

## · 调查报告与分析 ·

# 2019—2022 年宁夏回族自治区炭疽时空聚集性及炭疽芽孢杆菌分子分型分析

洗然<sup>1,2</sup>, 杨聪<sup>1</sup>, 高建炜<sup>1</sup>, 高磊<sup>1,2</sup>, 陈倩<sup>1,2</sup>, 赵瑜<sup>2</sup>, 蒯文和<sup>1</sup>, 樊浩浩<sup>1,2</sup>, 李筱笛<sup>1,2</sup>, 马江涛<sup>1</sup>

1. 宁夏回族自治区疾病预防控制中心, 银川 750004;

2. 宁夏医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 银川 750001

通信作者: 马江涛, E-mail: [nxcdcmjt@sina.com](mailto:nxcdcmjt@sina.com)

**【摘要】目的** 对 2019—2022 年宁夏回族自治区炭疽病例进行时空聚集性分析和同时期分离的 14 株炭疽芽孢杆菌进行分子分型分析。**方法** 收集宁夏回族自治区 2019—2022 年发生的炭疽病例资料, 以区县为单位应用 SaTScan 软件进行时空聚类分析; 对 2019—2021 年分离的全部 14 株炭疽芽孢杆菌采用 CanSNPs、MLVA-25、SNR-4 方法进行分子分型分析。**结果** 2019—2022 年宁夏回族自治区共报告炭疽病 80 例, 均为皮肤炭疽病例。SaTScan 时空聚类分析显示, 2021 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日在宁夏中北部存在时空聚集区, 其中永宁县存在一类聚集区 ( $P < 0.01$ ,  $RR = 13.83$ ), 同期在灵武市和吴忠市利通区存在二类聚集区 ( $P = 0.022$ ,  $RR = 3.47$ )。同时期分离的 14 株炭疽芽孢杆菌的遗传关系被定义为: A.Br 001/002 亚群、A3.b 基因簇内 6 种不同的 MLVA 基因型, 其中存在 3 个共享基因型, 并分别被 SNR-4 分析定义为 2、3、5 种 PHANA 基因型; SNR-4 分析显示有 12 种 SNR 基因型。**结论** 2019—2022 年宁夏回族自治区炭疽病发病率呈上升趋势。2021—2022 年形成炭疽病的时空聚集区的原因之一可能是自然疫源地形成和发展。通过分子分型发现, 2019—2022 年宁夏回族自治区分离出的菌株遗传关系较为单一, 同一遗传关系下遗传多样性丰富。

**【关键词】** 炭疽; MLVA-25; CanSNPs; SNR-4; 时空聚类分析; 宁夏回族自治区

## Spatiotemporal clustering of anthrax and molecular typing of *Bacillus anthracis* in Ningxia Hui Autonomous Region, 2019 – 2022

XIAN Ran<sup>1,2</sup>, YANG Cong<sup>1</sup>, GAO Jianwei<sup>1</sup>, GAO Lei<sup>1,2</sup>, CHEN Qian<sup>1,2</sup>, ZHAO Yu<sup>2</sup>, KUAI Wenhe<sup>1</sup>, FAN Haohao<sup>1,2</sup>, LI Xiaodi<sup>1,2</sup>, MA Jiangtao<sup>1</sup> (1. Ningxia Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China)

Corresponding author: MA Jiangtao, E-mail: [nxcdcmjt@sina.com](mailto:nxcdcmjt@sina.com)

**【Abstract】 Objective** To analyze the spatiotemporal clustering of anthrax cases in the Ningxia Hui Autonomous Region from 2019 to 2022 and to perform molecular typing of 14 strains of *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) isolated during the same period. **Methods** Data on anthrax cases reported in Ningxia Hui Autonomous Region (Ningxia) from 2019 to 2022 were collected, and spatiotemporal cluster analysis was performed using SaTScan software with districts and counties as units. A total of 14 strains of *B. anthracis* isolated from local anthrax cases from 2019 to 2021 were subjected to molecular typing analysis using canonical single nucleotide polymorphisms (CanSNPs), twenty-five marker multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA-25), and single nucleotide repeat (SNR-4) methods. **Results** A total of 80 anthrax cases, all of which were cutaneous anthrax, were reported in Ningxia during the 3-year period. SaTScan spatiotemporal cluster analysis revealed a spatiotemporal cluster in north-central Ningxia from 2021 to 2022, with a primary cluster in Yongning county [ $P < 0.01$ , relative risk ( $RR$ ) = 13.83] and secondary clusters in Lingwu city and Litong district ( $P = 0.022$ ,  $RR = 3.47$ ). The genetic relationships of the 14 *B. anthracis* strains isolated during the same period were defined as: A.Br 001/002 subgroup, 6 different MLVA genotypes within A3.b gene cluster, of which 3 common genotypes were defined as 2, 3, and 5 PHANA genotypes, respectively, by SNR-4 analysis; SNR-4 analysis showed 12 SNR genotypes. **Conclusion** The incidence of anthrax in Ningxia showed an increasing trend from 2019 to 2022. One of the reasons for the formation of spatiotemporal clusters of anthrax in 2021 – 2022 may be the formation and development of natural foci. Molecular typing revealed that the genetic relationship of the strains isolated in Ningxia from 2019 to 2022 was relatively homogeneous, with abundant genetic diversity within the same genetic relationship.

