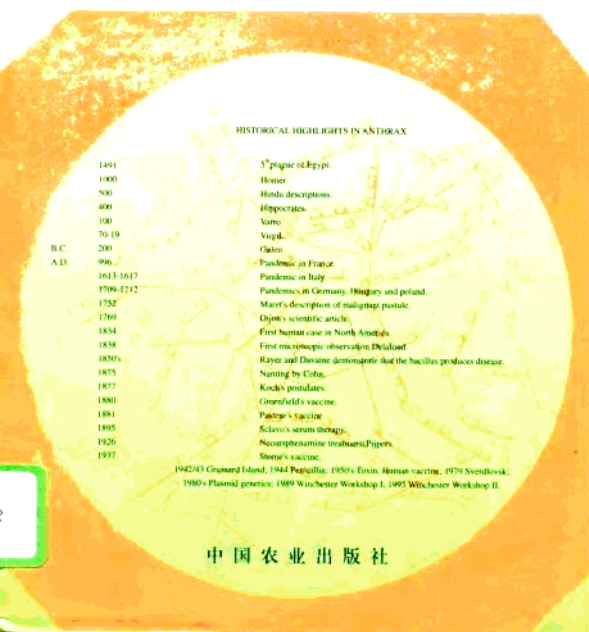


纪念巴斯德逝世100周年 斯特恩菌苗株问世58周年

现代炭疽研究进展

Modern Advances in the Studies of Anthrax

主编 梁旭东



中国农业出版社

93
1517.2
2
2

纪念 巴斯德逝世100周年
斯特恩菌株问世58周年

现代炭疽研究进展

Modern Advances in the Studies Of Anthrax

主编 梁旭东

X1121120



中国农业出版社



.C

354286

现代炭疽研究进展

主编 梁旭东

* * *

责任编辑 郭永立

中国农业出版社出版发行 (北京市朝阳区农展馆北路2号)

通县曙光印刷厂印刷

850×1168mm32开本 11.5印张 280千字

1996年6月第1版 1996年6月北京第1次印刷

印数 1—1000册 定价 38.00元

ISBN 7-109-04454-8/Q·286

主 编 梁旭东

副主编 肖东楼 南俊华 林 涛 王秉翔

编 委 (按姓氏笔划为序)

马凤琴 刘 慧 卢金呈 李更德

杨 珊 苏崇鳌 俞东征 赵 明

徐建国

编 审 董树林 刘秉阳 祁国明

参加编译作者名录 (以单位为序)

- 南俊华 中华人民共和国卫生部
刘 慧 中华人民共和国农业部
祁国明 中国预防医学科学院
苏崇贇 中国预防医学科学院
肖东楼 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
徐建国 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
刘贵阳 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
俞东征 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
卢金呈 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
梁旭东 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
林 涛 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
马凤琴 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
景怀奇 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
吴海彦 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
董树林 卫生部兰州生物制品研究所
王秉翔 卫生部兰州生物制品研究所
王 楝 卫生部兰州生物制品研究所
陈翠萍 卫生部兰州生物制品研究所
刘远恒 新疆自治区卫生防疫站
杨 珊 新疆自治区卫生防疫站
赵 明 青海医学院
李更德 青海省西宁市第一人民医院
史献明 河北省地方病防治所

序

炭疽是一种典型的人兽共患传染病，它多年来一直为人们所关注。在距今146年前的1850年，科学工作者 Davaine 从溺死的病羊血中看到了杆状微生物，但并不明白它是什么。说明这些杆形物就是炭疽的病原体，是由德国著名学者 R. Koch (郭霍) 于1876年通过人工体外培养方法完成的。另一个重要的发现是由法国科学家 L. Pasteur (巴斯德) 在1881年用高于一般培养病原菌的缓慢培育传代后 (42—43°C) 的炭疽弱毒活菌接种牲畜群，于二周后用强毒菌攻击，试验组的24只绵羊、1只山羊和6头奶牛无一发病，而对照组的24只绵羊、1只山羊和4头奶牛全部死亡。这一成功的试验不仅说服了对巴斯德的观点 (弱毒菌苗可使羊得到保护，避免强毒菌感染) 持不同意见的著名兽医 Rossignol，而且还为巴斯德后来利用人工处理的狂犬病毒活疫苗通过接种保护狗和人的实验获得成功奠定了理论基础。上述在微生物学和免疫学中具有重大里程碑意义的历史事件都与炭疽这一古老疾病的病原菌及其在人畜中的防治密切相关。

