

云南省鼠疫菌 *Fse* I 酶切分型及其流行病学意义

石丽媛 叶蕊 董珊珊 郭英 杨光璨 张蓉 崔志刚 李伟 王鹏

【摘要】 目的 构建云南省鼠疫菌 *Fse* I 酶切的脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 图谱库并探讨其流行病学意义。方法 采用限制性内切酶 *Fse* I 对云南家、野鼠型及丽江玉龙鼠疫菌株进行酶切分析, 并聚类分析电泳图谱。结果 30 株被试菌株分为 16 种 PFGE 型别, 其相似性系数为 79.8% ~ 100.0%; 16 种 PFGE 基因型可以分为 4 个簇, 除 EV76 自成一簇, 其余 3 个簇分别为家鼠型基因簇、野鼠型基因簇及玉龙基因簇。结论 云南省鼠疫菌 PFGE 基因型与生态型、生物型相吻合, 具有一定的区域聚集性, 而丽江玉龙鼠疫菌为一个独立基因簇。

【关键词】 鼠疫耶尔森菌; 脉冲场凝胶电泳; *Fse* I 酶切方法

Genotyping and its epidemiological significance on Yunnan *Yersinia pestis* under *Fse* I enzyme digestion method Shi Liyuan¹, Ye Rui², Dong Shanshan¹, Guo Ying¹, Yang Guangcan¹, Zhang Rong², Cui Zhigang³, Li Wei³, Wang Peng^{1,2}. 1 Provincial Key Laboratory for Plague Control and Prevention, Yunnan Institute for Endemic Diseases Control and Prevention, Dali 671000, China; 2 School of Public Health, Dali University, Dali, Yunnan Province; 3 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention and State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Wang Peng, Email: wp030801@126.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81160354), the Industry Fund by Ministry of Health (No. 201202021) and the Basic Research Program for Application of Yunnan Province (No. 2011FB134).

【Abstract】 **Objective** To create the fingerprint library of Yunnan *Yersinia pestis* by pulse field gel electrophoresis (PFGE) with *Fse* I enzyme digestion method and to study its epidemiological significance. **Methods** We used rare cutting restriction enzyme *Fse* I to digest Yunnan *Yersinia pestis* strains that were isolated from foci including *Rattus flavipectus* Plague Focus, *Apodemus chevrieri-Eothenomys miletus* Plague Focus and Yulong Plague Focus. Fingerprints to Bionumerics software were used for cluster analysis. **Results** 30 tested strains were divided into 16 genotypes with the similarity value as 79.8%–100.0%. 16 genotypes were formed into 4 clusters, with one consisted of only EV76 while the other three belonged to *Rattus flavipectus*, *Apodemus chevrieri-Eothenomys miletus* and Yulong clusters, respectively. **Conclusions** PFGE genotypes of Yunnan *Yersinia pestis* accorded with its ecotypes and biovars, with clustered regional features. The strains isolated from Yulong showed a unique PFGE type, indicating a new clone group was identified.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Pulse field gel electrophoresis; *Fse* I enzyme digestion method

云南省已证实存在滇闽居民型家鼠鼠疫和滇西纵谷型野鼠鼠疫疫源地。其中家鼠鼠疫疫源地曾于 1982 年复燃后在多地暴发, 随后流行减弱, 于 2006

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.02.018

基金项目: 国家自然科学基金 (81160354); 卫生部行业基金 (201202021); 云南省应用基础研究 (2011FB134)

作者单位: 671000 大理, 云南省地方病防治所 云南省鼠疫防控技术重点实验室 (石丽媛、董珊珊、郭英、杨光璨、王鹏); 大理学院公共卫生学院 (叶蕊、张蓉、王鹏); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室 (崔志刚、李伟)