**【 Keywords】** anthrax; twenty-five marker multi-locus variable number tandem repeat analysis; canonical single nucleotide polymorphisms; single nucleotide repeat; spatiotemporal cluster analysis; Ningxia Hui Autonomous Region



炭疽病例在全球范围内均可发生, 每年全球估计报告 20 000~100 000 例, 主要发生在贫穷的农村地区<sup>[1]</sup>, 95% 以上的炭疽病例为皮肤炭疽<sup>[2-3]</sup>。研究显示, 中国炭疽流行时间和地域特征明显, 1955—2014 年共报告病例 120 111 例, 其中 99.7% 的病例为皮肤炭疽, 主要集中于东北、中部、西南和南部地区<sup>[4]</sup>。2015—2022 年每年的报告病例均在 400 例以下, 主要集中于西部和东北地区<sup>[5]</sup>。为探讨宁夏回族自治区炭疽的时空分布与分子遗传学的关系, 本研究采取回顾性研究方法, 对 2019—2022 年宁夏回族自治区报告的炭疽病例进行时空聚集分析, 确定病例间是否存在关联性; 同时, 对分离的 14 株炭疽芽孢杆菌进行分子流行病学分析, 确定炭疽芽孢杆菌的遗传关系和遗传多样性。

## 1 对象与方法

**1.1 对象** 2019—2022 年确诊炭疽病例为宁夏回族自治区全区各医疗机构收诊并由宁夏回族自治区疾病预防控制中心人兽共患病实验室确诊的病例, 病例确诊过程为: 首先由各级医疗机构根据患者的临床症状和流行病学史确定为炭疽疑似病例后上报各级疾病预防控制中心并由专业人员采样后送至自治区疾病预防控制中心对病例进行最终确认。本研究时空聚类分析数据包含: 各区/县炭疽病发病数和宁夏地区病例数(按月份分布), 以及研究期间宁夏地区炭疽病的报告发病率均由传染病监测系统获取。病例样本检测在宁夏回族自治区疾控预防控制中心实验室由专业技术人员完成, 菌株分离培养和基因组核酸提取由专业技术人员在相应等级的生物安全实验室完成, 由已提取的核酸取样培养 24 h 确认无菌后使用。宁夏回族自治区人口学数据 2019—2020 年由 WorldPop 数据库获取<sup>[6]</sup>, 2021—2022 年由联合国平均年变化率推导获取。

**1.2 主要实验仪器与试剂** DNA 提取试剂为 QIAamp® DAN Mini kit (QIAGEN, Germany) 根据使用说明提取基因组核酸, 扩增体系使用的酶反应混合液试剂为 TaKaRa Premix Taq™ (日本 Takara Bio Inc 公司), 无菌水(北京全式金生物股份有限公司), 常规 PCR 扩增仪: S1000™ Thermal Cycler (美国 Bio-RAD 公司), 无盖 96 孔板(美国 Applied Biosystems 公司)执行扩增程序, 96 孔板封口膜(美国 Applied Biosystems, USA), RT-PCR 仪: QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 炭疽芽孢杆菌分子分型的引物参考 MLVA-25<sup>[7]</sup>、SNR-4<sup>[8]</sup>、CanSNPs<sup>[9-10]</sup> 和探针 CanSNPs<sup>[10]</sup>, 均由上海生工生物公司合成。

## 1.3 方法

**1.3.1 SaTScan 时空聚类分析<sup>[11-12]</sup>** 为分析病例时空流行病学特征, 使用 SaTScan 10.1.2 软件进行聚类分析, 以确定其存在统计学差异的时空聚集区。聚类分析中, 选择“Space-Time”扫描类型和“Poisson”模型, 以年份为时空步长, 以危险人群系数(15%、25%、50%)作为 3 个搜索圈的最大直径<sup>[13-14]</sup>, 以每个区县质心的经纬度作为位置<sup>[13]</sup>, 由 GeoDa 1.20 提取质心, 最后由历史资料中病例精确到区县的住址, 将病例信息与时空模型进行关联, 重复 999 次,  $\alpha = 0.05$ 。由对数似然比(log-likelihood ratio, *LLR*)确定聚集区类别, *LLR* 值最大且有统计学意义的为一类聚集区; 其余有统计学意义的较小 *LLR* 值的为二类聚集区, 并以此类推。SaTScan 时空聚类分析的原理是: 在研究的地理区域建立动态变化的圆柱形扫描窗口, 其中底面对应研究的地理区域, 高对应时空步长, 底面直径对应扫描的危险人群系数, 扫描窗口的位置和大小随着空间和时间进行动态变化, 由窗口内外区域空间单元的预期发病数与实际发病数一起构造 *LLR* 值并进行统计学检验。

**1.3.2 分子分型** 采用单核苷酸多态性分析方法(canonical single nucleotide polymorphisms, CanSNPs)<sup>[10]</sup>, 根据 RT-PCR 仪反馈的荧光信号对照探针序列确定菌株在系统发育树上所属群或组; 采用多位点可变数目串联重复序列分析方法(twenty-five marker multi-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA-25)<sup>[7]</sup>, 确定菌株基因型别; 采用单核苷酸重复序列分析方法(single nucleotide repeat, SNR-4)<sup>[15]</sup>, 区分菌株的遗传多样性。上述后 2 种方法中, 由 PCR 扩增后得到的产物, 经琼脂凝胶电泳确定存在目标条带(确认目标基因扩增成功)后, 委托上海生工生物公司进行毛细管电泳以确定基因位点的片段大小, 每批次毛细管电泳通过 A<sub>1</sub>~H<sub>1</sub> 的产物测序对该批次结果进行矫正, 同时要求毛细管电泳检测的扩增产物的检测峰值  $\geq 400$  RFU。

