

## 青海高原喜马拉雅旱獭血清中特异性鼠疫噬菌体抗体的检测

李存香,魏柏青,熊浩明,张爱萍,张青雯,杨建国,李翔,赵海红,应凯业,王生泰,祁芝珍\*,代瑞霞\*

青海省地方病预防控制所,青海 西宁 810021

**摘要:目的** 利用微量法间接检测青海高原喜马拉雅旱獭血清中特异性鼠疫噬菌体抗体,为后续噬菌体和哺乳动物免疫学之间的相互作用、噬菌体治疗、噬菌体与生态学研究提供理论依据。**方法** 以青藏高原鼠疫疫源地分离的3株野生型鼠疫噬菌体和实验室诊断用鼠疫噬菌体为抗原,利用微量板法和双层琼脂平板法定性检测青海高原同德县、贵南县、共和县、兴海县、天峻县5个疫源县采集于2020年、2021年7—9月份喜马拉雅旱獭血清中的特异性鼠疫噬菌体免疫抗体。**结果** 4株鼠疫噬菌体分别与847份喜马拉雅旱獭血清进行中和试验,通过点滴法均未检测到与鼠疫噬菌体抗原反应的特异性噬菌体免疫抗体。**结论** 青海高原喜马拉雅旱獭血清中未发现特异性鼠疫噬菌体抗体,这与2020—2021年青海省天峻县、同德县、共和县、兴海县、贵南县5个鼠疫疫源县采样地点的鼠疫流行病学显示为静息期无鼠疫病原体存在的流行特点一致,即无鼠疫病原体的存在,间接说明这些鼠疫疫源地鼠疫噬菌体不存在或者比较弱的存在,故检测不到特异性鼠疫噬菌体免疫抗体。可能反映了宿主动物与鼠疫噬菌体自然接触频率少,抗噬菌体抗体可能与鼠疫感染的形式和疾病的强度有关。

**关键词:** 喜马拉雅旱獭;噬菌体;鼠疫噬菌体免疫抗体;鼠疫;血清

**中图分类号:** R516.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2022)10-913-04

**DOI:** 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2022.10.05

Detection on antiserum of *Yersinia pestis* phage in *Marmota himalayana* blood  
in the natural plague foci of Qinghai-Tibet Plateau

LI Cun-xiang, WEI Bai-qing, XIONG Hao-ming, ZHANG Ai-ping, ZHANG Qing-wen, YANG Jian-guo,

LI Xiang, ZHAO Hai-hong, YING Kai-ye, WANG Sheng-tai, QI Zhi-zhen, DAI Rui-xia

Institute for Endemic Disease Prevention and Control of Qinghai Province, Xining, Qinghai 810021, China

Corresponding authors: DAI Rui-xia, E-mail: drx200907@163.com; QI Zhi-zhen, E-mail: qzz7777@163.com

**Abstract: Objective** To detect and analyze the antiserum of *Yersinia pestis* phage in *Marmota himalayana* blood from the natural plague foci of Qinghai-Tibet Plateau by micro-bolus technique, to provide a theoretical basis for interaction between phages and mammalian immunology, phage therapy and interaction between bacteriophage and ecology in future. **Methods** Using diagnostic *Yersinia pestis* phage and 3 wild plague phages from Qinghai-Tibet Plateau Natural Plague Foci as antigens, 847 serums of *Marmota Himalayana* blood, from Tongde, Guinan, Gonghe, Xinghai, Tianjun foci counties in Qinghai Plateau, were collected from July to September in 2020, 2021 and determined on antiserum of *Yersinia pestis* phage by microplate method and double agar plate method. **Results** The neutralization reaction experiment lasted for 24 hours between 4 phage and 847 serums by microplate method independently. These mixtures were tested by double agar plate method. All results were negative on antiserum of *Yersinia pestis* bacteriophage. **Conclusions** The positive antiserum of *Yersinia pestis* phage in *Marmota himalayana* were not found the natural plague foci of Qinghai-Tibet Plateau, which agreed with plague epidemiology in 5 foci counties in Qinghai plateau from 2020-2021, that was a characteristic of the resting period. In other words, it was in the absence of plague pathogen. It also showed indirectly that the absence or weak presence of *Yersinia pestis* bacteriophage in the plague foci. It showed a lower frequency on host animals coming into contact with phages naturally. The antiserum of *Yersinia pestis* phage may be related to the form of plague infection and the intensity of the disease.

