·调查研究·

西藏自治区2009—2011年鼠疫耶尔森菌分离株的生化特征

赵宏群[1],占堆[2],阮水良[2],蔡虹[1],海荣[1],李伟[1],梁莹[1]
1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所鼠疫室,北京 102206;
2 西藏自治区疾病预防控制中心,拉萨 850000

摘要:目的 通过对2009—2011年分离的鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)进行生化特征鉴定,及时掌握西藏地区鼠疫菌的遗传变异情况。**方法** 采用传统的糖醇酵解实验和硝酸盐还原实验,将2009—2011年分离自西藏自治区的111株鼠疫菌接种在新鲜配制的生化反应管内,28 ℃培养14 d,每天观察并记录反应管中培养基的颜色变化情况。**结果** 111株被测菌株均可还原硝酸盐并酵解甘油,但均不能酵解鼠李糖;有9株菌阿拉伯糖代谢阳性,其中6株来自那曲地区,3株来自藏南谷地;其余102株菌阿拉伯糖代谢结果为阴性。**结论** 被试菌均为古典型鼠疫菌,分离自藏北高原那曲地区的鼠疫菌均为青藏高原生态型菌株;分离自藏南谷地的鼠疫菌绝大部分属于冈底斯山生态型,且有3株表现出青藏高原生态型菌株特征,需进一步应用分子生物学方法对其遗传标记进行深入分析。

关键词: 鼠疫耶尔森菌; 生化特征; 西藏自治区
中图分类号:R378.6+1 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-8280(2017)02-0175-03
DOI:10.11853/j.issn.1003.8280.2017.02.021

Biochemical characteristics of *Yersinia pestis* strains in Tibet, 2009–2011

ZHAO Hong-qun[1], ZHAN Dui[2], RUAN Shui-liang[2], CAI Hong[1], HAI Rong[1], LI Wei[1], LIANG Ying[1]
1 *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing* 102206, China; 2 *Tibet Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention*
Corresponding author: LIANG Ying, Email: liangying@icdc.cn

Abstract: Objective To understand the mutations of *Yersinia pestis*, all of strains isolated in Tibet during 2009 to 2011 were selected to identify the biochemical features of the pathogen. **Methods** Traditional methods like glycerol fermentation, glucose metabolism and nitrate reduction were carried out. Tested strains isolated from Tibet during the year of 2009 and 2011, were incubated in biochemical action tubes made recently in 28 ℃ for 14 d, and the color of every tubes was observed and recorded each day. **Results** All of 111 tested strains were able to reduce nitrate and ferment glycerol, but unable to catabolize rhamnose; Nine of tested strains were capable of catabolizing arabinose, six of them isolated from Naqu and the other three from southern valley of the Qinghai-Tibet Plateau; The results of arabinose metabolism of the other 102 strains were all negative. **Conclusion** It was suggested that all tested strains belong to Biovar Antiqua. Those *Y. pestis* strains isolated from Naqu located in the northern Tibet were Qinghai-Tibet Plateau Ecotype, and most strains isolated from southern valley of the Qinghai-Tibet Plateau were Gangdise Mountain Ecotype except only three strains, which had the same biochemical features as the strains of Qinghai-Tibet Plateau Ecotype. It needs to utilize molecular methods through analyzing genetic markers to type the three special *Y. pestis* strains.

Key words: *Yersinia pestis*; Biochemical characteristic; Tibet

西藏自治区人间鼠疫流行最早可追溯到20世纪初,1966年首次从日喀则市仲巴县的鼠疫患者尸体中分离到鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*,鼠疫菌),并通过流行病学调查证实西藏自治区存在鼠疫自然疫源地[1],为青藏高原喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*)鼠疫自然疫源地,主要宿主动物为喜马拉雅旱獭,主要媒介为谢氏山蚤(*Oropsylla silantiewi*)和斧形盖蚤(*Callopsylla dolabris*)[2]。西藏地区鼠疫疫源地动物间鼠疫流行呈持续活跃状态,疫源地面积逐年扩大,动物间疫情时而波及人间。1966—2015年,西藏地区共报告人间鼠疫疫情22起,造成120例发病、75例死亡的严重后果。

