

青海省人间鼠疫病原学研究 及菌株溯源分析

李存香 魏柏青 熊浩明 祁美英 杨晓艳 辛有全 魏荣杰 靳娟 代瑞霞

【摘要】 目的 对1958—2012年青海省人间鼠疫流行期间自鼠疫患者和尸体中分离的119株鼠疫菌进行病原学研究。**方法** 采用常规方法和分子生物学技术对鼠疫菌进行病原学研究,同时采用差异区段(DFR)基因分型技术对2004年囊谦县、2009年兴海县人间肺鼠疫暴发疫情进行溯源分析。**结果** 119株鼠疫菌中,105株属青藏高原型菌株,6株属祁连山型菌株,8株菌具有特殊生化特性;84.03%(100/119)的鼠疫菌具有4个毒力因子($F1^+$ 、 $Pst I^+$ 、 VW^+ 、 Pgm^+)。测试的74株菌中,72株(97.30%)为强毒菌;携带大质粒 52×10^6 、 65×10^6 、 92×10^6 的菌株主要分布于海南、海北、海西、玉树、果洛、黄南6个州和湟源县;鼠疫菌DFR基因型以5、8型为主。其中5型占44.54%(53/119),分布于都兰、湟源、玉树、杂多、治多、称多、曲麻莱、玛多、囊谦、祁连等地区;8型占32.77%(39/119),分布于祁连山南北麓、青海湖环湖地区。2004年囊谦县肺鼠疫暴发分离株均为10型;2009年兴海县肺鼠疫暴发分离株(来自鼠疫患者、人尸和牧犬体内)的基因型均为8型。**结论** 本次试验菌株均具备青藏高原鼠疫病原体特性。菌株溯源分析显示,基于DFR的鼠疫菌基因分型与流行病学调查一致,可用于确定传染源。

【关键词】 鼠疫; 差异区段基因分型技术; 溯源

Sources of infection on human plague in Qinghai province Li Cunxiang, Wei Baiqing, Xiong Haoming, Qi Meiyang, Yang Xiaoyan, Xin Youquan, Wei Rongjie, Jin Juan, Dai Ruixia. Qinghai Provincial Institute of Prevention and Control of Endemic Disease, Xining 811602, China
Corresponding author: Dai Ruixia, Email: drx200907@163.com

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 81160211).

【Abstract】 Objective To study the biological and genetic characteristics of 119 strains of *Yersinia (Y.) pestis* isolated from plague patients in Qinghai province, from 1958–2012. **Methods** Both regular methods and different region (DFR) molecular typing techniques were used to study the epidemiological characteristics on 119 strains of *Y. pestis* in Qinghai during 1958–2012. Sources of *Y. pestis* from two outbreaks, in Nangqian county in 2004 and in Xinghai county in 2009, Qinghai province were also analyzed. **Results** 105 strains of *Y. pestis* were identified as Qinghai-Tibet Plateau Ecotype while the other 6 strains as Qilian Mountains Ecotype. 84.03% (100/119) of the tested strains carried 4 virulence factors $F1^+$, $Pst I^+$, VW^+ and Pgm^+ . 97.30% (72/74) of the tested strains showed high virulence. Strains that carrying 52×10^6 , 65×10^6 , 92×10^6 plasmids were distributed in Hainan, Haibei, Haixi, Yushu, Guoluo, Huangnan and Huangyuan counties. Genomovar 5 and 8 were the main genotypes that circling around Qinghai Lake. Genomovar 10 was found in strains of *Y. pestis* in Nangqian county while Genomovar 8 was found in the strains isolated from human plague patient during the epidemics in Xinghai county in Qinghai. **Conclusion** Data from biological and genetic analyses on the epidemics of human plague in Nangqian county in 2004 and in Xinghai county in 2009 demonstrated that methods as DFR genotyping and virulence factors profiles, as well as plasmids profiles were powerful tools in confirming the human plague epidemics and sources of infection.