MLVA-25 分析中可变串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)依据 Lista<sup>[7]</sup> 提出的数字编码约定, 根据序列长度、重复单元大小推断重复单元重复数, 当重复单元为非整数时取最接近的整数值<sup>[16]</sup>。MLVA-25 和 SNR-4 的数据由 BioNumerics 7.6 处理, 使用的统计模型为: 算术平均未加权对组法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)和最小生成树(minimum spanning tree, MST)。使用辛普森指数(多样性指数)<sup>[17]</sup>(diversity index, DI)计算菌株各基因位点的遗传多样性, DI 值为 0 表示该基因位点基因类型相同。



续表 3  
Table 3 Continued

基因位点	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	DI
Bams05	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0.000
Bams13	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	0.000
Bams15	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	0.000
Bams21	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0.000
Bams22	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0.000
Bams23	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0.000
Bams24	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0.000
Bams25	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	0.000
Bams28	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	0.000
Bams30	54	54	54	54	57	57	57	54	57	54	54	57	57	57	0.538
Bams31	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	0.000
Bams34	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0.000
Bams44	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0.000
Bams51	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0.000
Bams53	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0.000
CL10	556	556	555	556	556	557	557	557	556	556	557	557	556	557	0.604
CL12	566	566	565	565	565	565	567	566	565	565	561	565	565	565	0.571
CL33	712	711	710	708	707	700	700	700	709	708	706	709	710	709	0.912
CL35	636	637	637	637	637	641	641	640	637	637	636	637	637	637	0.582

注:1~14为炭疽芽孢杆菌编号,按BA2019001~2、BA2020001~2、BA2021001~5、BA2022001~5顺序排列。

## 2.4 分子分型分析(表 4)

2.4.1 单核苷酸多态性分析(CanSNPs) 14 株炭疽芽孢杆菌均为 A.Br 001/002 亚群。

2.4.2 多位点可变数目串联重复序列(MLVA-25)和单核苷酸重复序列分析(SNR-4)(图 1、2) 使用 BioNumerics 7.6 的 UPGMA 模型获得图 1、2: 由图 1 可见,14 株炭疽芽孢杆菌高度同源性并聚在 A 大类,归属于 A.3b 类基因簇的 6 种 MLVA25 基因型:以 BA2021002/3/4 亲缘关系相近的一个亚群 [BA2021002/3 共享同一基因型(记为 01)],剩余的菌株组成另一个亚群 BA2021001、BA2022003/4 共享同一基因型(记为 02); BA2019001/2、BA2020001/2、BA2022001/2 共享同一基因型(记为 03)。由图 2 可见,共享基因型 01、02 被 SNR-4 分为 2 种和 3 种 PHRANA 基因型;共享基因型 03 被 SNR-4 分为 5 种 PHRANA 基因型,其中 BA2020002、BA2022001 共享同一基因型。由分子分型分析发现,14 株炭疽芽孢杆菌为 A.Br.001/002 亚群,单一的 A.3b 类基因簇下的 6 种 MLVA-25 基因型,3 个共享基因型分别被分为 2、3 和 5 中 PHARNA 基因型,表明 2019—2022 年宁夏地区炭疽芽孢杆菌的遗传关系单一,但在同一遗传关系下存在较为丰富的遗传

多样性。

2.4.3 单核苷酸重复序列分析(SNR-4)(图 3) 使用 BioNumerics 7.6 的 UPGMA 和 MST 模型获得图 3。由图 3A 可见,对 14 株菌株进行 SNR-4 分子分型和聚类分析后发现,14 株炭疽芽孢杆菌被定义为 12 个 SNR 基因型(4 个位点完全相同定义为同一基因型)。14 株炭疽芽孢杆菌被定义为 A、B 两群,其中 A 群菌株为 A1、A2 和 A3 亚群。14 株菌株中:A1 亚群菌株 9 株,占 64.29%(存在 2 种共享基因型);其次是 A2 亚群菌株,共 3 株(21.43%);最后为 1 株(7.14%) A3 亚群菌株。B 群菌株 1 株(7.14%)。由图 3B 和图 3C 可见,14 株菌株中存在 12 个基因型,6 个基因型划分为 1 群,2 个基因型划分为 1 群,余 4 个单独的基因型。除 2019 年分离出的菌株之外,2020、2021、2022 年的菌株形成了一个遗传关系较近的克隆群(将遗传距离为 1 的菌株定义为同一克隆群菌株);利通区 2021 年分离的 2 株菌株形成另一个克隆群。结合 MLVA-25 分析发现同一年份、同一地区的菌株基因型相同或是亲缘关系相近,表明宁夏地区炭疽芽孢杆菌具有一定的时间、地域聚集性。

表 4 14 株炭疽芽孢杆菌 SNP 位点变异情况

Table 4 CanSNPs-based SNP site variation in 14 *Bacillus anthracis* strains isolated from 80 anthrax cases diagnosed in Ningxia Hui Autonomous Region from 2019 to 2022

