

# 甘肃省 202 株鼠疫耶尔森菌基因型分布及流行特征分析

王新华 张宏 郭丽民 苗克军 达文平 吴斌 徐大琴 葛亚俊  
穆洮霞 陈国娟 周晓艳 王世明 格鹏飞 席进孝

**【摘要】** 目的 研究甘肃省鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)基因分型分布及其流行特征。方法 根据鼠疫菌基因组 23 个差异区段设计引物,采用 PCR 技术,分析甘肃省 202 株不同来源的鼠疫菌。结果 202 株鼠疫菌共分为 8 个基因型,即 1b、5、7、8、13、26、GS1 型(新基因型)和 GS2 型(新基因型)。自 20 世纪 60 年代起至今分离到 1b、8 和 GS1 基因型,而自 1977 年后再未分离到 7、13、26 基因型,在 1995 年后才分离到 GS2、5 基因型。结论 甘肃省 1b、8 和 GS1 基因型鼠疫菌自 20 世纪 60 年代起持续流行至今,7、13 和 26 基因型菌已有 40 余年未分离到,而 GS2 和 5 基因型菌自 20 世纪 90 年代才开始流行。

**【关键词】** 鼠疫耶尔森菌; 基因分型; 流行特征

**Analysis on genotype distributions and epidemiological characteristics of *Yersinia pestis* plague foci in Gansu province** WANG Xin-hua, ZHANG Hong, GUO Li-min, MIAO Ke-jun, DA Wen-ping, WU Bin, XU Da-qin, GE Ya-jun, MU Tao-xia, CHEN Guo-juan, ZHOU Xiao-yan, WANG Shi-ming, GE Peng-fei, XI Jin-xiao. Gansu Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: XI Jin-xiao, Email: xixxp@163.com

This work was supported by grants from the National Health Industry Research Projects (No. 201202012), Gansu Provincial's Health Sector Industry Project (No. gswst09-14) and Gansu Provincial's Health Industry Management Project (No. GWGL2010-33).

**【Abstract】 Objective** To study the genotype distributions and epidemiological characteristics of *Yersinia pestis* in Gansu province. **Methods** Primers were designed according to the confirmed 23 differential sections, to genotype the 202 *Yersinia pestis* DNA of Gansu province by PCR, and to analyze its distribution and epidemiological characteristics. **Results** *Yersinia pestis* in Gansu province could be divided into eight genotypes: 1b, 5, 7, 8, 13, 26, new genotype 1 (GS1) and new genotype 2 (GS2). They were distributed in various regions. 1b, 8 and GS1 genotypes of *Yersinia pestis* had been identified since 1960s but the 7, 13 and 26 genotypes had not been isolated for more than 40 years while GS2 and 5 genotypes had been isolated since 1990s. **Conclusion** 1b, 8 and GS1 genotypes of *Yersinia pestis* continued to be violently prevalent since 1960s but 7, 13 and 26 genotypes had not been isolated for more than 40 years while GS2 and 5 genotypes had started to be popular since 1990s.

**【Key words】** *Yersinia pestis*; Genotyping; Epidemiological characteristics

甘肃省存在两种类型鼠疫自然疫源地,即青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地和甘宁黄土高原阿拉善黄鼠鼠疫自然疫源地,前者又分为甘南高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地、阿尔金山-祁连山北麓草原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地、陇中黄土高原阿拉善

黄鼠鼠疫疫源地,各疫源地间生境差异较大。鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)在适应性进化过程中表现出较大差异,这一差异取决于鼠疫菌遗传物质基础。基因组差异区段(DFR)的缺失和获得反映了鼠疫菌在自然界适应性演化的遗传基础,为了探究鼠疫菌在甘肃省鼠疫疫源地的进化及其与生态适应的关系,本文采用DFR方法对分离自该疫源地的202株鼠疫菌进行研究,分析其分布及流行特征。