【Key words】 Plague; Different region molecular typing techniques; Infection source

1958—2012年青海省共发生人间鼠疫198起,

发病468人,死亡240人。为进一步了解青海省鼠疫菌生物学性状、基因组型分布及其流行病学意义,本研究就1958—2012年青海省人间鼠疫流行期间自鼠疫患者和尸体中分离的119株鼠疫菌进行病原学研究。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.02.017

基金项目: 国家自然科学基金(81160211)

作者单位: 811602 西宁, 青海省地方病预防控制所鼠疫预防控制科
通信作者: 代瑞霞, Email: drx200907@163.com

材料与方 法

1. 材料:以 1958—2012 年青海省人间鼠疫流 行 期 间 自 鼠 疫 患 者 和 尸 体 中 分 离 的 119 株 鼠 疫 菌 作 为 实 验 对 象 (表 1)。菌 株 由 青 海 省 国 家 鼠 疫 菌 种 保 藏 中 心 提 供。实 验 动 物 小 白 鼠 由 青 海 省 实 验 动 物 中 心 提 供,体 质 量 18~20 g。

表 1 1958—2012 年 青 海 省 人 间 鼠 疫 分 离 株 的 地 区 分 布

地 区	菌 株 数
海 南 州 (共 和、兴 海、贵 德、同 德 县)	17
海 北 州 (祁 连、门 源、刚 察、海 晏 县)	22
海 西 州 (天 峻、都 兰、乌 兰 县 及 德 令 哈、格 尔 木 市)	10
玉 树 州 (玉 树、杂 多、治 多、称 多、曲 麻 菜、囊 谦 县)	54
果 洛 州 (玛 多、玛 沁 县)	10
黄 南 州 (同 仁 县)	2
西 宁 市 (湟 源 县)	4

2. 方 法:

(1)生 化 及 糖 醇 类 酵 解 试 验:被 试 菌 28 ℃ 24 h 培 养 物 用 1%蛋 白 陈 水 制 备 成 约 2×10⁹/L 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 中 培 养,连 续 观 察 7 d 后 在 室 温 条 件 下 再 观 察 7 d,逐 日 观 察 发 酵 情 况。

(2)毒 力 因 子 检 查 及 结 果 判 定:利 用 抗 鼠 疫 血 清 平 板 检 查 F1 抗 原^[1],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。

(3)毒 力 测 定:选 代 表 性 菌 株 74 株。将 37 ℃ 24 h 培 养 物 用 灭 菌 生 理 盐 水 制 成 菌 悬 液。比 浊 后 稀 释 为 每 毫 升 2×10⁴、1×10⁵、2×10⁶、2×10⁷、2×10⁸ 个 菌,分 别 取 0.5 ml 皮 下 注 射 于 小 白 鼠 鼠 颞 部,每 组 5 只 分 笼 饲 养 观 察 14 d,毙 后 取 淋 巴、肝、脾、肺、心 组 织 进 行 细 菌 培 养,以 分 离 出 鼠 疫 菌 为 特 异 性 死 亡,并 计 算 最 小 致 死 量 (MLD)。

(4)质 粒 检 测 及 鼠 疫 菌 DNA 提 取:参 照 李 敏 等^[2]方 法 进 行 质 粒 DNA 相 对 分 子 质 量 (Mr)测 定 (采 用 标 准 质 粒 对 照 法)。引 物 设 计 及 PCR 扩 增 参 照 文 献^[3-6]。

(5)差 异 区 段 (DFR)分 子 分 型:采 用 周 冬 生 等^[4]

DFR 基 因 分 型 方 法,对 2004 年 囊 谦 县、2009 年 兴 海 县 人 间 肺 鼠 疫 暴 发 疫 情 进 行 溯 源 分 析。采 用 MapInfo Professional 7.0 软 件 标 注 DFR 基 因 型 的 地 理 分 布。

