

土拉弗氏菌研究进展

翟俊辉 崔红 杨瑞馥

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

1 概述

土拉弗氏菌(*Francisella tularensis*, 下称土拉菌)是引起土拉菌病(或称土拉热)的病原体。1912年 McCoy 在美国西部加利福尼亚州研究黄鼠鼠疫时首次在土拉县(Tulare), 从黄鼠(*Citellus beecheyi*)分离出一株新菌种, 根据该地地名命名为土拉菌(*Bacterium tularensis*)。因本菌的某些生物学特征与出血性败血病菌群类似, 亦在啮齿动物中流行, 故长期将其归入巴氏菌属(*Pasteurella*), 1974年 Bergey 对细菌学分类又作了调整, 将土拉菌单独列为弗氏菌属, 正式称为土拉弗氏菌。

根据对家兔的致病力以及分解甘油的能力不同可将土拉菌分为两大变种^[1], 即土拉菌土拉变种(Jellison A型)和土拉菌旧北区变种(Jellison B型)。前者主要见于北美洲, 起源于美国中南部, 是两个变种中间毒性较强的一型。A型依暴露程度的不同会引起不同的临床症状。腺体溃烂是其中最主要的症状(80%), 伴以发热、淋巴结肿大和皮肤侵入部位的溃烂等, 侵入主要由脾、蚊和鹿蝇的叮咬引起; 食入或饮用土拉菌污染的食物和水会引起口咽和胃肠道症状, 气溶胶状态的土拉菌可引起肺部症状。不论接种的途径如何, 土拉菌总是首先侵入淋巴结而后经血液循环播散到全身各个脏器。土拉菌旧北区变种广泛分布于自然界, 多见于欧洲、亚洲和北美洲, 尽管这个变种在芬兰、日本和美国曾有过引起病例的报道, 人们普遍认为它的致病力要大大弱于土拉菌土拉变种。

土拉菌对低温抵抗力强, 可经呼吸道感染, 在气溶胶状态下存活率较高, 常发生实验室感染。

2 土拉弗氏菌的分离

土拉菌为兼性细胞内寄生菌, 只有在加入血、卵黄等营养丰富的培养基上才能生长。在有半胱氨酸的富集培养基上, 土拉菌也得生长 2~4d 才形成 1mm 左右

的菌落, 在普通的血平板或巧克力平板上通常不生长或在 7~10d 内才长出菌落。目前我们通常所用的培养基为 Francis 培养基, 这是一种较为经典的培养基, 其中含有半胱氨酸和兔血。较常用的培养基还有改良 Mueller-Hinton 培养基^[1,2]。

尽管有从血液中分离到土拉菌的报道, 但是美国中部西南地区最近的一个调查结果表明, 只有 13.2% 的实验室确证病例的血中分离到了土拉菌^[3]。实验室确证的手段主要是通过血清学诊断(ELISA 或凝集反应)来证明^[4]。因为临床上并不具备土拉菌培养的各种理想的条件, 所以从病例中初次分离土拉菌的成功率是比较低的。

近几年来人们分离到了几株与经典的土拉菌略有差异的菌株, 其中俄罗斯的 Pavlovich^[5]分离到了一株没有荚膜的菌株, 值得一提的是, 加拿大的一个研究小组报道(1994)他们分离到了七株非半胱氨酸依赖型的土拉菌^[6]。大家都知道土拉菌的培养通常要加入半胱氨酸, 这也几乎成了鉴定土拉菌的一个指标, 但他们从六名患者的身上分离到的这七株菌在普通的巧克力平板上培养 72h, 生长良好。初次分离被认为是嗜血杆菌属的细菌, 后经脂酸成分(CFA)分析和气-液色谱分析鉴定确定是土拉菌。根据这七株菌尚未有引起死亡和实验室感染这一事实分析, 不需半胱氨酸和富集培养基菌株致病力要弱于经典的土拉菌, 因此人们推测土拉菌的毒力可能与地理分布、人工传代^[7]、特殊基因型^[7,8]以及表型的性质有关。虽然其致病力弱, 但在操作时也要在 BL3 级的安全柜中进行。

