

· 实验研究 ·

炭疽芽孢杆菌传统鉴定指征与毒力基因关系的评价

海荣 魏建春 蔡虹 张建华 俞东征

【摘要】 目的 重新评估炭疽芽孢杆菌传统鉴定指征对确定具有致病能力的炭疽芽孢杆菌的意义。方法 采用常规的细菌学方法和 PCR 扩增毒力基因检测,并根据是否具有毒力基因,比较传统鉴别指征的表现差异。结果 菌落形态、溶血与动力阴性,是与毒力基因存在相关的最重要特征。结论 在判断炭疽芽孢杆菌对人与环境的危害时,首先应确定是否存在致病性决定基因。在无条件进行这种检测时,数种传统的鉴别方法具有一定的参考价值。

【关键词】 炭疽芽孢杆菌;生物学特性;毒力基因检测

Evaluation of the relation between the traditional index on the identification of *Bacillus anthracis* and its virulence determinant genes HAI Rong, WEI Jianchun, CAI Hong, ZHANG Jianhua, YU Dongzheng. Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To evaluate the significance of traditional index on the identification of *Bacillus anthracis* and its correlation with pathogenic strains. **Methods** Routine bacteriologic methods and PCR of virulence genes were used to determine the difference on traditional identification index between pathogenic and nonpathogenic *Bacillus*. **Results** The characteristics of colony, with hemolysis and mobility both negative are the important interrelated characters of pathogenic strains of *Bacillus anthracis*. **Conclusion** To judge the risk of anthrax, virulence of genes must be first defined. Some traditional methods for identification are still useful when molecular biological methods are not available.

【Key words】 *Bacillus anthracis*; Biology characters; Virulence determinant genes

炭疽是一种人畜共患病,牛羊进食时吸入了土壤中炭疽芽孢杆菌的芽孢后,迅速引起全身性的感染,对食草动物来说,这种疾病通常是致命的。人类主要是由于接触到被炭疽芽孢杆菌污染的皮毛、肉类和气溶胶而引起感染。在人与动物的组织中分离获得芽孢杆菌,鉴定相对容易,它们在本应无菌的组织中出现,自身即提示了其致病性质。然而,在自然界中,还有许多类似炭疽的芽孢杆菌,如苏云金、蜡样、枯草芽孢杆菌等,这些细菌对人类没有致病性,非常广泛地存在于自然界中。它们在常规的细菌学诊断上与炭疽芽孢杆菌有许多相似之处,容易混淆。现已了解,炭疽芽孢杆菌的致病性基因均集中在两个质粒上,其中任何一个质粒的缺失,都会丧失引起炭疽的能力,同时也使其鉴别特征发生改变。国内外的研究表明,这种无致病力的炭疽芽孢杆菌在自

然界确实存在,也易与其他种的芽孢杆菌相混淆。在我们近期鉴定环境中分离的芽孢杆菌的工作中,就遇到了多种似是而非的情况。为了准确地对它们进行鉴别,我们采用了这两个质粒上的两个关键性致病基因,作为识别致病性炭疽芽孢杆菌的标准,并将传统的炭疽芽孢杆菌的鉴定指标,与这一标准进行了对比,重新评估了它们在判定致病性炭疽芽孢杆菌过程中的意义。

材料与方法

1. 实验菌株来源:在所鉴定的菌株中,选取 002、033、052 菌株作为代表菌株,为原中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(原流研所)保藏菌株,LN-23、LN-31、TAN 为从土壤样本中新分离的菌株,GD-4、GD-5、H-10 为来自于环境标本的疑似菌株。

2. 试剂及培养基:试验中所用的分子生物学试剂均由华美生物工程公司提供,引物由中国科学院

微生物研究所合成 ,营养琼脂培养基、新鲜羊血培养基、指示选择培养基、半固体高层培养基由原流研所制备 ,青霉素为华北制药股份有限公司生产 ,批号为 00010043 ,炭疽噬菌体为卫生部兰州生物制品研究所生产 ,批号为 981101 ;其他为常规试剂。