SNP 位点	A.Br 001	A.Br 002	A.Br 003	A.Br 004	A.Br 006	A.Br 007	A.Br 008	A.Br 009	B.Br 001	B.Br 002	B.Br 003	B.Br 004	A/B.Br 001
检测结果	T	A	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A

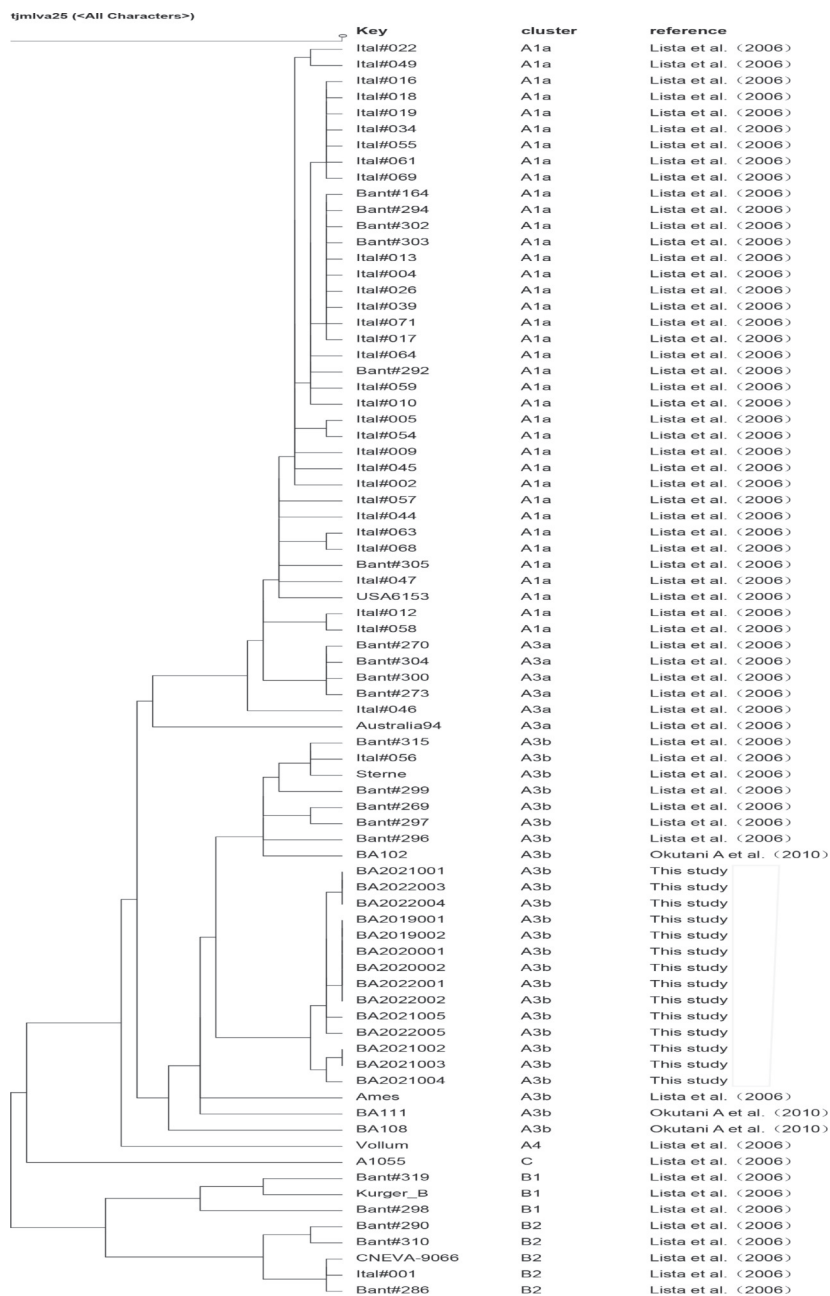
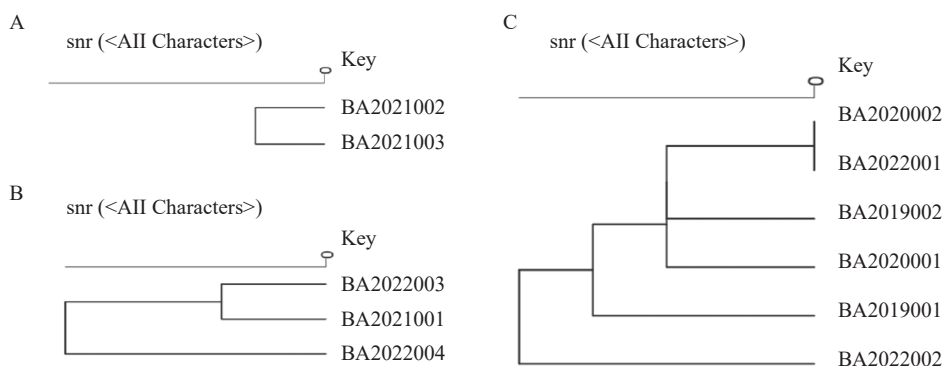


