

# 西藏自治区鼠疫自然疫源地鼠疫耶尔森菌耐药及耐消毒剂基因的研究

何建, 杨晓艳, 李胜, 靳娟, 张琪, 辛有全, 金泳, 熊浩明, 杨汉青, 魏柏青, 代瑞霞, 祁芝珍  
青海省地方病预防控制所鼠疫预防控制科, 西宁 811602

**摘要:** **目的** 调查西藏自治区鼠疫自然疫源地是否存在耐药及耐消毒剂的鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)菌株, 为鼠疫的临床治疗提供准确信息。**方法** 根据美国国立生物技术信息中心公布的耐氨基糖苷类链霉素 *StrA* 和 *StrB* 基因, 耐  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物 *TEM*、*SHV* 和 *CTX-M* 基因, 耐磺胺类药物 *Sul1*、*Sul2* 和 *Sul3* 基因序列, 耐消毒剂耐药 *QacEdelta1-sul1* 基因, 分别在每个基因上设计 1 对引物, 逐一对分离自西藏自治区鼠疫自然疫源地的鼠疫菌 DNA 进行 PCR 检测。**结果** 阴性对照和阳性对照成立, 355 株鼠疫菌的 PCR 检测结果均为阴性, 未发现耐链霉素、耐磺胺类药物及耐  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物和耐消毒剂菌株。**结论** 西藏自治区鼠疫自然疫源地鼠疫菌尚未出现耐药及耐消毒剂菌株。

**关键词:** 鼠疫耶尔森菌; 西藏自治区; 耐药基因; 耐消毒剂基因

中图分类号: R378.6<sup>+1</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2018)01-0061-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.01.015

## Study on the drug and disinfectant resistant genes of *Yersina pestis* in natural plague foci in Tibet

HE Jian, YANG Xiao-yan, LI Sheng, JIN Juan, ZHANG Qi, XIN You-quan, JIN Yong,  
XIONG Hao-ming, YANG Han-qing, WEI Bai-qing, DAI Rui-xia, QI Zhi-zhen

Qinghai Province Institute for Endemic Disease Control and Prevention, Xining 811602, Qinghai Province, China

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

Supported by the Natural Science Foundation of Qinghai Province of China (No. 2016-ZJ-789) and Key Laboratory for Plague Prevention and Control of Qinghai Province (No. 2017-ZJ-Y22)

**Abstract: Objective** To understand whether there is a drug- or disinfectant-resistant strains in natural plague foci in Tibet, and provide the accurate information for clinical treatment of plague. **Methods** According to the aminoglycoside resistant gene of streptomycin resistant, *StrB*, *StrA*, beta lactam antibiotics *TEM*, *SHV*, and *CTX-M* gene, sulfamidamide resistant *Sul1*, *Sul2*, and *Sul3*, and anti-disinfectant *QacEdelta1-sul1* gene sequence the National Center for Biotechnology Information (NCBI) released, a pair of primers in each gene was designed separately. DNA of strains isolated from natural plague foci in Tibet were amplified by PCR using every pair of primers. **Results** Negative and positive control were established, samples by PCR amplification results were negative, there were no streptomycin, sulfamidamide and beta lactam antimicrobial drug resistance genes and anti-disinfectant genes in strains studied. **Conclusion** The Tibet autonomous region of natural plague foci did not appear to have drug- or disinfectant-resistant *Yersina pestis*.

**Key words:** *Yersina pestis*; Tibet; Resistance genes; Disinfectant resistant genes

历史上 3 次世界性鼠疫大流行夺去数万人生命, 19 世纪抗生素的出现使鼠疫死亡率大幅度降低, 鼠疫耶尔森菌(*Yersina pestis*, 鼠疫菌)一旦产生抗生素耐药性, 将再次面临鼠疫危机。具有耐药性的鼠疫菌较少, 马达加斯加分离的 2 株耐药鼠疫菌的发现使全球对鼠疫菌进行系统的抗生素耐药性监

测势在必行<sup>[1]</sup>。革兰阴性多耐药菌株持续增加<sup>[2]</sup>。因此, 选择我国鼠疫治疗和预防中常用的抗生素药物, 设计相关耐药基因的检测引物, 对鼠疫流行较为严重的西藏自治区(西藏)鼠疫自然疫源地分离的鼠疫菌进行耐药基因及耐消毒剂基因分析, 以全面了解该鼠疫自然疫源地分离的野生鼠疫菌的耐药情

