

贝氏柯克斯体的分子生物学进展

亚红祥^{1,2}, 张丽娟², 白丽¹

摘要: Q 热是由贝氏柯克斯体引起的呈世界性分布的一种人兽共患疾病。目前,世界反恐组织已将该病原体列为生物战剂之一。早期应用抗生素对 Q 热有疗效,而慢性 Q 热治疗周期长、易复发,死亡率高。贝氏柯克斯体能以气溶胶的形式传播,一旦流行将难以控制,因此对人类危害极大。为进一步研究该病的致病机制、及时有效的诊断手段及其疫苗的开发提供参考依据,本文就贝氏柯克斯体的分子生物学研究进展作简要概述。

关键词: 贝氏柯克斯体; Q 热; 分子生物学; 研究进展

中图分类号: R376.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2008)12-0792-04

Progress on the molecular biology research of *Coxiella burnetii* YA Hong-xiang^{1,2}, ZHANG Li-juan, BAI li. 1 Yunnan Institute of Endemic Disease Control and Prevention, Dali 671000, China; 2 National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: ZHANG Li-juan, Email: zhanglijuan@icdc.cn

Abstract: Q fever caused by *Coxiella burnetii* is a zoonoses with worldwide distribution. At present, the global anti-terrorism organization has included the pathogen as a biological warfare agent. Although antibiotics is effective for acute patient, the treatment of chronic Q fever usually needs a long period with high relapse rate and case-fatality. Otherwise, Q fever is difficult to control once epidemic occurs and lead to consequent great harm to mankind because the pathogen could be spread by aerosol. To provide reference for the further study of pathogenesis, providing timely and effective diagnostic techniques and development of *Coxiella burnetii* vaccine, this paper summaries the progress on the molecular biology research of *Coxiella burnetii*.

Key words: *Coxiella burnetii*; Q fever; molecular biology; research progress

贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*, C.b, 俗称 Q 热立克次体)是一种严格寄生活细胞的革兰阴性菌,该病原体对理化因子抵抗力极强,在外界环境中可长期存活,人类和动物普遍易感,可通过气溶胶广泛传播,因此美国反恐怖组织将其列为生物战剂之一。一些家畜、宠物等为其主要储存宿主。

贝氏柯克斯体可引起人类急、慢性 Q 热,临床表现无特异性,60% 无任何症状^[1],误诊和漏诊相当严重。第二次世界大战期间,该病在军队中曾多次暴发流行。目前 Q 热已成为世界上分布最广的人兽共患病之一。中国于 1950 年发现首例 Q 热病例以来,多次证明在屠宰场、农牧场等地暴发流行,现已遍及全国大部分地区。另外该病原体能与其他病原体混

合感染,从而增加了人类感染所造成的危害性。Q 热在早期应用抗生素有效,若延误治疗,极易导致慢性 Q 热,其治疗周期长、易复发,且死亡率较高^[2]。

1 病原学

1.1 一般生物学特性 以往的分类方法将贝氏柯克斯体归为立克次体目、立克次体科、立克次体族。目前,按最新遗传分类法已将其从立克次体目中分离出来。该菌为革兰阴性菌,多形性,无鞭毛、无荚膜,大小约 0.2~0.4 μm×0.4~1.0 μm。在宿主细胞的吞噬溶酶体内增殖,适宜 pH 值为 4.5~5.0。

多形性可能与该病原体在溶酶体内的不同发育周期有关,小细胞(small cell variation, SCV)形态多位于宿主细胞外,待 SCV 活化后转向大细胞(large cell variation, LCV)形态,从而进行繁殖^[3]。其致病性与免疫原性与其脂多糖、质粒、表面蛋白等方面密切相关。该菌能在很多人和动物细胞内繁殖,鸡胚是培养该菌的极好宿主。

1.2 脂多糖 贝氏柯克斯体脂多糖(LPS)与其他革兰阴性菌十分相似,为水溶性,分子末端寡糖为主要

基金项目:中美新发传染病合作项目(No. 1U2CGH000018-01); 国家自然科学基金(No. 30771854)

作者单位:1. 云南省地方病研究所,云南 大理 671000; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206