3 土拉弗氏菌的检测

土拉菌的实验室检验主要是通过检测土拉菌的抗体来实现, 在土拉热初始症状出现 8~10d 后可以进行土拉菌的微凝集试验, 酶联免疫吸附试验(ELISA)的检

测可以比凝集试验早一些并且能检测出组特异性抗体。因为人们能够有效地利用抗生素治疗土拉菌病,所以土拉菌的早期诊断对土拉热的治疗是十分有意义的。

第一个从组织解剖中检出土拉菌抗原的例子是利用荧光抗体来实现的^[9]。最近的一些研究表明用16S rRNA的序列可以鉴定土拉菌^[8],把免疫印迹和特异单抗结合起来的抗原捕捉 ELISA 对于土拉菌的检测也是很有帮助的^[10]。

运用 PCR 技术检测全血中的土拉菌是一个十分敏感的方法。土拉热急性期的诊断是一个十分令人头痛的问题,因为土拉菌的生长十分缓慢。当用特殊的培养基并确知土拉菌的大致浓度时,在理想的实验室条件下可以用细菌培养证明,全血中含有大量的土拉菌而在血浆中含量极少。但临床上很少具备这种理想的条件。从全血中分离到土拉菌的病例不高于 20%。Long 等^[11]用针刺血和实验室感染的小鼠建立了一个土拉菌的 PCR 检测方法。此法检测 A 型和 B 型土拉菌可以达到每微升血 1 个 CFU 的水平。小鼠感染了疫苗株的血标本的有限稀释 PCR 结果与血标本的细菌培养结果一致。

与以上检测方法都不同的是,Geisbert 等^[11]利用免疫电镜(IEM)对土拉菌进行了鉴定,能够从其它四个革兰氏染色阴性的对照菌中明显地区分出土拉菌。作者利用三种免疫电镜检测方法,即阴性对照免疫电镜(nc-IEM, negative control-IEM),预镶嵌免疫电镜(Pre-IEM, Pre-embedding IEM)和后镶嵌免疫电镜(Post-IEM, post-embedding IEM)在 7~48h 内检出了土拉菌。Pre-IEM 对细菌的膜蛋白和内部超微结构的分辨率要高于 nc-IEM 和 Post-IEM,但是,当检测的是组织标本时就显示出了 Post-IEM 的优越性,因为它可以通过金颗粒结合二抗很容易地获得细菌抗原。既然 nc-IEM 可以在 7h 以内就可以区分出土拉菌,所以此法在诊断的特异性和快速性方面显然要优于最近建立的 16S rRNA 分析和抗原捕捉 ELISA 检测。况且 IEM 比其它检测土拉菌的方法都要安全,因为它所用的标本都是经过戊二醛处理的。

4 土拉弗氏菌的免疫学

不论是 80 年代还是 1990~1995 年初,土拉菌的研究大多数还是集中在免疫学研究方面^[2,12~16],其中尤以

前苏联的研究居多,这可能与土拉菌的地理分布有关,例如在我国西北地区如新疆和甘肃土拉热的发病率明显高于其它省份。

长期以来,人们一直认为在对抗土拉菌感染的保护性作用中,细胞免疫起着重要或许是唯一的作用^[2]。对于体液免疫在其中所起的作用人们一直有争议。例如有些报道认为感染土拉菌的小鼠的免疫血清可被动保护新生小鼠免受感染,这又与 Francis 等关于实验动物同源免疫血清对土拉菌没有保护性作用相矛盾^[17]。另外在人类中,免疫血清对土拉菌病的治疗没有效果,人们推测免疫血清的被动免疫可能对毒力较弱的土拉菌有保护作用而对毒力较强的菌株起不到保护作用。所以体液免疫在土拉菌感染过程中的作用还有待于进一步研究。Drabick 等的研究或许能对体液免疫的作用提供一个参考^[2],他们用活菌株(live vaccine strain, LVS)进行人体免疫,然后收集血清,实验室用 ELISA 和蛋白印迹试验(Western blot)证明抗血清在体外可与 LVS 株发生免疫反应。抗血清表面上看来是抗血清直接与 LVS 的脂多糖成分发生反应,实际上发现它也能与土拉菌 Schu4 株整个菌体发生完全的交叉反应。实验表明,混合的抗血清能成功地保护土拉菌 LVS 10 000 个 LD₅₀ 的激发反应。当抗血清被稀释或预先用 LVS 吸附后这种保护性作用就会降低和消失,但预先用大肠杆菌吸附的抗血清其保护作用没有降低,这就证明了抗血清保护的特异性。实验证明了用 LVS 在人体中引起的抗血清可以成功地保护小鼠免受致命剂量土拉菌的感染,至于这种抗血清能否保护人类免受土拉菌的感染还有待于深入的研究。