西藏地区鼠疫菌独特的生物学特性和超强的致病力是该地区人间鼠疫病死率较高的原因之一,也

作者简介:赵宏群,男,主管技师,从事生物安全和鼠疫防控工作,Email: zhaohongqun@icdc.cn
通信作者:梁莹,Email: liangying@icdc.cn

网络出版时间:2017-02-17 09:43 **网络出版地址:**http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

是区别于其他疫源地菌株的重要标志。为及时掌握西藏自治区鼠疫菌的遗传变化特征和地理分布情况，对2009—2011年分离自该地区的鼠疫菌进行了传统的生化特征鉴定和比较分析，现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 111株鼠疫菌于2009—2011年分离自西藏自治区。其中来源于拉萨市36株（2009、2010年各8株，2011年20株）、山南市10株（2009年4株，2010年6株）、林芝市32株（2009年17株，2010年8株，2011年7株）、日喀则市2009年2株、阿里地区25株（2009年4株，2010年11株，2011年10株）、那曲地区2011年6株。除1株鼠疫菌于2010年分离自林芝地区的鼠疫患者外，其余110株均分离自喜马拉雅旱獭。

1.2 试剂 硝酸钾为Amresco（美国）公司产品；鼠李糖、L-(+)-阿拉伯糖为SIGMA（美国）公司产品；甘油、蛋白胨、牛肉膏等其他试剂均为国产。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株复苏 按常规方法制备赫氏消化液培养基平板，37 ℃恒温培养24 h，确保无菌生长后，移入4 ℃冰箱，备用。用一次性无菌接种环蘸取菌种保存液，均匀涂布于赫氏消化液培养基平板上，28 ℃恒温培养18～24 h，使冻存菌株复苏。用一次性无菌接种环挑取复苏后的鼠疫菌单个菌落，连续划线接种于2块平板上，其中平板1用于鼠疫噬菌体裂解实验，平板2的培养物用于硝酸盐还原实验和糖醇酵解实验。

1.3.2 鼠疫噬菌体裂解实验 用微量移液器吸取25 μl诊断用鼠疫噬菌体，将其滴加在平板1的划线一侧，倾斜平板，使液体垂直流过划线。置28 ℃恒温培养24 h后观察有无噬菌带形成。

1.3.3 硝酸盐还原实验（脱氮反应） 当平板1鼠疫噬菌体裂解实验为阳性时，取平板2上的培养物进行实验。按照《鼠疫防控应急手册》[3]方法配制实验用培养基（每100 ml含0.1 g硝酸钾），甲液（0.8%氨基苯磺酸醋酸溶液）和乙液（0.5%α-萘胺醋酸溶液）。将待试菌株接种于脱氮反应用培养基后，置37 ℃恒温箱内培养2 d，加甲液0.1 ml混合后再加乙液0.1 ml，观察颜色变化情况。

1.3.4 糖醇酵解实验 采用常规试管法，首先配制甘油、鼠李糖和L-(+)-阿拉伯糖共3种糖醇培养基发酵管，配制方法参照文献[3]。用一次性无菌接种针挑取平板2上的鼠疫菌纯培养物，分别穿刺接种于上述糖醇发酵管内，置于37 ℃恒温培养7～14 d，每天观察并记录结果。同时用未接种菌的糖醇发酵管作空白对照。