**Keywords:** *Marmota himalayana*; bacteriophage; antiserum of *Yersinia pestis* phage; *Yersinia pestis*; serum

噬菌体作为感染细菌的病毒,是生物圈中数量最多的生命体<sup>[1]</sup>。动物或人体都可以成为噬菌体生命周期的环境。噬菌体可以自由地通过不同途径进入动

物或人体的血液和其他组织。哺乳动物免疫系统维持着微生物群落的稳态,从而确保宿主与微生物关系的互惠性得以维持<sup>[2]</sup>。免疫反应是决定噬菌体在机体

**基金项目:** 国家卫生健康委员会鼠疫防治研究重点实验室课题(No.2019PT310003);

青海省鼠疫防控及研究重点实验室(No.2021-ZJ-Y15);青海省医药卫生科技项目指导性计划课题(No.2020-wjzdx-110)

**作者简介:** 李存香(1976—),女,硕士,副主任医师,研究方向:鼠疫病原学和鼠疫噬菌体研究。

\***通信作者:** 代瑞霞, E-mail: drx200907@163.com; 祁芝珍, E-mail: qzz7777@163.com

中存活的主要因素。噬菌体可以通过吞噬和细胞因子反应来调节先天免疫,也可以通过影响抗体的产生和效应极化来影响适应性免疫<sup>[3]</sup>。自然界分离的噬菌体大多数具有低免疫原性。极少量的噬菌体进入动物或人体,当暴露和接触时间足够长时,也能引起免疫系统的长期次级反应<sup>[4]</sup>。鼠疫噬菌体种系进化过程中,其亲缘关系可以通过同源性和异源性抗噬菌体血清中和交叉试验确定。其中,相近种类噬菌体之间具有血清学关系,不同种类噬菌体则不存在血清型的区别。通常鼠疫噬菌体被同源性抗噬菌体血清中和的强度大于异源性,说明鼠疫噬菌体具有抗原的特异性<sup>[5]</sup>。本研究采集青海高原鼠疫疫源地主要宿主动物喜马拉雅旱獭的血液,对其进行血清分离,利用青藏高原鼠疫疫源地分离的野生型鼠疫噬菌体和实验室诊断用鼠疫噬菌体检测喜马拉雅旱獭血清中是否存在与鼠疫噬菌体抗原反应的特异性鼠疫噬菌体免疫抗体,为后续噬菌体和哺乳动物免疫学之间的相互作用研究、噬菌体与生态学研究、噬菌体治疗研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验菌株 鼠疫疫苗株EV<sub>76</sub>由青海省疾病预防控制中心鼠疫菌专业实验室提供。

1.1.2 鼠疫噬菌体 鼠疫诊断用噬菌体由青海省疾病预防控制中心鼠疫菌专业实验室制备,效价为10<sup>9</sup>,批号:2020-1。试验用野生型鼠疫噬菌体天峻087号、天峻476号、同德072204号于2019—2020年分离自青海省天峻县和同德县鼠疫疫源地喜马拉雅旱獭盲肠内容物。

1.1.3 血清来源 被检血清为2020年、2021年7—9月份采集同德县(38份)、贵南县(367份)、共和县(21份)、兴海县(300份)、天峻县(121份)喜马拉雅旱獭全血共计847份。阳性对照血清为青海省疾病预防控制中心鼠疫预防控制科制备的抗鼠疫噬菌体血清。

1.1.4 培养基 LB固体培养基、LB半固体培养基、LB液体培养基、噬菌体保存液(SM缓冲液)由青海省疾病预防控制中心鼠疫菌专业实验室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 喜马拉雅旱獭血清的处理

1.2.1.1 喜马拉雅旱獭血清的分离 对847份喜马拉雅旱獭全血进行5 000×g, 10 min离心,分离血清,低温分装。

1.2.1.2 血清检测 上述血清56℃水浴、30 min灭活,-20℃保存备用。参照鼠疫防控手册(2009年版)中《鼠疫诊断标准》(WS279-2008)及附录E、F中鼠疫间接血凝试验(IHA)<sup>[6]</sup>检测847份喜马拉雅旱獭血

清中的鼠疫F1抗体均为阴性。

1.2.2 菌液制备 鼠疫疫苗株EV<sub>76</sub>菌悬液100 μL接种于LB液体培养基中,28℃空气浴振荡培养箱18~20 h培养至对数生长期,将其作为宿主菌。

