

青海省1980—2011年鼠疫病原学分析及流行病学意义

杨建国, 靳娟, 游陪松, 谢辉, 李存香, 何建, 马林德, 熊浩明, 张强, 田富彰*, 代瑞霞*

青海省地方病预防控制所, 青海 西宁 811602

摘要: **目的** 分析青海省30年人间鼠疫疫情相关鼠疫菌株其病原学特征及流行病学意义, 为该省鼠疫突发公共卫生事件现场处置和综合防控措施提供科学依据。 **方法** 选取1980—2011年间青海省发生的29起典型人间鼠疫疫情中分离的35株鼠疫菌, 对其进行糖醇类酵解试验, 荚膜抗原(Fra1)、毒力抗原因子(VW)、色素沉着因子(Pgm)、鼠疫杆菌素 I (Pst I) 4种毒力决定因子检测, 差异区段(different regions, DFRs)基因分型研究病原学特征, 同时结合青海省近年来人间及动物间鼠疫流行现状, 分析当前鼠疫防控形势及流行特征。 **结果** 实验检测的35株鼠疫菌株生物型分型均为古典型; 生化分型有2种类型, 其中29株(82.86%)为青藏高原型, 主要分布在青南地区及环湖地区, 2株(5.71%)为祁连山型, 主要分布在祁连山区; DFR分型有6种基因型, 其中5型16株、8型12株、10型2株、36型1株、30型3株、1b型1株, 以5型和8型为主, 5型和1b型菌株主要分布于青海湖环湖地区和祁连山南麓, 8型、10型、36型、30型菌株主要分布于青南地区。 **结论** 青海高原鼠疫菌病原体生化型复杂, 动物间鼠疫疫情连年不断, 防控形势十分严峻, 鼠疫的发生和流行严重危害人民健康和社会经济发展, 因此, 必须扎实做好鼠疫防控工作, 切实保障人民群众生命安全。

关键词: 鼠疫; 流行病学特征; 病原学; 青海省

中图分类号: R516.8 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2022)12-1109-04

DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2022.12.01

Etiological analysis and epidemiological significance of plague in Qinghai, 1980–2011

YANG Jian-guo, JIN Juan, YOU Pei-song, XIE Hui, LI Cun-xiang, HE Jian, MA Lin-de, XIONG Hao-ming,
ZHANG qiang, TIAN Fu-zhang, DAI Rui-xia

Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xi'ning, Qinghai 811602, China

Correspondence authors: TIAN Fu-zhang, E-mail: qhxntfz@163.com; DAI Rui-xia, E-mail: drx200907@163.com

Abstract: **Objective** To analyze the pathogenic characteristics and epidemiological significance of human plague related strains in Qinghai Province in recent 30 years, so as to provide scientific basis for on-the-spot disposal and prevention and control measures of plague outbreak in Qinghai Province. **Methods** A total of 35 strains of *Yersinia pestis* isolated from 29 typical human plague outbreaks in Qinghai Province from 1980 to 2011 were selected and studied by biochemical fermentation experiments. Virulence factors detection of Fraction 1 antigen (Fra1), virulence antigen (VW), pigmentation (Pgm) and *Yersinia pestis* I (Pst I), determinants and genotyping of differential regions (DFRs) were used to study the pathogenic characteristics. At the same time, according to the epidemic situation of human and animal plague in Qinghai Province in recent years, the current situation of plague prevention and control and epidemic characteristics were analyzed. **Results** The biotypes of 35 strains of *Yersinia pestis* were classical, and the biotypes of 29 strains (82.86%) were of Qinghai-Tibet Plateau type, mainly distributed in southern Qinghai and around lake areas, 2 strains (5.71%) belonged to Qilian Mountains type, mainly distributed in Qilian mountains, and 6 genotypes were identified by DFR. Among them, 16 were type 5, 12 were type 8, 2 were type 10, 1 was type 36, 3 were type 30 and 1 was type 1b, the strains of type 5 and 1b were mainly distributed around the lake and the southern foot of Qilian Mountains, while the strains of type 8, 10, 36 and 30 were mainly distributed in the southern part of Qinghai. **Conclusions** The pathogen of *Yersinia pestis* in Qinghai Plateau has complex biochemical types, the epidemic situation among animals is continuous year after year, the situation of prevention and control is serious, the occurrence and prevalence of plague seriously endanger people's health and social development, so it is necessary to do a solid job in the prevention and control of plague to ensure the safety of people's lives.