3. 聚 类 分 析:通 过 BioNumerics 5.0 软 件,采 用 非 加 权 组 平 均 法 (UPGMA),对 数 据 进 行 聚 类 分 析,并 绘 制 聚 类 图。

结 果

1. 生 化 特 性:119 株 鼠 疫 菌 有 105 株 属 青 藏 高 原 型 菌 株,6 株 属 祁 连 山 型 菌 株,8 株 菌 生 化 特 性 特 殊 (表 2)。

2. 毒 力 因 子 检 测:119 株 菌 均 能 产 生 F1 抗 原 和 Pst I,VW⁺ 菌 株 占 87.39% (104/119),Pgm⁺ 菌 株 占 84.03% (100/119),Pgm⁻ 菌 株 占 9.24% (11/119),Pgm^{+/+} 菌 株 占 6.72% (8/119)。

3. 毒 力 测 定:参 照 朱 锦 沁 等^[7]对 青 海 省 鼠 疫 菌 株 毒 力 等 级 分 类。其 中 74 株 代 表 性 菌 株,MLD≤1 万 个 菌 占 97.30% (72/74),为 强 毒 菌 株;MLD>10 万 个 菌 为 自 然 弱 毒 菌,占 2.70% (2/74)。

4. 质 粒 种 类 及 地 区 分 布:80 株 代 表 性 鼠 疫 菌 经 琼 脂 糖 凝 胶 电 泳 共 观 察 到 6 种 质 粒,分 子 质 量 分 别 为 (6、27.04、45、52、65、92)×10⁶,在 质 粒 组 成 上 共 有 4 种 组 合 形 式,多 数 菌 株 含 3 种 质 粒。其 中 27 株 含 (6、45、52)×10⁶ 质 粒,50 株 含 (6、45、65)×10⁶ 质 粒,2 株 含 (6、45、92)×10⁶ 质 粒,1 株 含 (6、27.04、65)×10⁶ 质 粒。携 带 65×10⁶ 质 粒 的 菌 株 主 要 分 布 于 海 南、海 北、海 西、玉 树、果 洛、黄 南 6 个 州;携 带 52×10⁶ 质 粒 的 菌 株 主 要 分 布 于 海 南、海 北、海 西、玉 树、果 洛 5 个 州 和 湟 源 县;携 带 92×10⁶ 质 粒 的 菌 株 主 要 分 布 于 曲 麻 菜 地 区;携 带 27.04×10⁶ 质 粒 的 菌 株 主 要 分 布 于 兴 海 县。

5. DFR 基 因 分 型:119 株 菌 的 23 个 DFR 基 因 分 型 PCR 扩 增 后 显 示,共 有 10 个 基 因 组 型 (1b、5、7、8、10、21、30、32、36、44),其 中 以 5 型 和 8 型 为 主。5 型 菌 占 44.54% (53/119),主 要 分 布 于 都 兰、湟 源、玉 树、杂 多、治 多、囊 谦、曲 麻 菜、玛 多、囊 谦、祁 连、共 和 等 地 区;8 型 菌 占 32.77% (39/119),主 要 分 布 于 祁 连 山

表 2 1958—2012 年 青 海 省 人 间 鼠 疫 分 离 株 生 化 性 状 及 地 区 分 布

菌 株 生 态 型	菌 株 数	生 化 特 性						地 区 分 布
		阿 胶 糖	鼠 李 糖	麦 芽 糖	密 二 糖	甘 油	脱 氮	
青 藏 高 原 型	113	+	- ^a	+ ^b	- ^c	+	+	湟 源、海 晏、刚 察、同 仁、共 和、贵 德、兴 海、同 德、玛 沁、玛 多、玉 树、杂 多、称 多、治 多、囊 谦、曲 麻 菜、德 令 哈、格 尔 木、乌 兰、天 峻、都 兰、祁 连
祁 连 山 型	6	+	-	-	-	+	+	门 源、囊 谦