#### 1.2.3 鼠疫噬菌体免疫抗体检测方法的建立

1.2.3.1 诊断用鼠疫噬菌体与被检血清的中和试验 实验室诊断用鼠疫噬菌体按10倍梯度稀释至10<sup>-5</sup>。分别取诊断用鼠疫噬菌体40 μL和待测喜马拉雅旱獭血清40 μL置于96孔无菌微量板中,二者混匀,实验完毕后盖好96孔板封板膜,置于37℃恒温培养箱孵育24 h。

1.2.3.2 抗体验证试验 将培养板分为九分格,每个格标记1份血清样本编号。取对数生长期鼠疫疫苗株EV<sub>76</sub>菌悬液200 μL,加入已融化至45℃6 mL LB半固体培养基中,缓缓混匀后倒入底层LB固体培养基中。平板琼脂凝固后,分别取上述中和反应24 h的培养液15 μL,点滴于培养板对应标记的分格内,依次完成待检样本的点滴试验,每个血清样品做2份,分别置于28℃/37℃恒温培养箱,20~24 h后观察有无噬菌斑。如有噬菌斑存在,说明该样本中不含有特异性鼠疫噬菌体免疫抗体;若无斑,说明该样本中含有特异性鼠疫噬菌体免疫抗体。

#### 1.2.4 野生型鼠疫噬菌体与被检血清的中和试验

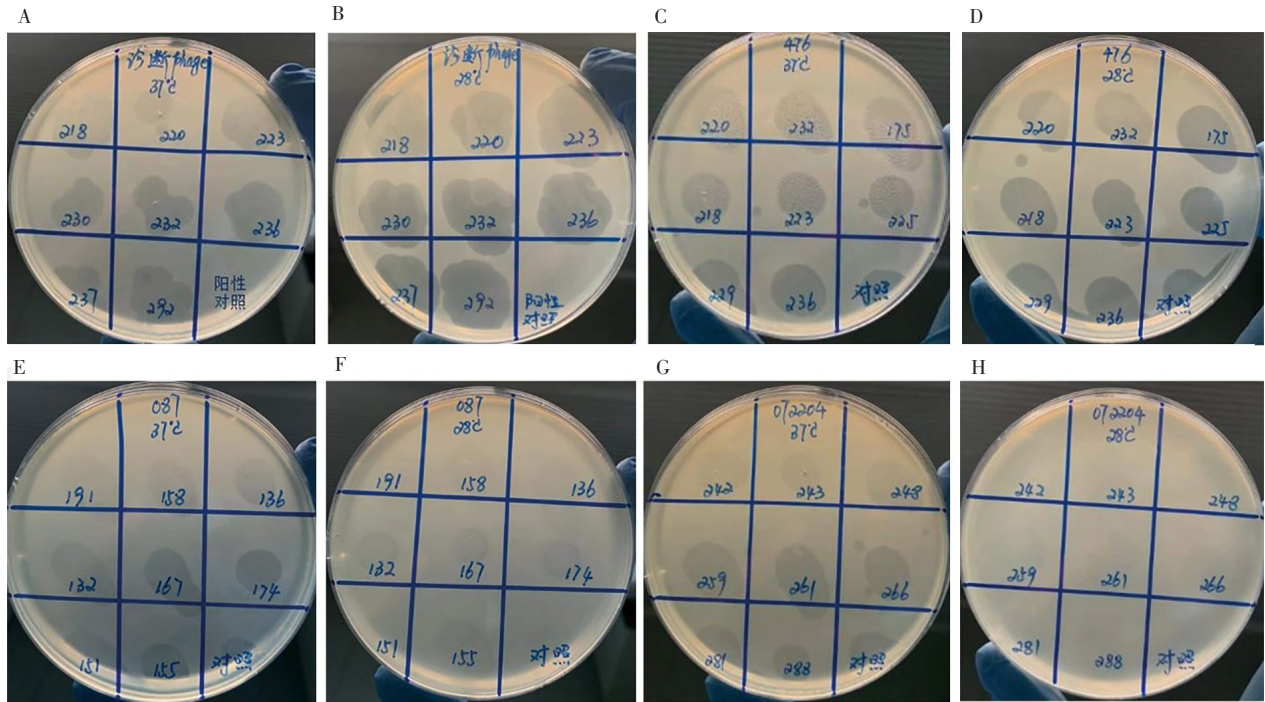
因3株野生型鼠疫噬菌体效价较低,效价为10<sup>-6</sup>~10<sup>-7</sup>,故分别取野生型鼠疫噬菌体原液和待测喜马拉雅旱獭血清各40 μL,按照上述建立的特异性鼠疫噬菌体免疫抗体检测方法,进行中和实验和抗体验证试验。

