

# 关于嗜肺军团菌的微生物学研究

陈 恩 临

(广西壮族自治区卫生防疫站)

1976年7月在美国费城暴发过一次由前所未知的病原引起的流行病,由于主要患者是美国退伍军人组织年会的代表,被名为军团病。从该病致死者肺组织中分离到一种革兰氏阴性菌,以其鸡胚卵黄囊培养物为抗原检测可疑血清,证实该种杆状细菌是军团病的病原,并被命名为军团病杆菌 (*Legionnaires' disease bacterium*)<sup>[1]</sup>。除北美外,目前在欧洲、澳大利亚等处也有该病流行或散发,并分离到该菌。此外,该菌还能引起症状与军团病症状完全不同的一种疾病,称Pontiac热<sup>[2]</sup>。因此,对这类细菌的研究近年来进展很快。1979

年,该菌被定名为嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)<sup>[3]</sup>。现就其生物学特性综述如下。

## 分离与培养

嗜肺军团菌最初是以尸检材料接种于豚鼠腹腔,于豚鼠死后取其含大量细菌的肝脏和脾脏制成悬液,再接种到6日龄的鸡胚卵黄囊中,35℃培养后分离得到的。为探求最适培养条件,Feeley发现,在加有1%血红素和1% IsoVitalex 的 Muller-Hinton (MH-1H) 培养基上生长良好。后又发现可溶性的焦磷酸铁可代

替血红素,并且效果较优。在此基础上他们提出了 F-G 琼脂培养基,培养 4 天后菌落出现较多<sup>[4]</sup>。后又报告,以酵母浸汁作蛋白质来源,再加入 0.2% (重量/体积) 活性炭的培养基 (CYE 培养基)比 F-G 培养基,据说效果更好。Smalley 报告在 F-G 培养基中加入 5—10 μg/ml 硒酸钠,可增进本菌生长,18 小时出现菌落<sup>[13]</sup>。还有人用市售加料棕色含血琼脂 Gibco,在含 CO<sub>2</sub> 的条件下直接从胸膜液及肺组织标本中各分离出一株该菌。Edelstein 利用含 40 单位以下多粘菌素 B 和 1 μg 万古霉素的 CYE 培养基,自三份严重污染杂菌的肺组织标本中分离出该菌。该菌于第 8 天长出<sup>[4]</sup>。

嗜肺军团菌的最适生长温度为 35℃,最适 pH 为 6.9, (对 pH 的适应范围较狭窄),需氧,但要求含 2.5—5.0% 的 CO<sub>2</sub>,厌氧条件下不生长。

嗜肺军团菌用改良的 M-H 培养基传代易失去毒力,通过人胚肺成纤维细胞传代可得到恢复<sup>[17]</sup>。

## 形态

嗜肺军团菌大小为 0.3—0.4 μm × 2—3 μm,有的直杆状,两端钝圆;有的微弯或呈纺锤状;也有的呈丝状。菌体呈多形性,因培养条件而异,如有人发现培养基上培养 4—7 天形成长达 100 μm 的菌体,但在卵黄囊中呈丝状的菌体较少,肺组织中极少有伸长到 8 μm 以上者。处于分裂末期的菌体长 10—15 μm。在合成培养基上,在稳定期末丝状菌体变成链状的雪茄样杆菌,继而断裂成对,再培养或限制营养时则变为球状。

电子显微镜观察证实为典型的原核生物。丝状的核酸散布于局限的核糖核蛋白体区域内。胞浆内可见空泡及包涵体。菌体外围的包被具有典型的革兰氏阴性菌形态,可见胞浆膜及外膜,均为典型的三层结构的单位膜。在两层膜间有一电子透射层。有人报道见到细胞内膜,或为胞浆膜的内褶。在一些菌株已分离到有质粒,其功能尚不明。此菌不生芽孢<sup>[6,9,10]</sup>。

Thomason 在 *Togus* 1 株中见到直的及弯曲的鞭毛,在一端或两端,亦可在侧面。有些菌有长而薄的“飘带 (Streamer)”,这种细长的附属物除长度不一般外,很像纤毛。有的菌株可同时具有鞭毛及飘带<sup>[11]</sup>。

此菌为革兰氏阴性菌,但蕃红花红很难染色,此点甚至被认为是它们长期未被发现的原因。但用石炭酸复红可以复染。1% 的甲苯胺蓝, 0.1% 天青对热固定的新鲜培养物,或经甲醛固定的肺组织,石蜡包埋的切片及 Epon-Araldite 包埋的超薄切片均能染色。卵黄囊涂片以 Giménez 染色为佳,但此法不宜染石蜡切片。Dieterle 银浸染法适用于各种标本,较为敏感<sup>[12,13]</sup>。此菌抗酸染色阴性。