注: ^a 鼠 李 糖 4 株 阳 性, ^b 麦 芽 糖 4 株 阴 性, ^c 密 二 糖 8 株 阳 性

南北麓、青海湖环湖地区及青海南山和宗务隆山等地区;10型菌占6.72%(8/119),为2004年囊谦县肺鼠疫暴发时分离株;44型菌占5.04%(6/119),主要分布于祁连、门源、海晏等地区;7、30型菌各占2.52%(3/119),前者主要分布于祁连、同仁地区,后者主要分布于祁连、称多、曲麻莱等地区;1b、32、36型菌各占1.68%(2/119),1b型菌主要分布于杂多、乌兰等地区,32型菌主要分布于格尔木等地区,36型菌主要分布于玛多、囊谦等地区;21型菌占0.84%(1/119),主要分布于兴海县(图1)。

6. 菌株溯源分析:2004年9—10月分离自囊谦县尕羊乡麦迈村8株鼠疫菌,其DFR分型均为10型,该型别在青海省只存在于囊谦县。现场流行病学调查显示8例患者均由同一传染源传播所致。聚类分析表明,2004年囊谦县人间肺鼠疫暴发疫情分离菌株明显不同于其他基因型,而形成单独分支。该地区20世纪70—90年代分离菌株的DFR分型均为5型。2009年7月兴海县暴发一起典型的家族性肺鼠疫,自鼠疫患者或人尸中分离4株鼠疫菌,其基因型为8型。从牧犬体内分离的2株菌,其基因型也为8型。在海北、海西、玉树、果洛州及湟源县也存在2009年海南州兴海县暴发疫情菌株的DFR型别,且聚类分析结果显示2009年兴海县暴发的人间肺鼠疫菌株明显与其同在一个分支上。但该地区1962年人间鼠疫分离株基因型为21型,形成单独的一个分支,该型别在青海省仅存在于兴海县(图2)。

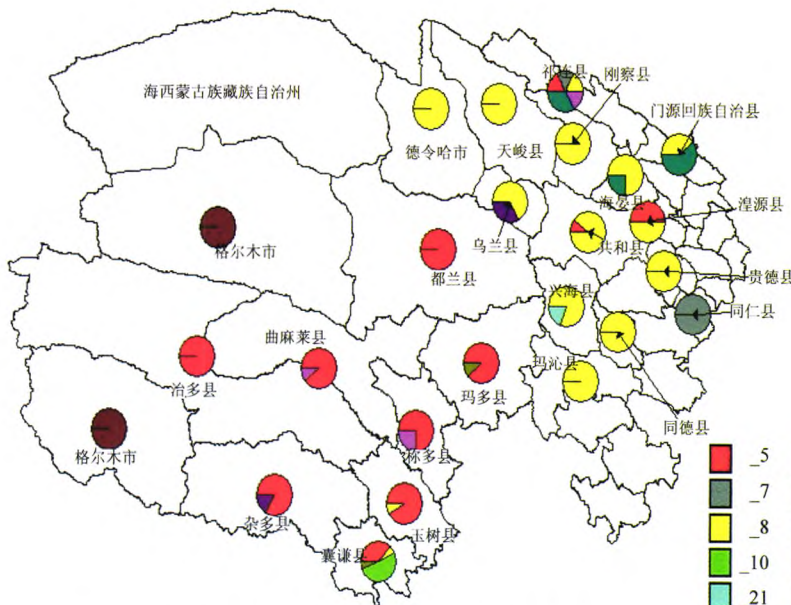


图1 1958—2012年青海省119株人间鼠疫分离株基因组型的地区分布

讨 论

青海省存在喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地和青海田鼠鼠疫自然疫源地。目前尚未见青海田鼠鼠疫疫源地以青海田鼠作为传染源引发人间鼠疫的报道。1958—2012年青海省人间鼠疫流行期间自鼠疫患者或尸体分离的119株菌中,94.96%属青藏高原型菌株,分布于青海省大多数鼠疫疫源地区;仅5.04%属祁连山型菌株,分布于门源、囊谦县。