一个多世纪过去了，随着科学技术在基础研究中的重大进步，炭疽有关问题的研究又有了崭新的进展。发现和明确了炭疽杆菌决定毒力的几个因子。它们是决定细菌侵袭力的荚膜 (多聚 α -谷氨酸肽组成) 和细菌的外毒素。后者是由3个因子组成的，分别称为：I. “EF” 即水肿毒素，II. “PA” 即保护性抗原和 “LF” 即致死因子。水肿毒素实际上是一种腺苷酸环化酶的无活性形式，当它与保护性抗原结合时才能起作用——它能使细胞内的环磷酸腺苷 (CAMP) 升高引起水肿，同时，还有致死毒素的作用，这种

毒性复合物会迅速导致感染动物以及炭疽患者的死亡。通过分子遗传学研究,发现炭疽杆菌的荚膜和毒素的有无是由它们的遗传基因组 DNA 分别决定的。这两个基因组都存在于染色体外的大质粒中。它们分别称 pXO1 (184.5Kbp——编码毒素组分的形成)和 pXO2 (95.3Kbp——编码荚膜)的合成。这两个决定炭疽杆菌毒力的质粒已被证明能在环境中重碳酸盐/CO₂ 存在的情况下编码一个贯通活化因子 (Transactivator)——它能导致两种毒力因子的合成和活化。不仅弄清了两种毒力质粒中 EF, PA 和 LF 的位置和转录方向以及荚膜基因的位置和它们复制时的起始部位,而且也证明了在质粒 pXO1 中的一型 DNA 局部异构转移酶 (Type I topoisomerase) 基因对于保持这个质粒的稳定性及其毒素的表达能力具有重要作用。关于早年巴斯德获得的温敏弱毒疫苗为什么能保护接种动物免受强毒菌攻击而存活的不解之谜也在 1 个世纪以后由科学实验证明,即在 42.5℃ 培养时炭疽杆菌毒株不合成质粒 pXO2 这一编码荚膜外层物质,此外,编码 3 个毒素因子的质粒 pXO1 基因也同时受到温度和重碳酸盐的浓度的调节作用而发生变化。还证明了另一个调节因子对于毒力基因的表达十分重要;即 DNA 螺旋的构型如超扭转 (Supercoiling) 构型态。丢失质粒 pXO2 的炭疽杆菌不生成荚膜,它具有有序的“S 表层”细胞壁,它的合成却是由细菌染色体 DNA 片段编码。这一基因的顺序也已查明,经推断它的氨基酸顺序指明:在它的 N 末端含有 3 个 SLH 顺序。若这一基因被去除,这一突变株的“S”表层细胞壁也就消失了。在含有 pXO1 质粒的炭疽菌株中,这个基因的“S 层”蛋白质表达比 pXO1⁻ (即不含此毒素复合物质粒)菌株中的较多一些,但在实验室中多次传代培养后,这一膜蛋白将会完全消失。另外,近年来学者们还证明了炭疽杆菌的毒力因子的遗传决定基因不仅存在于两个质粒中,而且还存在于细菌染色体中。通过小鼠足垫内注射炭疽杆菌的芽孢,对比枯草杆菌的试验结果说明:当枯草杆菌能很快地被动物清除于体外时,用作试验的所有

菌株包括消除了两个毒力质粒的细菌在内都能长期地在宿主体内存活下来。它提示：炭疽杆菌有别于一般无病原性的枯草杆菌，它不仅具有毒力质粒基因，且它的染色体 DNA 中存有毒力决定基因，使其能抵御宿主的防御机制，从而继续保存活力，并表现致病力作用。