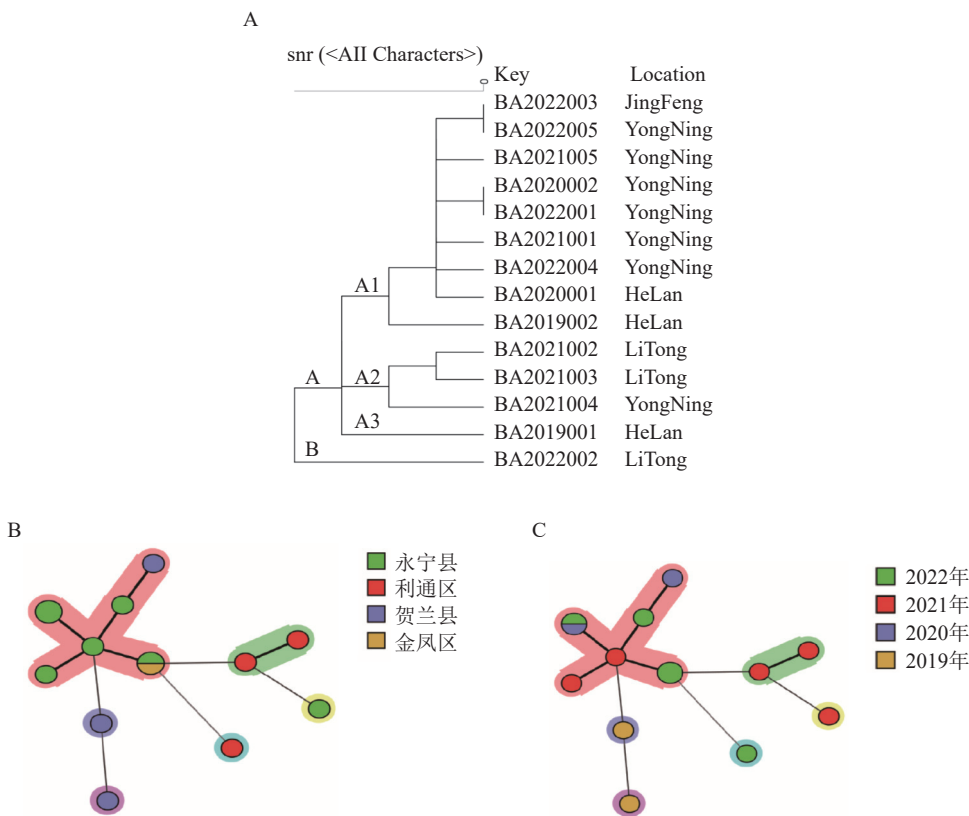
图 1 78 株炭疽芽孢杆菌的 MLVA-25 聚类分析  
 Fig. 1 Cluster of 78 *Bacillus anthracis* strains based on MLVA-25 analysis



注: A: 共享基因型 01; B: 共享基因型 02; C: 共享基因型 03。

图 2 相同 MLVA25 基因型菌株的 SNR-4 聚类分析

Fig. 2 Cluster of 14 *Bacillus anthracis* strains with identical MLVA-25 genotypes isolated from 80 anthrax cases diagnosed in Ningxia Hui Autonomous Region from 2019 to 2022: SNR-4 analysis (A, B, and C indicate common genotypes of 01, 02, and 03)



注: A: 14 株炭疽芽孢杆菌的 SNR-4 聚类分析, 使用 UPGMA 模型; B: 14 株炭疽芽孢杆菌的 SNR-4 最小生成树分析, 以地区为分组依据; C: 14 株炭疽芽孢杆菌的 SNR-4 最小生成树分析, 以年份为分组依据。

图 3 14 株炭疽芽孢杆菌 SNR-4 分析

**Fig. 3** SNR-4 analysis of 14 *Bacillus anthracis* strains isolated from 80 anthrax cases diagnosed in Ningxia Hui Autonomous Region from 2019 to 2022: A: UPGMA model-based cluster analysis, B: region-specific maximum likelihood tree analysis, and C: year-specific maximum likelihood tree analysis.

### 3 讨论

炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)是一种革兰氏阳性大杆菌,属于芽孢杆菌属,是广义蜡样芽孢杆菌组(*Bacillus cereus sensu lato*)的一员<sup>[18-20]</sup>,各菌株之间基因组高度相似<sup>[9, 21-23]</sup>,因此常用的细菌学分型手段[如脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(multi-locus sequence typing, MLST)],不易区分炭疽芽孢杆菌,需要特殊的分子分型方法,且应用的分子分型的标记基因的突变率低时不易区分,而高突变率的标记基因可能会造成高同质性的困扰,因此 Keim<sup>[9]</sup>提出使用核酸层级递进分析(progressive hierarchical resolving assays using nucleic acids, PHRANA),该方法由 CanSNPs 建立系统发育组,而后 MLVA 进行基因分型,最后 SNR 区分密切相关的菌株。该方法不仅可以增加菌株分辨率,还减少因使用高突变率标记基因带来的高同质性问题。SNR-4 基于炭疽芽孢杆菌基因组内 DI 最高的位点用于区分亲缘关系相近的菌株之间的遗传多样性<sup>[8]</sup>;而 MLVA-25 基于基因组内稳定遗传的 VNTR 位点<sup>[9]</sup>,用于定义不同菌株的基因型,因此 2 种分子分型方法将相同的 14 株菌株分