通信作者: 王鹏, Email: wp030801@126.com

年至今连续 8 年未出现人间病例; 野鼠鼠疫疫源地自 1975 年证实以来, 流行持续 20 余年, 至今未发现人间病例。2005 年丽江市玉龙县出现 5 例肺鼠疫病例^[1], 为 1950 年后云南省发现的首例肺鼠疫病例, 分离的鼠疫菌株其生化特性与云南省家、野鼠两型鼠疫菌均有差异, 但与喜马拉雅旱獭鼠疫青藏高原型的主要生化特性相同^[2]。为探讨玉龙分离菌株与云南省家、野鼠两型疫源地菌株的关系, 本研究采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 对云南省不同年代、宿主、地点分离的鼠疫菌株进行 PFGE 分型, 试图从基因水

平上了解菌株间的差异和亲缘关系。

材料与方法

1. 菌株: 选取云南省不同流行地区、宿主、媒介分离的鼠疫菌株 29 株(来自家鼠鼠疫源地 24 株、野鼠鼠疫源地 2 株、玉龙新分离菌株 3 株), 对照菌株为疫苗株 EV76。其中 17 株分离自 3 种鼠, 6 株分离自 4 种蚤, 6 株分离自人体。所有菌株由云南省地方病防治所菌种资源库提供。

2. 模拟酶切及其聚类分析: 通过网站 <http://insilico.ehu.es> 获取耶尔森菌属用限制性内切酶 *Fse* I (识别 GG_CCGG'CC) 酶切及 PFGE 模拟图谱。共获取 19 株菌[鼠疫菌 12 株(云南省菌株 2 株)、小肠结肠炎菌 3 株、假结核菌 4 株]。将模拟图导入 BioNumerics (Version 6.6) 数据库, 通过软件识别条带, 进行聚类分析。

3. 菌株 PFGE 分型: 按照美国疾病预防控制中心 PulseNet protocols 推荐的鼠疫菌 PFGE 操作规程 (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>)。将活化的被试菌株包埋于琼脂糖中, 之后将胶块裂解、洗涤, 使用 *Fse* I 内切酶酶切, 利用 BioRad CHEF Mapper 电泳仪电泳, 最后用 SYNGENE 成像仪成像。

4. 聚类分析: 使用 BioNumerics 数据库软件进行处理, 聚类分析选择基于 band 的 Dice 方法, Optimization 为 1.5%, Tolerance 为 2%, 算法选择非加权配对算术平均法 (unweighted pair group average method, UPGMA)。勾选 Calculate cluster cutoff 选项, 由软件自动定义“簇”。

结果

1. 模拟酶切及其聚类分析: 酶切的条带约有 20~30 条, 集中分布于 50~500 kb 范围内。模拟聚类分析(图 1)可将耶尔森菌属的 3 种致病菌基本分开, 鼠疫菌与假结核菌的相似度高于小肠结肠炎菌。丽江菌株 D106004 和剑川菌株 D182038 相似度较高(90.0%)。提示用 *Fse* I 对耶尔森菌进行酶切分型分辨力较好, 条带分布较合适。

2. PFGE 图谱聚类分析: 将测试的 30 株菌酶切电泳后得到 20~1 000 kb 电泳片段, 不同菌株条带数在 18~24 条之间(图 2)。根据相似度 100% 为同一 PFGE 型别的原则, 30 株菌分为 16 种 PFGE 型别, 其相似系数为 79.8%~100.0%(图 3)。每种型别包含菌株 1~4 株, 其中 7 种型别(43.75%)分别只包含 1 株菌, 其他 9 种型别包含菌株数均 >1 株。有 2 种带型包含来自不同州(市)的菌株, 有 13 种(81.25%)带型只局限在某个州(市)。将 16 种 PFGE 图谱进行聚类分析, 可以分为明显的 4 个簇(图 3)。簇 1 包含 23 株家鼠鼠疫源地菌株, 有 12 种带型, 相似性系数为 86.4%~100.0%; 簇 2 仅有 EV76 一株菌和一种带型; 簇 3 包含 3 株丽江玉龙菌株, 有 2 种带型, 相似性系数为 97.6%~100.0%; 簇 4 包含 2 株野鼠鼠疫源地菌株和 1 株家鼠鼠疫源地菌株, 只有 1 种带型。