基金项目: 青海省自然科学基金(2016-ZJ-789); 青海省鼠疫防控及研究重点实验室项目(2017-ZJ-Y22)

作者简介: 何建, 男, 主管医师, 从事鼠疫病原学研究, Email: 550199930@qq.com

通信作者: 代瑞霞, Email: drx200907@163.com; 祁芝珍, Email: qzz7777@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=](http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=)

况,为鼠疫治疗提供指导性建议。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 耐药基因 *StrA*、*StrB*、*TEM*、*CTX-M*、*Sul1*、*Sul2* 和 *QacEdelta1-sul1* 的阳性模板 DNA(A1234) 由中国 CDC 传染病预防控制所鼠疫室馈赠。被试菌株为 1966—2015 年分离自西藏鼠疫自然疫源地的 355 株鼠疫菌(表 1),由青海省地方病预防控制所鼠疫预防控制科保存。

1.1.2 引物设计 参照美国国立生物技术信息中心公布的耐氨基糖苷类链霉素 *StrA*、*StrB* 基因,耐β-内酰胺类抗生素药物 *TEM*、*SHV* 和 *CTX-M* 基因,耐磺胺类药物 *Sul1*、*Sul2* 和 *Sul3* 基因序列,耐消毒剂 *QacEdelta1-sul1* 基因序列,分别设计引物,见表 2。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 仪器和试剂 PCR 扩增仪(型号: MastercyclerproS,德国 Eppendorf 公司);凝胶成像仪

表 1 西藏自治区鼠疫自然疫源地 355 株鼠疫菌分离年代及其疫源地分布

Table 1 The distribution of time and epidemic focus counties of the 355 *Y. pestis* in natural plague foci in Tibet

疫源地	分离年代					总计
	1966— 1975 年	1976— 1985 年	1986— 1995 年	1996— 2005 年	2006— 2015 年	
拉萨市	0	0	16	60	18	94
昌都地区	0	7	1	3	2	13
山南地区	0	0	16	51	13	80
日喀则地区	13	0	2	19	7	41
那曲地区	0	26	17	33	3	79
阿里地区	0	0	7	1	25	33
林芝地区	0	0	1	0	14	15
合计	13	33	60	167	82	355

(型号:GBOX-F31,英国 SYNGENE 公司);超微量核酸蛋白测定仪(型号:NaNovuel,英国通用电气);多用电泳仪(型号:DYY-12,北京六一仪器厂)。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 和琼脂糖均购自北京欣经科生物技术有限公司。

表 2 引物序列及长度

Table 2 Primer sequences and length

抗生素药物	耐药(消毒剂)基因	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)
磺胺类	<i>Sul1</i>	F: CTT CGA TGA GAG CCG GCG GC R: GCA AGG CCG AAA CCC GCG CC	437
	<i>Sul2</i>	F: GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT R: GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT	285
	<i>Sul3</i>	F: AGA TGT GAT TGA TTT GGG AGC R: TAG ATG TTT CTG GAT TAG AGC CT	443
链霉素	<i>StrA</i>	F: CGC CGT TGA TGT GGT GTC R: GGT CCA ATC GCA GAT AGA AGG	392
	<i>StrB</i>	F: CGA GCA CGG CGA CTA CC R: CCA CTT CAC CGA CCA GAC	314
β-内酰胺类	<i>CTX-M</i>	F: CGC TTT GCG ATG TGC AG R: ACC GCG ATA TCG TTG GT	551
	<i>SHV</i>	F: ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG R: GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG	862
	<i>TEM</i>	F: ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA R: GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC	1 080
耐消毒剂基因	<i>QacEdelta1-sul1</i>	F: TAG CGA GGG CTT TAC TAA GC R: ATT CAG AAT GCC GAA CAC CG	307

### 1.2 方法

1.2.1 鼠疫菌 DNA 的提取 细菌染色体 DNA 的提取按照常规十二烷基硫酸钠(SDS)裂解及酚-氯仿抽提方法进行<sup>[3]</sup>。利用超微量核酸蛋白测定仪测定 DNA 含量,DNA 终浓度稀释至 0.002 μg/μl。

