文章编号:1000-5404(2011)13-1315-03

专家述评

加强类鼻疽的研究



毛旭虎 (400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,国家免疫生物制品工程技术研究中心,全军免疫生物制品重点实验室)

【关键词】 类鼻疽伯克霍尔德菌;类鼻疽
【中图法分类号】 R754.3 【文献标志码】 A

Progress on melioidosis

Mao Xuhu (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Melioidosis, caused by its pathogenic agent *Burkholderia pseudomallei*, is a new tropical disease epidemic to Hainan, Guangdong, Hong Kong, Taiwan of China and other regions around Nanhai sea, and is regarded as a diffusing amphixenosis. Because of ready accessibility, resistance to most common antibiotics, high rate of infectivity *via* aerosols and no effective vaccine, this bacteria has been classified as category B priority pathogens by the WHO. Hainan is an island of great military values as barrier of Nanhai, and has draw more economical attention due to its becoming more important in international tourist industry. Therefore, the research of melioidosis is urgent to the public health and the safety of our country. In order to control the infection of *Burkholderia pseudomallei*, more work has to be done about the pathogen, such as, the interaction between this pathogen and human, its secretory system, potential vaccine, and so on. This review focused on progress in the research of *Burkholderia pseudomallei*, attempting to appeal public attention on the research of melioidosis.

【Key words】 *Burkholderia pseudomallei*; melioidosis

Supported by the National Major Project of Science and Technology(2008ZXJ09014-007). Corresponding author: Mao Xuhu, E-mail: mxh95xy@tom.com

类鼻疽(melioidosis)是由类鼻疽杆菌感染引起的一种新发传染病,属热带医学疾病。我国海南、广东、香港、台湾以及南海周边国家为流行区,有学者认为它是一种正在扩散的人兽共患病。类鼻疽杆菌主要存在于土壤或水中,极易获取和传播;加上该菌易培养、耐药性强,目前还没有有效的疫苗,WHO 将其列为 B 类生物恐怖剂。海南国际旅游岛的开发以及南海海洋主权维护和经济安全保障等已上升至国家战略要求,加强类鼻疽研究具有重要的社会意义和军事价值。

1 类鼻疽病及其感染流行病学

类鼻疽是由类鼻疽杆菌感染引起的一种新发传染病。该病主要侵犯人体肺部,初期会出现发烧、寒战、咳嗽、恶心、呕吐、头痛、腹痛、肌肉痛、肋膜炎、呼吸不顺等症状。一旦类鼻疽侵入肺部,会造成难治性肺炎、肺部空洞,并快速地造成败血症而死亡,还能导致脑炎、前列腺及肝脾等内脏的脓肿[1-2]。

类鼻疽病例主要集中分布在南、北纬 20°内,涵盖我国海南、广东、广西、香港、台湾以及柬埔寨、越南、菲律宾、文莱、马来西亚、新加坡、泰国、缅甸、澳洲北部等。除上述地区外,在印度、斯里兰卡、巴基斯坦及孟加拉国也有一些散在病例报道[3]。

类鼻疽为人畜共患病。人和动物接触污染类鼻疽杆菌的土壤或水,通过直接接触、呼吸道、消化道以及吸血昆虫叮咬等感染发病[4]。除有少数报道外,无直接的证据认为该菌会在人与人之间直接传染。

人群对类鼻疽杆菌普遍易感,发病与否及症状与菌量、毒力和宿主的免疫状态有关[5-7]。农民、军人、矿工、探险者和疫区原居民是类鼻疽的高危感染者,这与这类人员与受污染环境的密切接触有关。

2 类鼻疽的病原微生物学

类鼻疽的病原体类鼻疽杆菌,学名叫类鼻疽伯克霍尔德菌(*burkholderia pseudomallei*)。该菌于 1912 年首先被 Whitmori 和 Krishnaswami 在仰光确定。因其形态与培养特性类似鼻疽杆菌,血清学上又有明显交叉,最初将其命名为类鼻疽杆菌。1993 年国际上根据其生物学特性,将其定名为类鼻疽伯克霍尔德菌。

