

## · 实验室研究 ·

## 青海省三江源地区鼠疫病原学分析

祁芝珍 李超 王丽 赵海红 杨晓艳 李存香 何建 魏荣杰

**【摘要】** 目的 研究青海省三江源地区鼠疫菌株生物学特性并确定疫源地空间结构及性质。方法 对 1954—2007 年青海省三江源地区分离的鼠疫菌株进行生物学表型鉴定及分子生物学研究。结果 411 株代表性菌株中, 12 株脱氮(-)阿胶糖(-)甘油(+)属田鼠型, 399 株为脱氮(+)阿胶糖(+)甘油(+)属古典型。411 株均能产生 F1 和 Pst I; VW<sup>+</sup> 菌株占 95.13%(391/411), VW<sup>-</sup> 菌株占 4.87%(20/411); Pgm<sup>+</sup> 菌株占 80.78%(332/411)、Pgm<sup>±</sup> 菌株占 9%(37/411)、Pgm<sup>-</sup> 菌株占 10.22%(42/411)。220 株代表株中 96.82%(213/220) 的菌株对小白鼠表现为强毒株, 3.18%(7/220) 为中等毒力, 说明绝大多数具高致病性, 其毒力很强。90.02%(307/341) 菌株携带  $6 \times 10^6$ 、 $45 \times 10^6$ 、 $65 \times 10^6$  质粒。80 株代表株包括 8 个基因组型, 其中 6 个基因组型与原原型相同, 另有 2 个新的基因组型。结论 三江源地区鼠疫菌株具备青藏高原鼠疫病原体特性, 人类一旦感染可导致发病急、病情重、传染性强、病死率高等特点。

**【关键词】** 鼠疫; 病原学分析; 流行病学

**Study on the pathogen of plague in Sanjiangyuan area in Qinghai province** QI Zhi-zhen, LI Chao, WANG Li, ZHAO Hai-hong, YANG Xiao-yan, LI Cun-xiang, HE Jian, WEI Rong-jie. Qinghai Institute of Endemic Disease Control and Prevention, Xining 811602, China

**【Abstract】** **Objective** To study the biological characteristics of *Yersinia pestis* and to develop prevention and control program on plague in Sanjiangyuan areas, Qinghai province. **Methods** To identify the biologic types and molecular biological features of *Y.pestis* isolated in Sanjiangyuan area from 1954—2007. **Results** Among the 411 strains of *Y. pestis*, 12 strains belonged to the microtus type *Y. pestis* with denitrification (-) and donkey-hide gelatin carbohydrate (-) and glycerine (+). 399 strains belonged to classic type *Y.pestis* with denitrification (+) and donkey-hide gelatin carbohydrate (+) and glycerine (+). 411 *Y.pestis* strains had factor F I and Pst I. Among them, VW<sup>+</sup> strains of *Y.pestis* accounted for 95.13%(391/411), VW<sup>-</sup> accounted for 4.87%(20/411), Pgm<sup>+</sup> accounted for 80.78%(332/411), Pgm<sup>±</sup> accounted for 9%(37/411) and Pgm<sup>-</sup> accounted for 10.22%(42/411) respectively. 96.82%(213/220) of the *Y.pestis* strains showed strong virulence to laboratory mice while 3.18%(7/220) of the strains carried medium virulence. 90.02% of the tested *Y.pestis* (370/411) strains had  $6 \times 10^6$ ,  $45 \times 10^6$ ,  $65 \times 10^6$  plasmids. 8 types of genome were found among 80 strains of *Y.pestis*, with 6 of them resembling ZHOU Dongsheng's classification. Two new genome types were found. **Conclusion** The *Y.pestis* in the Sanjiangyuan area had the characteristics of plague pathogen, identified in Qinghai-Tibet plateau. It is estimated that human beings are highly susceptible to the disease which spread fast, causing serious signs and symptoms with high death rate.

**【Key words】** Plague; Pathogen analysis; Epidemiology

三江源国家自然保护区位于青海省南部, 其东部、东南部与甘肃省、四川省相邻, 南部、西部与西藏自治区相接, 也是青海省动物间和人间鼠疫流行最严重的地区之一。近几年该地区发生多起人间鼠疫病例<sup>[1]</sup>, 严重影响三江源自然保护区的建设和人群的身体健康。为此针对该地区自 1954—2007 年分离的鼠疫菌代表株进行病原学研究, 对确定疫源地结构和性质等有重要意义。

## 材料与与方法

1. 菌株: 研究用鼠疫菌 411 株, 是 1954—2007 年从青海省三江源地区不同宿主、媒介体内分离; 其中喜马拉雅旱獭 243 株, 其体外寄生蚤、蜱、虱 55 株, 小型啮齿动物 18 株, 食肉动物 10 株, 藏(黄)羊 14 株, 人尸及患者 71 株; 均由鼠疫菌专业实验室提供。

