

河北省鼠疫自然疫源地鼠疫耶尔森菌 变异性研究进展

史献明¹, 杜国义¹, 王治宇¹, 杨顺林¹, 王海峰¹, 周松¹, 刘冠纯¹, 谢树军²,

姚剑坤³, 崔树学⁴, 杨建明⁵, 张懿晖¹

1 河北省鼠疫防治所, 河北 张家口 075000; 2 河北省蠡县医院, 河北 保定 071400; 3 沽源县疾病预防控制中心,

河北 张家口 075000; 4 丰宁县疾病预防控制中心, 河北 承德 067000;

5 康保县疾病预防控制中心, 河北 张家口 075000

摘要: 在河北省鼠疫自然疫源地流行初期分离的鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)毒力较强, 脱氮能力稳定, 质粒种类丰富, 但在流行末期分离的鼠疫菌往往毒力较弱, 脱氮能力不稳定, 质粒易缺失。鼠疫菌的形态学在自然界中存在较大差异。该文通过探讨河北省鼠疫菌的生物学、生化、质粒和毒力变异情况, 揭示鼠疫静息期存在的机制。

关键词: 鼠疫耶尔森菌; 变异性; 河北省

中图分类号: R254.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-8280(2018)01-0100-03

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.01.027

Study on variability of *Yersinia pestis* in plague natural foci of Hebei province, China

SHI Xian-ming¹, DU Guo-yi², WANG Zhi-yu¹, YANG Shun-lin¹, WANG Hai-feng¹, ZHOU Song¹, LIU Guan-chun¹,

XIE Shu-jun³, YAO Jian-kun⁴, CUI Shu-xue⁴, YANG Jian-ming⁵, ZHANG Yi-hui¹

1 Anti-plague Institute of Hebei Province, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China; 2 Lixian County Hospital of Hebei

Province; 3 Guyuan Center of Disease Control and Prevention; 4 Fengning Center of Disease Control and Prevention;

5 Kangbao Center of Disease Control and Prevention

Corresponding author: DU Guo-yi, Email: dgyhbs@163.com

Supported by the Key Medical Projects of Hebei Province in 2017 (No. 20170446) and the National Major Research and Development Plan (No. 2016YFC1201304)

Abstract: At the initial stage of epidemics, the bacteria of plague natural foci were more virulent, nitrogen removal was stable, and the plasmid species were relatively complete and stable. But at the end of the epidemic, the virulence of the plague was weaker, nitrogen removal was not stable, and plasmids tended to be absent. There were great differences in the morphology of plague bacteria in nature. Biological, biochemical, plasmid and virulence of *Yersinia pestis* were investigated in Hebei province, China. The mechanism of the existence of plague was revealed in some way.

Key words: *Yersinia pestis*; Variability; Hebei province

河北省鼠疫自然疫源地位于河北省北部康保县, 属于内蒙古高原, 其东、西、北三面分别与内蒙古自治区的正镶白旗、正镶黄旗和太仆寺旗相邻, 南与尚义、张北和沽源县相邻。全县有15个乡(镇)324个行政村, 人口28万, 总面积3 395.4 km²。地势由南向北倾斜, 海拔平均1 460 m, 属低山丘陵区。土壤以栗钙土和草甸土为主。植被属于半干旱草原类型, 农作物以春小麦、莜麦、马铃薯、亚麻和菜籽为主。气候属重干旱区, 年平均气温1.2℃, 无霜期90 d, 平均降雨量300 mm。全省以该县光照最好, 年日照时数在3 019~3 214 h。该鼠疫自然疫源地的主要宿主动物为长爪沙鼠

(*Meriones unguiculatus*)和达乌尔黄鼠(*Spermophilus dauricus*), 小型鼠类以黑线仓鼠(*Cricetulus barabensis*)和小家鼠(*Mus musculus*)为主。自1971年发现鼠疫自然疫源地, 截至目前共发生动物间鼠疫流行4次, 但未波及到人间。该文通过探讨河北省鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*, 鼠疫菌)的生物学、生化、质粒和毒力变异情况, 以揭示鼠疫静息期存在的机制。