类鼻疽杆菌为革兰阴性球杆菌,长 1~2 μm,宽 0.5~0.8 μm,多单在,偶成对或丛集,不形成荚膜及芽孢。一端有 3 根以上

【基金项目】 国家重大科技专项(2008ZXJ09014-007)
【作者简介】 毛旭虎,男,博士,教授,博士生导师,担任重庆市生物制药专业委员会副主任委员、全军微生物专业委员会委员。主持国家"863、国家重大科技专项及国家自然科学基金"等课题 10 余项。获重庆市技术发明一等奖和军队科技进步二等奖各 1 项。获得国家发明专利 22 项,以第一作者或通信作者发表 SCI 论文 15 篇。荣立个人三等功和集体三等功各 1 次,获军队院校育才银奖、总后科技新星和首届中国药学会青年生物药物奖。电话:(023) 68752315, E-mail: mxh95xy@tom.com

鞭毛,故运动活泼。细菌染色常见两极浓染,用感染脏器样品制备的压印片染色时,可见菌体周围有不着色的白圈,即伪荚膜。本菌为需氧菌,能在普通培养基上生长良好,加入甘油可促进生长。在4%甘油营养琼脂上培养24 h,形成正圆形,中央微隆起,呈光滑型菌落,48~72 h后变为粗糙型,表面出现蜂窝状皱褶,并呈同心圆状,培养物有强烈的霉臭味。本菌生化反应特性活泼,能分解葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、左旋核糖及蔗糖等,产酸不产气,但不分解左旋木糖[8]。

类鼻疽杆菌胞内有两条染色体:1条大染色体,与细菌的基本的营养代谢活动相关;1条小染色体与细菌的耐药、毒力和环境适应性相关。不同菌株之间有一定差异,主要表现在小染色体基因上。类鼻疽杆菌具有高致病性,强抵抗力,目前还未在疫区及非疫区中发现弱毒力的天然突变株。

3 类鼻疽的临床特点

类鼻疽初期症状和感冒相近,未能尽早警觉,而常错过治疗佳机。类鼻疽感染几乎可以涉及身体的任何器官和组织,和结核有很多临床症状上的相似之处。人的类鼻疽病例分为急性败血症、亚急性型、慢性型和亚临床感染。急性败血型最为严重,约占60 %,早期的文献报道其死亡率高达90 %,随着抗生素的发展和应用死亡率仍高于30 %,而且单从临床上看不出和其他细菌败血症的差别。亚急性型的病程为数周至数月,病灶局限于局部组织。常见的临床表现在肺部,如肺炎、肺脓肿、脓胸等,也可表现为心包炎、心包积水、肾炎、前列腺炎、骨髓炎、脾脓肿、皮下脓肿、肝脓肿、脑炎等。慢性型的病程长达数年,文献报道的最长病程为26年。

类鼻疽的诊断还很困难,入院初诊的误诊率甚至是100%,一方面是各级诊断条件的限制,而且该菌极易被误判为结核或其同属的鼻疽杆菌,另一方面是由于临床医生对该病很陌生,尤其在非疫源地。实验室诊断主要依靠细菌分离培养、血清学诊断和基于16S rRNA[9-10]、23S rDNA免疫荧光等,方法的稳定性及经济代价使得临床上仍然没有一种简便、快速、经济的诊断方法出现。

类鼻疽的临床治疗主要采取抗生素的疗法,也有结合免疫治疗的方法,如使用IL-13。临床上常用亚胺培南、阿莫西林-克拉维酸盐和头孢哌酮-舒巴坦等作为一线药物,最近的一项临床试验初步表明美罗培南有更加优越的治疗效果。但是治疗的周期和代价都很高。治疗初始期至少要14 d,如果伴有化脓病灶还要进行6周的静脉输液治疗;维持期治疗周期至少为3~6个月。另外,该病的复发率很高,约20%。目前还没有有效的疫苗,进入疫源地的人群预防性的服用抗生素或许能降低感染该细菌的几率[11]。