为了不一致的基因型,造成这种差异最主要的原因检测位点之间的不同,但 2 种检测方法最终都将大多数同一地区、同一年份的菌株归于相同的基因型或相近的亲缘关系。虽然不同研究中 MLVA 编码方式不同,且 Ames Ancestor、Ames、Sterne 等分子分型常用菌株的分子分型各基因位点的片段已知并被应用于多种研究中<sup>[24-25]</sup>,结合已发表的研究就可以推断出相应的编码方式,再对原始数据进行转换。由于本次研究纳入了 Lista、Okutani 等人<sup>[7, 26]</sup>的研究数据,为了研究的便利性使用 Lista 的编码约定。

2004—2018 年宁夏回族自治区炭疽病为较低水平的散发,年均报告率 0.11/10 万<sup>[27]</sup>,在 2018 年后逐年增加:2019 年(0.26/10 万, 19 例)、2020 年(0.14/10 万, 10 例)、2021 年(0.32/10 万, 23 例)和 2022 年(0.37/10 万, 28 例),报告炭疽病例呈上升趋势。SaTScan 时空聚类分析发现,在宁夏中北部地区发现炭疽病例的时空聚集区:一类和二类聚集发生期间(2021—2022 年)聚集区病例占总病例的 38.75%,时空聚集区所属区县在整个研究期间病例数占总病例的 47.5%,发生时空聚集期间炭疽病例缓慢上升。由于一类和二类聚集区相邻和聚集区的持续时间可以推断:常年发

生炭疽病的区域更易再次发生炭疽病并影响邻近区县,这与传染性炭疽病可以影响周边地区以及炭疽可以通过贸易途径传播和炭疽病可周期性发生的结论吻合<sup>[28-31]</sup>,而快速发展的畜牧业和密集的人口流动可能是相邻区域相互影响的基础。因此必须针对以上情况开展公共卫生、兽医基础措施,如对动物接种炭疽疫苗和加强监测(如在高发月份开展主动监测)和采取宣传教育工作等措施<sup>[13,28]</sup>。由于根除土壤中的炭疽芽孢已被证明是难以完成的任务<sup>[28]</sup>,而在炭疽高发月份通过加强监测工作以控制疫情已在欧洲、美国、澳大利亚被证明是可行的<sup>[32-34]</sup>,且炭疽芽孢可以在土壤中存在数十年<sup>[28]</sup>,因此开展时空分布研究,识别炭疽病的聚集区域可以为决策者提供关键理论数据<sup>[35-36]</sup>。

CanSNPs 将本研究分离的 14 株炭疽芽孢杆菌归为 A.Br.001/002 亚群,相关研究表明该亚群为中国境内最常见的亚群<sup>[31,37-38]</sup>,在中国境内长期存在和广泛进化,借炭疽病的发生而蔓延至全中国境内。A3.b 类基因簇的炭疽芽孢杆菌在世界范围内大范围流行并导致了大规模流行病疫情<sup>[26,39]</sup>。在中国,A3.b 类基因簇的炭疽芽孢杆菌分布几乎遍及全国<sup>[40]</sup>,该基因型的菌株通过牲畜贸易等途径蔓延至全中国,如 2016 年甘肃岷县由牛羊贸易而发生的炭疽疫情<sup>[41]</sup>。MLVA-25 将 14 株炭疽芽孢杆菌归类为 A3.b 类基因簇中的 6 种基因型,其中 3 种共享基因型菌株分别被 SNR 定义为 2、3、5 种 PHRANA 基因型,表明以 A3.b 类基因簇为代表的炭疽芽孢杆菌是宁夏地区的本地流行株,且在同一遗传关系下基因多样性非常丰富,原因可能是该类基因簇的长期存在并反复致病而导致了变异的产生。对 14 株菌株进行的 SNR-4 分析也佐证了这一观点:14 株炭疽芽孢杆菌被划分为 12 种 SNR 基因型,几乎每一株菌株之间的 SNR 位点均发生了变异,因此 4 个位点的 DI 均很高。由分子分型技术发现菌株之间具有一定的地域和时间聚集性,如 MLVA-25 和 SNR-4 分析均发现分离年份、地域相同的菌株之间基因型相同或是亲缘关系相近,如共享基因型 01 系列的菌株,流行病学信息显示,其分离地区相同、分离时间相近,如此表明同一种基因型的炭疽芽孢杆菌在同一地区形成疫源地后,在一定时期内反复暴发造成炭疽疫情。而由于炭疽芽孢杆菌的多次暴发或芽孢在适宜的环境中复苏<sup>[22]</sup>,导致了相同遗传关系下遗传多样性较高,如 A 群中 A3 (BA2019001)、A1 (BA2019002) 亚群的 2 株菌株为同一疫情中不同感染者分离的菌株,经聚类分析发现,虽然这 2 株属于同一 MLVA 基因型,但

仍然被 SNR 分析分为不同的 PHRANA 基因型,推测菌株可能起源于过去不同的疫情或是同一菌株变异形成。

MLVA-25 分析中共享基因型 03 系列的菌株不仅来自于 3 个不同地区,其分离时间也来自不同的年份,由于流行病学信息不足以推断传播路径,因此推测炭疽芽孢杆菌在这 3 个地区(贺兰县、永宁县、利通区)传播或是这些地区的菌株均源于同一个祖先经遗传变异后才产生的不同,由于不完全的终末消毒而形成疫源地并经过发展后在环境条件允许的情况下再次感染人或动物,最终导致大量炭疽病例的聚集;共享基因型 02 系列的菌株则提示永宁县与金凤区之间存在菌株的相互传播。SNR-4 分析发现的共享基因型菌株 BA2020002 和 BA2022001 进一步佐证了第 1 条假设的可信度,而共享基因型菌株 BA2022003/5 亦进一步证明了第 2 条假设的可信度。上述表明在宁夏地区传播的炭疽芽孢杆菌株属于本土已存在的菌株(在条件允许的情况下再次复苏并感染引起疾病)。