3. PFGE 图谱与酶切模拟图谱比对: 将本研究的玉龙分离株 PFGE 图与酶切模拟图相比较(图 4), 两者拟合较好。

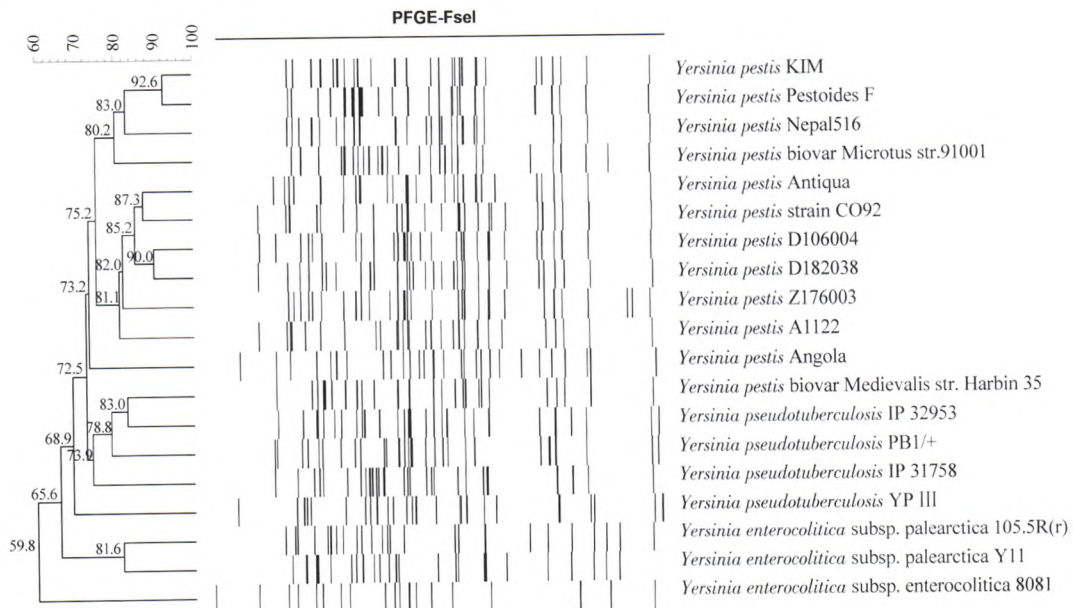
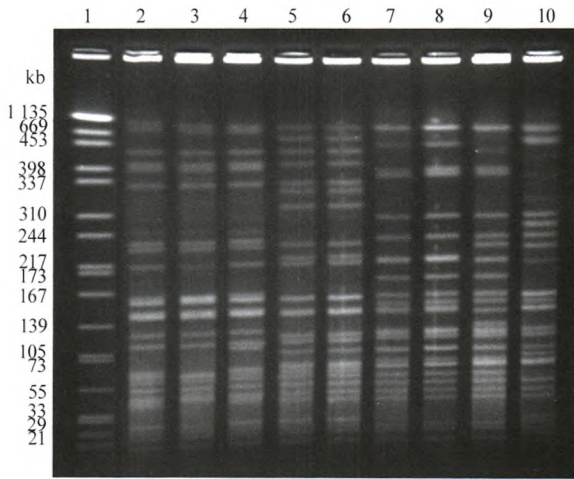


图 1 耶尔森菌酶切模拟图聚类分析



注:1:沙门菌 Braenderup 血清型全球参考菌株 H9812; 2:LJZ14; 3:LJ1367; 4:LJ485; 5:1061; 6:1318; 7:2299; 8:2302; 9:2563; 10:EV76