## 2 结果

以诊断用鼠疫噬菌体作为抗原,847份被检血清分别与其在37℃条件下相互作用后,培养板上全部出现几乎相同的噬菌斑,说明847份被检血清中均未检测到特异性鼠疫噬菌体免疫抗体。

阳性对照结果中,实验室制备的抗鼠疫噬菌体血清与诊断用鼠疫噬菌体经中和反应,培养板上未出现对应的噬菌斑。以天峻087号、天峻476号、同德072204号分别作为抗原,847份被检血清分别与其在28℃/37℃条件下相互作用后结果显示,鼠疫噬菌体天峻476号在28℃和37℃培养板上全部出现几乎相同的噬菌斑;因野生型鼠疫噬菌体天峻087号和同德072204号在28℃不裂解鼠疫疫苗株EV<sub>76</sub>,37℃裂解鼠疫疫苗株EV<sub>76</sub>,以这两株噬菌体作为抗原,28℃培养板上全部未出现噬菌斑,而在37℃培养板上全部出现几乎相同的噬菌斑,说明847份被检血清中也均未检测到特异性鼠疫噬菌体免疫抗体。对照组的的结果与3株野生型鼠疫噬菌体实验组的结果一致。见图1。





鼠疫疫源地喜马拉雅旱獭血清与实验室诊断用鼠疫噬菌体(A, B)、野生型鼠疫噬菌体476号(C, D)、野生型鼠疫噬菌体087号(E, F)、野生型鼠疫噬菌体072204号(G, H)分别在37℃和28℃中和和作用24 h后的试验验证结果;对照均为阳性对照。Validation results on neutralization experiment at 37℃ and 28℃ for 24 hours in serum of *Marmota himalayana* and diagnostic *Yersinia pestis* phage(A, B), wild plague phages 476 (C, D), wild plague phages 087 (E, F), wild plague phages 072204 (G, H), respectively; All controls are positive.

图1 鼠疫疫源地喜马拉雅旱獭血清分别与不同鼠疫噬菌体中和作用24 h后的试验验证结果

Fig. 1 The part of validation results on the neutralization experiment 24 hours between 4 phage and 847 serums from Qinghai-Tibet plateau natural plague foci by microplate method independently

### 3 讨论

免疫系统在病毒生物种群组成中发挥着一定的作用,并考虑了驻留病毒可能如何影响宿主免疫<sup>[7]</sup>。机体对抗原的免疫反应涉及许多免疫系统的组成部分,其中体液反应并不遵循简单的诱导模式,似乎取决于噬菌体的给药途径、个体特征、剂量、给药时间和其他尚未确定的特征<sup>[8-9]</sup>。据国外文献报道,一些人类血清和牛初乳中检测到没有被噬菌体治疗刺激的噬菌体中和抗体<sup>[10]</sup>。在T<sub>4</sub>噬菌体头部表面蛋白免疫原性的研究中,82%(41/50)从未接受过噬菌体治疗或参与过噬菌体工作的健康志愿者血清显著降低了噬菌体活性(阳性血清),只有18%(9/50)的血清没有诱导抗噬菌体效应(阴性血清)<sup>[9]</sup>。第一个T<sub>4</sub>噬菌体应用于人类的安全性研究中,所有噬菌体处理的志愿者中没有诱导出抗体,这可能与免疫系统的多因素性质及其潜在抗原的相互作用有关<sup>[11]</sup>。

青海高原鼠疫疫源地动物鼠疫好发于每年的5—7月份,而鼠疫噬菌体、鼠疫抗体一般出现在动物鼠疫流行末期<sup>[12]</sup>。噬菌体在宿主体内的持续时间及其在特定器官中的浓度,很大程度上取决于易感细菌的有无<sup>[9]</sup>。本研究采集青海高原鼠疫疫源地喜马拉雅旱獭血液,对其进行血清分离,以诊断用鼠疫噬菌体