2 结 果

2.1 复苏鼠疫菌的形态特征 111株鼠疫菌全部培养复苏成功，肉眼观察菌落形态呈圆形、淡灰色、中心凸起，符合典型的鼠疫菌菌落形态特征。

2.2 噬菌体裂解实验结果 鼠疫噬菌体裂解实验结果均为阳性，在噬菌体流过处可见1条清晰的噬菌带。

2.3 脱氮反应结果 111株鼠疫菌株全部具有硝酸盐还原能力，脱氮反应结果均为阳性，见表1。

表1 鼠疫菌株的生化实验结果

分离地区	菌株数（株）	分离时间（年）	生化实验			
			甘油	鼠李糖	阿拉伯糖	脱氮反应
拉萨市	8	2009	+	-	-	+
	8	2010	+	-	-	+
	1	2011	+	-	+	+
	19	2011	+	-	-	+
山南市	4	2009	+	-	-	+
	6	2010	+	-	-	+
林芝市	17	2009	+	-	-	+
	8	2010	+	-	-	+
	1	2011	+	-	+	+
	6	2011	+	-	-	+
日喀则市	2	2009	+	-	-	+
阿里地区	4	2009	+	-	-	+
	11	2010	+	-	-	+
	1	2011	+	-	+	+
	9	2011	+	-	-	+
那曲地区	6	2011	+	-	+	+
合计	111					

2.4 菌株的甘油、鼠李糖和阿拉伯糖代谢结果 111株鼠疫菌均能酵解甘油，而不能酵解鼠李糖。9株鼠疫菌阿拉伯糖代谢结果呈阳性（发酵管由未接种时的紫色变成接种后的黄色），包括分离自那曲地区的6株和2011年分离自林芝市朗县、拉萨市当雄县、阿里地区噶尔县各1株；102株菌的阿拉伯糖发酵管均呈紫色或淡紫色，与空白对照管颜色相比，由于未发生明显的颜色变化，故将结果定为阴性，见表1。

综合以上实验结果并根据鼠疫菌的生物型分型标准，111株鼠疫菌应全部属于典型的鼠疫菌古老变种（古典型鼠疫菌）。

3 讨 论

西藏鼠疫自然疫源地是我国青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地的重要组成部分，分离自该疫源地的鼠疫菌具有毒力强、传播快、致死率高等特点。纪树立等[4]根据鼠疫菌的糖醇酵解能力等6项

（下转第187页）

卫生害虫，但市售的蚊香类产品，大部分仍以该药物为主要成分，用于驱避蚊虫。经过几十年的使用，其抗药性聚集。但武汉市野生致倦库蚊对三氯杀虫酯的抗性倍数＜10，两蚊种抗药性水平相差较大，原因有待研究。

白纹伊蚊虽非武汉市的优势蚊种[11]，但是登革热的重要传播媒介。因此，监测武汉市野外白纹伊蚊对常用杀虫剂的抗药性水平及变化趋势对于防控登革热意义重大，同时可指导科学合理地使用杀虫剂、保障灭效及延缓抗性的发生发展[12]。野外白纹伊蚊一般孳生于小型积水容器，应加强宣传，使居民了解翻盆倒罐的灭蚊方法，减少使用杀虫剂，通过环境治理进行灭蚊。同时使用生物防治方法，如有条件的水体可喂养柳条鱼捕食蚊幼虫，其他水体可使用微生物灭蚊幼剂，如苏云金芽孢杆菌等。同时应加强消杀专业技术人员的培训，使其掌握药物作用机制，了解药物的合理混配，从而轮换使用不同作用机制的杀虫剂，延缓白纹伊蚊抗药性的发展，提高防治效果。

参考文献

[1] Halstead SB. Dengue[J]. Lancet, 2007, 370(9599): 1644-1652.

[2] Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems[J]. Arch Med Res, 2002, 33(4): 330-342.

[3] Whitehorn J, Farrar J. Dengue[J]. Br Med Bull, 2010, 95(1): 161-173.

[4] Reiter P. Yellow fever and dengue: a threat to Europe?[J]. Euro Surveill, 2010, 15(10): 19509.

[5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 26347－2010 蚊虫抗药性检测方法 生物测定法[S]. 北京：中国标准出版社，2011.

[6] Zhang K, Zhang W, Zhang S, et al. Susceptibility of *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) to six insecticides in China[J]. J Econ Entomol, 2014, 107(5): 1916-1922.