1 河北省鼠疫自然疫源地鼠疫菌的发现

1949年11月河北省康保县发生人间鼠疫流行, 发病15

基金项目: 2017年河北省医学重点项目(20170446); 国家重点研发计划重点专项(2016YFC1201304)

作者简介: 史献明, 男, 主任医师, 从事鼠疫防治工作, Email: shiwolf@163.com

通信作者: 杜国义, Email: dgyhbs@163.com

网络出版时间: 2017-12-12 11:34 **网络出版地址:** http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

例,死亡14例,调查认为此次鼠疫流行系内蒙古自治区传入引起。自1949年开始,当地一直开展鼠疫监测工作,但1950—1970年鼠疫监测未发现动物间鼠疫,也无人间鼠疫发生。当时认为河北省不存在鼠疫自然疫源地,是内蒙古自治区鼠疫自然疫源地的动物鼠疫流行偶然扩散导致。但1971年11月26日在动物鼠疫监测中发现1只自毙长爪沙鼠,经解剖培养,分离出鼠疫菌,这是首次在河北省康保县康保牧场动物间分离到鼠疫菌,从而证实了河北省鼠疫自然疫源地的存在^[1]。1984年从鼠疫自然疫源地内的沙狐(*Vulpes corsac*)血清中分离出鼠疫F1抗体阳性,并于1994—1995、2002—2003和2005年先后发生3次动物鼠疫流行。

2 河北省鼠疫菌生物学变异研究

典型的鼠疫菌形态呈两极浓染且钝圆的小杆菌。对河北省1971—1972年分离的23株鼠疫菌形态学进行研究,30℃培养24~48h,在普通肉汤、普通琼脂和3%NaCl三种培养基中培养后,显微镜检查呈革兰阴性;在肉汤培养基中培养的鼠疫菌呈短链状小杆菌;3%NaCl琼脂培养的鼠疫菌呈圆球、棒状或鼓锤状,生长特性为半透明、有粗糙颗粒的小菌落;在半固体培养基中培养显示无动力^[2]。鼠疫菌细胞壁在自然界中存在变异,苏联学者从野生鼠疫菌中分离出L型鼠疫菌,即为细胞壁缺失的鼠疫菌,对河北省鼠疫自然疫源地分离的鼠疫菌进行研究^[3],利用氨苄西林、青霉素、噬菌体和胆汁等对鼠疫菌进行诱导,鼠疫菌变异为L型,其细胞壁丢失,抗原比原菌株阳性滴度低2~4倍,生化反应表现对糖的酵解能力相同,但均发酵迟缓,经过动物传代后又重新获得鼠疫强毒菌的特征。说明鼠疫菌在某些特殊环境下可以发生细胞壁变异,但不会死亡,在条件成熟的情况下可反转变异重新获得细胞壁,在人工培养条件下也可变异,冻干鼠疫菌也会发生变化。董国润等^[4]对24株河北省鼠疫菌冻干前后的生物学特征进行研究,其形态学等未发生改变,但其生化特征发生明显变化:冻干前后的菌株均可发酵葡萄糖、阿拉伯胶糖、木胶糖和甘露糖;迟缓酵解麦芽糖、甘油;无法酵解蔗糖、鼠李糖、乳糖和尿素;硝化反应均呈阴性,无明显变异,但脱氮能力在冻干前后发生明显变化,冻干前有4株菌可还原硝酸盐,而冻干后达8株。鼠疫菌的脱氮能力在自然界刚刚分离后比较稳定,为脱氮阴性。河北省鼠疫菌生物学特性有明显变异,一般情况下新分离的鼠疫菌表现为典型的鼠疫菌特性,而经过变换其培养特性后或经过长期保存后,其生物学特性会发生变异,进一步说明鼠疫菌在自然界中的变异普遍存在。