## 对象与方法

### 1. 菌株来源: 202 株鼠疫菌均分离自 1962—

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.005

基金项目: 国家卫生行业科研专项(201202012); 甘肃省卫生行业计划项目(gswst09-14); 甘肃省卫生行业管理项目(GWGL2010-33)

作者单位: 730000 兰州, 甘肃省疾病预防控制中心

王新华、张宏同为第一作者

通信作者: 席进孝, Email: xixxp@163.com

2007 年甘肃省鼠疫疫源地境内,其中阿克塞县 45 株、肃北县 54 株、玉门市 6 株、肃南县 79 株、山丹县 1 株、夏河县 7 株、会宁县 8 株、白银市平川区 2 株。菌株分离自人(尸)体 9 株、活体和自毙喜马拉雅旱獭 113 株、狐 2 株、黄鼠 5 株、灰尾兔 2 株、猫 1 株、小家鼠 1 株、谢氏山蚤 22 株、斧形盖蚤 23 株、腹窦纤蚤深广亚种 5 株、虱 8 株、蜱 11 株。

2. 研究方法:

(1)引物设计:按文献[1,2]报道用于鼠疫菌 DFR 分析的 23 对引物。引物序列见表 1。

(2)PCR 反应体系:①反应体系 30 μl (Mix 15 μl、上下引物各 0.5 μl、模板 5 μl、补水至 30 μl); ②PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 40 s, 56 °C 40 s, 72 °C 60 s 扩增 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min; ③PCR 产物检测,即取 PCR 产物 8 μl 加载到 1.5% 琼脂糖, 60 V 电压,电泳 30 min 后,用凝胶成像仪观察分析。每次实验均设阴性(用 TE 液代替模板)、阳性(用 EV 菌及其他鼠疫菌株 DNA 混合物代替模板)对照。对可疑 PCR 结果采取多次重复试验确定。

结 果

1. 鼠疫菌基因型分布:202 株鼠疫菌分为 8 个基因型<sup>[3]</sup>(表 2,图 1~3),即 1b、5、7、8、13、26 型以及新出现的 GS1 型和 GS2 型。GS1 型与 8 型近缘,但与 8 型相比,缺失了 DFR18,该区段编码一个保守未知功能的蛋白质。GS1 型鼠疫菌在甘肃省鼠疫疫源地内数量多,占分析菌株数量的 29%,仅次于 8 型菌株,所分布的地理位置相对独立,是该区域的主基因型。GS2 型在甘肃省鼠疫疫源地内数量较少,分布地点分散、量少,仅占分析菌株数量的 5%。另外在肃南县境内发现 1 株缺失 pMT1 质粒的鼠疫菌株。

2. 各基因型鼠疫菌区域分

布:甘肃省存在两种类型鼠疫自然疫源地,并分为三大块。其中旱獭鼠疫疫源地分为两大块,即阿尔金山-祁连山北麓和甘南高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地,前者可分为相对独立的 3 个区,即阿尔金山山地、大雪山和祁连山北麓东段区,后者为甘南高原区。黄鼠鼠疫疫源地为陇中黄土高原阿拉善黄鼠鼠疫疫源地,为黄土高原区。由此甘肃省鼠疫疫源地分为相对独立的 5 个区域。阿尔金山山地疫源地鼠