4 加强类鼻疽研究具有重要的社会意义和军事价值

类鼻疽作为公共卫生问题,目前虽然不是法定传染病,但仍被列为应报告传染病。自从上世纪初发现该病以来,在相当长的时间内并没有引起人们的兴趣。直到60年代美军在越南战争中因本细菌感染遇到损失后才引起美军和东南亚地区卫生部门的注意。泰国政府首先对该病予以了重视,并于80年代末得出结论即类鼻疽杆菌是引起泰国人群败血症的主要原因。随着人们认识的不断提高,越来越多的国家从环境中分离到了该菌并且有越来越多的病例报道,因此有学者认为它是一种正在扩散的人兽共患病。

由于类鼻疽杆菌主要存在于土壤或水中,有报道植物(如马铃薯等)也会感染而带菌,因此其极易获取和传播[12]。研究指出,类鼻疽的发生率和雨季中密集降雨相关,因为丰沛的雨水易把类鼻疽伯克氏菌从深层土壤中冲刷出来,而污染水源;另外雨季时的强风会把带有类鼻疽伯克氏菌的尘土吹起,而增加了吸入性感染的几率。加上该菌易培养、耐药性强,是经典生物战剂,在战争史上也有过记载,美军在越南战争中因该病遭受严重损失,被列入国际《禁止生物武器公约》核查清单。"9·11"后,WHO也将其列为B类生物恐怖剂。

而且,随着全球恶劣气候(如暴雨,台风,海啸)的日益肆虐,细菌的微生态平衡被破坏,凡亚比台风、澳大利亚洪水等极端环境事件对类鼻疽的播散、爆发推波助澜,加上国际和国内的人员往来及交流的增加,进一步增加了类鼻疽蔓延的可能。实际上,类鼻疽流行区域已经不局限于南北纬20°之间了,其他非疫区陆续有散发病例及死亡病例的报道。

类鼻疽覆盖广州战区、南京战区重要战略方向[13],特别是国家海南国际旅游岛的开发以及南海海洋主权维护和经济安全保障等已上升至国家战略要求。因此,无论从保障该地区人员的公共卫生健康需求出发,还是从我军军事斗争卫勤准备的需求出发,在我国亟待加强类鼻疽的研究,包括流行病学、致病机制以及诊防治等方面[14]。

5 类鼻疽研究的重点和进展

鉴于类鼻疽日益严重的危害,越来越多的科学家引起了研究兴趣。随着类鼻疽杆菌全基因组序列完成,在该菌的结构生物学、致病分子机制、询证医学、疫苗研制等方面都取得了一定的进展,但由于类鼻疽杆菌特殊的病原生物学特性,在其研究过程中还存在很多的问题和困境,主要集中在以下几个方面:

5.1 类鼻疽的感染与免疫机制

首先,其感染机体的途径还不明确[15]。类鼻疽虽然能通过气溶胶传播,目前却未找到动物传播给人及人人间传播的直接证据[16]。能否通过消化道摄入、气溶胶传播形式有多大作用都莫衷一是,需要进一步开展动物模型和流行病学研究[8,17]。

其次,细菌进入机体后是直接扩增还是先潜伏在细胞或组织中,如何进入组织或细胞中潜伏、扩增,如何入血形成2次菌血症,甚至急性败血症,又是如何形成免疫耐受以致病症迁延;再者,细菌如何从潜伏生境中逃逸内吞体的消化,是直接破坏宿主免疫细胞还是延迟内吞体的成熟,这些问题的答案远没有同是土壤来源的结核杆菌研究得清楚。

5.2 类鼻疽的实验室诊断

由于类鼻疽的临床症状非常不典型,早期、快速、准确的实验室诊断对类鼻疽的治疗以及其传染病的溯源控制就显得更为重要。基于类鼻疽杆菌基因组学和蛋白组学的研究为寻找特异、敏感的诊断靶点可提供有效的指导和帮助,将分子生物学、免疫学检测的新技术手段,包括基因芯片、实时定量PCR技术、胶体金免疫技术应用于类鼻疽的实验室诊断[18-19]。