SaTScan 时空聚类分析结合分子分型分析发现,2019 年的炭疽芽孢杆菌相互之间遗传距离相隔较远,同时与其他年份的菌株之间的遗传距离也较远,而部分 2020—2022 年分离出炭疽芽孢杆菌形成了一个主要的克隆群,2021 年的 2 株菌株单独形成的次要克隆群,这 2 个克隆群中的菌株的主要分离地位于同一县区或位于相邻县区,具有较强的地域聚集性,且主要克隆群是由不同年份的菌株构成。上述表明这些地区近年来炭疽病的发生具有关联性,表明炭疽芽孢杆菌菌株由原先在不同区域的独立散发转化为由畜牧贸易或是人员交流而造成了跨区域的传播并形成疫源地(经分析表明,BA2020002 和 BA2022001 的 MLVA-25 基因型相同,4 个 SNR 位点亦相同,且分离地点均为永宁县,但感染引起疾病的时间不同,这些说明永宁县在不同年份存在由相同菌株引起的炭疽病,表明永宁县存在炭疽芽孢杆菌的自然疫源地),这是导致炭疽病例在 2021—2022 年形成时空聚集星团的可能原因。疫源地形成可能的原因:炭疽芽孢杆菌在外环境中产生能长期存在的芽孢,在 6—9 月(温暖、多雨、潮湿月份)由地面浅表或深埋地下转为暴露在环境中,导致食草动物感染再引起人的感染或借助大量繁殖的嗜尸性苍蝇而造成的炭疽病的暴发并造成疫源地扩大,因此这些地区报告了大量的炭疽病<sup>[28,42]</sup>。虽然宁夏地区尚无嗜尸性苍蝇传播炭疽的直接证据,但宁夏地区现存的嗜尸性苍蝇物种<sup>[43]</sup>,在美国得克萨斯州的研究中被证实可携带和储

存炭疽芽孢杆菌<sup>[44]</sup>。2019—2020 年或更早时期,宁夏地区炭疽为独立散发,但是隐匿传播链的存在加上疫源地终末消毒不充分或牲畜尸体处理不规范,导致环境中残留了芽孢并形成疫源地;2021—2022 年残留的芽孢在适宜的环境条件下复苏并感染人或牲畜导致炭疽病在某一地区大规模流行。同时随着暴发导致 4 个 SNR 基因座不同程度的插入和缺失,形成了同一遗传关系下丰富的遗传多样性的炭疽芽孢杆菌种群。

2019—2022 年宁夏回族自治区炭疽病发病率呈上升趋势,2021—2022 年导致炭疽病的时空聚集区的原因是自然疫源地的形成。对同时段分离的 14 株炭疽芽孢杆菌的分子分型发现,2019—2022 年宁夏地区分离出的菌株遗传关系较为单一,在相同遗传关系下遗传多样性丰富。同时本次研究建立了宁夏地区炭疽芽孢杆菌的遗传基线,可以为未来炭疽的分子溯源和法医学工作提供帮助。因此,应当在自然疫源地的地区开展持续性的牲畜疫苗接种计划,在人类炭疽病聚集地区开展持续性的公共卫生监测以及在炭疽病高发月份开展主动监测以控制炭疽病的流行。