Keywords: Plague; epidemiological characteristics; etiology; Qinghai Province

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81660349); 第二次青藏高原综合科学考察研究资助(No. 2019QZKK0607)

作者简介: 杨建国(1985—), 男, 本科, 主管医师, 研究方向: 鼠疫防控。

*通信作者: 田富彰, E-mail: qhxntfz@163.com; 代瑞霞, E-mail: drx200907@163.com

青海省地处青藏高原腹地,位于我国的中西部,是长江、黄河、澜沧江的发源地,素有“中华水塔”之称。这里地形复杂,气候条件恶劣,自然景观多样,在长期的生物进化过程中,形成了许多高原自然动物种群,出现了鼠疫等多种自然疫源性疾。青海省是青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地的重要组成部分,截止目前全省有喜马拉雅旱獭鼠疫疫源县33个,疫源乡(镇)121个,疫点695处^[1],鼠疫疫源地面积20多万km²。喜马拉雅旱獭疫源地鼠疫菌毒力强,侵袭力高,人间鼠疫多以肺鼠疫和败血型鼠疫多见,具有发病快、传染性强、病死率高等特点,很容易造成人群的暴发流行。近年来,青海省动物间鼠疫连年不断,相邻省区人间鼠疫频发,鼠疫已进入活跃期,防控形势十分严峻。为此,笔者于2021年选取青海省近30年几起典型的人间鼠疫疫情中分离出的鼠疫菌进行病原学研究和流行特征分析,旨在今后本地区发生人间鼠疫时能够快速精准的溯源,为该省鼠疫防控和生物反恐提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 选取1980—2011年青海省29起人间鼠疫疫情中从不同宿主中分离的35株鼠疫菌株作为实验对象^[2],其中分离自人(尸体)16株,患者7株,喜马拉雅旱獭11株,牧犬1株^[3]。实验菌株由青海省地方病预防控制所鼠疫菌专业实验室提供。

1.1.2 仪器与试剂 北京赫氏培养基、*Taq* DNA聚合酶、RNA裂解酶、dNTPs、琼脂糖购自北京欣经科生物技术有限公司;Mj-25全自动PCR仪购自美国伯乐BIO-RAD公司。

1.2 方法 对选取的35株鼠疫菌株进行糖醇酵解试验、毒力决定因子检测及差异区段(different region, DFR)分型等研究。

1.2.1 菌株处理 于北京赫氏培养基28℃培养24h,用1%蛋白胨水将培养物制备成 2×10^{13} 个菌/mL的菌悬液,分别接种于标注阿胶糖、甘油、脱氮、鼠李糖、麦芽糖和蜜二糖培养基中,于37℃温箱中培养并连续观察7d,后转置室温条件下再连续观察7d,逐日观察并记录发酵情况。以鼠疫菌标准强毒株141和假结核菌PTB5为阳性和阴性对照^[4]。

1.2.2 毒力决定因子检测 分别选用鼠疫菌Fra1抗原胶体金检测试剂盒、草酸镁琼脂培养基、氯化血红

素培养基和Pst I培养基检测鼠疫菌荚膜抗原(Fra1)、毒力抗原因子(VW)、色素沉着因子(Pgm)和鼠疫杆菌素I(Pst I)。以鼠疫菌标准株141和假结核菌PTB5分别为阳性和阴性对照^[4-6]。

1.2.3 鼠疫菌DNA的提取 采用经典的苯酚-氯仿混合抽提法^[7]。

1.2.4 细菌差异片段(different region, DFR) 采用23对DFR分型引物(DFR01—DFR23)和PTM1(质粒验证引物)对被试菌株进行PCR扩增,以82009、620024菌株DNA的等量混合物为阳性对照,以无菌超纯水为阴性对照,实验结果在中国鼠疫菌自然分离菌株的DFR分型数据库^[8]中进行检索后对被试菌株进行DFR基因分型。引物序列及DFR分型方法参见文献^[9-11]。