科学家通过给小鼠皮下接种各种不同毒力的炭疽杆菌菌株，发现了不同菌株之间明显有区别。拥有“毒素质粒”（即 pXO1⁺ 菌株）的菌株，即使其中的两个毒素因子已经被消除，接种动物仍出现疾病，而不具有此质粒（即 pXO1⁻ 株）的菌株则否。这个试验的结果提示：pXO1 这一质粒的存在是炭疽杆菌在宿主动物体内进行繁殖的必需前提。上述两个动物模型试验帮助我们进一步认识到遗传物质中细菌染色体部分和染色体外的两个毒力质粒 DNA 都对炭疽杆菌具有的毒力起了作用。为了补充说明毒力因子的多元性，在宿主动物体内寻找针对各种毒力抗原而合成的蛋白质——相应抗体无疑是一种有力的工具。学者们发现：EA1 蛋白是由染色体编码形成的，而 EA2 抗原蛋白则是在质粒 pXO1 上的基因编码。这两种抗原在毒力中的作用还有待进一步研究。用不同株炭疽杆菌在体外培养和在动物体内生长繁殖后形成的菌蛋白二者进行比较研究，将会给我们提供有意义的分析资料。当前，这一方面的研究工作正在一些先进国家的炭疽毒力研究实验室中开展，其中包括在法国巴黎的巴斯德研究所的毒素分子遗传研究室。在巴斯德逝世 100 周年的今天，上述“毒力”与致病机制和减毒疫苗的基础性研究仍是防治炭疽在人、畜群中发生的根本。其他方面包括世界范围的流行病学调查研究，人兽群的现场疾病表现，疫源地、炭疽菌及其芽孢的生态学分析以及消毒无害化问题等都在研究中取得了很大的成绩。特别是在过去的 10 多年中分子生物学技术的新发展促进了我们对炭疽杆菌这一古老微生物的新认识，从 1989 至 1995 年的短短 6 年中就由世界卫生组织和国际微生物学会联合会等共同组织召开了两次内容丰富的炭疽学术研

讨会。来自世界各地的代表共计 200 人次参加了两次学术座谈会，两次会议中我国委派科学工作者参加会议，交流了各方面的科研成果和经验，探讨了海湾战争中和前苏联出现 Sverdlock 事件的教训等。在 1995 年 9 月召开的研讨会中，各国科学家们对炭疽毒素和炭疽杆菌的身经多次被战争狂人用作屠杀和平人民的生物武器表示愤慨，一致认为这种罪恶行为违背了科学工作者的职业道德和良知，更有悖于老一辈科学大师巴斯德、郭霍等本着人道主义精神，为解放人类疾苦而献身科学，奋斗终生的一贯初衷。科学家们呼吁禁止使用一切化学和生物武器国际公约的早日签订。在我们纪念伟大的导师、炭疽免疫研究的先行者巴斯德逝世 100 周年的时候，为了全人类的健康和幸福，为了使牲畜免遭炭疽的侵袭而造成损失，我们要继承先人的遗志，以不懈的努力，完成他们未竟的事业。

我国从事炭疽防治和科研工作多年并取得成就的老科学家董树林、庄汉澜同志和中青年科学工作者梁旭东同志分别出席了第一、二届国际炭疽学术研讨会，并组织专人将两次座谈会中交流的学术资料或论文摘要进行编译，同时将我国有关这一疾病的科研成果择要加入，汇编成册，准备付梓以利我国的学术交流和干部培养。以此纪念世界科学巨人巴斯德逝世 100 周年，表达我们对他的永恒怀念和景仰之忱，我认为是很意义的。

刘秉阳

于中国预防医学科学院
流行病学微生物学研究所

1996 年 3 月

前 言

为了纪念微生物学的奠基人——巴斯德逝世(1885—1995) 100周年,在英国应用微生物学会的大力赞助下,世界卫生组织于1995年9月18—21日在英国温彻斯特市第二次召开了国际炭疽专题研讨会,会议为期四天,着重讨论了控制动物炭疽的办法。参加本次会议的有来自28个国家和地区的代表共120人,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所的梁旭东同志应大会组织者的邀请代表中国参加了这次盛会,并在大会上作了关于《中国炭疽监测与控制研究》和《中国炭疽杆菌分子流行病学研究》的专题报告,受到了与会代表们的关注和好评。

本次大会报告交流论文45篇,以墙报的形式交流论文45篇。论文内容可归纳为六类:流行病学和生态学研究16篇;致病机理研究10篇;分类、检测、鉴定和诊断20篇;分子生物学11篇;疫苗研究20篇;历史回顾、消毒、健康教育以及战略观念等13篇。

