

• 综述 •

立克次体与立克次体病的检测与鉴定

张骁鹏¹, 李忻樛², 郑波², 胡晓梅¹

1. 第三军医大学微生物教研室, 重庆市微生物工程实验室, 重庆 400038; 2. 第三军医大学学员旅八营, 重庆 400038

摘要:立克次体是一类严格细胞内寄生的原核细胞型微生物, 已被列入生物战剂名录。立克次体病是一类严重威胁人类健康的人兽共患的自然疫源性疾。立克次体严格的细胞寄生性决定了立克次体病的诊断不同于传统方法, 需根据流行病学资料、临床症状和体征及实验室检测进行综合判断, 通常实验室检测是明确诊断的主要依据。从病原体的分离和培养到目前的基因水平比对, 立克次体的检测技术虽发展了 100 多年, 但人类尚未实现早期快速诊断立克次体病的目标。本文主要综述了立克次体与立克次体病检测与鉴定的研究进展。

关键词:立克次体; 立克次体病; 检测; 鉴定

Detection and identification of *Rickettsia* and rickettsial diseases

ZHANG Xiao-Peng¹, LI Xin-Lei², ZHENG Bo², HU Xiao-Mei¹

1. Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Eighth Battalion, Cadet Brigade, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: *Rickettsia* is an obligate intracellular parasitic bacterium which has been included in the list of biowarfare agents. Rickettsial diseases are zoonotic, natural focal diseases, and also threats to human health seriously. Different from the standard detection methods for other bacteria, the diagnosis of rickettsial diseases needs a collective consideration of the epidemiological data, clinical symptoms and laboratory test results. Although *Rickettsia* detection technology has been developed for more than 100 years, early rapid diagnosis is still difficult. Current progresses on *Rickettsia* and rickettsial disease detection, including pathogen isolation and molecular detections, are reviewed in this paper.

Key words: *Rickettsia*; Rickettsial disease; Detection; Identification

1 立克次体与立克次体病

立克次体是一类严格细胞内寄生的原核细胞型微生物, 天然寄生于多种吸血节肢动物和昆虫体内^[1,2]。对人类致病的立克次体主要包括 5 个属, 分别为立克次体科中的东方体属、埃立克体属、柯克斯体属和立克次体属, 以及巴通体科的巴通体属(表

1)。其中立克次体属包括 2 个群: 斑疹伤寒群仅有普氏立克次体和斑疹伤寒立克次体 2 个种; 而目前发现对人类致病的斑点热群已超过 15 个种, 如立氏立克次体、西伯利亚立克次体、澳大利亚立克次体、康氏立克次体等, 该群还不断有新现立克次体导致人类疾病的报道^[3-5]。

基金项目: 全军“十二五”重大科研项目(AWS11C001)

通信作者: 胡晓梅

Corresponding author. HU Xiao-Mei, E-mail: hxmay2008@163.com

表 1 主要立克次体病及流行区域

Tab. 1 The epidemic area of main rickettsial diseases

病原菌种属		代表菌株	代表疾病	我国主要流行地区
立克次体科	立克次体属	斑疹伤寒群	普氏立克次体、斑疹伤寒立克次体	在我国分布较广, 全国 31 个省市均有病例报告
		斑点热群	立氏立克次体、康氏立克次体等	在我国分布较广
	东方体属	恙虫病东方体	恙虫病	海南、广东、福建、浙江、广西、云南、四川、湖南、西藏、台湾等省区
	埃立克体属	人粒细胞埃立克体	人单核细胞埃立克体病、人粒细胞埃立克体病	云南、福建、内蒙古、黑龙江、新疆、广东、广西、西藏等省区
	柯克斯体属	贝纳柯克斯体	Q 热	内蒙古、黑龙江、福建、安徽、新疆、西藏、海南等省区
巴通体科	巴通体属	汉赛巴通体	巴通体病	我国南方