菌落形态在 MH-1H 及 F-G 培养基上基本相同,3 天时菌落小如针尖,再过 4—5 天增大,色白,较光滑,生长密的地方,菌落及其周围有暗褐色。10° 角斜射光

照明,显微镜下见菌落淡蓝,有如雕花玻璃。在 F-G 培养基上,在 366nm 波长紫外光下产生荧光。在 CYE 培养基上,菌落更光滑,但不见褐色素及荧光,亦不见“雕花玻璃”状。用 Gibco 培养基,菌落起初很小,数日后可达 3—4mm,灰色,有光泽,粘稠,但不难从培养基上刮下<sup>[4,13,14]</sup>。

与军团菌类似的其它细菌 (LLO),在初次培养时只生长在 CYE 液固双相培养基上,继代培养时可在 F-G 营养琼脂上生长。

## 营养要求与生化特性

嗜肺军团菌的生长需要一定的无机盐。Pine 的合成培养基中加有钾、镁、钙、锌、硫、磷及微量元素铁、锰、钼等,还加有肌醇等 6 种 B 族维生素,硫辛酸和辅酶 A<sup>[15]</sup>。对氨基酸的需要,以甲硫氨酸,半胱氨酸最重要。精氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸及酪氨酸亦为各菌株所必需,但需有 20 种氨基酸才能正常生长及传代。

Weiss 等用两株菌,在卵黄囊及 CYE 双相培养基中测定了 <sup>14</sup>C 标记的葡萄糖、谷氨酸和琥珀酸等在菌体中的掺入及 CO<sub>2</sub> 的释放。认为谷氨酸是最活跃的代谢物质。当谷氨酸浓度低时,或细胞浓度高时,主要产生 CO<sub>2</sub>,反之则掺入大分子中。葡萄糖浓度低时则反而掺入大分子的比例高。葡萄糖经磷酸戊糖和 Entner-Doudroff 途径或二者之一代谢<sup>[16]</sup>。

CO<sub>2</sub>、丙酮酸、α-酮戊二酸可刺激该菌生长<sup>[15]</sup>。

不同菌株的脂肪酸气相色谱-质谱图形一致。其特点之一是脂肪酸含量高,其二是支链脂肪酸占 80% 以上。支链脂肪酸主要存在于革兰氏阳性菌中,该菌这一特点可应用鉴定。

嗜肺军团菌产生过氧化氢酶,氧化酶弱阳性。水解淀粉,不利用其它糖类。酶活性测定亦表明无 α-L-岩藻糖苷酶, α-D-半乳糖苷酶等 7 种糖苷酶。能水解马尿酸钠,可与属内其它菌种相鉴别。水解明胶,不还原硝酸盐,无脲酶活性。未发现赖氨酸脱羧酶及精氨酸双水解酶。本菌对常见的氨基酸除脯氨酸及羟脯氨酸外均有氨基肽酶活性;磷酸酯酶阳性,此二点认为可能与其致病力有关。无胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性。其产生褐色素的能力与苯丙氨酸羟化酶有关。有的报告指出本菌能产生 β-内酰胺酶<sup>[17,18,19]</sup>。

## 分类与命名

Brenner 利用 DNA 杂交技术和 GC 含量测定判明了嗜肺军团菌的分类地位<sup>[4,20]</sup>,它的 GC 含量为 39%,将其它各类 GC 含量与此相近的细菌,与其进行 DNA 杂交试验,其相关度仅为 0—5%,而用不同血清群的 18 株军团病杆菌进行 DNA 杂交,相关度在 80% 以上。它的 DNA 分子量约为 2.5 × 10<sup>6</sup> 道尔顿,约相当于

3000 个基因携带的信息。

为此, Brenner 等建议设军团菌科, 军团菌属, 原称军团病杆菌的细菌定名为嗜肺军团菌, 并以 Philadelphia 1 菌株作为模式株<sup>[19]</sup>。

对于不同时期分离的那些类似军团病杆菌, 但不同于嗜肺军团菌的细菌, 依据其生物学特性及 DNA 相关性, 亦相继分别被定为几个新种。如 *Legionella bozemanii*, *L. micdadei* 等。而 *L. pittsburgensis* 与 *L. micdadei* 是同种异名。

## 血清学分群及抗原

对嗜肺军团菌的抗原结构, 目前研究尚少。主要依据直接荧光抗体染色反应来分群。

McKinney 最初发现 1:80 的 Knoxville 1 株的荧光血清不能染色 Togus 1 株, 反之亦然; 同时 Bloomington 2 菌株与 Los Angeles 1 菌株又都不能被上述两株菌的荧光血清染色。因此, 他用上述 4 菌株为代表, 制备了 IgG 荧光抗体, 检验了 35 株嗜肺军团菌。同时用盐水提取抗原与血清进行免疫电泳。结果发现, 只有同菌株的血清与抗原出现明显的沉淀弧, 各菌株间共同的抗原反应微弱。为此, 他提议将它们分为 4 个血清群<sup>[21]</sup>。后来, England 报告了第 5 个血清群, McKinney 又用 Chicago 2 菌株的免疫血清与各已知血清型进行交叉试验, 确定了第 6 个血清群, 并发现该群菌株与第 3 群菌株有交叉<sup>[22]</sup>。