2. 实验动物: 小白鼠体重 18~20 g, 由青海省实验动物中心提供。

3. 生化及糖醇类酵解试验: 将被试菌株的 28℃ 24 h 普通琼脂培养物用 1% 蛋白胨水制成约 20 亿/ml 的菌悬液, 分别接种于阿胶糖、鼠李糖、麦芽

糖、密二糖、甘油、脱氮培养基中，混匀后置37℃温箱，连续观察7 d后再室温观察7 d，逐日观察发酵情况，脱氮作用以96 h培养物，加入试剂后记取结果。

4. 毒力因子检查及结果判定：参照文献[2]方法用抗鼠疫血清平板检查F1抗原；草酸镁培养基检查VW抗原；氯化血红素培养基检查Pgm细胞组成；Pst I琼脂培养基检查鼠疫菌素I的产生。

5. 毒力测定：取被试菌37℃ 24 h培养物，用灭菌生理盐水制成菌悬液，标准比浊后稀释成 $2 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $2 \times 10^2$ 、 $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 及 $>2 \times 10^9$ 个菌/ml，分别注射0.5 ml于小白鼠鼠蹊部皮下，每组5只动物，分笼饲养观察14 d，动物死亡后取腺体、肝、脾、肺、心脏器进行细菌培养，以分离到鼠疫菌确定为特异性死亡，并计算最小致死量(MLD)。

6. 质粒检查：Kado法常规进行。

7. 基因分型：参照文献[3,4]采用全基因组芯片杂交技术和抑制削减杂交技术在鼠疫菌中共鉴定出23个差异区段(DFR)，其中有3个位于pMT1质粒中，20个位于染色体上。采用Array Designer 2.0软件针对每个DFR各设计一对引物，为证实pMT1的存在，实验针对pMT1质粒设计了一对引物，引物序列参照文献[5]。PCR反应体系： $10 \times$  buffer 3  $\mu$ l，10 mmol/L dNTP 0.2  $\mu$ l，5000 U/L Taq DNA聚合酶 0.2  $\mu$ l，5  $\mu$ mol/L引物对 1  $\mu$ l，5 mg/L模板DNA 2  $\mu$ l，用去离子水补足至30  $\mu$ l。PCR扩增条件：95℃ 3 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 60 s，30个循环；72℃ 5 min。PCR产物检测：PCR产物在1%的琼脂糖凝胶上电泳，紫外分析仪下观察结果，在预计分子质量大小处出现条带者为阳性。每次PCR检测均设阴性对照(用去离子水取代模板)和阳性对照(模板为鼠疫菌株91001和82009 DNA的混合物，包括全部23个DFRs)。可疑PCR结果和阴性PCR结果至少重复1次。

### 结 果

1. 三江源地区鼠疫菌生态型：411株鼠疫菌生态型分型的主要指标阿胶糖、鼠李糖、麦芽糖、密二糖、甘油、脱氮酵解情况见表1。

2. 毒力因子检查：411株均能产生F1和Pst I；VW(+)菌株占95.13%(391/411)；VW(-)菌株占

4.87%(20/411)；Pgm(+)菌株占80.78%(332/411)、Pgm(±)菌株占9%(37/411)、Pgm(-)菌株占10.22%(42/411)。

3. 毒力测定：220株鼠疫菌对小白鼠毒力试验结果显示，三江源地区鼠疫菌的毒力可分为二种类型：MLD在1万或1万以下强毒菌占96.82%(213/220)，MLD大于1万~10万中等毒力占3.18%(7/220)；见表2。

4. 质粒检查：对411株菌的质粒谱检查显示，90.02%(370/411)携带 $6 \times 10^6$ 、 $45 \times 10^6$ 、 $65 \times 10^6$ 质粒，主要分布于称多、格尔木、玛多、囊欠、曲麻莱、玉树、泽库多禾茂、扎多、治多；6.57%(27/411)的菌株携带 $6 \times 10^6$ 、 $45 \times 10^6$ 、 $52 \times 10^6$ 质粒，主要分布于同德、兴海、玛多、玛沁，零星分布于格尔木唐古拉地区；3.41%(14/411)携带 $6 \times 10^6$ 、 $45 \times 10^6$ 、 $90 \times 10^6$ 质粒，零星分布于格尔木唐古拉地区和曲麻莱以及玉树县。