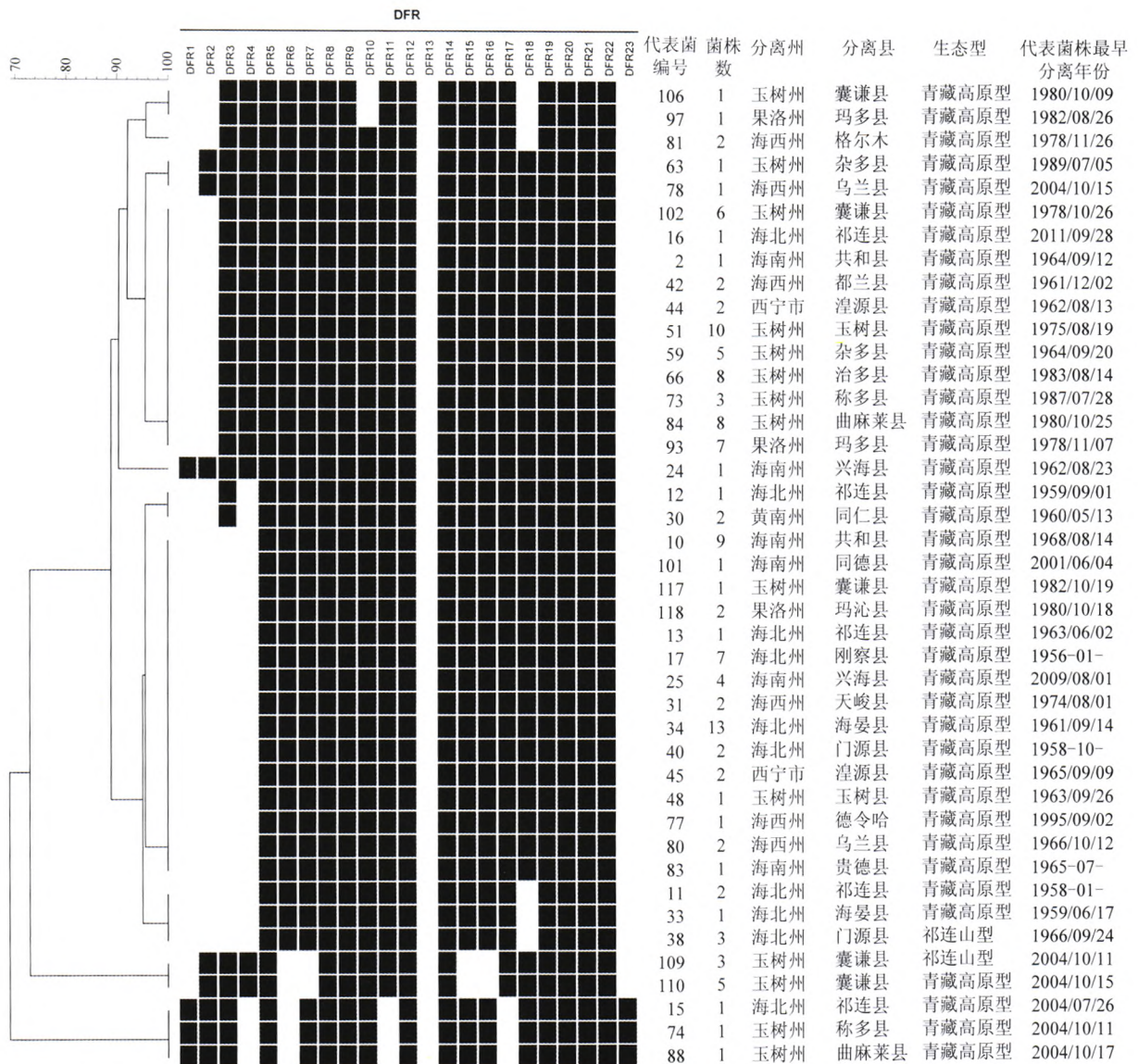
本研究显示,鼠疫菌 52×10^6 质粒分布于祁连山南、北麓和青海湖环湖地区,而 65×10^6 质粒分布于青海湖周围、青海高原和青海西部地区, 92×10^6 质粒分布于青海高原的玉树、曲麻莱等地区。这些菌株特征为疫情溯源、疫源地研究、菌种分型及遗传学分析等提供资料。