Wong 等将 Knoxville 1, Bellingham 1 及 Togus 1 三株菌用溶菌酶及 DNA 酶处理, 用醋酸锂缓冲液提取后通过 DEAE 柱, 得到了两个成分。一种是型特异抗原, 为类脂-蛋白质-糖复合物, 并含有支链脂肪酸; 第二种成分是交叉抗原, 主要是蛋白质。Knoxville 1 和 Togus 1 型抗原间无交叉, 而与 Bellingham 1 有部分相同。各型间的交叉抗原成分复杂, 可有 5 条主要的及 15 条次要的沉淀带<sup>[23]</sup>。据 Johnson 报告, Philadelphia 2 菌株含一种大分子的 F1 抗原。用恢复期患者血清进行间接荧光染色及微量凝集试验表明, F1 抗原可能是一种主要抗原, 并有型特异性<sup>[24]</sup>。应用超薄切片免疫酶标记技术, 证明 F1 抗原存在于细胞表面<sup>[25]</sup>。

## 毒素

虽然目前所报道的菌株大多数来自患者, 已知各血清群均有致病性, 但有关毒素及发病机理却知之甚少。Wong<sup>[26]</sup> 用细胞的水抽提物和纯化的细胞壁碎片研究了嗜肺军团菌的内毒素性 (endotoxicity)。发现在试管中对鲎变形细胞溶解物有高度凝固活性。将该菌注射给小鼠, 测量 7 天中的体重变化, 显示典型的内毒素曲线, 但毒性比用作对照的淋病奈瑟氏菌低 6 倍。放线菌素可使内毒素毒性增强 2000 倍, 但对嗜肺军团菌的毒性增强不过 10 倍。多粘菌素 B 对它的减毒作

用也很弱。注射给家兔相当于干重 1.5 mg 的该菌, 未能诱发 Schwartzman 反应。由该菌的化学分析, 认为其“内毒素性”的活性因子是一种新型脂多糖。但 Johnson 由该菌制备的高分子量的 F1 抗原, 含糖 35%, 蛋白质 2.6%, 磷脂 1.8%, 和 1.0% 2-酮-3-脱氧辛酸。其化学性质接近革兰氏阴性菌中的内毒素, 注射家兔会出现双峰热, 并能导致 Schwartzman 反应<sup>[24]</sup>。

嗜肺军团菌有裂解红血球的作用, 感染该菌死后的鸡胚羊膜囊液, 除菌后亦可使豚鼠血球裂解。这种活性在 60°, 30 分钟或 100°, 15 分钟处理后仍存在。该菌在含 5% 卵黄的 F-G 琼脂上还表现有消化卵黄的能力。这些特性又可能和产生外毒素有关。动物试验未检出嗜肺军团菌中有像大肠杆菌中的 LT(不耐热肠毒素)和 ST(耐热性肠毒素)样物质。

Friedman 报告过嗜肺军团菌会产生一种细胞毒素, 可能是一种小分子的多肽<sup>[27]</sup>。Müller<sup>[28]</sup> 报告, 该菌对 23 种人血清蛋白中的 5 种有水解作用。认为对其中  $\alpha$ -抗糜蛋白酶的灭活作用, 可能会引起肺综合症。这一情况类似于因缺少抗糜蛋白酶而产生的慢性肺机能不全症。

## 免疫反应

将嗜肺军团菌与食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 的肺泡巨噬细胞混合培养, 发现吞噬细胞并不能杀死嗜肺军团菌, 而且细菌在其中大量繁殖, 这说明嗜肺军团菌能解除寄主的初级防御机制<sup>[29]</sup>。

Arko 用  $10^8$  CFU (菌落形成单位) 的活菌与正常人血清按 1:1 混合, 发现细菌能消耗其中 50% 以上的补体, 并且其自身加速死亡。用皂土除去溶菌酶等血清成分并不影响血清的杀菌效果, 但 56°C 处理 30 分钟却会丧失杀菌能力。有 1:20 抗 Knoxville 的间接荧光染色的抗体, 但缺乏 C'4 成分的人血清, 无杀菌作用; 如加入正常人血清, 1.5 小时后即杀死全部细菌。ICR 品系的小鼠因缺少补体 1、2、4 等成分, 亦无杀菌力。这些都说明杀菌作用是通过补体途径<sup>[30]</sup>。Johnson<sup>[31]</sup> 用 F1 抗原吸收证明血清的调理活性有型特异性, 在无抗血清时, 大鼠肺及小鼠腹腔中的巨噬细胞均不吞噬嗜肺军团菌。以 F1 抗原免疫豚鼠, 可保护同型菌 100 LD<sub>50</sub> 的攻击, 而对不同型免疫者无效<sup>[32]</sup>。