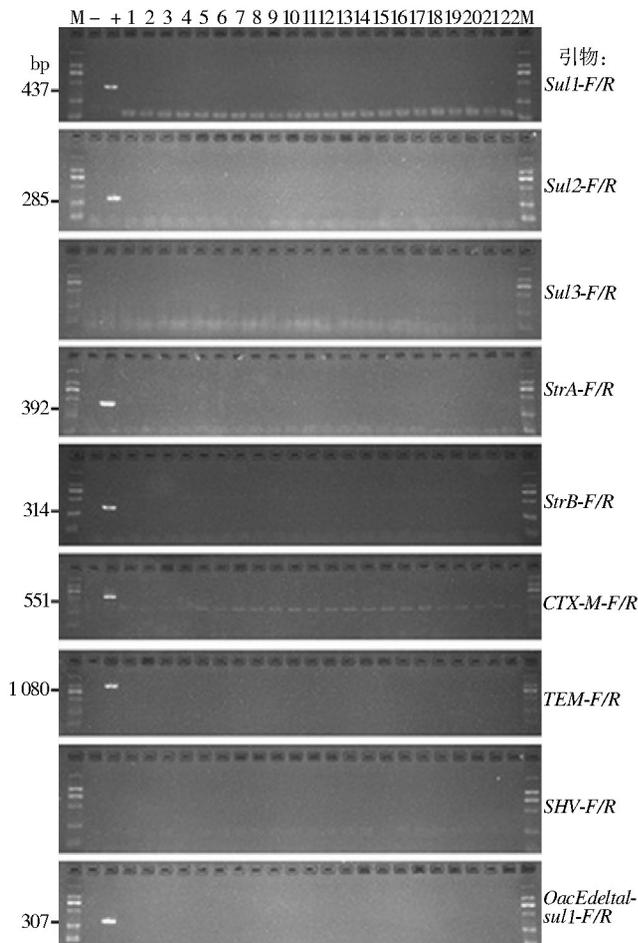
1.2.2 PCR 扩增 以鼠疫菌 DNA 为模板,应用 9 对引物逐一进行扩增,设阳性对照和阴性对照。PCR 反应体系:10× Buffer 5.0 μl,10 mmol/L dNTP 0.2 μl,5 U/μl Taq DNA 聚合酶 0.5 μl,2 μmol/L 引物对 1.0 μl,模板 DNA(0.002 μg/μl)5.0 μl,用去离子水补足至

25.0 μl。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 4 min;95 °C 变性 40 s,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 40 s,30 个循环;72 °C 终延伸 4 min。因 *SHV*、*TEM* 基因 2 对引物的产物较长,延伸时间延长为 70 s,其他条件不变。取 PCR 产物 7.5 μl 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,电压为 80~100 V,电泳 15~30 min,结束后将胶置于凝胶成像系统拍照并记录。

## 2 结果

PCR 扩增结果显示,阴性对照和阳性对照均成

立,所测菌株DNA在目的基因处均未出现条带,尚未发现具有链霉素、磺胺类药物及 $\beta$ -内酰胺类抗生素药物的耐药基因及耐消毒剂菌株,见图1。拉萨市、昌都地区、山南地区、日喀则地区、那曲地区、阿里地区和林芝地区检测菌株数分别为94、13、80、41、79、33和15株,均未检出耐药基因及耐消毒剂鼠疫菌。



注: M. Marker DNA 分子质量标准; 1~22. 部分菌株扩增结果; -, 阴性对照; +. 阳性对照

图1 西藏鼠疫自然疫源地部分鼠疫菌PCR扩增结果

Figure 1 Part of *Y. pestis* PCR amplification results in natural plague foci in Tibet

### 3 讨论

3.1 鼠疫疫源地概况及研究结果 西藏位于我国西南部,总人口300余万,是以藏族为主的多民族聚居区,平均海拔4 000 m,为青藏高原的主体,是青藏高原喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*)鼠疫自然疫源地的重要组成部分。1901年曾有类似鼠疫疫情流行,1966—2015年西藏地区共报告人间鼠疫疫情22起,发病120例,死亡75例<sup>[4]</sup>。该地区鼠疫菌具有青藏高原鼠疫病原体特性,人类感染鼠疫菌后具有发病急、病情重、传染性强及病死率高等特点<sup>[5]</sup>。目前,西藏鼠疫自然疫源地总面积达257 800 km<sup>2</sup>,