3. 鉴定试验方法 :

(1) 环境样本和污染样本的前期处理 :在无菌条件下 ,用白金耳钩取样本 ,置含有 200 μ l 灭菌生理盐水的微型离心管中 ,封闭管口 ,置沸水浴中 20 min ,取 100 μ l 接种到营养琼脂培养基上 ,37℃ 24 h 培养。

(2) 革兰染色涂片 :取新鲜培养物少量 ,溶于玻片上的生理盐水中 ,自然干燥 ,火焰固定 3 次 ,常规方法做革兰染色。

(3) 孔雀绿芽孢染色涂片 :取陈旧培养物少量 ,溶于玻片上的生理盐水中 ,自然干燥 ,火焰固定 3 次 ,常规方法做孔雀绿芽孢染色。

(4) 噬菌体裂解试验 :挑选 24 h 培养的单可疑菌落 ,密涂于营养琼脂培养基上 ,滴加炭疽噬菌体 1 滴 ,37℃ 24 h 培养。

(5) 青霉素抑制试验 :挑选 24 h 培养的单可疑菌落 ,密涂于营养琼脂培养基上 ,将 100 U/ml 的青霉素滤纸片置于培养物上 ,37℃ 24 h 培养 ,8 h 观察结果。

(6) 溶血试验 :挑选 24 h 培养的单可疑菌落 ,接种于新鲜羊血琼脂培养基上 ,37℃ 24 h 培养 ,观察菌落周围的溶血环。

(7) 指示选择性培养基试验^[1] :挑选 24 h 培养的单可疑菌落 ,接种于选择培养基上 ,37℃ 24 h 培养 ,观察菌落的颜色。

(8) 致病性毒力基因检测 :挑选 24 h 培养的单可疑菌落 ,接种于选择培养基上 ,37℃ 24 h 培养后 ,按公司提供的试剂盒及说明 ,提取炭疽质粒。PCR 引物设计及合成 :根据已发表的炭疽芽孢杆菌相对分子质量 60×10^6 和 110×10^6 质粒的序列设计两对引物 ,扩增片段长度分别为 830 bp 和 1 000 bp。详细方法另文发表。

4. 鉴定方法评价 :按照致病基因存在与否 ,将所鉴定的细菌划分成致病性炭疽芽孢杆菌和非致病芽孢杆菌两组 ,逐一对照两组细菌间传统鉴定指标的差异 ,并对这些指标在判定致病性炭疽芽孢杆菌时的可靠性重新做出评估。

结 果

1. 菌株分离与鉴定 :标本经过沸水浴的前期处

理后 ,37℃ 24 h 培养均有若干灰白色可疑菌落生长。这些菌落的鉴定结果见表 1。

表1 被检菌株生物学性状及毒力基因检测结果

菌号	革兰染色	溶血	动力	青霉素抑制 (mm)	水杨素酵解	噬菌体试验	毒力基因
002	+	-	-	> 10	-	+	+
033	+	-	-	> 10	-	+	+
052	+	-	-	> 10	-	+	+
LN-23	+	-	-	> 10	-	+	+
LN-31	+	-	-	> 10	-	+	+
TAN	+	+	-	> 5	-	浑浊空斑	-
H-10	+	+	-	> 5	-	浑浊空斑	-
GD-4	+	+	+	< 5	-	-	-
GD-5	+	+	+	< 5	-	-	-

2. 菌体显微形态 :图 1 显示所鉴定细菌的典型显微形态 ,其中 A、B 图分别为革兰和荚膜染色的致病性炭疽芽孢杆菌 ,C、D 图为相应染色的非致病芽孢杆菌。非致病细菌除革兰染色时链稍短之外 ,很难与致病的炭疽芽孢杆菌相区别。因而 ,这项指征仍只能作为在人与动物体内分离的细菌的鉴别指征 ,而不能用于在环境标本中区分致病与非致病的芽孢杆菌。