2 结果

2.1 生化特征 对选取的35株鼠疫菌进行生化糖醇类试验,经检测35株鼠疫菌均能酵解阿胶糖和甘油,脱氮反应均为阳性,但各型菌株对麦芽糖、鼠李糖和蜜二糖的酵解各有不同,35株鼠疫菌生物分型均为古典型,生化分型中29株为青藏高原型,2株为祁连山型,剩余4株鼠疫菌酵解阿胶糖、鼠李糖、麦芽糖、甘油、蜜二糖和脱氮反应均为阳性,与青海省疫源地菌株生化型均不相同。见表1。

2.2 毒力因子 对选取的35株鼠疫菌进行毒力决定因子检测,35株鼠疫菌均能产生荚膜抗原(Fra1)和鼠疫杆菌素I(Pst I),其中26株鼠疫菌(74.28%)能产生毒力抗原因子(VW),29株鼠疫菌(82.86%)能产生色素沉着因子Pgm+,色素沉着因子Pgm±的菌株有2株(5.71%),色素沉着因子Pgm-菌株有4株(11.43%)。见表2。

2.3 基因组型 对选取的35株鼠疫菌进行DFR分型,发现有6种基因组型,即5型16株、8型12株、10型2株、36型1株、30型3株、1b型1株,以5型和8型为主。见表3。

2.4 鼠疫菌基因组型空间分布 青海省鼠疫菌基因型分布有一定的特征,此次检测的35株鼠疫菌中5型菌株分布于青南地区玉树州境内的玉树市、囊谦县、称多县、曲麻莱县、治多县;8型菌株分布于海南州境内的兴海县、同德县,海西州境内的德令哈市、天峻县、乌兰县;10型和36型菌株分布于囊谦县;1b型菌株分布于乌兰县;30型菌株分布于曲麻莱县、称多县。

表1 1980—2011年人间鼠疫相关菌株生化特性及地区分布

Table 1 Biochemical characteristics and regional distribution of human plague-related strains, 1980-2011

菌株数 Strains No.	生化特性检测 Detection of biochemical characteristics						生化型 Biotype	地理分布 Geographical distribution
	阿胶糖 Aabinose	鼠李糖 Rhamnose	麦芽糖 Maltose	蜜二糖 Melibiose	甘油 Glycerol	脱氮 Denitrification		
29	+	- ^a	+	- ^b	+	+	青藏高原型	治多县、囊谦县、玉树市、称多县、曲麻莱县、 德令哈市、天峻县、乌兰县、兴海县、同德县
2	+	-	-	-	+	+	祁连山型	祁连县、囊谦县

注: a. 鼠李糖有4株阳性菌; b. 蜜二有4株阳性菌; +. 阳性; -. 阴性。Note: a. Rhamnose has 4 positive bacteria; b. Melibiose has 4 positive bacteria; +. Positive; -. Negative.

表2 1980—2011年青海省喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地35株人间鼠疫相关菌株毒力因子检测结果

Table 2 Results of detection of virulence factors of 35 strains of human plague-associated strains from Himalayan marmot plague natural foci in Qinghai, 1980-2011

生化型 Biotype	菌株数 Strains No.	荚膜抗原 Fra1		鼠疫杆菌素 IPstI		毒力抗原因子 VW		色素沉着因子 Pgm		
		+	-	+	-	+	-	+	-	±
青藏高原型 Qinghai-Tibet Plateau type	33	33	0	33	0	25	8	27	4	2
祁连山型 Qilian Mountains type	2	2	0	2	0	1	1	2	0	0

注: +. 阳性; -. 阴性。Note: +. Positive; -. Negative.

表3 1980—2011年35株人间鼠疫相关菌株差异片段分析结果

Table 3 Results of differential fragment analysis of 35 strains of human plague-related strains, 1980-2011

基因型 Genotype	菌株数 Strains No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	PMT	
5	16	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
8	12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
10	2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
36	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
1b	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
30	3	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

注: +. 扩增阳性; -. 扩增阴性; 1~23为分型引物; PMT为质粒验证引物。Note: +. Amplification positive; -. Amplification negative; 1-23 is typing primer; PMT is plasmid validation primer.