表 1 23 个 DFR 引物序列

DFR	包含基因	扩增靶基因	序列(5' ~ 3')
01	91001-pMT044 ~ 047	91001-pMT046	F:AGAGAGTTTCATCTATCAGACCATG R:ATACCAGTGGATCGTCTTTGATTC
02	91001-pMT086 ~ 094	91001-pMT090	F:CATCCGTTCTACATCATCCATAGC R:CCAGATCTCATCCAGGTACTIONATG
03	CO92-YPMT1.03 ~ 1.12	CO92-YPMT1.06	F:AGCACAAGCAGATGGTCAATAATG R:TGTGCCTTCAGTTGGGTAATTTG
04	91001-YP0966 ~ 0986	91001-YP0976	F:GTGGAGTACCTCTTATCTGGATG R:CAAATATTTACCACCGCTTAAACC
05	CO92-YP00621 ~ 0636	CO92-YP00624	F:TAATATACTCTCGCAGAAAGCAG R:GCCAATAGCAATACACCATTCTG
06	CO92-YP00738 ~ 0739	CO92-YP00739	F:GAAAATCATCGAGCGCTACTGG R:GGAATGTGGCTTCTGCCTTG
07	CO92-YP00740 ~ 0754	CO92-YP00743	F:TGTGTACCAATGGCACTTAAAC R:GGCTATCTATCTGCACCTGACTC
08	CO92-YP00988 ~ 0989	CO92-YP00988	F:ACCGTTTACGCCTCAATATGTTG R:GATAGAATAATACCAGCGTTGAAC
09	CO92-YP00998 ~ 1007	CO92-YP01002	F:TATGTGCCGTCTATCAAGTC R:TTAACTAAATCATCCACCTCACAG
10	CO92-YP01165 ~ 1172	CO92-YP01168	F:GTTACCGTTTCAGTTTTGTGATTTTC R:TCTGTTCTTTGCTGTAGTCCATC
11	CO92-YP01986 ~ 1987	CO92-YP01987	F:CTGGAATATGCCTACCG R:TCGGTCCGCTTTATCCC
12	CO92-YP02096 ~ 2135	CO92-YP02110	F:TTGAAGTTGATGGCAAGAAAACC R:CATTGATTGGATATGAGCGGAAG
13	CO92-YP02271 ~ 2281	CO92-YP02277	F:GTTCTCCAGTTGTAGGTG R:ATTCGTACAGTCACGCTTC
14	CO92-YP02286 ~ 2287	CO92-YP02286	F:CCGATCTTAATCAGGCTCTTCAG R:CTTGCGAGGTAATTTGGTTCTTG
15	CO92-YP02135	CO92-YP02135	F:GATTTTGATGGTCTTTTCACATTTG R:CTTCTACTGACAGGATCAATTCCG
16	CO92-YP02375 ~ 2376	CO92-YP02375	F:CTCATCTGCATACCGACTATCTG R:GGTCATGGTCAGAGAAAGTGATG
17	CO92-YP02380	CO92-YP02380	F:ATGGCAATGTTATCAGCATGGAG R:GTATAAATACCCGCTTCCCTTACG
18	CO92-YP02469	CO92-YP02469	F:AAGTGGAATGGCTATTGC R:GACTGGCGAACAATGTC
19	CO92-YP02487 ~ 2489	CO92-YP02489	F:GTTTGATATTAAGTGGGC R:AATAAGTTTGCCAGTTTC
20	CO92-YP03046 ~ 3047	CO92-YP03047	F:GAGACATTCCTGCCTGAGTTATTG R:GATAGCCTCATCGGTAAGTTGATC
21	CO92-YP03674	CO92-YP03674	F:ACGATGCACTGTATCAGCTTATC R:AGATAACTTTCGCTGTCACTGATG
22	CO92-YP04012 ~ 4045	CO92-YP04017	F:TGATGAATAACCTCGATCCTGACG R:TTGTTGGCATTGATGTTTCAGAG
23	383 bp		F:GTTACAGGAACCTCAGCG R:TCCGCGAGCAGCAAATTCAC
pMT1		YPMT1.44	F:AACACTATCTCATCCGAGTAAAG R:AGTGGATGATGAAGTAGACCGAG

表 2 甘肃鼠疫菌 23 个 DFR 和 pMT1 的分布

基因型	菌株数	DFR																							pMT1
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1b	50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
5	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
7	6	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
8	67	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
13	2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
26	8	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
GS1	58	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	
GS2	10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
pMT1 缺失		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	