作者简介:亚红祥,男,云南省人,大理学院联合培养硕士研究生

通讯作者:张丽娟, Tel: 010-61731692, Email: zhanglijuan@icdc.cn

收稿日期:2008-09-02

抗原决定簇。该菌存在抗原相变异现象,主要原因是脂多糖(LPS)结构发生改变,适应不同宿主环境而表现出两相抗原性。I 相立克次体毒力强,含完整的抗原组分,具有光滑脂多糖 I; II 相含粗糙脂多糖 II,为弱毒株。I 相立克次体毒力强,可在感染的早期诱发 II 相抗体,晚期产生 I 相抗体,因而 II 相抗原可与早期及恢复期血清反应, I 相抗原只与晚期血清呈阳性反应,两相立克次体 LPS 的差异主要在糖类组成上。研究贝氏柯克斯体的 LPS 的结构和功能的关系,对分析其致病性和免疫原性相关问题有很大的意义。

1.3 质粒 贝氏柯克斯体是立克次体族中目前已知唯一含有质粒的病原菌,现已发现 4 种质粒型(QpHI、QpRS、QpDV 和 QpDG)和无质粒型(plasmidless)。QpHI 为 36 kb, QpRS 为 39 kb, QpDV 为 33.5 kb, QpDG 为 51 kb。每种质粒各有其特异序列,其 DNA 大部分是保守的,以前一些学者认为可据质粒来区分急、慢性分离株,近年有人发现其质粒的类型与 Q 热的临床类型无关^[4]。

2 主要表面蛋白基因及一些其他相关基因

贝氏柯克斯体主要表面蛋白基因有热休克蛋白基因、*com1*、*p1*、17 kDa 蛋白基因、*omp34*。其他相关基因有 *gltA*、*sod*、*Cbmip*、23S rRNA、16S rDNA 等基因。

2.1 热休克蛋白基因 贝氏柯克斯体的热休克蛋白主要有 Hsp60 和 Hsp70,分别属于 Hsp60 和 Hsp70 的家族成员。Hsp 为高度保守的分子,是重要的保护性抗原,可诱导体液免疫和细胞免疫。Hsp60 包括 *htpA* 和 *htpB*,两基因紧密相连,间距为 27 bp,在大肠埃希菌中转录受启动子的调节,37 °C 时可产生两种蛋白。*HtpA* 无免疫原性,ORF 长 291 bp,多肽分子量为 10.5 kD; *htpB* ORF 长 1656 bp,多肽分子量为 58.5 kD。通过表达发现 *HspB* 位于贝氏柯克斯体和大肠埃希菌的表面,*HspB* 没有明显的跨膜区,其只与急性恢复期和慢性 Q 热患者血清反应。*Hsp70* 基因长 1968 bp,多肽分子量为 71 kD,主要位于菌体表面,具有良好的抗原性。另一种热休克蛋白 Gp96 是内质网中的一种 96 kD 糖蛋白,为胞内寄生菌侵入宿主细胞的重要靶标分子蛋白,在免疫方面发挥重要作用^[5]。

2.2 *com1* *com1* 基因全长 756 bp,多肽分子量为 27 kD,该基因相当保守,其编码的蛋白位于菌体的表面。*Com1* 为一种与其细胞膜疏松连接的膜蛋白,有 3 个强亲水区,等电点为 8.8。*Com1* 的功能可改变吞

噬溶酶体内的氧化还原电位,可能与致病性有关。Sekeyova 等^[6]认为 *com1* 基因序列与分离株的地理分布和疾病形式无关。余全等^[7]研究发现根据 *com1* 基因序列进行的分组与贝氏柯克斯体的质粒型高度相关,而与疾病型和分离株的地理起源无关。

2.3 *p1* *p1* 基因全长 759 bp,编码 252aa,多肽的分子量为 29.5 kD,高度保守。P1 蛋白是贝氏柯克斯体的一种表面蛋白,存在于贝氏柯克斯体的 LCV,而 SCV 则未发现^[8]。贝氏柯克斯体的 I 相和 II 相中含有 P1 外膜蛋白,其具有良好的免疫原性和免疫反应性。

2.4 17 kDa 蛋白基因 17 kD 外膜蛋白基因所编码的蛋白是通过柯克斯体七医株构建基因文库发现的,其可与七医株多价血清及针对 17 kDa 外膜蛋白的单克隆抗体发生反应,证实该蛋白为七医株的外膜蛋白,具有免疫反应性。

2.5 *omp34* 该基因全长为 903 bp,编码 300aa,多肽分子量为 34 kD,有关该蛋白的生物学特性尚不太清楚。

2.6 *gltA* 贝氏柯克斯体的枸橼酸合成酶(*gltA*)基因全长 1290 bp,编码 46 kDa 多肽。*gltA* 在三羧酸循环的生物合成中发挥重要的作用。