本次会议的论文,除了应用一般经典方法(如生态学和流行病学等)取得不少成就外,在致病机理、分类、检测、鉴定和诊断以及遗传和疫苗研究等方面都不同程度地进入了分子水平,反映了当前世界范围内炭疽研究的最新进展和今后实验研究工作的方向。会议还对1979年前苏联斯维尔德夫斯克市发生的泄露炭疽毒素事件和海湾战争引起的教训进行了热烈讨论,从而提出了今后在加强生物武器控制方面的一系列措施和意见。

为了解全球炭疽发展现状及其研究进展,促进我国炭疽监测与控制研究工作的发展,我们组织有关人员对本次会议上交流的90篇论文(包括摘要)作了编译,还有选择地收集了1989年第一

次炭疽国际会议上交流的重要论文以及近年在国内外发表的部分具有参考价值的论文 52 篇,总计为 142 篇资料,供医学和农业院校相关专业的人员和从事人、畜炭疽研究的科技干部以及广大基层防疫人员学习参考,并提供这一最新资料作为世界卫生组织 1996 年在我国举办培训炭疽干部学习班的主要参考教材。期望本书的出版能推动我国炭疽领域的教学、科研和防制工作的进程,并使我国炭疽研究提到更新、更高的水平,达到国际先进。

本书在编译出版过程中得到了卫生部疾病控制司,农业部畜牧兽医司、中国预防医学科学院、中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所领导的大力支持,并得到了卫生部兰州生物制品研究所董树林研究员的鼎力相助,谨致深切谢意。

由于编辑内容多,工作量大,编者水平有限,错误之处在所难免,恳请广大读者提出宝贵意见,以利修正。

编 者

1996 年 3 月

目 录

流行病学

- 1993 年和 1994 年世界炭疽流行的现状 M. E. Hugh-Jones (1)
- 我国炭疽高发省(区)监测与控制研究..... 梁旭东等 (4)
- 三峡库区炭疽疫源地调查情况及防制意见..... 梁旭东等 (9)
- 炭疽自然疫源地的复发病规律 B. L. Cherkasskiy 等 (11)
- 炭疽是一直困扰印度南部的问题..... M. K. Lalitha 等 (12)
- 赞比亚西部的炭疽流行情况 Godfrey Bbalo 等 (13)
- 坦桑尼亚地区对炭疽实施的控制措施 S. F. H. Jiwa (16)
- 尼泊尔人间和动物间炭疽流行情况 D. D. Joshi 等 (18)
- 土耳其人间炭疽流行情况 M. Doganay (19)
- 克鲁格国家公园大面积炭疽暴发的流行病学调查 V de Vos 等 (20)
- 纳米比亚伊图沙国家公园炭疽疫情分析 P. M. Lindeque 等 (23)
- 加拿大北部驯犴中炭疽流行情况 D. C. Dragon 等 (24)
- 炭疽在海地的流行情况及控制措施 J. Valbrun 等 (26)
- 对朝鲜近期炭疽暴发流行中的炭疽病人进行血清学检测 Hee-Bok Oh 等 (27)
- 我国炭疽监测与控制研究进展..... 梁旭东 (28)
- 我国炭疽研究进展..... 梁旭东等 (32)

病原学

炭疽杆菌的弱毒分离株鉴定和强毒株

- 消化酶减毒试验..... 董树林等 (37)
- 炭疽芽孢杆菌噬菌体 AP631 的生物学特性检测
- 王秉翔等 (39)
- 世界范围内的炭疽菌株检测 D. C. Dragon 等 (41)
- 英国炭疽的发病率和环境中炭疽杆菌的检测
- P. C. B Turnbull 等 (42)
- 炭疽杆菌芽孢荚膜形成和芽孢鉴定 J. W. Ezzell 等 (43)
- 多重 PCR 试验鉴定炭疽杆菌和蜡样杆菌群.....
- V. Ramisse 等 (44)
- 来自不同炭疽杆菌菌株的噬菌体 C. Redmond 等 (46)
- 用系统的表型标准方法鉴定炭疽杆菌
- N. A. Staritzyn 等 (48)
- 格雷纳德岛上的炭疽杆菌分离与鉴定
- R. J. Manchec 等 (51)