注: - 不存在 DFR, + 存在 DFR

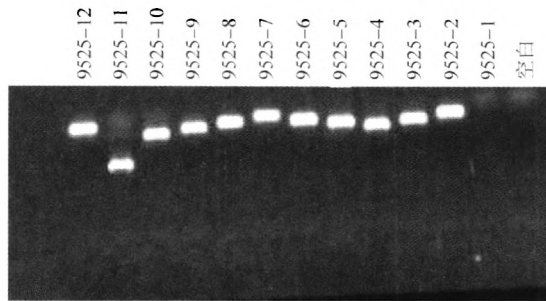


图 1 9525 号鼠疫菌第 1~12 对引物 PCR 扩增产物

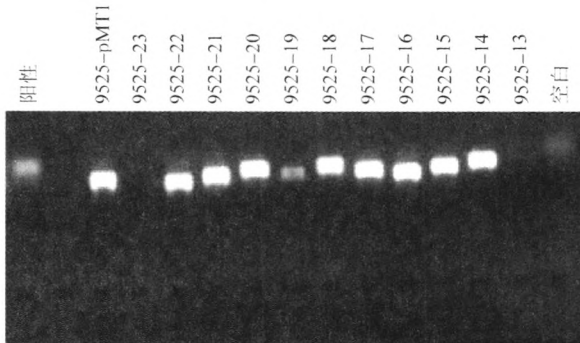
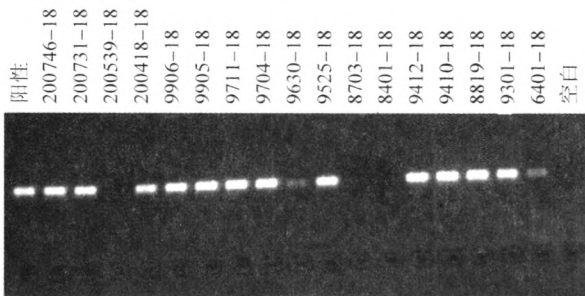


图 2 9525 号鼠疫菌第 13~23 对及 pMT1 引物 PCR 扩增产物



注: 图中数字为“菌号-引物号”, 如“9525-1”表示 9525 号鼠疫菌的第 1 对 DFR 引物扩增结果

图 3 17 株鼠疫菌第 18 对引物 PCR 扩增产物

疫菌主基因型为 1b 型(93.3%, 42/45), 大雪山疫源地鼠疫菌主基因型为 8 型(76.7%, 46/60), 祁连山北麓东段鼠疫菌主基因型为 GS1 型(69.1%, 56/81), 陇中黄土高原阿拉善黄鼠鼠疫疫源地内鼠疫菌主基因

型为 26 型(80%, 8/10), 甘南高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地内鼠疫菌基因型为 7 型(表 3)。以鼠疫菌不同来源地区分析, 夏河县只有 7 基因型分布, 会宁县、白银市平川区有 13、26 基因型分布, 阿克塞县主基因型为 1b 型, 肃北县主基因型为 8 型, 玉门市主基因型为 5 型, 肃南县主基因型为 GS1 型, 山丹县只有 GS1 型分布。阿克塞、肃北、肃南 3 个县的基因型在两县接壤地区交错分布, 阿克塞县主基因型 1b 型是肃北县次基因型, 次基因型 8 型成为肃北县主基因型; 肃北县主基因型 8 型是肃南县次基因型, 次基因型 GS1 型成为肃南县主基因型, 由西北向东南方向依次演化(表 4)。

表 3 甘肃省鼠疫疫源地鼠疫菌基因组型分布

鼠疫疫源地	菌株数	基因型							
		1b	5	7	8	13	26	GS1	GS2
阿尔金山山地	45	42	1	0	2	0	0	0	0
大雪山	60	7	0	0	46	0	0	2	5
祁连山北麓东段	81	1	0	0	19	0	0	56	5
甘南高原	6	0	0	6	0	0	0	0	0
黄土高原	10	0	0	0	0	2	8	0	0
合计	202	50	1	6	67	2	8	58	10