图2 云南省鼠疫菌 *Fse* I 酶切 PFGE 图谱

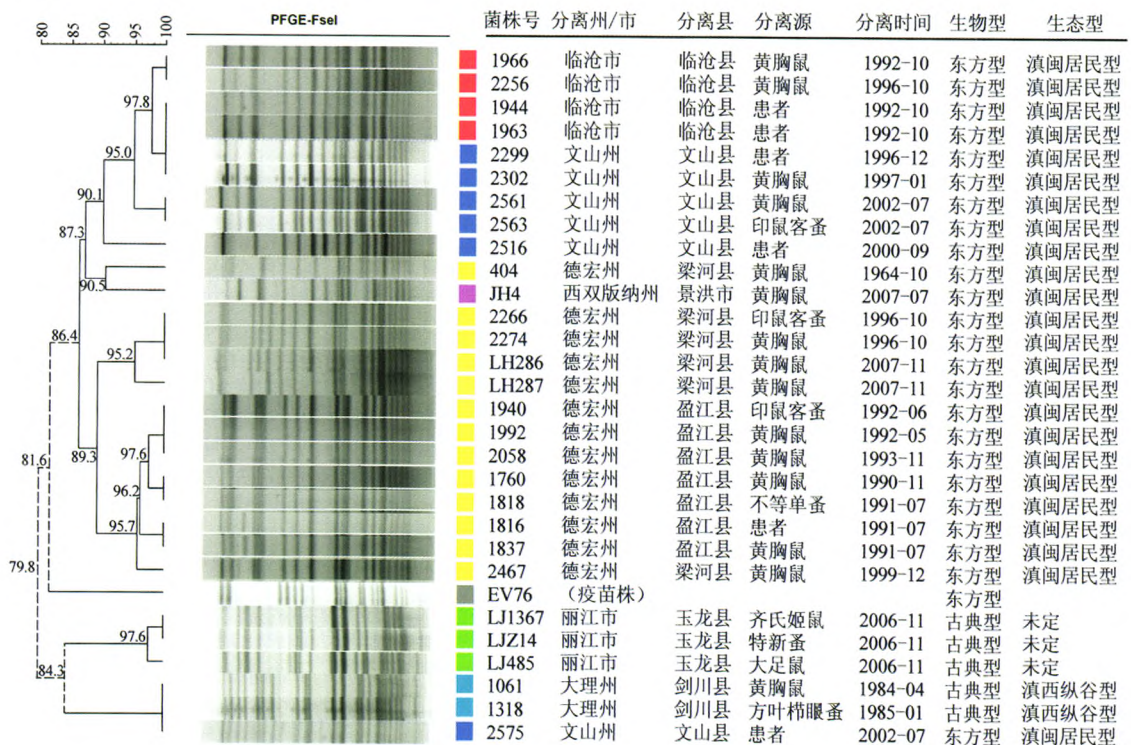
讨论

1. 云南省鼠疫菌 PFGE 基因型与生态型的关系: 29 株分离菌的 PFGE 聚类图谱显示, 云南省鼠疫菌 PFGE 基因型可分为 3 个簇, 并恰好与云南省鼠疫菌生态型吻合, 即滇闽居民型家鼠菌株为家鼠基因簇、滇西纵谷型野鼠菌株为野鼠基因簇、玉龙菌株为玉龙基因簇。玉龙鼠疫菌是一个独立的簇, 与云南家鼠、野鼠鼠疫菌簇均有差异。以往应用差异区

段(different regions, DFR)^[3,4]、随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)技术^[5]研究表明, 云南省家、野鼠鼠疫菌具有不同的基因型, 家鼠菌株基因型具有多态性。Zhang 等^[6]对中国鼠疫菌基因分型发现, 玉龙菌株为一个独特的 MLVA 型别, 提示是一个新的克隆群。Zhang 等^[7]对分离自玉龙、剑川和弥渡县的 8 株鼠疫菌进行 PFGE 分型, 结果发现来自 3 个县的鼠疫菌有各自不同的带型, 而同一分离地点的菌株有相同的带型, 本研究与上述结果一致, 认为家、野鼠型及玉龙鼠疫菌各自独立成簇。3 株玉龙菌株均在同一时间地点分离自不同宿主, 虽然仅有 1 条带型上的差别, 但按照 Tenover 等^[8]的原则, 可以认为是同一个流行株。