5. 三江源地区鼠疫菌基因组型别分布：选代表性菌80株进行23个DFR的PCR扩增，参照分型标准<sup>[3]</sup>，青海省三江源地区80株代表株鼠疫菌可以分为8个基因型，其中6个基因型与周冬生的分型相同，即1、5、7、8、10、14型。此外，另有2个基因型并不包括在周冬生的分型中，将其分别称之为新型和Ype-ancestor(表3)。其基因型以5型为主，8型次之，结果见表4、5。

### 讨 论

鼠疫耶尔森菌的生物学特性是多样的，与地理分布及生物群落密切相关。菌株某些生物学特性的研究，对确定疫源地结构和性质等有重要意义，其流行病学作用对采取综合性防治措施等亦有实用价值。根据周冬生等<sup>[6]</sup>研究显示，三江源地区喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地分离的鼠疫菌株生化表型为甘油(+)、阿胶糖(+)、脱氮(+)，因而其生物型为古典型；从田鼠鼠疫疫源地分离的鼠疫菌株生化表型为甘油(+)、阿胶糖(-)、脱氮(-)为田鼠型，则该地区鼠疫菌有两种生物型。根据纪树立等<sup>[7]</sup>对我国鼠疫菌生态型分型的主要指标及刘振才等<sup>[8]</sup>的研究，三江源地区的鼠疫菌株生态型可分为青藏高原型、祁连山型和青海田鼠型，92.46%的菌株为青藏高原型。青藏高原型菌株基因型以5型为主，青海田鼠型菌株均为14型，因此，无论从表型特征还是从分子生物学特征上看，该地区从疫源地空间结构组成

表1 三江源地区鼠疫菌株生化性状

生物型	菌株数	阿胶糖 (+/-)	鼠李糖 (+/-)	麦芽糖 (+/-)	甘油 (+/-)	脱氮 (+/-)	分布地区(县、市)
青藏高原型	380	380/0	0/380	380/0	380/0	380/0	兴海、河南、格尔木、玉树、扎多、治多、曲麻莱、囊欠、称多、玛多、玛沁
祁连山型	19	19/0	0/19	13/6	19/0	19/0	泽库、同德
青海田鼠型	12	0/12	12/0	12/0	12/0	0/12	称多

表 2 三江源地区鼠疫菌毒力测定结果

菌株数	MLD (个菌/ml)					
	10	50	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup> ~
220	20	62	66	56	9	7

表 3 三江源地区鼠疫菌基因组类型

地点	菌株数	基因组型							
		1	5	7	8	10	14	新型	Ype-ancestor
兴海	5	0	1	0	3	0	0	0	1
同德	6	0	0	0	6	0	0	0	0
泽库	6	1	0	2	3	0	0	0	0
称多	16	0	3	0	0	0	12	1	0
格尔木	6	0	6	0	0	0	0	0	0
河南	1	0	1	0	0	0	0	0	0
玛多	3	1	2	0	0	0	0	0	0
玛沁	2	0	0	0	2	0	0	0	0
囊欠	13	1	3	1	0	8	0	0	0
曲麻莱	6	0	5	0	0	0	0	1	0
玉树	7	0	7	0	0	0	0	0	0
扎多	4	1	3	0	0	0	0	0	0
治多	5	0	5	0	0	0	0	0	0
合计	80	4	36	3	14	8	12	2	1

上,是由喜马拉雅旱獭鼠疫源地和青海田鼠鼠疫源地构成。

李敏等<sup>[9]</sup>提出,鼠疫菌含有的 6×10<sup>6</sup>质粒决定 Pst I 产生,许多学者认为鼠疫菌的 VW 因子是 45×10<sup>6</sup>质粒所控制并与毒力有直接关系。认为失去 45×10<sup>6</sup>质粒的菌株其表型为 VW<sup>-</sup>,且呈低毒。本研究显示,三江源地区鼠疫菌株的 4 个毒力因子俱全,质粒谱显示无质粒缺失株,这也是该地区菌株毒力强的综合表现。

毒力是决定动物鼠疫流行强度及预测流行阶段的主要标志之一。根据朱锦沁等<sup>[10]</sup>对青海鼠疫菌株毒力等级分类,三江源地区 96.82%的菌株对小白鼠表现为强毒。该地区流行病学资料显示<sup>[1]</sup>,1960—