## 参考文献

- [1] Swartz MN. Recognition and management of anthrax – an update [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(22): 1621–1626.
- [2] Vieira AR, Salzer JS, Traxler RM, et al. Enhancing surveillance and diagnostics in anthrax-endemic countries[J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(13): S147–S153.
- [3] 石有昌, 孙立华, 孙英伟, 等. 辽宁省 2001 年炭疽流行特征及流行因素分析 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(6): 715–716.
- [4] Li Y, Yin W, Hugh-Jones M, et al. Epidemiology of human anthrax in China, 1955–2014[J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(1): 14–21.
- [5] 吴萌萌, 张栋良, 孙彩虹, 等. 2015—2020 年全国炭疽流行统计分析 [J]. *畜牧兽医杂志*, 2022, 41(6): 45–51.
- [6] Lloyd CT, Chamberlain H, Kerr D, et al. Global spatio-temporally harmonised datasets for producing high-resolution gridded population distribution datasets[J]. *Big Earth Data*, 2019, 3(2): 108–139.
- [7] Lista F, Faggioni G, Valjevac S, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis[J]. *BMC Microbiol*, 2006, 6: 33.
- [8] Kenefic LJ, Beaudry J, Trim C, et al. A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis*[J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 73(3): 269–272.
- [9] Keim P, Van Ert MN, Pearson T, et al. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales[J]. *Infect Genet Evol*, 2004, 4(3): 205–213.
- [10] Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*[J]. *PLoS One*, 2007, 2(5): e461.
- [11] Jung I, Kulldorff M, Richard OJ. A spatial scan statistic for multinomial data[J]. *Stat Med*, 2010, 29(18): 1910–1918.
- [12] Kulldorff M, Heffernan R, Hartman J, et al. A space-time permutation scan statistic for disease outbreak detection[J]. *PLoS Med*, 2005, 2(3): e59.
- [13] Tan LM, Hung DN, My DT, et al. Spatial analysis of human and livestock anthrax in Dien Bien province, Vietnam (2010–2019) and the significance of anthrax vaccination in livestock[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, 16(12): e0010942.
- [14] Luong T, Nguyen TT, Trinh VB, et al. Informing one health anthrax surveillance and vaccination strategy from spatial analysis of anthrax in humans and livestock in Ha Giang Province, Vietnam (1999–2020)[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2023, 108(3): 492–502.
- [15] Garofolo G, Ciammaruconi A, Fasanella A, et al. SNR analysis: molecular investigation of an anthrax epidemic[J]. *BMC Vet Res*, 2010, 6: 11.
- [16] Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 551: 141–158.
- [17] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity[J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(11): 2465–2466.
- [18] Datta KK, Singh J. Anthrax[J]. *Indian J Pediatr*, 2002, 69(1): 49–56.
- [19] Woese CR. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself[J]. *Microbiol Rev*, 1994, 58(1): 1–9.
- [20] Moore ER, Mihaylova SA, Vandamme P, et al. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons[J]. *Res Microbiol*, 2010, 161(6): 430–438.
- [21] Pilo P, Frey J. *Bacillus anthracis*: molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution[J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(6): 1218–1224.
- [22] Kim K, Cheon E, Wheeler KE, et al. Determination of the most closely related bacillus isolates to *Bacillus anthracis* by multilocus sequence typing[J]. *Yale J Biol Med*, 2005, 78(1): 1–14.
- [23] Keim P, Kalif A, Schupp J, et al. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(3): 818–824.
- [24] Beyer W, Bellan S, Eberle G, et al. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(3): e1534.
- [25] Thierry S, Tourterel C, Le Fleche P, et al. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e95131.
- [26] Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, et al. Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism[J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(1): 93–97.
- [27] 李涛, 李红, 马岳, 等. 2004—2018 年宁夏皮肤炭疽流行病学分析 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2020, 42(4): 404–407.
- [28] Carlson CJ, Getz WM, Kausrud KL, et al. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*)[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018, 93(4): 1813–1831.
- [29] Turner WC, Kausrud KL, Krishnappa YS, et al. Fatal attraction: vegetation responses to nutrient inputs attract herbivores to infectious anthrax carcass sites[J]. *Proc Biol Sci*, 2014, 281(1795): 1813–1831.

- 20141785.
- [ 30 ] Hu W, Clements A, Williams G, et al. Spatial analysis of notified dengue fever infections[J]. *Epidemiol Infect*, 2011, 139(3): 391 – 399.
- [ 31 ] Simonson TS, Okinaka RT, Wang B, et al. *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages[J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9(1): 71
- [ 32 ] Blackburn JK, McNyset KM, Curtis A, et al. Modeling the geographic distribution of *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax disease, for the contiguous United States using predictive ecological [corrected] niche modeling[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77(6): 1103 – 1110.
- [ 33 ] Barro AS, Fegan M, Moloney B, et al. Redefining the Australian anthrax belt: modeling the ecological niche and predicting the geographic distribution of *Bacillus anthracis*[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(6): e0004689.
- [ 34 ] Mullins JC, Garofolo G, Van Ert M, et al. Ecological niche modeling of *Bacillus anthracis* on three continents: evidence for genetic-ecological divergence?[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72451.
- [ 35 ] Hampson K, Lembo T, Bessell P, et al. Predictability of anthrax infection in the Serengeti, Tanzania[J]. *J Appl Ecol*, 2011, 48(6): 1333 – 1344.
- [ 36 ] Gachohi J, Bett B, Otieno F, et al. Anthrax hotspot mapping in Kenya support establishing a sustainable two-phase elimination program targeting less than 6% of the country landmass[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 21670.
- [ 37 ] Wang D, Wang B, Zhu L, et al. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis[J]. *Microbiol Res*, 2020, 233: 126414.
- [ 38 ] Chen WJ, Lai SJ, Yang Y, et al. Mapping the distribution of anthrax in Chinese mainland, 2005 – 2013[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(4): e0004637.
- [ 39 ] Jung KH, Kim SH, Kim SK, et al. Genetic populations of *Bacillus anthracis* isolates from Korea[J]. *J Vet Sci*, 2012, 13(4): 385 – 393.
- [ 40 ] 王秉翔, Smith KL, CK, 等. 中国的炭疽杆菌 DNA 分型及其地理分布 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2002(1): 14 – 17.
- [ 41 ] Yu D, He J, Zhang E, et al. Investigation and source-tracing of an anthrax outbreak in Gansu Province, China[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0203267.
- [ 42 ] Blackburn JK, Van Ert M, Mullins JC, et al. The necrophagous fly anthrax transmission pathway: empirical and genetic evidence from wildlife epizootics[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2014, 14(8): 576 – 583.
- [ 43 ] 杨立, 蔡继峰, 文继舫, 等. 中国 14 省不同地区常见嗜尸性苍蝇 mtDNA 中 CO I 基因序列检测 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2010, 35(8): 819 – 825.
- [ 44 ] Blackburn JK, Curtis A, Hadfield TL, et al. Confirmation of *Bacillus anthracis* from flesh-eating flies collected during a West Texas anthrax season[J]. *J Wildl Dis*, 2010, 46(3): 918 – 922.