2004年囊谦县肺鼠疫暴发疫情8株分离菌出现3种不同的生化检测结果,即在同一次鼠疫流行的不同患者体内分离菌株生化性状发生变异,表明鼠疫菌生化性状的稳定性是相对的,其生态型可因宿主、媒介、土壤、植被等生存环境的改变而发生转化。而基于23个DFR的基因分型方法描述菌株的遗传特征表明,该次肺鼠疫疫情分离菌株的基因型为10型,且据流行病学调查此8例患者均由同一传染源传播而感染。鼠疫菌基因型检测与现场流行病学调查结果一致,证实该次鼠疫暴发来自同一个传染源。2009年7月兴海县暴发一起典型的家族性肺鼠疫,自鼠疫患者或人尸中分离4株鼠疫菌,从牧犬体内分离2株鼠疫菌,其基因型均为8型,表明该次疫情是由受感染犬引起的传播。

参 考 文 献

[1] Qi ZZ, Jin LX, Yu XT, et al. Comparison and analysis of the virulence factors of *Yersinia pestis* in China [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2001, 21 (4) : 385-388. (in Chinese)
 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[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(4) : 385-388.

[2] Li M, Yu XT, Li L, et al. Screening of plasmids in *Yersinia pestis* strains isolated from China [J]. Chin J Microbiol Immunol, 1995, 15(5) : 341. (in Chinese)



注:黑色方块为存在DFR;白色方块为DFR缺失

图2 1958—2012年青海省119株人间鼠疫分离株聚类分析

李敏,于晓涛,黎莉,等.我国鼠疫菌质粒种类和组成特征的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,1995,15(5):341.

[3] Zhou DS, Han YP, Dai EH, et al. Development of whole-genome DNA microarray of *Yersinia pestis* and its validity in comparative genomic analysis[J]. Med Phar J PLA, 2004, 29(3): 200-203. (in Chinese)

周冬生,韩延平,戴二黑,等.鼠疫耶尔森菌基因组DNA芯片的研制及用于比较基因组学分析[J].解放军医药杂志,2004,29(3):200-203.

[4] Zhou DS, Han YP, Song YJ, et al. DNA microarray analysis of genome dynamics in: insight into bacterial genome microevolution and niche adaptation[J]. Med Phar J 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[J].解放军医药杂志,2004,29(3):204-210.

[5] Dai EH, Tong ZZ, Wang XY, et al. A suppression subtractive hybridization analysis of genomic differences among strain of *Yersinia pestis*[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2005, 25(3): 179-182. (in Chinese)

戴二黑,童宗中,王效义,等.应用抑制消减杂交技术进行鼠疫耶尔森菌的比较基因组研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(3):179-182.

[6] Cui BZ, Dai EH, Zhou DS, et al. Study on the genomic typing of strains of *Yersinia pestis* from plague foci of Qinghai province in China[J]. Chin J Endemiol, 2006, 25(6): 605-607. (in Chinese)

崔百忠,戴二黑,周冬生,等.青海省鼠疫疫源地耶尔森菌的基因型分布[J].中国地方病学杂志,2006,25(6):605-607.

[7] Zhu JQ, Li M, Wang L, et al. Study on biological features and epidemiological significance of *Yersinia pestis* in Qinghai plague natural focus[J]. Endem Dis Bull, 1994, 9(1): 1-5. (in Chinese)

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其流行病学意义的研究[J].地方病通报,1994,9(1):1-5.

(收稿日期:2013-08-29)

(本文编辑:张林东)