5.3 类鼻疽杆菌的分泌系统和临床的耐药问题

已知类鼻疽杆菌天然地对很多的抗生素都有抗药性[20-21],包括3代头孢、青霉素类、利福霉素类、氨基糖苷类。对喹诺酮类、大环内酯类的相对抗性也妨碍了这些抗生素的临

床应用。治疗上要求长疗程地使用抗生素,这也有增大类鼻疽杆菌耐药谱的危险,而且患者的依从性也不好,复发率很高。这些都是临床上棘手的问题。

类鼻疽杆菌具有 3 型分泌系统和 6 型分泌系统,无论是细菌的毒力研究、致病机制还是疫苗策略都与之密切相关[16]。由于类鼻疽杆菌 3 型分泌系统本身的复杂性致使这方面的研究似乎还没能得到很好的解释[22-23],6 型分泌系统的发现似乎带来了新的研究思路[24],但也给分泌系统的研究带来更多的复杂性,但相信随着这方面研究工作的深入和全面,类鼻疽杆菌的分泌系统面纱会逐步被揭开,对阐明该菌的致病机制、诊断和疫苗的研制将会发挥有力的推动作用。

5.4 疫苗的研制

胞内菌的疫苗研究一向比较困难,因为疫苗不仅要起着封闭抗原、调节吞噬的作用,还要担负起调节机体适应性免疫功能,靶向清除病原体的功能。全细胞死疫苗被证实不起保护作用,减毒活疫苗似乎只能延长小鼠的生存周期,而不能完全清除细菌。到目前还没有有效的疫苗得以应用。研究者也尝试了长期培养的方法,试图得到像卡介苗一样的减毒株,但是要获知其免疫的有效性还为时尚早。其实早已发现了一类与类鼻疽杆菌形态学和血清学反应相似的无毒株,即洋葱伯克霍尔德杆菌,也有人提议将其作为一种研究类鼻疽杆菌模式生物,可以避免研究的危险,也不需要在生物安全级别很高的实验室中进行了。文献[2,11]报道,类鼻疽的幸存者体内的脂多糖抗体滴度比死亡患者体内的高,而且没有发生败血症型类鼻疽的患者体内脂多糖抗体滴度比发生败血症患者的也要高,暗示这些抗体能提高机体存活率。细菌的表面生物结构也一向是研究的热点[20],通过噬菌体展示、高通量优势免疫抗原筛选等技术的发展使得我们不断在发现该细菌表面的优势蛋白抗原。

6 展望

作为一种胞内感染病原,其特殊的细菌分泌系统、逃避宿主免疫机制在其致病中发挥重要作用。随着类鼻疽杆菌基因组学、蛋白组学和结构生物学研究的深入,该菌的致病分子机制将逐步得到揭示,新的诊断、治疗和预防靶标将被鉴定,并在该病的预防和控制上起到理论指导作用。

志谢 感谢军事医学科学院王恒墀研究员和中国疾病预防控制中心微生物流行病研究所张守印副研究员的指导

参考文献:

[1] Puthucheary S D. Melioidosis in Malaysia[J]. Med J Malaysia, 2009, 64(4):266-274.

[2] Wiersinga W J, van-der-Poll T, White N J, *et al*. Melioidosis:insights into the pathogenicity of Burkholderia pseudomallei[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(4):272-282.

[3] Currie B J. Advances and remaining uncertainties in the epidemiology of Burkholderia pseudomallei and melioidosis[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102(3):225-227.

[4] Sagripanti J L, Carrera M, Robertson J, *et al*. Size distribution and buoyant density of Burkholderia pseudomallei[J]. Arch Microbiol, 2011, 193(1):69-75.