立克次体病是一类人兽共患的自然疫源性疾 病。人体通过感染立克次体的昆虫叮咬或接触其粪 便而感染,多发生于热带与亚热带国家和地区,在历 史上曾严重威胁人类健康。近年来,世界范围内新 发及再发立克次体病逐年上升,引起人们关注^[6]。 立克次体病通常指由立克次体属和东方体属感染所 引起的人类疾病,分为斑疹伤寒、斑点热和恙 虫病^[7]。

斑疹伤寒主要由斑疹伤寒群立克次体引起,包 括普氏立克次体引起的流行性斑疹伤寒(或虱传斑 疹伤寒)和斑疹伤寒立克次体引起的地方性斑疹伤 寒(或鼠传斑疹伤寒)。普氏立克次体通过人类体虱 进行传播,体虱叮咬患者后普氏立克次体随患者血 液感染体虱消化道,在患者与他人亲密接触过程中 可伴随体虱转移至新的宿主,叮咬人类皮肤形成伤 口,并通过粪便感染这些伤口,从而引起流行性斑疹 伤寒。斑疹伤寒立克次体通过鼠蚤粪便感染人类, 造成地方性的流行性传播。

斑点热群立克次体病主要根据发现的地域和相 应的立克次体分群来命名,如落基山斑点热、非洲 蜱咬热、昆士兰斑疹伤寒、日本红斑热,以及我国流 行的北亚蜱传斑点热、黑龙江蜱传斑点热、内蒙古 蜱传斑点热等,目前除极地地区外世界各地均有该 群立克次体病的报道^[8]。斑点热群立克次体也主 要通过蜱类传播,受环境湿度和温度、自然植被与野 生动

物、人类活动及杀虫剂应用等因素的影响,呈现地 域流行性特征^[9]。

恙虫病由恙虫病东方体引起,通过恙螨幼虫传 播,主要分布于丛林地区,也称丛林斑疹伤寒。

目前,美国已将引起流行性斑疹伤寒、落基山 斑点热及 Q 热的立克次体列入生物战剂名录中^[10,11]。 这 3 种立克次体也是实验室感染的重要病原体。

2 致病机制和临床表现

立克次体对内皮细胞有明显的亲嗜性(其次是对单核-巨噬细胞和干细胞),通过其表面蛋白与宿 主细胞相应受体的特异性结合侵入内皮细胞。立克 次体的表面蛋白主要包括外膜蛋白 A 和 B(OmpA/ B),OmpA 仅存在于斑点热群立克次体,而 OmpB 普遍存在于立克次体属,与宿主细胞表面受体 Ku70 特异性结合,募集 Arp2/3 复合物,在其他表面蛋白 如 RickA 的协助下改变宿主细胞内的肌动蛋白构 象,从而介导宿主细胞的内存作用,将立克次体吞入 细胞。然后,立克次体凭借磷脂酶 D 和溶血素 C 迅 速破坏内体膜,在内体与溶酶体融合前进入胞质,以 免被溶酶体溶解。在宿主细胞内大量增殖的同时, 立克次体会引起宿主细胞产生大量过氧化物,导致 细胞膜磷脂过氧化损伤,破坏细胞间的紧密连接,造 成宿主细胞膜的破坏和血管内皮通透性增高^[12]。 这一方面引起患者组织水肿和循环血量下降(如果

发生于肺和脑组织,后果尤为严重),另一方面会增强立克次体的组织间扩散。立克次体可随宿主细胞破裂崩解入血,引起第1次菌血症,随即扩散至全身各处血管内皮细胞并增殖。被立克次体感染的细胞产生肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor β , TNF- β)、白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、IL-8等炎性介质,引起机体炎症反应,患者出现发热、乏力、头昏头痛等症状。若未加以干预治疗,在患者血管内皮细胞中广泛增殖的立克次体会再次引起血管内皮通透性增加并释放入血,引起第2次菌血症,往往导致机体严重的炎症反应和弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC),病死率较高。