3. 菌落形态 :图 2 为典型菌落的显微照片 ,其中 A 图为致病性炭疽芽孢杆菌 ,B 图为非致病芽孢杆菌。可以看出 ,致病性炭疽芽孢杆菌菌落边缘的“ 狮鬃 ”结构非常明显 ,而非致病细菌的结构则模糊得多。这说明 ,菌落形态仍可以作为判断细菌致病性的重要参考特征。

4. 溶血 :致病性炭疽芽孢杆菌在血琼脂平板上接种 24 h 后 ,菌落周围无明显的溶血环。在我们所鉴定的菌株中 ,所有具有致病基因的菌株 ,无一例外地均为溶血阴性 ,而非致病菌株 ,则全为溶血阳性。从这一结果看 ,溶血与否仍然是识别致病性炭疽芽孢杆菌的重要指征。

5. 动力 :在我们的结果中 ,致病的炭疽芽孢杆菌均无动力 ,而非致病的芽孢杆菌部分有动力。因而 ,这项指征可被作为排除指征。

6. 青霉素敏感试验 :至今为止 ,还没有在自然界分离到天然对青霉素抗性的菌株。然而 ,目前已经存在作为细菌战剂的 ,耐青霉素炭疽菌株。因此 ,这项指征的鉴别价值 ,应当重新考虑。

7. 水杨素酵解特征 :在分类学上 ,水杨素与七叶素酵解阴性 ,是炭疽芽孢杆菌重要的识别特征。在本次试验中 ,由于事先已经将水杨素阴性作为选择菌落的条件 ,因而所有投入鉴定的菌落 ,都是水杨素阴性的。由此看来 ,水杨素阴性特征 ,在非致病芽孢

杆菌中也普遍存在。

8. 噬菌体裂解试验:以往,噬菌体裂解试验被作为炭疽芽孢杆菌最重要的鉴别特征。在我们的工作中发现,非致病的芽孢杆菌中,也存在着相当一部分噬菌体裂解现象。不过,这两种裂解现象仍有区别。如图 3 所示,A 为致病的炭疽芽孢杆菌形成的,都是透明的空斑,而 B 则为非致病性芽孢杆菌,均为浑浊空斑。空斑底部的细菌生长迅速,有遮盖空斑的趋势。实际上,一些判定为噬菌体裂解阴性的菌株,在早期观察中也能隐约看到空斑的痕迹,只不过被生长出来的细菌迅速填平,在 24 h 以后的观察中,已难看到空斑的痕迹。因此,只有透明空斑才能作为致病的炭疽芽孢杆菌的鉴别指征。

讨 论

目前,PCR 已成为许多实验室中的常规技术,利用扩增炭疽芽孢杆菌中致病基因的方法,来鉴定所获得的菌株是否具有致病能力,并不算十分困难,许多基层单位的实验室也可以做到。在我们的试验中,选取了分别位于两个质粒之上,编码保护性抗原和决定荚膜合成的两个基因,把这两个基因同时存在,作为确定炭疽芽孢杆菌致病性的指标。以往的工作表明,这一指标是可靠的。

如果直接进行致病基因鉴定存在困难,传统的鉴别方法,仍有应用价值。在这些鉴别指标中,与荚膜形成有关的指标最为可靠。具有致病能力的炭疽芽孢杆菌,菌体表面被覆着厚厚的荚膜,赋予其独特的表面电荷及化学性质,最容易通过外部特征表现出来。由于荚膜的包裹,细菌分裂形成不易断裂的索状,形成了菌落边缘独特的“狮鬃”样结构。另外,据文献报道^[2],有致病力的炭疽芽孢杆菌菌株始终表现为不溶血和动力阴性。但是 Brown,Cherry^[3]在 1955 年曾经鉴定了一株有动力的炭疽芽孢杆菌。至于其他经典的鉴别指标,如荚膜肿胀试验和串珠试验,同样也以存在荚膜为前提。如果失去荚膜,在失去致病能力的同时,这些性质也随即失去。

