words: Lyme disease; serum specimen; antibody test

莱姆病是一种由伯氏疏螺旋体感染引起的人兽共患传染病,主要是通过感染了伯氏疏螺旋体的蜱叮咬人或动物的皮肤而传播。临床表现为皮肤游走性红斑、神经和关节等多器官多系统的损害^[1-3]。该疾病晚期可严重影响患者的生活质量。该病首次发现是 Willy Burgdorfer 博士在美国康涅狄格州的莱姆镇成功地分离到伯氏疏螺旋体并于 1982 年在 Science 杂志上报道^[4]。随后该疾病相继在世界五大洲报道发现,以欧美各国为多见^[5]。我国以黑龙江、新疆、内蒙古、吉林及河南等省区报道多见。近几年,朱雄等在海南三亚地区调查了该疾病人群感染状况,证实该地区存在莱姆病^[6],但未见海南省海口、文昌和琼海地区的病例报道。随着海南全岛自由贸易试验区的大力建设以及海口作为省会城市,开展该地区人群莱姆病血清流行病学调查可为莱姆病的诊断、预防和监测提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2015 年 9—12 月在海南省海口市第四人民医院、文昌市人民医院和琼海市人民医院就诊、具有神经系统症状和(或)关节症状并排除类风湿性关节炎的 1 334 例患者,采集其血清标本并分离血清, -80 °C 超低温冰箱保存待检。

1.2 主要试剂 异硫氰酸荧光素标记的羊抗人 IgM 和 IgG 抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗人 IgM 均购自美国 Sigma 公司;HRP 标记的 SPA 购自博尔西生物科技有限公司;莱姆病螺旋体标准菌株 PD91 免疫兔血清、莱姆病抗原片和 WB 膜条均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室提供。

1.3 莱姆病抗体检测

1.3.1 间接免疫荧光试验(indirect fluorescent antibody, IFA) 抗原片使用我国 PD91 菌株制备。待检血清用磷酸盐缓冲液(PBS)倍比稀释,稀释度分别为 1:16、1:32、1:64、1:128、1:256。每个稀释度血清加 2 孔于抗原片上,分别用于 IgG 和 IgM 抗体检测,每孔 20 μ l,置于 37 °C 孵育 30 min 取出,用 PBS 浸泡 10 min,再用蒸馏水冲洗。每个稀释度的两孔分别加 FITC 标记的抗人 IgG 和 IgM 抗体,置于 37 °C 孵育 30 min,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,吹干,用 90% 甘油封片。将抗原片在荧光显微镜 10 \times 40 视野下,背景干净 50% 以上螺旋体染上明亮荧光,抗体效价达到 IgM \geq 1:64 或 IgG \geq 1:128 者为阳性。同时做阴阳性对照。阴性对照为 PBS,阳性对照为 PD91 菌免疫兔血清。

1.3.2 免疫印迹法(Western blot, WB) 硝酸纤维素膜条使用 PD91 菌株制备。IFA 法初筛的阳性标本进一步用 WB 法确证。待检血清用磷酸盐缓冲液-吐温(phosphate buffered saline with Tween, PBS-T)以 1:25 稀释,并浸泡硝酸纤维素膜条,震荡 3 hr,然后用 PBS-T 洗脱 5 遍,每次震荡至少 10 min。每份血清做两份膜条,分别加入二抗 SPA 和 HRP 标记的抗人 IgM,震荡 3 hr。将膜条取出,PBS-T 洗 5 遍,每次至少 10 min,加入显色剂,1-3 min 后加入纯水终止反应,并观察结果。阴性对照为 PBS-T,阳性对照为 PD91 菌免疫兔血清。WB 结果根据文献进行判定^[7]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IFA 法检测结果 1 334 例患者血清莱姆病抗体筛查发现 IgG 抗体阳性 44 例, IgM 抗体阳性 17 例, 两者均阳性 1 例, 阳性率 4.50%。三家医院就诊患者的莱姆病 IgG、IgM 抗体检出阳性率比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 25.640, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 海南省某类就诊患者血清莱姆病抗体筛查结果(IFA 法)

地区	例数	IgG(+)	IgM(+)	IgG 和 IgM(+)	阳性数	阳性率(%)
海口	400	15	2	0	17	4.25
文昌	499	2	5	0	7	1.40
琼海	435	27	10	1	36	8.28
合计	1 334	44	17	1	60	4.50

2.2 不同性别和年龄患者血清莱姆病抗体阳性率的比较 经 IFA 法筛查 60 例阳性患者中, 男性 29 例, 阳性率为 3.76%, 女性 31 例, 阳性率为 5.50%, 两者比较差异无统计学意义($\chi^2 = 2.306, P > 0.05$); 年龄 ≤ 20 岁 0 例, 21~49 岁 19 例, ≥ 50 岁 41 例; 其中 ≤ 20 岁阳性率 0%, 21~49 岁阳性率 4.66%, ≥ 50 岁阳性率 4.53%, 三组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 1.015, P > 0.05$), 见表 2。