立克次体病的主要临床表现为发热、皮疹、肌肉痛和头痛。斑点热群立克次体病常伴有恶心、呕吐、腹泻等胃肠道症状,恙虫病常伴有广泛性的淋巴结肿大和疼痛。除斑疹伤寒群外,立克次体感染的典型症状为蜱或螨叮咬部位形成的焦痂样皮损,但通常由于皮损部位隐秘且无痛,很难观察到而被忽视。由于立克次体病的临床表现一般缺乏特异性,实验室检测通常是明确诊断的主要依据。实验室常用的血清学诊断要在发病后10~12 d才开始呈阳性,无法满足早期诊断的需求,且由于立克次体之间存在广泛的抗原交叉,血清学检测只能用于分群诊断^[7]。因此,发展立克次体的早期快速诊断和分型诊断的技术迫在眉睫^[13]。

3 检测与鉴定

3.1 病原学诊断

立克次体感染初期,即病原体通过节肢动物叮咬侵入患者机体时,往往没有明显的疾病表现,患者不会就医,很难分离到阳性标本,仅能从部分患者被叮咬部位形成的焦痂中通过组织活检分离得到。当立克次体在患者体内大量增殖而引起明显疾病表现时,可从血液样本中分离到立克次体,由于其是胞内寄生菌,故血液样本中有核细胞含量越多,检出阳性率越大。另外,在疾病中后期出现的皮损中也能分离到大量立克次体。除患者外,从立克次体的中间宿主如虱、蚤等节肢动物体内,以及自然宿主如野生哺乳类、鸟类和啮齿类动物体内,也可分离出大量的立克次体。

立克次体的培养和染色观察是其诊断和分类的重要方法,为研究奠定了重要基础。最为经典的常规培养方法为鸡胚接种,也可采用细胞培养(如

Vero细胞),但仍需借助染色观察或其他技术手段加以诊断和鉴别^[14]。吉姆萨(Giemsa)染色法、吉姆尼茨(Gimenez)染色法、直接免疫荧光法(direct immunofluorescence assay, DFA)等可用于立克次体鉴定,但在非培养条件下很难观察到阳性结果^[15]。

立克次体检查耗时长、成本高,对检测人员的要求高,且存在一定的继发感染风险,目前仅用于基础研究和流行病学调查,不作为临床检测的主要方法。

3.2 血清学诊断

由于立克次体中部分种属与变形杆菌有抗原交叉,可利用变形杆菌属 X19, X2, Xk 菌株的菌体 O 抗原代替立克次体抗原,与患者血清进行交叉凝集反应,检测患者血清中相应抗体,即外斐试验。外斐试验一度是立克次体诊断最经典的方法,成本低廉,但特异性很差,目前已逐渐被特异性较高的荧光免疫法取代,仅在经济条件较差的国家和地区使用。免疫荧光法利用含有立克次体外膜蛋白特异性表位的荧光探针,检测患者体内针对该蛋白产生的特异性抗体,以诊断立克次体感染。免疫荧光法包括直接法和间接法2种,其中间接荧光法(indirect fluorescence assay, IF)是目前诊断立克次体感染的“金标准”。基于此原理建立的酶联免疫法,即用酶染料代替荧光染料标记,常用于实验室研究,其中免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)与酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)最常用^[16],但以上方法仍存在不能确定种属且不能应用于早期诊断的问题。

3.3 聚合酶链反应和限制性片段长度多态性分析

1989年聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的出现,为立克次体的诊断与分型打开了一扇新的大门,从而进入基因检测的新时期。最初研究者尝试利用普通PCR检测立克次体的特定序列,但特异性和敏感性均不满意。随后改良的套式PCR(nested PCR, nPCR)明显提高了检测灵敏度,但存在假阳性率过高的问题。实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)很好地克服了这一缺陷,还可利用荧光标记进行定量检测^[17]。DNA检测缩短了立克次体诊断的窗口期,比传统的血清学检测更适用于早期快速诊断,已被很多研究机构所采用。