青霉素敏感和水杨素酵解阴性,是炭疽芽孢杆菌自身的性质,与致病能力无关。因此,在使用这些鉴别特征时,应小心对待。

以往噬菌体裂解试验是最关键的鉴别特征,但文献记载,在自然条件下,约有 4.6% 的菌株噬菌体裂解显示不同的变化模式,有 1.2% 的炭疽芽孢杆菌

在任何噬菌体作用下均不裂解^[4]。我国现在使用的噬菌体 Ap631 是 1963 年分离的,从 20 世纪 60 年代开始使用至今,有试验表明^[4],炭疽芽孢杆菌一旦产生荚膜之后,荚膜可以掩盖噬菌体受体,而不能被噬菌体裂解,因此,噬菌体的使用,应该在非荚膜状态下。本次试验,非致病芽孢杆菌不产生荚膜,因而不是裂解试验表现异常的原因。从我们的结果看来,不仅炭疽芽孢杆菌,一些其他种的芽孢杆菌也可能被该株噬菌体裂解,但溶原状态显然不同。致病性炭疽芽孢杆菌一般不产生溶原状态,而形成透明空斑,相反,在非致病芽孢杆菌中,溶原菌较多,形成浑浊空斑甚至看不到裂解。这是不是一种可靠的鉴别指标,还需要做更多的工作来证实。

在本次的研究中,从发病现场被污染土壤中分离的菌株,是典型的致病性炭疽芽孢杆菌,它的生物学和分子生物学特征相一致;而在一些未发病地区的土壤或环境标本中检出的类炭疽杆菌,尽管它们与炭疽芽孢杆菌在生物学特性方面很相似,但是,最终的毒力基因检测显示它们并不携带致病性毒力基因。至于在本研究中划归为非致病芽孢杆菌的细菌,可能有一部分在生物学意义上仍应属于炭疽芽孢杆菌,但失去了其质粒,也可能属于近缘的蜡样芽孢杆菌或其他芽孢杆菌,这种鉴别需要做进一步的工作。

此外,具有致病能力的炭疽芽孢杆菌,也需要做进一步分型,以利于追踪传染的来源和发现外来的生物袭击。因此,使用致病性毒力基因的检测以及本次试验中确定有效的鉴定标准,目前已经可以判定它们对人类和环境是否会造成危害,这对于迅速采取防治措施是非常重要的。

(本文图 1~3 见插图第 2-2 页)

参 考 文 献

- 1 梁旭东,主编.炭疽防治手册.北京:中国农业出版社,1995.92-95.
- 2 Murray RGE, Brenner DJ, Marvin PB, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, 1986, 2: 1104-1139.
- 3 Brown ER, Cherry WR. Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. J Infect Dis, 1955, 96: 34-39.
- 4 梁旭东,主编.现代炭疽研究进展.北京:中国农业出版社,1996. 39-47.

(收稿日期 2001-10-16)

(本文编辑:尹廉)

炭疽芽孢杆菌传统鉴定指征与毒力基因关系的评价

(正文见第 131 页)