3 河北省发现R型鼠疫菌

典型的鼠疫菌菌落形态在普通培养基生长呈灰白色菌苔,为不规则圆形,黄色透明,中央隆起粗糙,常称为S型鼠疫菌,与之对应的菌落形态未出现粗糙颗粒的为R型鼠疫菌。对1971—1972年分离自河北省鼠疫自然疫源地的鼠疫菌进行形态学研究,发现1株变异菌株^[5]。该菌株在普通培养基上生长无变化,但是在普龙亚培养基(龙胆紫、亚硫酸钠琼脂培养基)生长48h后发生了变化,形成肉眼可见的灰白色菌苔,带有淡紫色,表面光滑,为R型鼠疫菌,河北省分离的

鼠疫菌仅发现1株该菌,具体原因尚待研究,下一步将对鼠疫菌培养特性变异的原因进行深入研究。

4 河北省鼠疫菌毒力因子变异性研究进展

鼠疫菌毒力因子有荚膜抗原(F1)、毒力抗原(VW)、鼠疫菌素(Pst I)和色素沉着因子(Pgm),但我国鼠疫菌株4种毒力因子因地域或相同鼠疫自然疫源地内分离的菌株会发生变异^[6]。有研究证明,鼠疫菌毒力因子基因编码由鼠疫菌质粒决定,10 kb质粒决定Pst,74 kb质粒决定鼠疫菌的致病性,即鼠疫菌Ca²⁺依赖和VW抗原的产生,110 kb质粒介导F1抗原和鼠毒素的产生。河北省鼠疫源地的鼠疫菌部分表现为VW⁻,其相应的也缺失74 kb质粒。刘秀莲^[8]对河北省分离于1971—1972年的26株鼠疫菌进行毒力因子研究发现,26株全部为F1⁺、Pst I⁺,21株VW⁻,5株VW⁺,25株Pgm⁻,1株Pgm⁺,测定发现,有3株VW⁺经过移植3代转变为VW⁻;有1株经过豚鼠16次传代,Pgm⁻转变为Pgm⁺。刘秀莲等^[9]对河北省分离于1994年的40株鼠疫菌毒力因子进行研究,均可产生F1、Pst I,对Pst I不敏感。但38株菌在草酸镁培养基上为VW⁺,2株菌为VW⁻。可见,河北省鼠疫菌4种毒力因子存在缺失现象,以74 kb质粒易丢失。

5 河北省鼠疫菌生化变异研究进展

对河北省康保牧场分离于1971—1972年的23株鼠疫菌进行生化鉴定,与纪树立等^[10]对鼠疫菌分型的特征相同。刘合智等^[11]对河北省鼠疫自然疫源地分离于2002—2003年的27株鼠疫菌进行生化反应研究,其脱氮能力略有差异,可轻微产生H₂S,由此可见,该疫源地内鼠疫菌的生化特性基本稳定。鼠疫菌经过长期保存或经敏感动物传代后其生化特征往往会发生变异,李静海和王福^[12]对河北省鼠疫自然疫源地的39株鼠疫菌的脱氮能力进行研究,实验室保存的39株鼠疫菌中有3株脱氮阳性、36株脱氮阴性。在培养基上保存传代15年后,原3株脱氮阳性的鼠疫菌仍保持脱氮能力,36株脱氮阴性的鼠疫菌中有26株变为脱氮阳性。其中3株脱氮阴性的鼠疫菌每年经敏感动物传代,15年后仍保持脱氮阴性。鼠疫菌与主要宿主长爪沙鼠和主要媒介秃病蚤(*Nosopsyllus laeviceps*)构成完整的生态系统,使鼠疫在该疫源地内得以长期存在,从而形成自然疫源性,这是鼠疫菌自然选择的必然结果。经过多年研究发现,鼠疫菌个别生化反应往往会发生一些变异,以脱氮能力变异明显,在长期保存的条件下,其脱氮能力会降低甚至丢失,但经敏感动物传代会发生反转变异而恢复其脱氮阳性,进一步说明鼠疫菌在自然界及人工培养过程中其生化能力会发生变异。