表 2 海南省某类就诊患者血清莱姆病抗体检测结果(IFA 法)性别和年龄分布

特征	分组	检测数	阳性数	阳性率(%)
性别	男	771	29	3.76
	女	563	31	5.50
年龄	≤ 20	21	0	0.00
	21~	408	19	4.66
	≥ 50	905	41	4.53

2.3 WB 法检测结果 60 例 IFA 法筛查血清莱姆病抗体阳性者经 WB 法检测, IgG 抗体阳性 20 例, IgM 抗体阳性 11 例, 两者均阳性 3 例, 两者之一阳性 28 例。三家医院初筛阳性者确证情况, 见表 3。

表 3 海南省某类就诊患者血清莱姆病抗体 WB 法确证结果

地区	初筛阳性数	IgG(+)	IgM(+)	IgG 和 IgM(+)	确证阳性数
海口	17	1	6	1	6
文昌	7	2	3	1	4
琼海	36	17	2	1	18
合计	60	20	11	3	28

2.4 WB 法确证阳性者性别、年龄和阳性条带分布 阳性条带以 31 KD、33 KD-36 KD、39 KD、41 KD、60 KD、66 KD 蛋白为主, 分别为伯氏疏螺旋体外膜蛋白 A(outer surface protein A, ospA)、外膜蛋白 B(outer surface protein B, ospB)、膜脂蛋白(*Borrelia burgdorferi* membrane protein A, bmpA)、鞭毛蛋白、热休克蛋白和

黏附分子, 见表 4。

表 4 海南省 28 例确证患者血清莱姆病抗体结果(WB 法)

序号	性别	年龄(岁)	IgG(+)	IgM(+)	特异蛋白
si101	男	75	36KD	41KD	ospB、鞭毛蛋白
si109	女	58		36KD	ospB
si238	男	60		41KD	鞭毛蛋白
si240	女	53		83-100KD	
si347	男	52		36KD	ospB
si374	女	58		66KD	黏附分子
we165	男	85	36KD		ospB
we190	女	85	39KD	33KD	bmpA、ospB
we345	男	39		33KD	ospB
we392	男	79		33KD	ospB
qh2	男	59		31KD	ospA
qh4	男	79	31KD		ospA
qh24	男	28	39KD		bmpA
qh37	女	69	50KD		
qh46	女	30	43KD		
qh48	女	37	36KD、41KD、66KD		ospB、鞭毛蛋白、黏附分子
qh99	女	52	39KD、60KD	31KD	bmpA、热休克蛋白、ospA
qh189	女	53	43KD		
qh144	女	68	39KD、41KD		bmpA、鞭毛蛋白
qh155	男	52	36KD、39KD、41KD		ospB、bmpA、鞭毛蛋白
qh158	女	33	41KD、48KD		鞭毛蛋白
qh165	女	54	41KD、83-100KD		鞭毛蛋白
qh185	男	40	17KD、58KD、60KD		热休克蛋白
qh192	男	67	12KD		
qh199	男	71	43KD		
qh275	女	54	23KD、31KD		ospA
qh283	女	48	58KD、60KD		热休克蛋白
qh435	女	61	36KD、39KD		ospB、bmpA

3 讨论

莱姆病是一种分布比较广泛的自然疫源性疾病, 其自然疫源地主要位于美国、欧洲和亚洲感染该病病原体伯氏疏螺旋体的动物和媒介蜱出没的温带地区。1987 年有学者首次报道了我国黑龙江海林县第一例螺旋体疾病莱姆病^[8], 随后新疆、内蒙古、辽宁、吉林、贵州、河北、河南和北京等多地都开展了该疾病的人群流行病学调查。万康林学者也开展了我国 20 个省市自治区动物莱姆病的调查, 从血清流行病学和病原学均证实我国动物莱姆病也广泛存在^[9], 段存娟等^[10] 调查表明野鼠存在莱姆病螺旋体的自然感染。海南省处于北纬 19 °C 左右的热带亚热带地区, 地理环境适宜莱

姆病传播媒介蜱的生长。本研究调查了海南省海口、文昌和琼海地区三家医院具有神经系统症状和(或)关节症状就诊患者莱姆病抗体情况,结果显示海口四院该类就诊患者莱姆病抗体阳性率为4.25%,文昌人民医院为1.40%,琼海人民医院为8.28%。三家医院该类就诊患者莱姆病抗体阳性率比较差异有统计学意义。这可能与琼海地区高达60%的森林覆盖率,合适的气温和湿度更有利于蜱的存活有关。

本研究进行了海南省东北部地区1334例某类患者莱姆病抗体调查,按不同性别和年龄分组,该地区莱姆病抗体阳性率比较差异均无统计学意义。结果可能表明该地区不同性别和年龄与莱姆病的发生并无直接的关联,也从侧面反映人群对莱姆病致病体伯氏疏螺旋体普遍易感。