2.7 *sod* 超氧化物歧化酶基因(*sod*)的 ORF 长 579 bp,编码 193aa,多肽分子量约 23 kDa。SOD 可通过将超氧离子转变成过氧化氢,从而去除吞噬细胞产生的超氧离子对细菌的毒性作用,促进了病原体对宿主的感染。

2.8 *Cbmip* 贝氏柯克斯体吞噬细胞感染因子(*Cbmip*)基因编码 230aa,多肽分子量 25.5 kDa。其编码的蛋白能与抗肺炎军团菌 Mip 的特异抗体反应,因此称该基因为 *Cbmip*,在柯克斯体的致病中起一定作用。

2.9 其他 *C.b.* 的 23S rRNA 基因中含有长 444 bp 的插入序列(IVS),构成一开放读码框。其胞外菌中变异较大的 16S ~ 23S rRNA 基因间区(ISR)在不同分离株中趋于保守。*C.b.* 的 16S rDNA 和 23S rDNA 之间有一 497 ~ 501 bp 长的间区(ITS)高度保守。因此该 IVS、ITS 均可作为贝氏柯克斯体的遗传标志,可依其应用于 PCR 或 DNA 探针鉴定该病原体。

3 分子生物学诊断技术

3.1 常规 PCR 血清学诊断在发病 1 周内往往检测不到抗体,而病原分离操作复杂,且分离率十分低,以 PCR 扩增为主要手段的分子生物学技术目前已取

代病原分离作为直接诊断依据。根据 16S rRNA^[9]、IS1111a^[10]以及 *comI*、*sod* 与 16S rDNA^[11] 特异性基因设计引物,广泛应用于 PCR 检测哺乳动物、节肢动物及患者等各种标本的 Q 热病原体。

3.2 多重聚合酶链反应 多重-聚合酶链反应(多重-PCR, multiplex PCR) 又称多重引物 PCR 或复合 PCR,它是在同一 PCR 反应体系里加上 2 对引物,同时扩增出多个核酸片段或对模板 DNA 上的多个区域进行扩增,其难点在于必需保证设计的多对引物之间不形成二聚体,引物与目标模板区域具有高度特异性。有人应用此法对牛奶样品同时扩增 *C.b.* IS1111 序列和作为对照的牛 CD₁₈ 基因,从而能很好地区别假阴性结果^[12]。与常规 PCR 相比较,多重 PCR 更有效地减少了假阴性结果。

3.3 巢式与半巢式-PCR 半巢式-PCR 是先外引物对目的基因进行第一轮扩增,再用一条内引物和第一轮外引物中的一条对第一轮产物进行第二轮扩增,大大地提高了 PCR 技术的敏感性和特异性,已被应用于 Q 热的诊断。巢式-PCR 是先一对外引物扩增含目的基因的大片断,再用一对内引物以大片断为模板扩增获取目的基因。慢性 Q 热常被延误诊断,造成患者死亡,从而要求早期尽快诊断 Q 热,巢式与半巢式 PCR 法的应用加速了 Q 热的早期诊断。在 Q 热立克次体中 *comI*^[13]、*hpaAB*^[14]、*C.b.* 质粒核酸^[15] 等 *C.b.* 特异性基因,常被用于巢式 PCR 检测 *C.b.* 核酸。根据巢式 PCR 法与 IFA、capture-ELISA 法、常规 PCR 相比较发现,巢式-PCR 具有很好的敏感性和特异性,其灵敏度是普通 PCR 法的 10 倍多^[16]。依据已知的 Q 热立克次体的 16S 和 23S rRNA 基因及其间区的序列,设计 3 条引物,对 Q 热立克次体分离株和对照菌样本扩增 ISR,并与常规 PCR 相比,半巢式 PCR 更为灵敏,敏感度可达 1pg^[17]。巢式与半巢式 PCR 在第二轮反应时较易发生交叉污染,造成假阳性结果。有人应用单管巢式 PCR 法检测 Q 热立克次体^[18],此法是据两对引物退火温度差异而把两对引物一起加入到一个反应管中进行巢式 PCR,它最大的优点是避免了一般巢式 PCR 的第二次污染。

3.4 DNA 斑点杂交法 DNA 杂交技术的特异性和灵敏度是依据病原体特异的核酸序列进行设计特异性引物和 DNA 探针,从而有效地用于病原诊断。利用 Q 热立克次体 IS1111^[19]、*gltA*^[20]、*hpaAB*^[21]、IVS^[17]、23S rRNA ISR^[22] 等基因片断制备探针检测多种标本中的 Q 热立克次体,比常规 PCR 更特异,更敏感,减少了常规 PCR 污染产生交叉反应的缺点。ISR 和