2. 云南省鼠疫菌 PFGE 基因型与生物型的关系: 按生物型分型^[9], 家鼠鼠疫菌和 EV76 属于东方型, 野鼠鼠疫菌和玉龙菌株属古典型, 聚类图的一级分支恰好将东方型和古典型分开, 表明鼠疫菌的 PFGE 分型与生物型分型一致。

3. 云南省鼠疫菌 PFGE 基因型的区域聚集性: 聚类图谱显示云南省鼠疫菌 PFGE 分子分型具有一定的区域聚集性, 即盈江县分离的 7 株菌全部聚在一起, 分离自梁河县的 4 株菌(分离时间跨度 11 年)全部聚在一起, 分离自临沧、文山县的 9 株菌(分离时间跨度 10 年)全部聚在一起。相同地点分离的菌



注:图中虚线的每个顶点为一个簇, 菌株号前不同颜色表示不同分离地区

图3 云南省鼠疫菌株 *Fse* I 酶切的 PFGE 图谱聚类分析

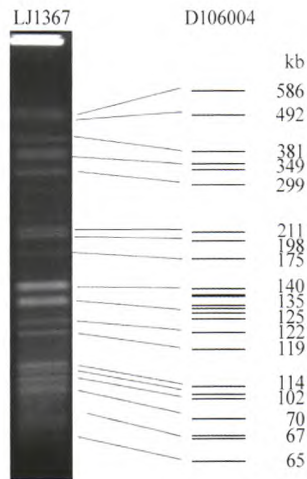


图4 本研究PFGE图谱与酶切模拟图谱比对

株,尽管在分离时间上有差距,但图谱相似度仍然很高(>95%),表现出该地区特有的型别特征。因此将新分离菌株的PFGE图谱与已有的型别比对可以追溯菌株来源。404号菌株(1964年分离自梁河县)与当前自该地分离菌株的带型有较大差异,该菌株是在云南省家鼠鼠疫复燃前的静息期内自黄胸鼠体内分离到的弱毒菌株,表明静息期菌株与疫情复燃后的菌株在基因上存在差异,该差异是否与鼠疫流行或静息相关,值得进一步研究。1061号菌株分离自剑川县石龙村黄胸鼠,以往研究表明该菌株具有野鼠鼠疫菌株的生化特性(发酵甘油,不发酵麦芽糖),曾被认为是具有特殊表型的家鼠鼠疫菌株^[10],但本研究结果表明,该菌株与分离自野鼠鼠疫源地的方叶栉眼蚤1318号菌株具有相同PFGE型别,从基因水平上证明是同一疫源地菌株,虽然黄胸鼠不是滇西纵谷野鼠疫源地的主要宿主,但在疫情波及到家鼠的情况下,仍然能从家鼠中分离到野鼠菌株,体现出自然疫源地固有的生物学特征。此外,自文山县患者分离的2575号菌株其PFGE基因型较为特殊,与野鼠菌株相近,但按照纪树立等^[11]对生态型分型指标进行检测,并未发现其具有野鼠菌株的生化表型特征,其原因有待进一步研究。

4. PFGE实验图谱与酶切模拟图谱的拟合性: PFGE实验图谱与模拟图谱拟合较好,这也印证了本研究的结果,但在实际操作中,电泳条带的迁移受温度、离子强度、脉冲角度、转换时间、琼脂糖浓度、运行时间等因素影响,故模拟酶切的图谱无法替代实验结果。模拟图谱的聚类结果与NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/153/>)上鼠疫菌全基因组BLAST的聚类结果相似,表明在揭示不同鼠疫菌亲缘关系的研究方面,PFGE的结果值得参考。