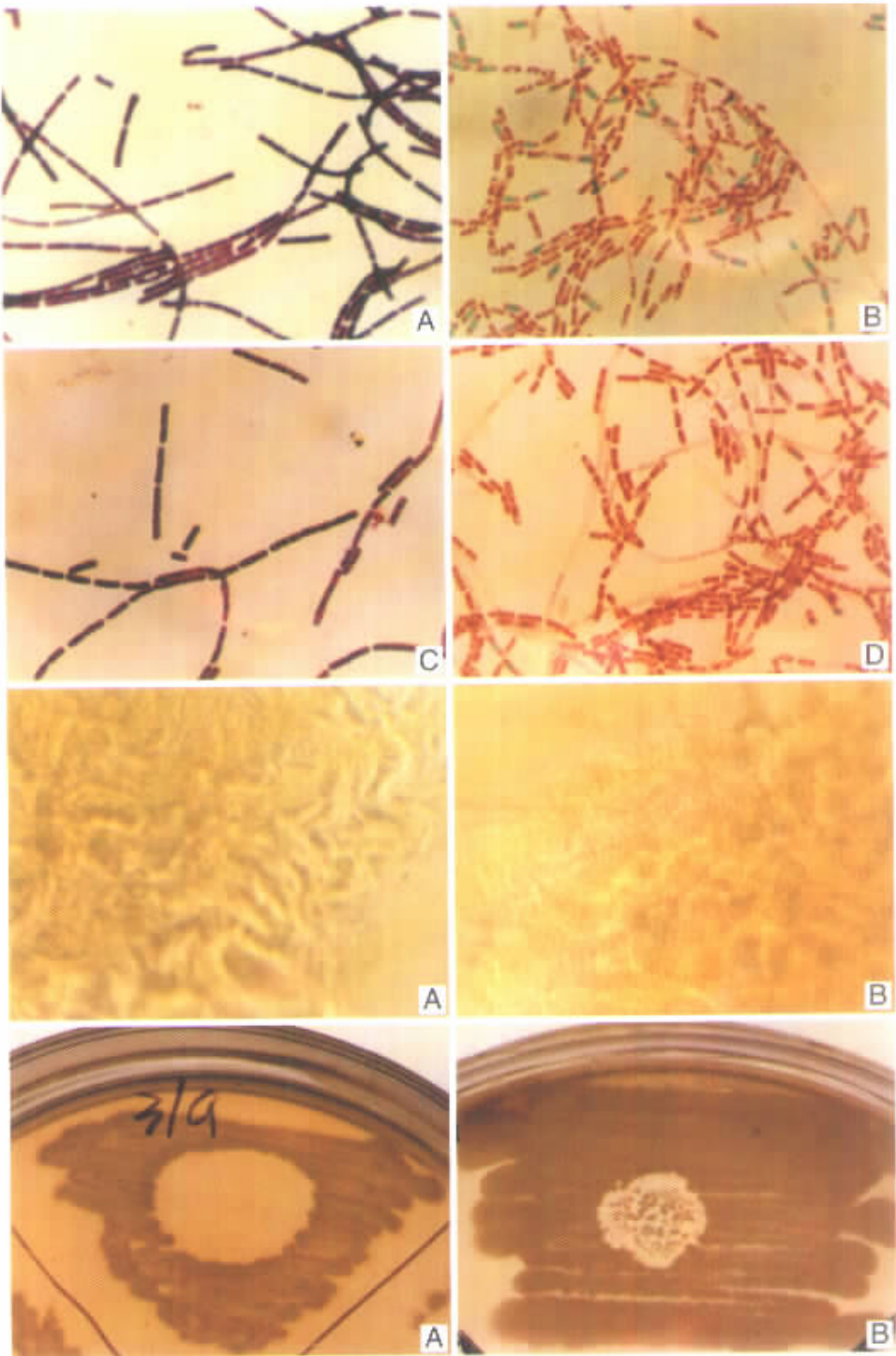


图1 炭疽芽孢杆菌显微镜观察结果 A 033 菌株 革兰染色×100 B 033 菌株芽孢染色×100 C TAN 菌株革兰染色×100 D TAN 菌株芽孢染色×100 图2 炭疽芽孢杆菌单个菌落显微镜观察结果 A 033 菌株 B TAN 菌株 图3 炭疽芽孢杆菌噬菌体裂解试验结果 A 033 菌株 B TAN 菌株