分子生物学

不同来源的炭疽杆菌质粒 DNA 和全菌蛋白

- 电泳分析..... 梁旭东等 (52)
- 地高辛标记炭疽杆菌 DNA 探针的研究 梁旭东等 (56)
- 不引发炭疽的炭疽芽孢杆菌..... P. C. B. Turnbull 等 (59)
- 热分解质谱分析法分析炭疽杆菌图谱
- Nigel F Lightfoot 等 (67)
- 炭疽杆菌荚膜操纵子的结构和功能及其表达产物在
- 炭疽致病机理中的作用..... Staritzyn N. A 等 (67)
- 炭疽杆菌 Tn917 转座作用分析 Timothy Hoover (70)
- 炭疽杆菌与靶细胞的相互作用 Stephen H Leppla 等 (72)
- 炭疽毒力基因决定体 A. Fouet 等 (73)

炭疽毒素基因调控	Zhihao Dai 等 (75)
炭疽杆菌是体内抗原释放的表达载体	Jean—Claude Srrard 等 (77)
快速鉴定炭疽杆菌的特异性寡核苷酸引物 ...	G. Patra 等 (79)
质粒表达在炭疽杆菌细胞电动势上的影响	S. Yereimin 等 (82)
用DNA-DNA 杂交和 DNA 扩增指纹图谱分析观察炭疽杆 菌和蜡样芽孢杆菌之间的分类学关系	Heike Roloff 等 (83)
炭疽杆菌 pXO1 启动子和 Pag 基因在土拉杆菌中的 克隆	Vitalii M. Pavlov (85)
炭疽杆菌编码芽孢的染色体基因和毒力基因 偶联的可能性研究	S. Yereimin 等 (86)
炭疽杆菌毒素因子分子功能区域作用的探讨	A. N. Noskov 等 (87)
蜡样杆菌和炭疽杆菌毒素的结构相似性的比较	Yu. V. Epchuk 等 (89)
炭疽杆菌致死因子 (Lef) 和水肿因子(CYa)的核苷酸序列: EF 和 LF 功能区的阐述	Donald Robertson 等 (92)
炭疽毒素致死因子 1—254 残基构建融合多肽 即可发挥生物作用	N. Arora 等 (94)
用基因融合方法研究炭疽杆菌的毒力基因表达	Joanne M. Martkus 等 (94)
炭疽杆菌的基因交换和转座子致突变作用	D. D. Heemskerk (99)
炭疽杆菌毒素表达的遗传学研究	A. Cataldi 等 (105)
根据 DNA-DNA 杂交和 (G+C) Mol % 进行炭疽杆菌分类	R. Bohm 等 (106)
炭疽杆菌腺苷环化酶 (EF): 基因及其蛋白质	M. Ichele Mock (109)

- 炭疽杆菌产荚膜基因区域克隆 I. Vchida 等 (110)
- 炭疽杆菌质粒 pXO1 和 pXO2 的制图和鉴定
..... Donald. L. Rolertson 等 (112)
- 炭疽杆菌内的细胞外蛋白酶 Alexey S. Stepanov 等 (116)

诊断学

- 用PCR 方法自实验动物体内检测炭疽杆菌 DNA
..... 梁旭东等 (118)
- 免疫荧光法检测炭疽荚膜抗体早期诊断炭疽的探讨
..... 过祥豹等 (122)
- 一种分离炭疽杆菌的选择性鉴别培养基的研制
..... 梁旭东等 (125)
- 一种培养炭疽杆菌产生荚膜的新方法 梁旭东等 (127)
- 鉴别炭疽杆菌的新特征 高树德等 (129)
- 用DNA 探针检测炭疽杆菌 R. A. Hutson 等 (133)
- 炭疽杆菌 PCR 图谱 I. Henerson (136)
- 炭疽杆菌的 DNA 图谱分析 G. Patra 等 (137)
- 炭疽菌素——一种用于早期和回顾性诊断炭疽的
皮肤试验 E. Shiyakhov (139)
- 用BIOLOG 系统鉴定弱毒炭疽杆菌分离物
..... L. M. J. Baillie 等 (141)
- 用API50CHB 系统鉴定炭疽杆菌 R. Cogne 等 (141)
- 炭疽杆菌保护性抗原的单克隆抗体作为诊断目的的
可能应用 C. Klein-Albers 等 (143)
- 瑞士用“炭疽菌素”皮试回顾性诊断炭疽
..... R. M. Pfisterer (145)