6 河北省鼠疫菌毒力研究进展

我国鼠疫菌的毒力程度分为强毒、弱毒和无毒。河北省鼠疫自然疫源地分离的鼠疫菌毒力差异较大,分离于1971—1972年的5株鼠疫菌毒力均为强毒,但毒力差异较大,以分离于1972年5月4日的7220菌株毒力最强,宿主动物为达乌尔黄鼠,感染100个菌,实验动物全部死亡;分离于1972年3月9日的728菌株毒力中等,宿主动物为长爪沙鼠;而分离于1972年4月7日的7212菌株,宿主为长爪沙鼠,感染10⁶个

菌,仅致死1只小白鼠,毒力相差10 000倍以上。本研究鼠疫菌分为高毒菌(728和7220菌株)、中毒菌(7213和7219菌株)和弱毒菌(7212菌株),说明强毒菌分离于流行前期,弱毒菌分离于流行末期,达乌尔黄鼠携带的鼠疫菌毒力强于长爪沙鼠^[13]。研究发现,鼠疫菌经过人工培养基传代其毒力发生明显变化,是动物间鼠疫疫情自然熄灭的原因。杜国义等^[14]对河北省2002—2003年动物鼠疫流行期分离的5株菌进行研究,发现,分离于不同时间的菌株,其毒力有明显差异,一般在流行初期分离的菌株毒力较强,而在流行末期分离的较弱,其中200201、200202、200204菌株为2002年10—11月分离,在本次流行的初期,毒力较其他菌株强,其半数致死量(LD₅₀)分别为10 251和1 778个菌,而分离于流行末期的200213菌株毒力较弱,LD₅₀为31 620个菌。

7 讨论

1971年12月26日在河北省鼠疫自然疫源地首次分离到鼠疫菌,证实河北省鼠疫自然疫源地的存在,后于1994—1995、2002—2003和2005年发生了3次动物间鼠疫流行,河北省鼠疫防治工作进入较科学阶段,先后对分离的鼠疫菌进行分子生物学、毒力因子、毒力、形态学和生化等研究,确定为鼠疫鄂尔多斯高原长爪沙鼠生态型鼠疫菌,中等毒力,但在研究过程中发现鼠疫菌的毒力、毒力因子及生化特性等生物学特征发生较大变化,同一流行年度分离的鼠疫菌在流行初期与流行末期毒力存在较大差异,且与动物间鼠疫流行有较大关系,该文对河北省鼠疫菌的变异性进行全面阐述,进一步揭示河北省动物间鼠疫的流行规律。

7.1 河北省鼠疫菌研究支持鼠疫菌变异保菌学说 鼠疫菌在自然界的保存机制有土壤保菌说、植物保菌说、外来学说和微小鼠疫源地学说,虽然这些学说在某种情况下得到部分支持,但经过多年研究发现,未得到普遍认可,在自然界无充分证据,仅作为假设。但经过长期研究发现,鼠疫菌在自然界中发生变异和反变异被人们普遍接受。当自然界的某种条件成熟,如疫源地内主要宿主动物密度升高到一定程度或发生干旱等,鼠疫菌重新获得某种遗传基因,如鼠疫74 kb质粒重新获得、染色体毒力岛的变异等因素,其毒力恢复而致死动物,人类仅偶然接触动物而感染引起鼠疫流行。研究发现,在河北省鼠疫自然疫源地流行前期分离的鼠疫菌较流行末期毒力强^[13-14],是鼠疫自然疫源地每次鼠疫流行可自然消亡的主要原因,也是自然界自我调节动物密度、保持生态平衡的手段。