表 4 甘肃省不同疫源地鼠疫菌基因型分布

疫源(市、县、区)	菌株数	基因型							
		1b	5	7	8	13	26	GS1	GS2
阿克塞	45	42	1	0	2	0	0	0	0
肃北	54	7	0	0	41	0	0	2	4
玉门	6	0	0	0	5	0	0	0	1
肃南	79	1	0	0	18	0	0	55	5
山丹	1	0	0	0	0	0	0	1	0
夏河	7	0	0	7	0	0	0	0	0
会宁	8	0	0	0	0	1	7	0	0
平川	2	0	0	0	0	1	1	0	0
合计	202	50	1	7	66	2	8	58	10

3. 不同基因型鼠疫菌的流行特点: 甘肃省 8 个基因型鼠疫菌在不同年代、不同地区流行趋势差异

较大。其中 1b、8 和 GS1 基因型菌在阿尔金山-祁连山山地鼠疫疫源地内一直持续猛烈流行,GS2 型菌自 20 世纪 90 年代开始流行,5 型菌在 2000 年后才开始流行,7 型菌在甘南高原鼠疫疫源地内自 20 世纪 60 年代猛烈流行后再未分离到,13 和 26 型菌在 20 世纪 60—70 年代猛烈流行后也未分离到(表 5)。

表 5 甘肃省不同流行年代鼠疫菌基因型分布

年代	菌株数	基因型							
		1b	5	7	8	13	26	GS1	GS2
1960—1970	19	1	0	7	2	1	7	1	0
1980	7	0	0	0	4	1	1	1	0
1990	27	5	0	0	8	0	0	13	1
2000	54	15	0	0	16	0	0	16	7
2010	95	29	1	0	36	0	0	27	2
合计	202	50	1	7	66	2	8	58	10

4. 甘肃省鼠疫菌的传播及演化:甘肃省鼠疫疫源地存在喜马拉雅旱獭和阿拉善黄鼠两种主要宿主动物,旱獭鼠疫疫源地宿主生态位在 4 个区域均有差异,而黄鼠鼠疫疫源地则无差异。5 个相对独立的鼠疫疫源地均有单独的主基因型鼠疫菌,依据鼠疫菌基因组进化特征及其在我国传播和演化<sup>[1]</sup>,认为甘肃省 3 大疫源地的鼠疫菌均由不同路径传入,

即黄土高原疫源地与内蒙古长爪沙鼠及甘宁黄土高原阿拉善黄鼠鼠疫自然疫源地的地理位置较为接近,鼠疫菌主基因型与内蒙古长爪沙鼠及甘宁黄土高原阿拉善黄鼠鼠疫自然疫源地内鼠疫菌主基因型分别相差 1、2 个位点,推测可能是由上述疫源地传入;甘南高原疫源地与青甘藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地地域相连<sup>[4]</sup>,且鼠疫菌主要基因组型一致,推测该块疫源地是由青甘藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地传入,且未演化;阿尔金山-祁连山山脉疫源地内的鼠疫菌主基因型之一的 1b 型,在青甘藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地内为次基因型,由于鼠疫菌在该疫源地内流行时间较长,推测传入后发生了演化,首先传入阿尔金山疫源地,由西北向东南传入大雪山疫源地,再传入祁连山北麓东段疫源地(图 4)。

### 讨 论

鼠疫菌在自然选择压力作用下,那些有利于个体生存繁殖的变异在基因组中稳定遗传下来,使带有变异表型的个体在种群或某一亚群中逐步占据优势,在总体上达到了表型的有序进化<sup>[5]</sup>。甘肃省的