免疫学

炭疽保护性抗原的理化特性和免疫原性的

初步观察	庄汉澜等 (148)
免疫荧光法检测炭疽病人血清中荚膜抗体的	
初步结果	过祥豹等 (149)
酶联免疫吸附试验检测炭疽病人血清抗毒性	
抗体的研究	薛采芳等 (154)
炭疽杆菌毒素的纯化和单克隆抗体的制备	王棣等 (159)
使用 Sterne 芽孢菌苗对大规模自由活动的野生	
动物进行远距离群体免疫	V de Vos 等 (163)
炭疽杆菌生长细胞的表面抗原和保护性抗原的	
血清蛋白酶裂解分析	W. John 等 (165)
应用酶联免疫分析试验检测绵羊和牛血清中	
炭疽杆菌的抗体	G. R. Ferrier 等 (169)
由抗独特型抗体检测炭疽杆菌保护性抗原的	
免疫应答	D. A. Fercival 等 (171)
实验室工作者中广泛存在炭疽杆菌 Sterne 菌株的	
抗体	P. Hunter 等 (173)
炭疽毒素的细胞介导免疫反应	E. D. Williamson 等 (174)
炭疽杆菌对气溶胶攻击的保护力	M. G. Broster 等 (179)
炭疽发病中巨噬细胞所起的作用	P. C. Hanna 等 (180)
蜡样芽孢杆菌的磷脂酶 C 和神经磷脂酶在抗炭疽保护作用	
中的免疫调节作用	A. P. Pomerantsev 等 (181)
炭疽杆菌特异的芽孢蛋白抗原	C. P. Quinn 等 (182)
用酶联免疫分析检测感染者产生炭疽杆菌 PA	
抗原的保护性抗体	C. Kleine Albers 等 (185)
炭疽杆菌在宿主细胞内外合成的质粒和染色体编码因子对	
巨噬细胞的杀伤作用	Alexey S. Stepanov 等 (187)

菌苗研究

炭疽保护性抗原菌苗的动物免疫效果	庄汉澜等 (189)
------------------------	------------

炭疽吸附抗原对山羊免疫效果的初步观察	庄汉澜等 (194)
纪念 Max Sterne 和 34F ₂ 菌苗菌株的问世	
..... Tikvah Ainer (199)	
在短小芽孢杆菌 47 株中产生炭疽杆菌保护性抗原	
高效表达系统的建立	M. L. Rees 等 (201)
用保护性抗原片段预防实验性炭疽感染	
..... S. F. Little 等 (201)	
保护性抗原是基因工程菌苗的基础	
..... Yogendra Singh 等 (203)	
用气雾芽孢攻击测定标准人用炭疽菌苗在猕猴体内	
抗炭疽的效果	B. E. Ivins 等 (205)
在纳米比亚伊图沙国家公园炭疽菌苗诱导斑马和	
大象血清学改变的观察	C. Brain 等 (206)
炭疽联合冻干菌苗的研制以及在实验室和农用动物中	
试验效果的评价	T. L. Anisimova 等 (208)
以豚鼠为模型检验英国人用疫苗对有毒炭疽杆菌毒株	
芽孢气溶胶感染的保护效果	M. N. Jones 等 (209)
对口服炭疽菌苗的初步鉴定	F. Gessler 等 (210)
用豚鼠模型进行炭疽菌苗对非肠道感染	
保护效果的试验	Suprodjo Hardjoutomo 等 (212)
炭疽菌苗 STI-1 株和实验株 Zen Kovsky 的筛选和	
制备方法的建立	T. L. Anisimova 等 (214)
纯化保护性抗原和 MDPH 对人以外的灵长类动物吸入型	
炭疽保护效果的比较	M. L. M. Pitt 等 (215)
炭疽杆菌细胞表面 92KD 分子量的蛋白抗原在抗炭疽的	
保护性免疫中起重要作用	Besonsov M. V 等 (216)
对微生物附加 UK 菌苗和 PA 纯化菌苗产生保护力的	
研究	P. C. B. Turnbull 等 (217)
标准人用炭疽菌苗对豚鼠的保护效力	