以可溶性抗原自动免疫或用羊抗嗜肺军团菌血清被动免疫 AKR/J 系小鼠, 均能保护动物接受  $2 \times 10^6$  个菌的腹腔攻击而不死亡。未免疫小鼠则在 24 小时内全部死亡。有意义的是, 上述被免疫动物虽不死亡, 在攻击后 4—6 小时后又出现症状。细菌在被免疫动物的脾脏中不增殖, 并逐渐减少, 未被免疫的则会增殖, 攻击后 4—6 小时菌数最高, 濒死前有所减少<sup>[33]</sup>。

关于细胞免疫的报道较少。Wong 以灭活抗原加弗氏佐剂, 或用活菌致敏豚鼠。分别以其制备的型抗

原及交叉反应抗原进行激发超敏反应研究。发现两种抗原均可引起超敏反应。皮肤反应在激发后2—4小时开始出现,前24小时反应逐步增强,然后逐步消退。48小时后组织学检查可见型抗原的反应是皮下小血管及周围组织中有多种形核白细胞,整个真皮中有单核细

胞浸润;交叉反应抗原的反应主要为单核细胞浸润。整个过程及表现似象速发与迟发的混合型超敏反应。试验还发现型抗原在正常动物体内亦可引起反应,而交叉反应抗原则不能。且对由各型菌致敏的豚鼠均能激发超敏反应。因此认为它们可以用于流行病学调查<sup>[31]</sup>。

## 参 考 文 献

[1] McDade, J. E. et al.: *N. Engl. J. Med.*, 297: 1197—1203, 1977.  
[2] Fraser, D. W. et al.: *Science*, 205: 690—691, 1979.  
[3] Brenner, D. J. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 656—658, 1979.  
[4] Feeley, J. C.: *J. Clin. Microbiol.*, 8: 320—325, 1978.  
[5] Smalley, D. L. et al.: *ibid*, 12: 32—34, 1980.  
[6] Edelstein, P. H. et al.: *ibid*, 10: 141—143, 1979.  
[7] Wong, M. C. et al.: *Curr. Microbiol.*, 5: 31—34, 1981.  
[8] Neblett, T. R. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 648—651, 1979.  
[9] Chandler, F. W. et al.: *ibid*, 90: 642—647, 1979.  
[10] Kundson, G. B. et al.: *Infect. Immunol.*, 29: 1092—1035, 1980.  
[11] Thomason, B. M. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 224—226, 1979.  
[12] Chandler, F. W. et al.: *N. Engl. J. Med.*, 297: 1218—1220, 1977.  
[13] Dumoff, M.: *Ann. Int. Med.*, 90: 694—696, 1979.  
[14] Feeley, J. C. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 10: 437—441, 1979.  
[15] Pine, L. et al.: *ibid*, 9: 615—625, 1979.  
[16] Weiss, E. et al.: *Curr. Microbiol.*, 4: 1—6, 1980.  
[17] Isenberg, H. D.: *Ann. Int. Med.*, 90: 502—505,

1979.  
[18] Muller, H. E.: *J. Clin. Microbiol.*, 13: 423—426, 1981.  
[19] Fliermans, C. B. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 1239—1242, 1979.  
[20] Brenner, D. J. et al.: *Curr. Microbiol.*, 1: 71—75, 1978.  
[21] McKinney, R. M. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 621—624, 1979.  
[22] McKinney, R. M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 12: 395—401, 1980.  
[23] Wong, K. H. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 634—638, 1979.  
[24] Johnson, W. et al.: *ibid*, 90: 638—641, 1979.  
[25] Elliott, J. A. et al.: *Infect. Immunol.*, 31: 822—824, 1981.  
[26] Wong, K. H. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 624—627, 1979.  
[27] Friedman, R. L. et al.: *Infect. Immunol.*, 29: 271—274, 1980.  
[28] Muller, H. E.: *ibid*, 27: 51—53, 1980.  
[29] Kishimoto, R.: *ibid*, 25: 761—763, 1979.  
[30] Arko, R. J. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 680—683, 1979.  
[31] Johnson, W. et al.: *Infect. Immunol.*, 26: 698—704, 1979.  
[32] Hedlund, K. W. et al.: *Ann. Int. Med.*, 90: 676—679, 1979.  
[33] Wong, K. H. et al.: *Curr. Microbiol.*, 4: 105—110, 1980.