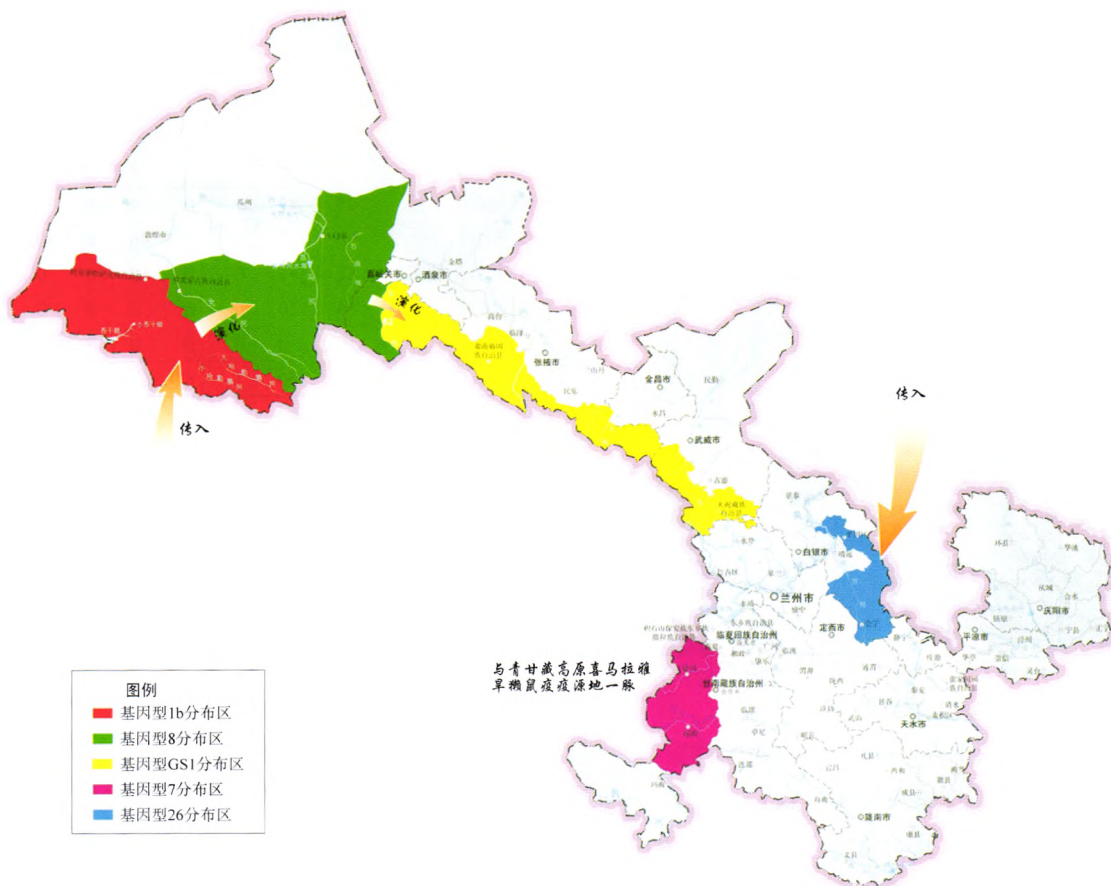


图 4 甘肃省鼠疫菌主基因型分布、演化和传播情况

阿尔金山-祁连山脉鼠疫疫源地分为相对独立的 3 个区域,其自然景观明显不同,使得区域间生态系统差异较大。阿尔金山山地疫源地鼠疫菌主基因型 1b 型传入大雪山疫源地为了适应其宿主生态位,在演化过程中缺失了 2 个位点演化成 8 型,或者说阿尔金山山地疫源地鼠疫菌传入大雪山疫源地后 8 型鼠疫菌适应其环境成为流行的主基因型。大雪山疫源地鼠疫菌主基因型 8 型传入祁连山北麓东段,为了适应其宿主生态位缺失了 1 个位点而演化出新基因型 GS1 型,并成为该区域的主基因型。相应的 5 个区域就有了各自宿主生态位,也就决定了不同基因型鼠疫菌的存在,符合鼠疫菌在自然选择压力作用下适应不同生态景观,遗传物质变异后有利于其基因组稳定的遗传成为某区域的主基因型。疫源地接壤区域的主次基因型鼠疫菌共存,也符合生态区之间存在过渡区的实际情况。