另外一个关于土拉菌细胞免疫^[12]的研究表明,土拉菌的膜蛋白在已接触过土拉菌抗原的人体 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞中可以诱发 γ -干扰素, γ -干扰素被认为在宿主的防御系统中起着十分重要的作用,它可以促进吞噬细胞的吞噬作用。用 γ -干扰素的单抗处理实验动物后会增加它们对土拉菌的敏感性。最近的一些研究认为,细胞免疫对土拉菌四种抗原的免疫应答主要局限于 CD45RO⁺ 记忆 T 细胞亚群,Sjostedt 等^[12]对免疫应答细胞的表型作了进一步的鉴定,他们用抗原分别刺激纯化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞,发现 CD4⁺ 而不是 CD8⁺ 增殖并分泌 γ 干扰素,实际上当用抗原刺激 3d 并大量提取白细胞分离 CD8⁺ T 细胞时,它们也能产生

与 CD4⁺ T 细胞一样的免疫应答。当加入白细胞介素-2 (IL-2) 时, 纯化的 CD8⁺ T 细胞也产生免疫应答。在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖反应和 γ 干扰素的产量之间有一个直接的定量关系, T 细胞培养物中检测出有 IL-2 存在, 但在 CD4⁺ 中的含量要显著高于 CD8⁺。培养物中没有检测到 IL-4。看来在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的增殖和 γ 干扰素的产量之间有一个直接的关系, 并且 CD8⁺ 的免疫应答似乎依赖于细胞因子和 CD4⁺ 的增殖。

5 土拉弗氏菌的分子生物学

人们对土拉菌的遗传学研究一直进展缓慢^[18~22], 80~90年代关于土拉菌遗传学的研究报告只有两篇^[23, 24], 尤其是对其基因组的了解知之甚少。1990年 Forsman^[8]和 Sjostedt^[18]的研究报告是土拉菌分子生物学研究中的两件大事, Forsman等对土拉菌的 16S rRNA 进行了分析, 通过这一研究可以区分弗氏菌属内的种及土拉菌的两个变种: A型和B型土拉菌。而 Sjostedt等则对土拉菌一个重要的抗原-外膜蛋白的 T 细胞识别位点基因进行了测序。

在患土拉热或注射土拉菌疫苗的人体中, T 细胞能够识别土拉菌一个 17ku 的主要膜蛋白。Sjostedt等^[18]研究了编码这个蛋白的基因。其中的 A+T 丰富的区域可编码一个 149 氨基酸的蛋白, 分子量为 15 772 与预想值吻合。一些研究结果表明 17ku 蛋白质是一个脂蛋白, 同时人们也发现它与大肠杆菌的肽聚糖相关脂蛋白^[7]有高度同源性。十三种涵盖整个蛋白的重叠合成小肽段在土拉菌激发人体的白细胞中作了检验, 发现其中有三个肽段能引起 T 细胞应答, 即刺激白细胞增殖并产生 IL-2 和 γ -干扰素。在五个产生免疫应答的人体中, 只有一个人能对一个以上的肽段发生应答反应。从 T 细胞反应肽段上分离的位点能被鼠源单抗所识别。人们推测此明确的 T 细胞位点与宿主防御土拉菌有关, 因为 γ -干扰素能够增强宿主的杀菌作用。

Forsman 对土拉菌 16S rRNA 的分析对土拉菌的鉴定和分型有很大帮助^[8]。迄今为止, 人们还未找到一个检测土拉菌的较成熟的方法。Forsman 等对土拉菌两个型以及关系较密切的新凶手弗氏菌 (*F. novicida*) 的 16S rRNA 进行了测序。在所分析的 550 个核苷酸序列中, 只在 16S rRNA 的初始序列中发现了一个碱基的差异, 即在所分析 550 个碱基的第七个碱基位置上, 土拉

菌土拉变种碱基为 G, 而土拉菌旧北区变种为 A, 新凶手弗氏菌为 G, 其余序列三株菌完全一致。据此差异可以设计出属特异性和型特异性的探针, 就可以将土拉菌鉴定到属并且可以区分出土拉菌的两个型。因为新凶手弗氏菌的 16S rRNA 与土拉菌土拉变种的序列相同, 故作者推测这两种菌应属于同一菌株, 1994 年他们的一篇报道更证实了这种推测^[19]。