IVS^[23] 作为探针可检出 0.5 ng 的 Q 热立克次体基因组 DNA, *sod* 为探针可检出含 10 个立克次体细胞的标本^[22]。用地高辛随机引物标记贝氏柯克斯体 24 kD 蛋白基因、27 kD 蛋白基因、30 kDa 蛋白基因、34 kD 蛋白基因与热休克蛋白 B 基因片段作探针行 DNA 斑点杂交,灵敏度可达到 10 pg^[22]。

3.5 荧光定量 PCR 传统 PCR 技术在应用中不能准确定量,容易交叉污染,产生假阳性。近年来荧光共振能量转移技术用于 PCR 定量后,上述问题得到较好的解决。荧光定量-PCR (FQ-PCR) 是在 PCR 定性技术基础上发展起来的核酸定量技术。它是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术是目前检测病原体最快速、最准确、重现性最好的高特异、高敏感的核酸检测新技术。该法能有效克服常规 PCR 污染,增强特异性、实时监控并绝对定量、自动化程度高,整个反应约 2 h 内完成。在国内外已有应用于 Q 热立克次体的诊断、疗效评价、药敏试验以及乳制品的质量监测。在 *C.b.* 荧光定量 PCR 中常应用 Taqman 探针和 SYBR 荧光染料,应用此法与 IFA 法、capture ELISA、普通 PCR 法、巢式 PCR 相比较说明荧光定量 PCR 的结果更加客观可靠,重复性好,灵敏度高,特异性好,操作简单,污染少,耗时短^[24,25]。其灵敏性是 Capture-ELISA 法的 100 倍以上^[26],是巢式 PCR 的 100 倍^[27]。利用 Taqman 探针运用于荧光定量 PCR 扩增 *icd* (异柠檬酸脱氢酶) 基因、IS1111a (转座酶) 基因、IS30a、16S rRNA 基因检测 Q 热立克次体^[25,28],对患者、乳制品、疗效或药敏试验进行评定分析。

3.6 其他 应用 ISRS-PCR (infrequent restriction site-PCR)、MLVA (可变串联重复分析)、MLST、PCR-RFLP (聚合酶链反应-限制性片段长度多态性) 等方法对 *C.b.* 分离株进行分型,应用于 *C.b.* 基因分型的有 *icd* (异柠檬酸脱氢酶), *gyrA* 等基因。采用分子克隆技术,在大肠杆菌中对 27 kD、30 kD、HspB 等蛋白进行表达及研究其免疫保护性。这些均为 Q 热的研究、诊断和预防奠定了基础。

4 结语

随着分子生物学的发展,贝氏柯克斯体的研究已取得了一些进展,但贝氏柯克斯体的毒力决定因子、相变异机制、还有临床分型与其基因、宿主的关系等一些问题都尚需进行深入的研究。近年来,随着我国畜牧业的迅速发展、宠物数量的激增和人类

野外活动的日益增多,发现慢性 Q 热病例日益增多,其预后极差。若家畜等动物中的 Q 热流行得不到及时有效控制,将会引起人类 Q 热的暴发与流行。加强对贝氏柯克斯体分子生物学的研究必将为其诊断、预防以及治疗奠定良好的基础。Q 热一直倍受国际社会的高度重视,因此我国对该病的研究、监测、防治应给予高度的重视。