占全区总面积的21%<sup>[6]</sup>,是我国乃至世界鼠疫流行最为活跃的地区之一<sup>[7]</sup>。本研究所测355株鼠疫菌经检测均为阴性,说明西藏鼠疫自然疫源地1966—2015年分离的野生鼠疫菌株未携带耐链霉素、磺胺类药物及 $\beta$ -内酰胺类抗生素药物耐药基因,链霉素等抗生素药物仍可用于鼠疫的临床治疗。王国钧等<sup>[8]</sup>通过大量动物实验筛选出新型抗生素(环丙沙星和头孢曲松钠)应用于鼠疫临床,以应对鼠疫耐药菌株。在今后鼠疫防治工作中可适当储备这些抗生素药物以防不时之需。此外,本实验未检测到耐消毒剂基因,但近年来已将季胺盐类(苯扎溴胺)、双胍类(氯己定)消毒剂纳入鼠疫防护用品并在实验中得以应用<sup>[9]</sup>。因此,鼠疫菌耐消毒剂基因的检测亦应引起重视。

3.2 鼠疫耐药性菌株流行情况 细菌耐药性是世界性难题,1995年Galimand等<sup>[10]</sup>首次报道第1株多重耐药鼠疫菌(17/95),该菌株含有自转移质粒(pIP1202),大小约150 kb,属Inc6-C群,pIP1202所携带的耐药基因有SHV1、StrA、StrB、aadA、aphA、tetRA、cat、QacEdelta、Sul1、Sul2,其耐药表型为氨基苄西林、氯霉素、链霉素、磺胺类药物、四环素、壮观霉素和卡那霉素。2001年Guiyoule等<sup>[11]</sup>在马达加斯加报道了1株质粒介导的对链霉素具有高抗性的鼠疫菌株(16/95),该菌株所携带的自转移质粒(pIP1203)大小约40 kb,pIP1203属IncP群,该质粒仅携带StrA、StrB耐药基因,可高频结合到其他鼠疫菌,这2株耐药菌株提示,自然条件下携带耐药基因的质粒可整合到鼠疫菌。

3.3 鼠疫耐药性菌株产生机制 2株耐药鼠疫菌株分离自马达加斯加的2个不同区域,相距80 km的不同患者;其中17/95鼠疫菌株属B基因型,16/95鼠疫菌株则属于马达加斯加特有的Q基因型;17/95鼠疫菌株携带质粒pIP1202大小约150 kb,属Inc6-C群,带有多种耐药基因,而16/95鼠疫菌株所携带的质粒pIP1203大小约40 kb,属IncP群,该质粒仅携带StrA、StrB耐药基因;鼠疫菌株17/95链霉素的耐药性产生为腺苷酰化作用,而16/95为磷酸化作用。故2株鼠疫菌耐药性的产生独立无关联<sup>[10]</sup>。2株鼠疫耐药菌株产生耐药的质粒来源不明确,推测最初质粒结合发生于鼠或人体内<sup>[11-14]</sup>。基因交换比较罕见,在同时感染鼠疫菌和另一个入侵的携带耐药质粒的供体细菌,且供体菌和受体菌间密切接触的条件下,基因交换才能产生,但在跳蚤体内将携带耐药质粒的大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和鼠疫菌先后感染后,3 d后鼠疫菌携带转移结合子耐药质粒<sup>[15]</sup>。该实验模型表明,随着其他 (下转第67页)

