

云南省鼠疫菌质粒特征及地理分布

董兴齐 叶枫 彭何碧 李俊勇 高子厚 尹家祥 张洪英 吴明寿

RS1 A

【摘要】 目的 探讨云南省鼠疫菌质粒分子流行病学意义。方法 按 Kado 和 Liu 法提取云南省 44 个县市及中缅边境一带共 1 020 株鼠疫菌的质粒,经琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。结果 云南省鼠疫菌具有相对分子质量(M_r)分别约 3.93、6.05、22.97、35.65、45.35、64.82、74.59、111.36 和 129.55×10^6 的 9 种质粒,其中 3.93、35.65 和 111.36×10^6 的 3 种质粒为云南省鼠疫菌特有。按质粒组成可分为 10 种不同类型的质粒谱,其中 I—V 种类型较为常见,且在分布上具有明显的地区集中现象。结论 根据鼠疫菌质粒特征,可将云南省自 1982 年以来发生鼠疫流行的地区划分为多片相对独立的疫源地。认为 80 年代重新开始的家鼠鼠疫流行,可能来源于多片潜伏的鼠疫自然疫源地的复燃。

【关键词】 鼠疫菌;质粒;流行病学,分子

Geographic distribution and feature of *Yersinia pestis* plasmid isolated from Yunnan province DONG Xingqi, YE Feng, PENG Hebi, et al. Yunnan Institute of Epidemic Diseases Control and Research, Dali 671000, China

【Abstract】 Objective To analysis the molecular-epidemiological feature of *Yersinia pestis* plasmid isolated from Yunnan. Methods One thousand and twenty strains of *Y. pestis* isolates from 44 counties of Yunnan province in China and the border of China-Myanmar using Kado and Liu method and detected by agrose gel electrophoresis. Results Results showed that these strains from Yunnan province carried 9 kinds of plasmids with molecular weights about 3.93, 6.05, 22.97, 35.65, 45.35, 64.82, 74.59, 111.36 and 129.55×10^6 . Of these, three kinds of 3.93, 35.65 and 111.36×10^6 were found very specific, only reported in Yunnan. The plasmid profile could be divided into 10 types according to the plasmid content. Type I—V were common and had a clustering nature in geographic distribution. Conclusion Based on the plasmid profile, the epidemic districts of plague could be divided into several independent plague foci, suggesting that the resurgence of domestic rat caused plague epidemics might have several hidden plague foci as the result of epidemics since 1982 in Yunnan.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Plasmid; Epidemiology, molecular

早在 80 年代初, Ferber 和 Brubaker^[1] 报告鼠疫菌携带有相对分子质量(M_r)分别为 6、45 和 65×10^6 的 3 种质粒,这一观察结果已为后人多次证实,进一步的研究发现这些质粒编码着一些决定鼠疫菌以及其他致病性耶尔森菌毒力的基因^[2-5]。其后,不少学者相继报道在鼠疫菌中观察到另一些具有不同 M_r 的质粒^[5-13]。特别是我国学者在研究中发现,鼠疫菌所携带的最大一个质粒,其 M_r 在不同地区分离的菌株之间存在着明显的变异,认为这种特征可用于追溯菌株的来源^[6]。

我们检查了迄今为止分离自云南省 44 县市及

中缅边境一带共 1 020 株鼠疫菌的质粒组成,分析了质粒特征所具有的流行病学意义。

材料与方法

1. 菌株来源:1953~1999 年分离自云南省 10 地(州)44 县、市(1 001 株)及中缅边境一带(19 株)共 1 020 株,其中分离自黄胸鼠 717 株,大足鼠 27 株,大绒鼠 20 株,齐氏姬鼠 19 株,斯氏家鼠 10 株,褐家鼠 7 株,臭鼯鼠和家养豚鼠各 5 株,社鼠和大耳林姬鼠各 2 株,小家鼠、趋泽绒鼠、小林姬鼠和巢鼠各 1 株,体外寄生印鼠客蚤 124 株,方叶栉眼蚤 20 株,缓慢细蚤 17 株,不等单蚤 6 株,棕形额蚤 5 株,特新蚤和低地狭臀蚤各 3 株,野切棒蚤 2 株,无孔微棒蚤指名亚种 1 株,毒刺厉螨 1 株,鼠巢土壤 2 株,病人 18 株。均由本所鼠疫中心保存并提供。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39960006);云南省中青年学术和技术带头人培养经费资助项目(1999C0026G)