由于立克次体的基因组高度保守,采用单一序列进行PCR检测无法达到种属分型的需求,研究者进一步采用限制性片段长度多态性分析(restriction

fragment length polymorphism, RFLP), 即通过比较被限制性内切酶处理过的样本基因片段长度来鉴别不同立克次体及鉴定未知立克次体的种属^[18]。该法使立克次体的分型诊断首次成为现实, 具有重要意义。但其仅通过酶切后的基因长度进行分析, 仍无法为亲缘性较近而立克次体分型, 对其信度和效度也存在一定争议。

3.4 多位点序列分型与全基因组比对分析

随着生物信息学技术的发展, 多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST 或 MST) 成为立克次体基因诊断与分型较为可靠的新方法。2003 年 Fournier 利用立克次体 OmpA 的编码基因序列与 GenBank 中的已知序列比对进行斑点热群立克次体的种间鉴别^[5], 并做了大量实验验证工作^[19]。随后 Fournier 采用了新的算法, 同时比对 *rrs*、

glpA、*ompA*、*ompB* 和 *sca4* 这 5 个不同基因, 综合 5 个位点的比对结果进行分型^[20], 结果发现 MLST 大大提高了立克次体检测的敏感性和分型的可靠性, 自此立克次体的 MLST 法得以建立^[21], 并很快在世界范围内被广泛采用^[22,23]。但某些样品的 MLST 分析结果与目前通用的 16s RNA 分型结果并不完全一致, 对现有的生物分类学标准提出了一定挑战^[9,24]。

随着人类进入后基因组时代, 全基因组测序的效率大幅度提高, 越来越多的立克次体全基因组测序结果先后被报道^[25]。Walker 等首次对立克次体进行全基因组水平的比对分析, 比传统的 5 基因 MLST 法更全面, 开启了细菌全基因组鉴定的先河^[26]。但其仍为 DNA 水平的比对分析, 对样本的要求也比传统 PCR 更高 (表 2)。

表 2 立克次体与立克次体病的检测与鉴定方法

Tab. 2 Detection and identification of *Rickettsia* and rickettsial diseases

方法		标本	用途	优缺点
病原学诊断	培养观察病原体	患者被叮咬部位焦痂或血液有核细胞	检测	基础方法; 但耗时长、成本高, 对检测人员的要求高, 且存在一定的继发感染风险
	血清学诊断	患者血清	检测	成本低廉, 较为迅速; 但特异性差, 受限患者血清抗体效价, 不能满足早期诊断需要
基因学诊断与鉴定	免疫法	主要采用人或动物血清	检测	特异性好, 其中荧光免疫法是目前检测的“金标准”; 但不能满足快速检测和早期检测, 不能用于分型鉴定
	PCR	主要采用人或动物血清	检测	方便快速, 便于早期诊断; 但存在假阳性, 不能分型鉴定
	RFLP	病原体基因组 DNA	鉴定	可对病原体进行初步分型; 但操作繁琐且成本高, 分型鉴定特异性不高
	MLST	病原体基因组 DNA	鉴定	可准确进行病原体分型鉴定; 但分型标准有待进一步完善
全基因组比对分析		病原体基因组 DNA	鉴定	比较详细的分型鉴定方法; 但成本高, 方法未完全建立

4 结语

从病原体的培养观察到较为特异的血清学诊断, 再到基因水平的诊断和鉴定分型, 人类在立克次体的诊断与分型道路上不断探索和前进。立克次体作为一种重要的生物战剂, 对其进行深度的流行病学研究和病原学分析意义重大。随着后基因组时代