[5] Barnes J L, Williams N L, Ketheesan N. Susceptibility to Burkholderia pseudomallei is associated with host immune responses involving tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) and TNF receptor-2 (TNFR2)[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52(3):379-388.

[6] Balaji V, Rajiv K, Abraham O C. Burkholderia pseudomallei recovered in an HIV-positive individual[J]. Indian J Med Sci, 2008, 62(11):456-458.

[7] Suwannasaen D, Mahawantung J, Chaowagul W, *et al*. Human Immune Responses to Burkholderia pseudomallei Characterized by Protein Microarray Analysis[J]. J Infect Dis, 2011, 203(7):1002-1011.

[8] Balder R, Lipski S, Lazarus J J, *et al*. Identification of Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei adhesins for human respiratory epithelial cells[J]. BMC Microbiol, 2010, 10:250.

[9] Couto M S, Cordeiro-Rde A, Rocha M F, *et al*. A diagnosis of Burkholderia pseudomallei directly in a bronchoalveolar lavage by polymerase chain reaction[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 65(1):73-75.

[10] 林容, 李羲, 陈海, 等. 类鼻疽病早期诊断依据的探讨[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23):2390-2391.

[11] Bondi S K, Goldberg J B. Strategies toward vaccines against Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei[J]. Expert Rev Vaccines, 2008, 7(9):1357-1365.

[12] Partida-Martinez L P, Groth I, Schmitt I, *et al*. Burkholderia rhizoxinica sp. nov. and Burkholderia endofungorum sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus Rhizopus microsporus[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(Pt 11):2583-2590.

[13] Chen Y S, Lin H H, Mu J J, *et al*. Distribution of melioidosis cases and viable Burkholderia pseudomallei in soil:evidence for emerging melioidosis in Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4):1432-1434.

[14] Inglis T J, Sousa A Q. The public health implications of melioidosis[J]. Braz J Infect Dis, 2009, 13(1):59-66.

[15] Galyov E E, Brett P J, DeShazer D. Molecular insights into Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei pathogenesis[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64:495-517.

[16] Adler N R, Govan B, Cullinane M, *et al*. The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis:how does Burkholderia pseudomallei cause disease?[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(6):1079-1099.

[17] Whitlock G C, Valbuena G A, Popov V L, *et al*. Burkholderia mallei cellular interactions in a respiratory cell model[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 5):554-562.

[18] Vellasamy K M, Mariappan V, Hashim O H, *et al*. Identification of immunoreactive secretory proteins from the stationary phase culture of Burkholderia pseudomallei[J]. Electrophoresis, 2011, 32(2):310-320.

[19] Sardo A, Wohlschlager T, Lo C, *et al*. Burkavidin:A novel secreted biotin-binding protein from the human pathogen Burkholderia pseudomallei[J]. Protein Expr Purif, 2011, 77(2):131-139.

[20] Felgner P L, Kayala M A, Vigil A, *et al*. A Burkholderia pseudomallei protein microarray reveals serodiagnostic and cross-reactive antigens[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(32):13499-13504.

[21] Mima T, Schweizer H P, Xu Z Q. In vitro activity of cethromycin against Burkholderia pseudomallei and investigation of mechanism of resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(1):73-78.

[22] Barrett B S, Picking W L, Picking W D, *et al*. The response of type three secretion system needle proteins MxiHDelta5, BsaLDelta5, and PrgIDelta5 to temperature and pH[J]. Proteins, 2008, 73(3):632-643.

[23] Whitlock G C, Estes D M, Young G M, *et al*. Construction of a reporter system to study Burkholderia mallei type III secretion and identification of the BopA effector protein function in intracellular survival[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102(Suppl 1):S127-S133.

[24] Burtnick M N, Brett P J, Harding S V, *et al*. The Cluster 1 Type VI Secretion System Is a Major Virulence Determinant in Burkholderia pseudomallei[J]. Infect Immun, 2011, 79(4):1512-1525.

(收稿 2011-02-22 修回 2011-04-16)

(编辑 王 红)