3 讨论

喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地鼠疫菌毒力强, 传染性强, 基因型复杂, 各区域有其独特的基因组型^[8], 有些地区也存在多种基因组型, 但每个基因组型均与特定自然生态环境相对应, 且有各自的基因型特点, 这样就避免了在同一疫源地出现能量利用重叠的现象。青海省喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地鼠疫菌基因型主要为5型和8型, 青南高原及海西州西部以5型为主, 祁连山南北麓、青海湖环湖各地、青海南山、宗务隆山等地区以8型为主, 2004年青海省囊谦县人间肺鼠疫疫情所分离的2菌株鼠疫菌基因组型为10型, 各地区交界区常存在2~3种基因型。

青海高原鼠疫自然疫源地分布于青藏高原高山草原、高寒草甸、灌丛草甸和高寒草原, 按照地貌、植被类型、气候特征、动物组成等方面可将青海省划分羌塘高原区、青南高原区、青藏高原向黄土高原

的过渡区、祁连山区、柴达木盆地5个区, 多样的地理环境和景观特征使得地区间生态系统差异较大, 特定自然环境内的鼠疫菌、宿主和媒介三者之间相互依存关系, 不但决定了鼠疫菌的存在, 同时也决定着鼠疫菌基因组的进化及其基因组型, 鼠疫菌为了适应不同的自然环境, 基因组型也就发生了相应的变化^[8, 12]。

1980—2011年全省共发生人间鼠疫疫情65起, 发病139人, 死亡66人, 主要的感染方式为剥食旱獭、蚤叮咬, 主要发病人群为当地的农牧民, 其次是务工人员, 病例主要分布在海南州兴海县、玉树州囊谦县、曲麻莱县、治多县、杂多县^[13-14], 海西州乌兰县、海北州祁连县西宁市湟源县, 2012年以来连续10年未发生人间鼠疫。

2001—2021年喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地共发生动物间鼠疫疫情63起, 分离出鼠疫菌165株。监测结果显示青海省现阶段动物间鼠疫疫情呈高发趋

势,海西州、玉树州、海北州、海南州等地部分地区动物鼠疫的流行连年不断,特别是海西州乌兰县、天峻县、都兰县、格尔木市、德令哈市鼠疫流行强度较大,自2010年至今已分离出鼠疫菌28株,动物间鼠疫疫情呈集中连片流行态势^[15-17]。同时,在部分地区检测出滴度较低的牧犬、藏系绵羊、狐狸等鼠疫Fra1抗体阳性血清,说明这些地区动物间鼠疫流行范围较广,旱獭间的鼠疫已经波及到了一些野生食肉类动物和家养动物需要引起我们高度的重视。

随着社会的进步和经济的高速发展,生态环境的改变、大型项目的建设、交通运输发展、人员流增加等诸多变化加大了鼠疫防控工作的强度和难度,给我省鼠疫防控工作带来了新的挑战。为此,我们要进一步完善和健全鼠疫防控体制机制建设,建立规范、科学的监测体系,依据相关法律、法规和预案,明确防控责任,落实工作任务,加强应急队伍、疫情和监测指挥平台、移动实验室等方面的建设,进一步提高应急响应能力和实验室快速检测能力,有效预防、快速应对和及时控制鼠疫疫情^[18-20],切实保障广大人民群众生命安全和身体健康,维护经济平稳发展和社会和谐稳定。