[7] World Health Organization. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets[R]. Geneva: WHO, 2006: 15-17.

[8] 吴志凤，王以燕，顾宝根. 我国卫生杀虫剂的现状与发展前景[J]. 农药科学与管理，2011，32(5)：16-19.

[9] 周良才，吴学胜，包继永，等. 武汉市致倦库蚊幼虫对5种杀虫剂的抗性状况[J]. 中国媒介生物学及控制杂志，2012，23(5)：477-478.

[10] 中华人民共和国农业部农药检定所. 2011农药管理信息汇编[G]. 北京：中国农药出版社，2011：1325-1326.

[11] 田俊华，吴太平，朱泽荣，等. 2006－2009年武汉市成蚊密度监测研究[J]. 中华卫生杀虫药械，2010，16(3)：185-187.

[12] 李成玲，严子锵，江毅民，等. 广州城区白纹伊蚊幼虫对常用杀虫剂的抗药性研究[J]. 中华卫生杀虫药械，2013，19(6)：487-489.

收稿日期：2016-10-27

（上接第176页）

指标建立了我国鼠疫菌的生态型分型体系，并将西藏自治区的鼠疫菌进一步分为冈底斯山型和青藏高原型，主要区别在于阿拉伯糖代谢能力和菌株的地理分布两方面。祁芝珍等[5]报道，冈底斯山型菌株不能酵解阿拉伯糖，该型菌株主要分布在青藏高原的藏南谷地，而青藏高原型菌株则能够酵解阿拉伯糖，主要分布在藏北高原、青海高原、祁连山地及新疆维吾尔自治区、四川省的部分地区。藏北高原和藏南谷地间由于念青唐古拉山的地理分隔，使两地的鼠疫菌分离株表现出各自的生化表型特征。2009－2011年在西藏地区分离出111株鼠疫菌，其中6株来自藏北高原的那曲地区，其生物学特征与青藏高原型菌株相符，因此，可以确定这6株鼠疫菌的生态型为青藏高原型。拉萨、林芝、日喀则、山南市和阿里地区均地处藏南谷地，该地区的鼠疫菌大部分（102株）不能酵解阿拉伯糖，属于冈底斯山生态型。另有3株鼠疫菌（2011年分离自拉萨市、林芝市和阿里地区各1株）阿拉伯糖酵解实验结果为阳性，但不能认为该3株菌属于青藏高原生态型，需进一步应用基因分型方法对其遗传特征进行鉴定分析，如多位点可变数目串联重复序列分析[6]、差异区段分型[7]和间区规律聚集的短回文重复分型方法[8]。综合运用这些基因分型方法可明确菌株的遗传特征和来源，有助于了解西藏地区鼠疫菌的传播扩散过程及疫源地变迁情况。

参考文献

[1] 麻占军，蒋志勇. 西藏自治区1966－2012年人间鼠疫流行病学分析[J]. 中国地方病防治杂志，2013，28(2)：119-122.

[2] 丛显斌，刘振才. 中国鼠疫及其防治(2001－2010)[M]. 长春：吉林科学技术出版社，2014：514.

[3] 卫生部卫生应急办公室，中国疾病预防控制中心. 鼠疫防控应急手册[M]. 北京：北京大学医学出版社，2009：251.

[4] 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)：3-9，62.

[5] 祁芝珍，李敏，金丽霞，等. 西藏地区鼠疫菌生物学特性的分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2002，22(2)：215-217.

[6] Li YJ, Cui YJ, Cui BZ, et al. Features of variable number of tandem repeats in *Yersinia pestis* and the development of a hierarchical genotyping scheme [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66567. DOI: 10.1371/journal.pone.0066567.

[7] 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，2014，35(8)：943-948.

[8] Cui YJ, Li YJ, Gorgé O, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2652. DOI: 10.1371/journal.pone.0002652.

收稿日期：2016-10-25