作者单位:671000 大理,云南省流行病防治研究所鼠疫流行病学室

2. 质粒 M_r 标准: 大肠杆菌 V517 由青海省地方病研究所李敏医师惠赠, 具有 M_r 为 1.4、1.8、2.0、2.6、3.4、3.7、4.8 和 35.8×10^6 的 8 个质粒。鼠疫菌 EV76 株, 购自中国药品生物制品检定所, 携 6、45 和 65×10^6 的 3 种质粒。这些质粒均作为本研究的标准 M_r 。

3. 质粒 DNA 提取方法: 按 Kado 和 Liu 法^[14] 稍加改进, 即将鼠疫菌接种于溶血赫氏琼脂斜面, 28℃ 培养 24 h, 用 1.0 ml TE 缓冲液 [三羟甲基甲烷 (Tris) 10 mmol/L, pH 8.0; 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 1.0 mmol/L, pH 8.0] 洗下菌苔, 取 0.3 ml 菌悬液于离心管内, 3 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 0.1 ml TE, 重新悬浮, 加 0.3 ml 裂解液 [3% 十二烷基硫酸钠 (SDS) + 50 mmol/L Tris, pH 12.45], 转摇数次; 置 60℃ 水浴 5 min, 悬液变清后加 3 ml 酚/氯仿/异戊醇 (24:24:1), 加胶塞缓慢颠倒 20 次, 3 500 r/min 离心 20 min, 收集上清供电泳。

4. 质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳: 采用 0.7% 琼脂糖凝胶。TBE 硼酸缓冲液 (Tris 89 mmol/L, 硼酸 89 mmol/L, EDTA 20 mmol/L), 电压 80 V, 电泳 8 h, 凝胶用 1 mg/ml 溴化乙锭染色 15 min, 在 2537A 紫外线照射下拍照测定其分子量。

结 果

1. 云南省鼠疫菌质粒种类: 经琼脂糖凝胶电泳证实, 1 020 株鼠疫菌中共有 9 种不同 M_r 的质粒 DNA, 其中 1 013 株 (99.31%) 均含有 6.05、45.35 和 64.82×10^6 的 3 种质粒, 除此 3 种外, 426 株菌 (41.76%) 尚存在第 4 种质粒, M_r 分别为 3.93、22.97、35.65 或 111.36×10^6 。其中 35.65 和 3.93×10^6 质粒已经双向电泳证实为超盘螺旋结构 (CCC)^[8,10,13]。具有 111.36×10^6 质粒的菌株, 最早于 1976 年分离自剑川县, 具有 22.97 或 35.65×10^6 质粒的菌株, 最早于 1982 年分离自瑞丽和陇川县, 而具有 3.93×10^6 质粒的菌株最早于 1992 年分离自澜沧县。

2. 云南省鼠疫菌质粒谱: 根据菌株的质粒组成, 可分为 10 种质粒谱, 见表 1, 其中最常见的是携有 3 种规范化质粒的鼠疫菌株 (I 型), 相当一部分菌株携带有一种附加质粒, 并构成 4 种不同的质粒谱 (II ~ V 型), 而另 5 种 (VI ~ X 型) 均为缺失某一种规范化质粒, 或最大一种质粒 M_r 发生明显变异的少数菌株。