1994 年 Forsman 等^[19]又对弗氏菌属的 16S 核糖体 DNA (rDNA) 进行了研究, 他们用 PCR 方法对 16S rDNA 进行了测序并认为此法可用于弗氏菌属的鉴定。弗氏菌属内的几个菌株序列表现出很高的同源性 (98.5%~99.9%), 其中的 17 株弗氏菌的 16S rDNA 序列的 390~450 个核苷酸之间有两个变化较大的区域。在土拉菌这个菌种之间至少发现了六个碱基的差异, 根据核苷酸序列的差异设计出不同的引物, 就可以用 PCR 检测弗氏菌到属间、种间和亚种间的水平。这样, 就可以确定菌株是否属于弗氏菌属并且可以区分出土拉弗氏菌和新凶手弗氏菌。

6 结语

土拉热作为一种自然疫源性疾病至今仍在很多地区流行, 由于它可以经由气溶胶传播, 所以给它的研究工作带来了一定的困难。土拉菌的培养似乎不再是一个问题, 但在临床上土拉菌的分离仍不是十分理想, 故寻找更合适的培养基仍有重要的意义。土拉菌的抗生素治疗已经十分成熟, 所以土拉热的诊断就显得十分重要。在抵抗土拉菌感染的过程中, 细胞免疫起着十分明确的作用, 对于体液免疫在其中的作用还有待进一步研究。土拉菌分子生物学研究中还有很多未知的领域, 由于分子生物学研究大都是研究核酸及蛋白, 研究对象一般是灭活的细菌, 所以危险性可能相对较小一些。土拉菌的分子生物学研究将对土拉菌的分类、鉴定、培养及免疫学研究产生重大的影响。

参 考 文 献

- [1] Long G W, Oprandy J J, Narayanan R B *et al.* J Clin Microbiol, 1993, 31(1): 152~154.
- [2] Drabick J J, Narayanan R B, Williams J C *et al.* Am J Med Sci, 1994, 308(2): 83~87.
- [3] Taylor J P, Istre G R, McChesney T C *et al.* Am J Epidemiol, 1991, 133: 1032~1038.
- [4] Sato T, Fujita H, Ohara Y *et al.* J Clin Microbiol,

- 1990, 28: 2372~2374.
- [5] Pavlovich N V, Misharkin B N. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol*, 1993, (2): 7~11.
- [6] Bernard K, Tessier S, Winstanley J *et al.* *J Clin Microbiol*, 1994, 32(2): 551~553.
- [7] Sandstrom G A, Sjostedt A, Forsman M *et al.* *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 172~175.
- [8] Forsman M, Sandstrom G, Jaurin B. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 949~955.
- [9] Karlsson M A, Dahlstrand S, Hanks E *et al.* *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B*, 1970, 78: 647~651.
- [10] Fulop M J, Webber T, Manchee R J *et al.* *J Clin Microbiol*, 1991, 29: 1407~1412.
- [11] Geisbert T W, Jahrling P B, Ezzell J W. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(3): 1936~1939.
- [12] Sjostedt A, Eriksson M, Sandstrom G *et al.* *Immunology*, 1992, 76(4): 584~592.
- [13] Polsinell T, Meltzer M S, Fortier A H. *J Immunol*, 1994, 153(3): 1238~1245.
- [14] Sjostedt A, Eriksson M, Sandstrom G *et al.* *J Infect Dis*, 1994, 170(1): 110~114.
- [15] Khlebnkov V S, Golovlev I R, Zhemchugov V E *et al.* *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol*, 1994, May-Jun (3): 61~64.
- [16] Narayanan R B, Drabick J J, Williams J C *et al.* *J Leukoc Biol*, 1993, 53(1): 112~126.
- [17] Tarnvik A. *Rev Infect Dis*, 1989, 11(3): 440~450.
- [18] Sjostedt A, Sandstrom G, Tarnvik A *et al.* *J Immunol*, 1990, 145: 311~317.
- [19] Forsman M, Sandstrom G, Sjostedt A. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(1): 38~46.
- [20] Leslie D L, Cox J, Lee M *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 111(2~3): 331~335.
- [21] Sjostedt A, Kuoppa K, Johanason T *et al.* *Microb Pathog*, 1992, 13(3): 243~249.
- [22] Zuber M, Hoover T A, Dertzbaugh M T *et al.* *Gene*, 1995, 164: 149~152.
- [23] Zakharenko V I, Komissarova L V, Ulanov B P *et al.* *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 1985, (5): 19~22.
- [24] Zakharenko V I, Gorelov V N, Nenashev A V *et al.* *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 1990, (2): 22~25.