## 参考文献

- [1] 赵玉遂, 吴青青, 徐水洋, 等. 浙江省居民传染病防治素养及其影响因素分析[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(9): 806-810.
- [2] 方娴, 金笑笑, 谢慧玲, 等. 某医科大学临床医学专业大学生健康素养知晓率及影响因素研究[J]. 中国社会医学杂志, 2016, 33(2): 144-147.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 中国公民健康素养: 基本知识与技能(试行)[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2008.
- [4] 王萍, 毛群安, 陶茂萱, 等. 2008 年中国居民健康素养现状调查[J]. 中国健康教育, 2010, 26(4): 243-246.
- [5] 姚丁铭, 吴青青, 王磊, 等. 2014 年浙江省居民健康素养现状调查研究[J]. 中国预防医学杂志, 2016, 12(17): 885-889.
- [6] 郭牧. 近二十年鼠疫流行状况及发展趋势[J]. 医学动物防疫, 2008, 24(2): 122-124.
- [7] 罗成旺, 刘起勇. 自然疫源性疾病流行因素分析及对策[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(4): 293-297.
- [8] 黄相刚, 李长宁, 李英华, 等. 中国居民传染病防治素养水平及其影响因素分析[J]. 中国健康教育, 2015, 31(2): 112-115.
- [9] 李娜. 河北省城乡居民健康素养状况及影响因素研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [10] 王治宇, 史献明, 陈永江, 等. 河北省鼠疫综合防治策略的探讨[J]. 中华卫生杀虫药械, 2016, 22(6): 608-610.
- [11] 王晓康. 结构方程模型在居民健康素养分析中的应用[D]. 南京: 东南大学, 2016.
- [12] 隋吉林, 唐雅清, 王瑞琴, 等. 北京市昌平区居民传染病健康素养现状研究[J]. 中国健康教育, 2012, 28(11): 943-945.
- [13] 刘潇潇, 刘国涛, 张震, 等. 北京市西城区居民传染病健康素养水平及其影响因素分析[J]. 中国健康教育, 2016, 32(2): 116-119.
- [14] 李志伟, 张丹丹, 鲍其雪, 等. 保定市外来经商务工人员传染病防治素养水平调查[J]. 现代预防医学, 2016, 43(22): 4134-4136.
- [15] 张海艳, 王珺, 赵楠, 等. 2014 年北京市东城区居民传染病预防素养调查[J]. 首都公共卫生, 2016, 10(4): 178-180.
- [16] 刘洋, 赵小娟. 北京市怀柔区居民传染病健康素养水平调查[J]. 国际病毒学杂志, 2016, 23(6): 419-422.

收稿日期: 2017-08-29

(上接第 63 页) 越来越多的耐药菌株的产生, 西藏鼠疫自然疫源地尚无耐药鼠疫菌株的报道, 但质粒易整合到鼠疫菌染色体组<sup>[16]</sup>, 故鼠疫菌出现耐药性有其必然性。

## 参考文献

- [1] Galimand M, Carniel E, Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10): 3233-3236.
- [2] Carraro N, Matteau D, Luo P, et al. The master activator of *incA/C* conjugative plasmids stimulates genomic islands and multidrug resistance dissemination [J]. PLoS Genet, 2014, 10(10): e1004714.
- [3] Li YJ, Dai EH, Cui YJ, et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China [J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2166. DOI: 10.1371/journal.pone.0002166.
- [4] 赵宏群, 占堆, 阮水良, 等. 西藏自治区 2009—2011 年鼠疫耶尔森菌分离株的生化特征[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2017, 28(2): 175-176, 187.
- [5] 杨晓艳, 辛有全, 魏柏青, 等. 西藏藏南地区新增疫源县鼠疫菌病原学分析及流行病学意义[J]. 中华地方病学杂志, 2015, 34(4): 247-249. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4255.2015.04.005.
- [6] 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.
- [7] 西绕若登, 李景中, 洛桑群增, 等. 西藏鼠疫流行现状与青藏铁路沿线鼠疫预防控制对策[J]. 中国地方病防治杂志, 2008, 23(3): 198-200.
- [8] 王国钧, 李敏, 郑谊, 等. 环丙沙星治疗家兔实验感染鼠疫疗效观察[J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24(5): 564-565.
- [9] 卫生部应急办公室. 鼠疫防控应急手册[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 142.
- [10] Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid[J]. N Engl J Med, 1997, 337(10): 677-681.
- [11] Guiyoule A, Gerbaud G, Buchrieser C, et al. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(1): 43-48.
- [12] Chanteau S, Ratsitorahina M, Rahalison L, et al. Current epidemiology of human plague in Madagascar [J]. Microbes Infect, 2000, 2(1): 25-31.
- [13] Dennis DT, Hughes JM. Multidrug resistance in plague[J]. N Engl J Med, 1997, 337(10): 702-704.
- [14] Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk [J]. PLoS One, 2007, 2(3): e309. DOI: 10.1371/journal.pone.0000309.
- [15] Hinnebusch BJ, Rosso ML, Schwan TG, et al. High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut[J]. Mol Microbiol, 2002, 46(2): 349-354.
- [16] Wagner DM, Runberg J, Vogler AJ, et al. No Resistance plasmid in *Yersinia pestis*, North America[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(5): 885-887. DOI: 10.3201/eid1605.090892.

收稿日期: 2017-08-27