3. 质粒的自然缺失和 M_r 变异: 研究发现, 1957 年分离自剑川县卫鼠香猫蚤的菌株 No400 自然缺失 6.05×10^6 质粒, 1953 年和 1955 年分离自祥云县黄胸鼠的 No345、378 菌株自然缺失 45.35×10^6 质粒, 1953 年分离自盈江县黄胸鼠的 No72 菌株和 1988 年分离自陇川县黄胸鼠的 No1408 菌株则缺失 64.82×10^6 质粒。此外还发现, 1984 年分离自中缅边境一带黄胸鼠的 No1247 和 1954 年分离自祥云县黄胸鼠的 No341 菌株所携带的大质粒 (64.82×10^6) 分别增大达 74.59 和 129.55×10^6 , 后者可能是大质粒的二聚体。

表1 云南省 1 020 株鼠疫菌质粒 (M_r 为 1×10^6) 组成

类型	质粒组成			菌株数	构成比 (%)	
I	6.05	45.35	64.82	587	57.55	
II	6.05	45.35	64.82	3.93	347	
III	6.04	45.35	64.82	22.97	38	
IV	6.05	45.35	64.82	35.65	12	
V	6.05	45.35	64.82	111.36	29	
VI	6.05	45.35		74.59	1	
VII	6.05	45.35		129.55	1	
VIII		45.35	64.82		1	
IX	6.05		64.82		2	
X	6.05	45.35			2	
合计				1 020	100.00	

4. 云南省鼠疫菌质粒的地理分布: 根据云南省鼠疫菌质粒的组成, I ~ V 种类型相对较为常见, 在分布上具有一定的地区集中现象, 见表 2。结合疫区地理特征可将 1974 年以来发生流行的地区划分为多片相对独立的疫源区域, 见表 3。分离自滇缅边境地区缅甸一侧的 19 株鼠疫菌, 质粒组成主要为 I 型。从不同年代分离的菌株看, 50 年代的 54 株鼠疫菌, 均为经典型 (I 型)。附加质粒是在 80 年代后分离的菌株中出现, 除个别疫点外, 同地区不同年份 (1982 ~ 2000 年) 分离的鼠疫菌, 质粒特征无明显变化, 尤其 3.93×10^6 质粒, 各年分离的菌株均保持稳定不变。分离自不同宿主、媒介的菌株 (包括分离自 14 种鼠类、9 种蚤类、1 种革螨以及人和巢土), 未发现质粒特征与宿主和媒介相关。

讨 论

质粒是细菌染色体以外的遗传物质, 通常一种细菌所携带的质粒种类, 是该细菌种的或株的稳定的遗传特征。1994 年朱锦沁等^[12] 根据大质粒的 M_r 将同属喜马拉雅型的鼠疫菌划分成 3 个亚型, 各自占据明确的地理区域。云南省分离的鼠疫菌,

表2 云南省各地鼠疫菌质粒谱

地区 (县)	菌株 数	质 粒 谱				
		I	II	III	IV	V
剑川	90	76(6)				14
祥云	28	28(28)				
弥渡	5	5(5)				
下关	1	1(1)				
盈江	93	91(4)		1	1	
架河	35	3(2)		32		
陇川	92	85(1)			1	6
瑞丽	88	77		3	5	3
畹町	10	10				
勐西	7	7				
保山	38	38(5)				
腾冲	5	5				
施甸	5	5				
耿马	102	93			3	6
双江	8	7		1		
镇康	4	4				
沧源	24	24				
临沧	73		73			
凤庆	6		6			
澜沧	52		52			
思茅	11		11			
江城	2		2			
孟连	11		11			
普洱	7		7			
景谷	15		15			
墨江	17		17			
镇源	6		6			
景洪	15		15			
勐海	64	8	55		1	
勐腊	4		4			
元江	4	2		1	1	
个旧	3		3			
石屏	13		13			
建水	4		4			
蒙自	4		4			
绿春	1		1			
开远	10		10			
红河	4		4			
弥勒	1		1			
文山	5		5			
砚山	5		5			
邱北	2		2			
宜良	6		6			
富民	8		8			
中缅边境	18	18				
合 计	1 013	587(52)	347	38	12	29