参 考 文 献

- [1] Karakousis PC, Trucksis M, Dumler JS. Chronic Q fever in the United States [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6):2283-2287.
- [2] Zhang LJ, Fu XP, Zhang JS. Q fever endocarditis with multi-organ complication: a case report [J]. Chin Med J, 2006, 119(18): 1580-1582.
- [3] Tang JQ. Natural source disease [M]. Beijing: Science and Technology Publishing House, 2005:614. (in Chinese)
唐家琪,主编.自然疫源性疾病[M].北京:科技出版社,2005:614.
- [4] Chen R, Yu SR, Wen BH. Molecular genetics progress of *Coxiella burnetii* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 1999, 15 (2):82-84. (in Chinese)
陈荣,俞树荣,温博海,贝氏柯克斯体的分子遗传学研究进展 [J].中国人兽共患病杂志,1999,15 (2):82-84.
- [5] Li LL, Wang HL, Wen BH, et al. Comparative proteomics study of the THP-1 cells engulfing *Coxiella burnetii* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2006, 22 (7): 604-609. (in Chinese)
李丽莉,王恒樑,温博海,等. THP21 细胞吞噬贝氏柯克斯体后的比较蛋白质组学研究 [J]. 中国人兽共患病杂志,2006,22 (7) : 604-609.
- [6] Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com1* and *mucZ* sequence comparison [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 180(1):61- 67.
- [7] Yu Q, Zhang GQ, Hideto F, et al. Sequence analysis of *com1* gene of Chinese isolates of *Coxiella burnetii* [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2002, 24(4):404-406. (in Chinese)
余全,张国全, Hideto F, 等. 贝氏柯克斯体中国分离株 *com1* 基因的序列分析 [J]. 第三军医大学学报, 2002, 24 (4) :404-406.
- [8] Wei WJ, Wen BH. The research of vaccine in Q fever [J]. Progress Microbiology Immunology, 2004, 3(32):64-68. (in Chinese)
魏文进,温博海. Q 热疫苗研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2004, 3 (32) :64-68.
- [9] Lee JH, Park HS, Jang WJ, et al. Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea [J]. Microbiology Immunology, 2004, 48(2) :125-130.
- [10] Marmion BP, Storm PA, Ayres JG, et al. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever [J]. QJM, 2005, 98(1): 7-20.
- [11] Cooper A, Layton R, Owens L, et al. Evidence for the classification of a crayfish pathogen as a member of the genus *Coxiella* [J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(5):558-563.
- [12] Edingloh M, Merck CC, Manz E. Multiplex PCR for the diagnostic detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk [J]. Ber Munch Tierarzt Wochenschr, 1999, 12 (1):5-9.
- [13] Cui H, Zhang XY, Gong ZW, et al. Nested PCR for rapid detection of *Coxiella burnetii* [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2000, 23(2):74-76. (in Chinese)
崔红,张雪颖,宫占威,等.巢式聚合酶链反应快速检测贝氏柯克斯体的研究 [J].中华检验医学杂志,2000,23(2):74-76.
- [14] Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41 (11):5094-5098.
- [15] Zhang GQ, Hotta A, Mizutani M, et al. Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(8): 2210-2213.
- [16] Ogawa M, Setiyono A, Sato K, et al. Evaluation of PCR and nested PCR assays currently used for detection of *Coxiella burnetii* in Japan [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2004, 35(4): 852-855.
- [17] Hu TH, Wen BH, Wan ZS, et al. Detection of *Coxiella burnetii* by semi-nested PCR and DNA probe [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2001, 23(9): 1104-1106. (in Chinese)
胡廷徽,温博海,万泽生,等. 半套式 PCR 和 DNA 探针技术检测 Q 热立克次体 [J]. 第三军医大学学报, 2001, 23 (9) : 1104-1106.
- [18] Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, et al. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR [J]. Vet Microbiol, 2006, 118 (2) :101-106.
- [19] Toledo A, Jado I, Olmeda AS, et al. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from central Spain [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2008, 22(10):1-4.
- [20] Barandika JF, Hurtado A, Josune GS, et al. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from Northern Spain [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2008, 29(8):1-8.
- [21] Barandika JF, Hurtado A, García-Esteban C, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(19): 6166-6171.
- [22] Zhang J, Zhu LN, Zhang JB, et al. DNA signatures of *Coxiella burnetii* analyzed by PCR and DNA dot-blot hybridization [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2005, 21(5):375-378. (in Chinese)
张军,朱丽娜,张晶波,等. PCR 和 DNA 斑点杂交分析贝氏柯克斯体的核酸标识 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21 (5) :375-378.
- [23] Chen R, Wen BH, Zhang X, et al. Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR and DNA probe [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2001, 17(1):28-31. (in Chinese)
陈荣,温博海,张雪,等.套式 PCR 和 DNA 探针技术检测 Q 热立克次体 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17 (1) :28-31.
- [24] Robert EB, James ES. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5):1869-1874.
- [25] Silke RK, Judith Tyczka, Heinz Ellerbrok, et al. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii* [J]. BMC Microbiol, 2006, 6(2):1-8.
- [26] Guatteo R, Beauveau F, Joly A, et al. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk [J]. Zoonoses Public Health, 2007, 54(5):191-194.
- [27] Zhang JB, Wen BH, Chen ML, et al. Detection of *Coxiella burnetii* by real-time quantitative PCR [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2005, 21(8):652-655. (in Chinese)
张晶波,温博海,陈梅玲,等. 检测贝氏柯克斯体的实时荧光定量 PCR [J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21 (8) :652-655.
- [28] Rolain JM. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever [J]. QJM, 2005, 98(8):615-620.