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王祖娜,李超. 青海鼠疫[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 1-8.
- [2] 丛显斌,鞠成. 中国人间鼠疫[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 105-159.
- [3] 丛显斌,刘振才,李群. 中国鼠疫自然疫源地1950-2014[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 105-159, 703-822.
- [4] 代瑞霞,魏柏青,李存香,等. 青海高原鼠疫病原生态学[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(12): 1083-1088.
- [5] 熊浩明,魏柏青,祁美英,等. 基于地理信息系统的青海省鼠疫菌毒力研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(1): 45-48, 16.
- [6] 祁芝珍,金丽霞,于晓涛. 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.
- [7] YANG X Y, WEI B Q, XIN Y Q, et al. DFR genotyping analysis for *Yersinia pestis* in Qinghai Plateau and the observation on the spatial distribution characteristics[J]. Chin J Zoonoses, 2014, 30(4): 387-389, 396.(in Chinese)
杨晓艳,魏柏青,辛有全,等. 青海高原鼠疫菌DFR分型及空间分布特征的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(4): 387-389, 396.
- [8] YANG X Y, WEI B Q, JIN J, et al. Regional genotyping and the geographical distribution regarding *Yersinia pestis* isolates in China[J]. Chin J Epidemiol, 2014(8): 943-948.(in Chinese)
杨晓艳,魏柏青,靳娟,等. 中国鼠疫耶尔森菌差异区段分型及其地理分布特征[J]. 中华流行病学杂志, 2014(8): 943-948.
- [9] 周松,杜国义,李伟,等. 河北省鼠疫菌CRISPR基因分型及流行病学分析[J]. 中华卫生杀虫药械, 2020, 26(4): 361-363.
- [10] 代瑞霞,魏柏青,李存香,等. 青海高原鼠疫病原生态学[J]. 中华预防医学杂志, 2013(12):1083-1088.
- [11] LI J Y, WU Z H, HU Y H, et al. The study of ecological type and DFR genotype of plague bacteria isolated from Huade of *Unquiculus* focus in Inner Mongolia in 2016[J]. J Med Pest Control, 2017, 33(4): 378-380.(in Chinese)
李建云,武正华,胡艳红,等. 2016年内蒙古长爪沙鼠疫源地化德县鼠疫菌的生态及DFR分型[J]. 医学动物防制, 2017, 33(4): 378-380.
- [12] ZHANG A P, XIONG H M, YANG X Y, et al. Space-time distribution of the *Yersinia pestis* genome in Himalayan marmot foci in Qinghai Province and analysis of influencing factors[J]. J Pathog Biol, 2019, 14(12): 1409-1414.(in Chinese)
张爱萍,熊浩明,杨晓燕,等. 青海地区喜马拉雅旱獭疫源地鼠疫菌基因组时空演变及其生态适应分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(12): 1409-1414.
- [13] ZHENG Y, ZHANG A P, LI Q, et al. Epidemiological characteristics of human plague in Qinghai Province[J]. Cap J Public Health, 2017, 11(2): 50-52.(in Chinese)
郑谊,张爱萍,李千,等. 青海省人间鼠疫流行病学分析[J]. 首都公共卫生, 2017, 11(2): 50-52.
- [14] WANG Z Y, WANG Z H. Analysis of frequent factors of human plague in Qinghai-Tibet Plateau and discussion on prevention and control measures[J]. Bull Dis Control Prev, 2011, 26(1): 44-46, 65. (in Chinese)
王祖娜,王振华. 青藏高原人间鼠疫频发因素分析与防控举措的探讨[J]. 疾病预防控制通报, 2011, 26(1): 44-46, 65.
- [15] YANG J G, YOU P S, LI S, et al. The prevention and control situation analysis of plague in recent years in Qinghai Province[J]. J Med Pest Control, 2018, 34(3): 280-282.(in Chinese)
杨建国,游培松,李胜,等. 青海省近年来鼠疫防控形势分析[J]. 医学动物防制, 2018, 34(3): 280-282.
- [16] 李民,焦巴太,王丽,李存香,郭文涛. 1991—2000年青海省人间鼠疫流行病学分析[J]. 中国地方病学杂志, 2002, 21(5): 452.
- [17] LI S, YANG J G, FENG J P, et al. Epidemiological analysis on plague in Qinghai Province from 2006 to 2015[J]. Chin J Control Endem Dis, 2016, 31(10): 1095-1096.(in Chinese)
李胜,杨建国,冯建萍,等. 青海省2006—2015年鼠疫流行病学分析[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(10): 1095-1096.
- [18] TIAN F Z, YANG J G, XIONG H M, et al. Present situation and thinking of plague prevention and control in Qinghai Province[J]. Chin J Control Endem Dis, 2019, 34(3): 297-298, 352.(in Chinese)
田富彰,杨建国,熊浩明,等. 青海省鼠疫防控工作现状与思考[J]. 中国地方病防治杂志, 2019, 34(3): 297-298, 352.
- [19] YANG J G, TIAN F Z, WEI B Q, et al. Prevention and control status and outlook on rat plague of natural foci of marmot plague in Marmota himalayana on Qinghai-Tibet Plateau[J]. J Med Pest Control, 2021, 37(9): 869-872.(in Chinese)
杨建国,田富彰,魏柏青,等. 青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地鼠疫防控现状及展望[J]. 医学动物防制, 2021, 37(9): 869-872.
- [20] 姜志宽,贾德胜,韩招久. 鼠疫的流行特点与防控对策[J]. 中华卫生杀虫药械, 2020, 26(1): 8-15.