注:表中括号内为 1964 年以前分离的菌株数

虽分属 2 个生态型,但其宿主、疫源地结构和流行规律均明显不同,而它们的蛋白电泳图型基本一致。俞东征等通过人工传代,发现滇西纵谷型的菌株可

以丧失其醇解甘油的能力,变得与滇闽居民区型类似。我们的质粒分析也表明两型菌株中,大多数仍保持着经典的规范化的 3 个质粒。这些都显示云南省的鼠疫菌在遗传进化上似乎来自同一祖先。

表3 云南省鼠疫菌质粒及地理分布

独立疫源地	地区分布	质粒类型
滇西北山地	剑川	I V
保山盆地	保山、施甸	I
大盈江流域	梁河、盈江、腾冲	I III IV
龙川江流域	陇川、瑞丽、畹町、潞西	I III IV V
南定河流域	耿马、双江、镇康、沧源	I III IV V
滇南及中部	临沧、澜沧、云县、凤庆、思茅、	II
宽谷区域	普洱、江城、景谷、镇源、墨江、孟连、景洪、勐海、勐腊、红河、个旧、石屏、建水、绿春、蒙自、开远、弥勒、文山、砚山、邱北、宜良、富民	

我所 50 年代分离的菌株数量虽然不多,但来自广阔的地理区域。所有这些菌株无例外地属于规范化的 I 型菌株,提示这种菌株可能代表着云南省鼠疫菌的原始状态。当云南省的家鼠鼠疫经历了 20 余年的静息期,于 80 年代初期重新开始活动之后,我们所分离的菌株中却有相当一部分出现了不同 Mr 的附加质粒,虽然这种情况并不是一种概率很高的现象,但表明菌株出现变化。

云南省 80 年代的鼠疫流行,最初发于中缅边界的陇川、瑞丽,逐渐扩展到云南西部、西南部和南部的广大地区。有认为流行过程可能是由缅甸边境或者从陇川、瑞丽开始,通过染疫啮齿动物的迁移,逐渐向东,向南扩展的。但实际观察却不支持这种认识。不仅在这些地区之间相隔着啮齿动物难以逾越的高山深谷和江河,而且流行过程在时间和空间上也是跳跃式地发生的。质粒分析也不支持这种从一点开始扩散蔓延的看法。从分离自滇南和滇东南宽谷区域的鼠疫菌均携有额外的 3.93×10^6 质粒分析,至少这一带的鼠疫不可能是从滇西德宏、保山地区传入的。

从澜沧江与怒江之间地带分离的菌株基本保持着经典菌株的原貌,大盈江流域的梁河县,90 年代分离的菌株均有 23×10^6 的附加质粒,而大盈江、龙川江、南汀河及其他汇入怒江水系的下游地区菌株质粒的分布特别复杂,提示它们是 I、III、IV、V 型菌株流行过程的交汇地区。携有 111×10^6 质粒的 V 型菌株在位于横断山脉中段的剑川最为常见。这些结果提示,云南的这次鼠疫流行,似乎并不是来自同

一来源的流行过程,而是存在于多处不同地域的鼠疫疫源地的先后复燃。从中缅边境一带分离的菌株看,其质粒特征基本一致,分析认为这一带可能同属一个类型的疫源地。

值得一提的是 1992 年 2 月首次发生在勐海县县城的鼠疫,其菌株质粒特征为 I 型和 IV 型,而后来在该县其他地区发生的多起鼠疫,全部菌株质粒组成均为 II 型,由此认为这一次流行可能是传入性的。此外,元江县于 1992 年 4 月也在县城爆发了首次流行,其菌株质粒特点也为 I 型、III 型和 IV 型,以后再未发生疫情,相反该县周围墨江、红河、石屏等县,首发至今分离的鼠疫菌质粒组成均为 II 型。初步分析,元江县 1992 年 4 月的鼠疫疫情也可能是传入性的。