的到来, 基因诊断与分型技术不断提高, 高通量的芯片和测序技术也不断发展和完善, 实现立克次体与立克次体病的早期快速检测与鉴定指日可待。

参考文献

[1] Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia* [J]. Ann NY

- Acad Sci, 2003, 990: 1-11.
- [2] Nyholm SV, Graf J. Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(12): 815-827.
- [3] Pacheco RC, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabó MP, Catroxo MH, Bouyer DH, Labruna MB. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(15): 5207-5211.
- [4] Izzard L, Graves S, Cox E, Fenwick S, Unsworth N, Stenos J. Novel rickettsia in ticks, Tasmania, Australia [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(10): 1654-1656.
- [5] Richards AL. Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 64(1): 107-110.
- [6] 栾明春, 俞东征, 唐立, 张丽娟. 立克次体病实验室诊断现状 [J]. *中国热带医学*, 2007, 7(3): 443-446.
- [7] Mahajan SK. Rickettsial diseases [J]. *J Assoc Physicians India*, 2012, 60: 37-44.
- [8] 张丽娟, 付秀萍, 范明远. 我国立克次体研究与立克次体病的流行现状 [J]. *热带病与寄生虫学*, 2005, 3(1): 37-42.
- [9] Raoult D, Fournier PE, Ereemeeva M, Graves S, Kelly PJ, Oteo JA, Sekeyova Z, Tamura A, Tarasevich I, Zhang L. Naming of Rickettsiae and rickettsial diseases [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1063: 1-12.
- [10] 张丽娟. 中国立克次体病监测及防治现状与展望 [J]. *疾病监测*, 2007, 22(9): 577-579.
- [11] Anderson PD, Bokor G. Bioterrorism: pathogens as weapons [J]. *J Pharm Pract*, 2012, 25(5): 521-529.
- [12] Walker DH. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 45 (Suppl 1): S39-S44.
- [13] Fournier PE, Drancourt M, Raoult D. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases [J]. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7(11): 711-723.
- [14] Uchiyama T. Growth of typhus group and spotted fever group rickettsiae in insect cells [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1063: 215-221.
- [15] Ogata H, Robert C, Audic S, Robineau S, Blanc G, Fournier PE, Renesto P, Claverie JM, Raoult D. *Rickettsia felis*, from culture to genome sequencing [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1063: 26-34.
- [16] 崔红, 张雪颖, 宫占威, 王建棉, 高方敏, 侯雨丰, 陈香蕊. 河北省无极县杨坊小学生斑疹伤寒血清抗体调查及分型 [J]. *中华流行病学杂志*, 2003, 24(7): 646.
- [17] Jiang J, Yarina T, Miller MK, Stromdahl EY, Richards AL. Molecular detection of *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma americanum* parasitizing humans [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010, 10(4): 329-340.
- [18] Tarasevich IV, Shaginyan IA, Mediannikov OY. Problems and perspectives of molecular epidemiology of infectious diseases [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 990: 751-756.
- [19] Zhang L, Jin J, Fu X, Raoult D, Fournier PE. Genetic differentiation of Chinese isolates of *Rickettsia sibirica* by partial *ompA* gene sequencing and multispacer typing [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(7): 2465-2467.
- [20] Zhu Y, Fournier PE, Ogata H, Raoult D. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (9): 4708-4712.
- [21] Fournier PE, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (12): 5456-5465.
- [22] Medina-Sanchez A, Bouyer DH, Alcantara-Rodriguez V, Mafra C, Zavala-Castro J, Whitworth T, Popov VL, Fernandez-Salas I, Walker DH. Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1063: 327-332.
- [23] Shpynov SN, Fournier PE, Rudakov NV, Samoilenko IE, Reshetnikova TA, Yastrebov VK, Schaiman MS, Tarasevich IV, Raoult D. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 74(3): 440-443.
- [24] Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2009, 1166: 1-11.
- [25] Dong X, El Karkouri K, Robert C, Raoult D, Fournier PE. Genomic analysis of *Rickettsia japonica* strain YHT [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(24): 6992.
- [26] Walker DH, Yu XJ. Progress in rickettsial genome analysis from pioneering of *Rickettsia prowazekii* to the recent *Rickettsia typhi* [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1063(1063): 13-25.

(收稿日期: 2014-12-09)