从甘肃省不同区域疫源地鼠疫流行现状分析,猛烈流行区不但有主基因型(1b、8 和 GS1),而且有次基因型(5 和 GS2);微弱流行区甘南高原只分离到 7 型鼠疫菌,黄土高原分离到 13 和 26 型鼠疫菌。不同型鼠疫菌的存在是鼠疫疫源地持续猛烈流行的首要条件,某区域内不同基因型鼠疫菌的存在是该疫源地动物间鼠疫活跃的客观表现,从而导致鼠疫在动物间持续流行。也就是说,鼠疫菌为了适应生态环境的变化而出现多种基因型共存或不断演化出新基因型,预示动物间鼠疫在该区域内可以持续流

行。反之,某区域只有单一型鼠疫菌,不利于鼠疫菌生存,该地从而进入微弱流行期。

### 参 考 文 献

- [1] Zhou DS, Han YP, Song YJ, et al. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insight into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *Med J Chin PLA*, 2004, 29(3):204-210. (in Chinese)  
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.解放军医学杂志,2004,29(3):204-210.
- [2] Dai EH, Tong ZZ, Wang XY, et al. A suppression subtractive hybridization analysis of genomic differences among strains of *Yersinia pestis*. *Chin J Microbiol Immunol*, 2005, 25(3):179-182. (in Chinese)  
戴二黑,童宗中,王效义,等.应用抑制削减杂交技术进行鼠疫耶尔森菌的比较基因组研究.中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(3):179-182.
- [3] Li YJ, Dai EH, Cui YJ, et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PLoS One*, 2008, 3:e2166.
- [4] Cui BZ, Dai EH, Zhou DS, et al. *Yersinia pestis* genotype distribution of plague foci in Qinghai province. *Chin J Endemiol*, 2006, 25(6):605-608. (in Chinese)  
崔百忠,戴二黑,周冬生,等.青海省鼠疫疫源地鼠疫耶尔森菌的基因型分布.中国地方病学杂志,2006,25(6):605-608. (in Chinese)
- [5] Zhou DS, Yang RF. Strategies on the evolutionary for bacterial genomes. *J Microbiol*, 2004, 24(1):34-40. (in Chinese)  
周冬生,杨瑞馥.细菌基因组进化的分子策略.微生物学杂志,2004,24(1):34-40.

(收稿日期:2012-11-21)

(本文编辑:张林东)

## 读者·作者·编者

### 中华医学会系列杂志已标注数字对象惟一标识符

数字对象惟一标识符(digital object identifier, DOI)是对包括互联网信息在内的数字信息进行标识的一种工具。

为了实现中华医学会系列杂志内容资源的有效数字化传播,同时保护这些数字资源在网络链接中的知识产权和网络传播权,为标识对象的版权状态提供基础,实现对数字对象版权状态的持续追踪,自 2009 年第 1 期开始,中华医学会系列杂志纸版期刊和数字化期刊的论文将全部标注 DOI。即中华医学会系列杂志除科普和消息类稿件外,其他文章均需标注 DOI,DOI 标注于每篇文章首页脚注的第 1 项。由中华医学会杂志社各期刊编辑部为决定刊载的论文标注 DOI。

参照 IDF 编码方案(美国标准 ANSI/NISO Z39.84-2000)规定,中华医学会系列杂志标注规则如下:“DOI:统一前缀/学会标识.信息资源类型.杂志 ISSN.\*\*\*\*-\*\*\*\*.年.期.论文流水号”。即:“DOI:10.3760/cma.j.issn.\*\*\*\*-\*\*\*\*.yyyy.nn.zzz”。

中华医学会系列杂志标注 DOI 各字段释义:“10.3760”为中文 DOI 管理机构分配给中华医学会系列杂志的统一前缀;“cma”为中华医学会(Chinese Medical Association)缩写;“j”为 journal 缩写,代表信息资源类别为期刊;“issn.\*\*\*\*-\*\*\*\*”为国际标准连续出版物号(ISSN);“yyyy”为 4 位出版年份;“nn”为 2 位期号;“zzz”为 3 位本期论文流水号。

中华医学会杂志社