鼠疫菌可产生丰富的荚膜 F1 抗原,一般认为不易接受外界质粒,我们发现的 3.93×10^6 质粒,至今在国内外文献尚未见报道^[5-10,12],经双向电泳证实为超螺旋结构 DNA,多次传代遗传稳定性好^[10]。该质粒在云南分布极为广泛,比较缺乏该质粒的菌株的毒力、耐药性及某些生物学表征,未发现明显差异。目前正在进一步对该质粒做序列分析,探讨其来源和功能。

参 考 文 献

- 1 Ferber DM, Brubaker RR. Plasmid in *Yersinia pestis*. Infect Immun, 1981, 31:839-841.
- 2 Ben GR, Shafferman A. Essential virulence determinants of different *Yersinia* species is carried on a common plasmid. Plasmid, 1981, 5: 183-187.
- 3 Portnoy DA, Falkow S. Virulence-associated plasmid from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. J Bact, 1981, 148: 877-883.
- 4 Sodeinde DA, Goguen JD. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. Infect Immun, 1988, 56: 2743-2748.
- 5 Tsukano H, Akira W, Yoshimasa S. Plasmid-like properties of the four virulence-associated factors of *Yersinia pestis*. Microbiol Immun, 1986, 3:837-848.
- 6 何永山,赵铭山,公允,等.我国各鼠疫自然疫源地鼠疫菌质粒种类的研究.中国地方病学杂志,1986,5:7-11.
- 7 Andrew AF, Nikolai SS, Liubov MK, et al. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. Federation of European Microbiological Societies, Microbiol Letter, 1990, 67:45-48.
- 8 赵铭山,何永山,公允,等.我国鼠疫菌 13MD 质粒的发现.中国地方病防治杂志,1988,3:131-133.
- 9 赵铭山,何永山,公允,等.鼠疫菌 36MD 质粒的发现及鉴定.地方病通报,1988,3:15-16.
- 10 Leal NC, Almerida AM, Ferreira LC. Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolated from a plague outbreak at the Paraíba state. Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1989, 31:295-300.
- 11 董兴齐,叶枫,彭何碧.鼠疫菌 4MD 质粒的发现及鉴定.中国地方病学杂志,1993,12:213-214.
- 12 朱锦沁,李敏,王丽,等.青海省鼠疫疫源地鼠疫菌某些生物学特性及流行病学意义的研究.地方病通报,1994,9:1-6.
- 13 May CC, Dong XQ, Zhou X, et al. A cryptic 19-kb plasmid associated with U. S. isolates of *Yersinia pestis* is a dimer of the 9.5 kb plasmid. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59:679-686.
- 14 Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation at large and small plasmid. J Bact, 1981, 145:1365-1373.

(收稿日期:2000-12-23)

(本文编辑:杨莲芬)

· 出版信息 ·

我国首部《皮肤病流行病学》专著出版发行

由安徽医科大学公共卫生学院流行病学教研室叶冬青教授、博士主编的《皮肤病流行病学》已由人民卫生出版社出版发行。该书共分 23 章,计 71.3 万字,是我国第一部皮肤病流行病学方面的专著。本书系统的介绍了皮肤病研究中常用的流行病学原理和方法,在此基础上还介绍了 Meta 分析、循证医学、卫生服务评价、巢式病例对照研究和病例队列研究、常用的多元统计方法及其 SAS 程序、敏感问题调查技术等内容,并对常见皮肤病的流行特征、危险因素及预防措施等作了详细的叙述,是广大皮肤病工作者、临床医生、流行病学工作者和其他医务人员有益的参考书。

本书为 16 开,共 519 页,定价 47.50 元,已在 2001 年 6 月推出,各地新华书店有售,也可直接向人民卫生出版社发行部联系邮购,地址:北京丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼(100078)。