作为抗原,建立了喜马拉雅旱獭血清中特异性噬菌体抗体检测的方法,同时以3株野生型鼠疫噬菌体分别作为抗原,与847份采集于7—9月份的喜马拉雅旱獭血清进行中和试验,通过点滴法均未检测到与鼠疫噬菌体抗原反应的鼠疫噬菌体免疫抗体,这与2020—2021年青海省贵南县、同德县、共和县、兴海县、天峻县5个鼠疫疫源县采样地点的鼠疫流行病学显示为静息期的流行特点一致<sup>[13-14]</sup>,即无鼠疫病原体的存在,间接说明鼠疫疫源地鼠疫噬菌体不存在或者比较微弱的存在,故检测不到特异性鼠疫噬菌体免疫抗体。这些结果可能反映了宿主动物与噬菌体自然接触的频率少<sup>[15-18]</sup>,进而说明抗噬菌体抗体可能与鼠疫感染的形式和疾病的强度有关<sup>[9]</sup>。

本研究采用微量法仅在鼠疫疫源地的主要宿主动物喜马拉雅旱獭血清中进行特异性鼠疫噬菌体抗体检测,且仅通过平板现象判断结果。作为鼠疫流行病学监测的一种新方法,其样品用量少,灵敏度高,成本低,可以直观、简便、间接地检测其特异性鼠疫噬菌体抗体,对今后鼠疫免疫学研究、鼠疫流行病学研究和噬菌体在自然状态下与宿主菌之间的相互作用研究具有重要的科研价值。

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

(下转第968页)

- 测工作手册[R]. 2021: 472-474.
- [ 9 ] CHAU T T H, THWAITES G E, CHUONG L V, et al. Headache and confusion: the dangers of a raw snail supper[J]. Lancet, 2003, 361(9372): 1866.
- [ 10 ] WANG C J, SONG Z F, LU X, et al. The invasion and control of *Pomacea canaliculata* in China[J]. J Biosaf, 2021, 30(3): 178-182. (in Chinese)  
王蝉娟, 宋增福, 鲁仙, 等. 我国福寿螺入侵现状和防控研究进展[J]. 生物安全学报, 2021, 30(3): 178-182.
- [ 11 ] ZHANG C Q, DAI J R. Progress of research on biologically invasive medical molluscs in China[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2019, 31(4): 441-445.(in Chinese)  
张超群, 戴建荣. 我国生物入侵医学贝类的研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(4): 441-445.
- [ 12 ] WEI F R, LIU H X, LV S, et al. Multiplex PCR assay for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Pomacea canaliculata* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2010, 28(5): 355-358.(in Chinese)  
危芙蓉, 刘和香, 吕山, 等. 用多重PCR技术检测小管福寿螺体内广州管圆线虫幼虫[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(5): 355-358.
- [ 13 ] MA X L, TAN F, PAN C W. Comparison of detection methods for the third larvae of *Angiostrongylus cantonensis* in *Ampullaria gigas* [J]. J Pathog Biol, 2008, 3(2): 130-132.(in Chinese)  
马雪莲, 谭峰, 潘长旺. 广州管圆线虫中间宿主福寿螺感染检测方法比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(2): 130-132.
- [ 14 ] LIU H X, ZHANG Y, LV S, et al. A comparative study of three methods in detecting *Angiostrongylus cantonensis* larvae in lung tissue of *Pomacea canaliculata*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(1): 53-56.(in Chinese)  
刘和香, 张仪, 吕山, 等. 三种方法检测福寿螺肺囊内广州管圆线虫效果的比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(1): 53-56.
- [ 15 ] HUANG D N, HUANG Y L, YANG F, et al. Potential of imported *Pomacea canaliculata* transmitting *Angiostrongylus cantonensis* in China[J]. China Trop Med, 2017, 17(9): 871-875.(in Chinese)  
黄达娜, 黄亚兰, 阳帆, 等. 输入性福寿螺传播广州管圆线虫的潜能研究[J]. 中国热带医学, 2017, 17(9): 871-875.
- [ 16 ] 李莉莎, 杨发柱, 张榕燕, 等. 福建省广州管圆线虫病的系列研究[Z]. 福建省疾病预防控制中心, 2013-01-29.