7.2 河北省鼠疫菌研究支持鼠疫流行静息期存在机制 在鼠疫自然疫源地内存在静息期,即鼠疫经过一次流行,一段时间后复燃,未发生鼠疫的某段时间称为鼠疫静息期。在我国各鼠疫自然疫源地内普遍存在,河北省鼠疫自然疫源地建国后发生4次动物间鼠疫流行,流行7个年度,基本间隔10~15年。鼠疫菌在自然界以某种形式存在,当宿主动物密度升高到一定程度或因其他因素而发生变异,重新获得毒力,主要宿主动物大量死亡,宿主动物密度降低,在鼠疫流行末期发生变异,毒力减弱,本次流行结束,进入鼠疫静息期,周而复始。

7.3 鼠疫菌发生变异形式尚无定论 河北省分离的鼠疫菌无论是其培养菌落发生变异,还是流行前期分离的菌株毒力较强,其生化特性经过培养或敏感动物传代后均发生脱氮能力的变异,说明鼠疫菌表型发生了变异,鼠疫菌质粒丢失已经形成定论^[15-16],但其是否存在染色体变异还处于实验室研究阶段^[17],未被普遍认可,故通过对河北省鼠疫自然疫源地的鼠疫菌进行全面研究和阐述,了解鼠疫菌在鼠疫静息期内的存在形式,从而揭示鼠疫流行规律。

参考文献

- [1] 宋东霞,史献明,孔祥骊,等.河北省鼠疫自然疫源地的发现及其防治对策的研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,1996,7(1):51-56.
- [2] 王海峰,杜国义,史献明,等.河北省鼠疫自然疫源地鼠疫菌生物学特征的研究概述[J].中国媒介生物学及控制杂志,2010,21(6):638-639.
- [3] 杨顺林,史献明,董国润,等.PCR用于鼠疫陈旧脏器标本检测的分析[J].疾病预防控制通报,2011,26(5):13-14,25.
- [4] 董国润,李敬海,王桂琴,等.冻干保存鼠疫菌的某些生物学特性研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,1993,4(3):212-214.
- [5] 杜国义,史献明,董国润,等.鼠疫血清学研究进展[J].中国媒介生物学及控制杂志,2009,20(1):91-92,94.
- [6] 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.
- [7] 刘满福,刘合智,张彩虹.河北省鼠疫自然疫源地内啮齿动物种类及其分布的调查[J].中国媒介生物学及控制杂志,2002,13(4):260-262.
- [8] 刘秀莲.河北省鼠疫菌毒力决定因子的变异[J].中国地方病防治杂志,1989,4(4):241.
- [9] 刘秀莲,张月枝,白小英.河北省鼠疫菌株的鉴定[J].中国地方病防治杂志,2002,17(2):103-104.
- [10] 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,1982,6(5):257-262.
- [11] 刘合智,张月芝,史献明,等.河北省鼠疫菌株生化特性的研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,2005,16(4):308-310.
- [12] 李敬海,王福.培养基保存的鼠疫菌获得脱氮能力的报告[J].中国地方病防治杂志,1988,3(3):187-188.
- [13] 刘合智,杜国义,白雪薇,等.河北省鼠疫耶尔森菌毒力测定[J].中国地方病学杂志,2007,26(5):478-480.
- [14] 杜国义,史献明,刘合智,等.河北省鄂尔多斯高原型鼠疫菌毒力试验[J].地方病通报,2007,22(2):14-15.
- [15] 徐菲莉,杨子平,李蕾,等.新疆鼠疫自然疫源地鼠疫菌质粒图谱分析[J].地方病通报,1997,12(1):12-15.
- [16] 董兴齐,彭何碧,叶枫,等.云南省鼠疫疫源地鼠疫菌质粒DNA种类及分子流行病学研究[J].地方病通报,1994,9(4):58-63.
- [17] 韩岳,王希良,董梅,等.tPA信号肽和鼠疫杆菌保护性抗原V融合基因的构建及免疫效果鉴定[J].现代免疫学,2006,26(6):477-482.

收稿日期:2017-10-18