表 4 鼠疫菌 23 个 DFR 在三江源地区鼠疫菌中的分布

菌株数	基因组型							
	1	5	7	8	10	14	新型	Ype-ancestor
DFR01	-	-	-	-	-	+	+	+
DFR02	+	-	-	-	+	+	+	+
DFR03	+	+	+	-	+	+	+	+
DFR04	+	+	-	-	+	+	-	+
DFR05	+	+	+	+	+	+	+	+
DFR06	+	+	+	+	-	-	-	+
DFR07	+	+	+	+	-	+	+	+
DFR08	+	+	+	+	+	+	+	+
DFR09	+	+	+	+	+	+	+	+
DFR10	+	+	+	+	+	+	+	+
DFR11	+	+	+	+	+	-	-	+
DFR12	+	+	+	+	+	-	+	+
DFR13	-	-	-	-	-	-	-	-
DFR14	+	+	+	+	+	+	+	+
DFR15	+	+	+	+	+	-	+	+
DFR16	+	+	+	+	+	-	+	+
DFR17	+	+	+	+	+	+	-	+
DFR18	+	+	+	+	+	-	+	+
DFR19	+	+	+	+	+	-	+	+
DFR20	+	+	+	+	+	-	+	+
DFR21	+	+	+	+	+	+	+	+
DFR22	+	+	+	+	+	+	+	+
pMT1	+	+	+	+	+	+	+	+
菌株数	4	36	3	14	8	12	2	1

注: +:基因组中存在该 DFR; -:基因组中缺失该 DFR

2006 年三江源地区除 12 个年份没有发生人间鼠疫外,其他年份均有人间鼠疫病例发生,发病地区主要分布在玉树、果洛、黄南、海南 4 州 12 个县和格尔木市唐古拉山乡,共发生人间鼠疫 85 起,发病 238 例,死亡 134 例,病死率 56.30%,因此,在三江源地区近年来人间鼠疫的发生呈上升趋势,动物间鼠疫流行猛烈,从而体现了菌株对人和动物的侵袭力和毒力最强。

根据生化特性、毒力因子、毒力、质粒以及基因组型,结合其地理分布认为,该地区分离的菌株多以青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫源地病原特性为主,是目前被认为致病力最强的菌株。

表 5 三江源地区鼠疫菌生物学特性及地理分布

生物型	菌株数	生化特征			毒力因子			大质粒 (×10 <sup>3</sup> ) (%)	毒力 MLD		基因组分布	
		阿糖	甘油	脱氮	F1	VW (%)	Pgm (%)		Pst I	强毒		中等毒
古典型	399	+	+	+	+	92.21 (+)	77.85 (+)	+	52(6.57)	7.73	0.00	1、5、8 型,主要分布于同德、兴海、玛多、玛沁,零星分布于格尔木唐古拉地区
									65(87.10)	86.36	2.72	1、5、7、8、10、新型、Ype-ancestor,主要分布于称多、格尔木、玛多、囊欠、曲麻莱、玉树、泽库多不茂、扎多、治多
									90(3.41)	0.45	0.45	5 型,分布于格尔木唐古拉地区、曲麻莱以及玉树县
田鼠型	12	-	+	-	+	2.92(+)	2.92(+)	+	65(2.92)	2.27	0.00	14 型,仅分布于称多珍秦乡

参 考 文 献

[1] 王国钧,李超,祁芝珍,等.青海省三江源地区人间鼠疫流行病学分析.中国地方病学杂志,2008,27(2):87-89.  
 [2] 祁芝珍,金丽霞,于晓涛,等.我国鼠疫菌毒力因子的比较与分析.中华微生物学和免疫学杂志,2001,21(4):385-388.  
 [3] 周冬生,韩延平,宋亚军,等.鼠疫耶尔森菌基因组进化与生态位适应研究.解放军医药杂志,2004,29(3):204-210.  
 [4] 祁芝珍,戴二黑,周冬生,等.2004 年青海人间鼠疫分离株基因分型及流行病学意义.中华流行病学杂志,2006,27(4):316-318.  
 [5] 崔百忠,戴二黑,周冬生,等.青海省鼠疫源地鼠疫耶尔森菌的基因分布.中国地方病学杂志,2006,25(6):605-609.  
 [6] 周冬生,董宗中,宋亚军,等.鼠疫耶尔森菌生物型变异遗传基

础的研究和新生生物型——田鼠型的提出.解放军医学杂志,2004,29(3):211-215.  
 [7] 纪树立,张海峻,刘云鹏,等.中国鼠疫耶尔森菌分型及其生态学流行病学意义.中华流行病学杂志,1990,11(特刊1号):160-164.  
 [8] 刘振才,海荣,李富忠,等.青藏高原青海田鼠鼠疫自然疫源地的发现与研究.中国地方病防治杂志,2001,16(6):321-327.  
 [9] 李敏,黎莉,于晓涛,等.青海鼠疫菌株的毒力因子及某些相关因素的研究.中国地方病学杂志,1993,12(4):215-218.  
 [10] 朱锦沁,李敏,王丽,等.青海省鼠疫源地鼠疫菌某些生物学特性及其流行病学意义的研究.地方病通报,1994,9(1):1-5.  
 (收稿日期:2008-06-23)  
 (本文编辑:尹廉)