收稿日期: 2022-02-22 编辑: 谢永慧 王思衡

(上接第915页)

#### 参考文献

- [ 1 ] FERNÁNDEZ L, RODRÍGUEZ A, GARCÍA P. Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities[J]. ISME J, 2018, 12(5): 1171-1179.
- [ 2 ] KOSKELLA B, BROCKHURST M A. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities[J]. FEMS Microbiol Rev, 2014, 38(5): 916-931.
- [ 3 ] VAN BELLEGHEM J D, DVUBROWSKA K, VANEE CHOUTTE M, et al. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system[J]. Viruses, 2018, 11(1): 10.
- [ 4 ] MAJEWSKA J, BETA W, LECION D, et al. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood [J]. Viruses, 2015, 7(8): 4783-4799.
- [ 5 ] 纪树立. 鼠疫[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 250.
- [ 6 ] Plague Prevention and Control Manual(2009) [M]. Peking University Medical Press, 2009: 340-343.  
鼠疫防控手册(2009年版) [M]. 北京大学医学出版社, 2009: 340-343.
- [ 7 ] DUERKOP B A, HOOPER L V. Resident viruses and their interactions with the immune system[J]. Nat Immunol, 2013, 14(7): 654-659.
- [ 8 ] ŁUSIAK-SZELACHOWSKA M, ZACZEK M, WEBER-DĄBROWSKA B, et al. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy[J]. Viral Immunol, 2014, 27(6): 295-304.
- [ 9 ] DĄBROWSKA K, MIERNIKIEWICZ P, PIOTROWICZ A, et al. Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface [J]. J Virol, 2014, 88(21): 12551-12557.
- [ 10 ] DĄBROWSKA K, SWITAJŁA-JELEN K, OPOLSKI A, et al. Bacteriophage penetration in vertebrates[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98(1): 7-13.
- [ 11 ] BRUTTIN A, BRÜSSOW H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7): 2874-2878.
- [ 12 ] 王洪喜, 王忠惠, 张景林, 等. 非典型鼠疫耶尔森菌及其流行病学意义的研究[J]. 中国地方病防治杂志, 1996, 11(2): 72-74, 127.
- [ 13 ] SU X D, QU J J, CAIRANG, et al. Analysis of plague surveillance results and epidemic trend of animal plague in Tianjun County in 2020 [J]. J Med Pest Control, 2021, 37(12): 1140-1143, 1238.(in Chinese)  
苏晓东, 曲江杰, 才让, 等. 2020年天峻县鼠疫监测结果及动物鼠疫流行趋势分析[J]. 医学动物防制, 2021, 37(12): 1140-1143, 1238.
- [ 14 ] YAO X H, SONG C, REN Z N, et al. Epidemiological analysis of human plague in China from 2001 to 2019[J]. Chin J Control Endem Dis, 2021, 36(1): 47-49.(in Chinese)  
姚晓恒, 宋驰, 任振宁, 等. 全国2001—2019年人间鼠疫流行病学分析[J]. 中国地方病防治, 2021, 36(1): 47-49.
- [ 15 ] DUTILH B E, CASSMAN N, MCNAIR K, et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4498.
- [ 16 ] XU D D, YIN J X. Impact of climate change on the epidemic of plague[J]. J Trop Med, 2018, 18(1): 111-113, 121.(in Chinese)  
徐丹丹, 尹家祥. 气候变化对鼠疫流行的影响[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(1): 111-113, 121.
- [ 17 ] XIN W Y, ZHANG L, DAI R X. Biochemical characteristics and genotyping of *Yersinia pestis* in Golmud, Qinghai[J]. China Trop Med, 2022, 22(6): 500-504.(in Chinese)  
辛文媛, 张丽, 代瑞霞. 青海省格尔木市鼠疫耶尔森菌生化特征及基因分型研究[J]. 中国热带医学, 2022, 22(6): 500-504.
- [ 18 ] HE C R, DENG X R, CAI J, et al. Surveillance on plague host animals and vectors in Longyan City from 2010 to 2018[J]. Chin J Hyg Insect Equip, 2021, 27(5): 416-419.(in Chinese)  
何春荣, 邓小如, 蔡军, 等. 2010—2018年龙岩市鼠疫宿主动物及媒介监测分析[J]. 中华卫生杀虫药械, 2021, 27(5): 416-419.

收稿日期: 2022-03-02 编辑: 黄艳 朱学义