综上所述,云南省鼠疫菌株 *Fse* I 酶切的PFGE分型与菌株的生态型、生物型相吻合,并具有区域聚集性的特点;新发现的玉龙鼠疫菌株是云南省独立的一个PFGE基因簇,鉴于其有引起肺鼠疫的风险,应有别于家、野鼠型鼠疫而制定针对性防控策略。

参 考 文 献

- [1] Zhang GJ, Liu ZC. Plague surveillance results of China in 2006 [J]. Chin J Ctrl Endem Dis, 2007, 22 (Supplement of Plague Surveillance): 1-6. (in Chinese)
张贵军,刘振才. 全国2006年鼠疫监测结果[J]. 中国地方病防治杂志, 2007, 22(鼠疫监测增刊): 1-6.
- [2] Guo Y, Zhang LY, Xia LX, et al. Biochemical characters of *Yersinia pestis* isolated from Yulong county of Yunnan province in China [J]. Endem Dis Bull, 2008, 23(3): 12-14. (in Chinese)
郭英,张丽云,夏连续,等. 云南省玉龙县鼠疫菌的生化特性[J]. 地方病通报, 2008, 23(3): 12-14.
- [3] Wu MS, Dai EH, Guo Y, et al. Genomic typing of *Yersinia pestis* from Yunnan province [J]. Chin J Endemiol, 2005, 24(5): 475-478. (in Chinese)
吴明寿,戴二黑,郭英,等. 云南鼠疫耶尔森菌基因分型研究[J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24(5): 475-478.
- [4] Zhao HH, Dai EH, Zhou DS, et al. Study of *Yersinia pestis* genotyping in Yunnan, Fujian and Guizhou [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2005, 25(11): 878-879. (in Chinese)
赵海红,戴二黑,周冬生,等. 云南、福建和贵州省鼠疫耶尔森菌基因分型研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(11): 878-879.
- [5] Shi XM, Hai R, Yu DZ, et al. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pestis* in China [J]. Chin J Endemiol, 2003, 22(6): 548-551. (in Chinese)
史献明,海荣,俞东征,等. 中国鼠疫菌随机引物扩增多态性指纹图谱[J]. 中国地方病学杂志, 2003, 22(6): 548-551.
- [6] Zhang XA, Hai R, Wei JC, et al. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 205.
- [7] Zhang ZK, Hai R, Song ZZ, et al. Spatial variation of *Yersinia pestis* from Yunnan province of China [J]. Am J Trop Med Hyg, 2009, 81(4): 714-717.
- [8] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [9] Zhou DS, Tong ZZ, Song YJ, et al. Molecular mechanism of biovar conversion of *Yersinia pestis* and the proposition of a new biovar: *Microtus* [J]. PLA Med J, 2004, 29(3): 211-215. (in Chinese)
周冬生,童宗中,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物型——田鼠型的提出[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(3): 211-215.
- [10] Wang P, Guo Y, Shi LY, et al. The contrast research of biochemical characters and nutrition requirement between rat plague strains and wild rodent plague strains in Yunnan [J]. Chin J Endemiol, 2003, 22(3): 217-220. (in Chinese)
王鹏,郭英,石丽媛,等. 云南省家、野两型鼠疫菌生化特性及营养需求的比较研究[J]. 中国地方病学杂志, 2003, 22(3): 217-220.
- [11] Ji SL, Zhang HJ, Liu YP, et al. Type and its ecological, epidemiological significance of plague bacteria in China [J]. Chin J Endemiol, 1987, 6(5): 257-263. (in Chinese)
纪树立,张海峻,刘云鹏,等. 我国鼠疫菌分型及其生态学、流行病学意义[J]. 中国地方病学杂志, 1987, 6(5): 257-263.

(收稿日期:2013-08-12)

(本文编辑:张林东)