莱姆病抗体血清学检测方法有IFA、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和WB。IFA法和ELISA法应用广泛^[11-12]。而本研究采用IFA和WB法进行检测。由于IFA法存在与钩端螺旋体和梅毒螺旋体交叉反应,而WB法中抗原膜片为伯氏疏螺旋体的特异性抗原,所以经过WB法确证的阳性条带即为血清中存在相对应的抗体。本研究调查了海口、文昌和琼海地区三家医院1334例有关节症状和(或)神经症状的患者,存在莱姆病抗体的有28例。28例血清莱姆病抗体以31KD的ospA、33KD-36KD ospB、39KD bmpA、41KD鞭毛蛋白、60KD热休克蛋白和66KD的黏附分子抗体为主。伯氏疏螺旋体的外膜蛋白与其致病性密切相关,螺旋体通过ospA黏附于蜱的中肠以维持在体内的生存和繁殖^[13-14]。ospC则是维持且感染哺乳动物所必需的因子^[14-15]。41KD的鞭毛蛋白对宿主细胞的侵袭力和附着力起着重要的作用^[16]。研究发现41KD的鞭毛蛋白与人的神经母细胞瘤系的表面蛋白具有共同的抗原成分,其抗原决定簇位于鞭毛蛋白的第213~214位的氨基酸,这就可以解释为什么病原体感染容易引起神经系统症状^[17]。39KD的bmpA位于螺旋体外膜的表面,为膜脂蛋白,是伯氏疏螺旋体的主要免疫原,是用于人和动物莱姆病诊断的主要抗原之一^[18]。33KD-36KD的ospB可以维持螺旋体持续感染。因此,WB法检测出相应抗体再结合临床相应症状和蜱叮咬史,基本可以确诊罹患莱姆病。

本研究通过血清流行病学证实海南省东北部地区人群存在莱姆病感染,但无病原学证实该地区为莱姆

病自然疫源地,这也是我们下一步努力的方向。通过本研究我们认为海南海口、文昌和琼海地区存在人群感染莱姆病,给当地临床医生诊断莱姆病提供一定的参考依据,并应加强当地疾病预防和监测。

参考文献

- [1] Arvikar SL, Steere AC. Diagnosis and treatment of Lyme arthritis[J]. Infect Dis Clin North Am, 2015, 29(2):269-280.
- [2] Sumner G, Rupprecht TA. Neurologic manifestations of Lyme borreliosis[J]. Rev Neurol (Paris), 2019, 19:30741-30746.
- [3] Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. Lyme neuroborreliosis - epidemiology, diagnosis and management[J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(8):446-456.
- [4] Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, et al. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis[J]. Science, 1982, 216(4552):1317-1319.
- [5] Hengge UR, Tannapfel A, Tying Sk, et al. Lyme borreliosis[J]. Lancet Infect Dis, 2003, 3(8):489-500.
- [6] 朱雄, 张琳, 侯学霞, 等. 海南省关节炎和神经系统疾病患者莱姆病调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(4):353-356.
- [7] Jiang Y, Hou XX, Geng Z, et al. Interpretation criteria for standardized Western blot for the predominant species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in China[J]. Biomed Environ Sci, 2010, 23(5):341-349.
- [8] 艾成绪, 温玉欣, 张永国, 等. 黑龙江海林地区发现一种新的蜱传螺旋体病-莱姆病[J]. 中国公共卫生, 1987, 2(6):6.
- [9] 万康林, 张哲夫, 张金声, 等. 中国20个省、区、市动物莱姆病初步调查研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1998, 9(5):366-370.
- [10] 段存娟, 郭英, 董珊珊, 等. 云南省剑川县野鼠感染莱姆病螺旋体状况的初步调查[J]. 中国热带医学, 2019, 19(1):66-69.
- [11] 陈霞, 刘文恩, 蒋红梅, 等. 1691例呼吸道感染患者病原学流行病学调查[J]. 实用预防医学, 2018, 25(8):975-977.
- [12] 胡玉山, 刘巧道, 肖丽红, 等. 以重组融合蛋白为基础的钩端螺旋体酶联免疫吸附实验检测试剂盒的初步研制[J]. 实用预防医学, 2019, 26(7):808-811.
- [13] Singh Sk, Girschick HJ. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(9):575-583.
- [14] Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1):382-388.
- [15] Sadziene A, Wilske B, Fardows MS, et al. The cryptic ospC gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid[J]. Infect Immun, 1993, 61(5):2192-2195.
- [16] Fikrig E, Berland R, Chen M, et al. Serologic response the *Borrelia burgdoeferi* flagllin demonstrates an epitope common to a neuroblastoma cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(1):183-187.
- [17] Jiang W, Luft BJ, Schubach W, et al. Mapping the major antigenic domains of the native flagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(6):1535-1540.
- [18] Bryksin AV, Tomova A, et al. BmpA is a surface-exposed outer-membrance protein of *Borrelia burgdorferi*[J]. FEMS Microbiol Letter, 2010, 309(1):77-83.