

细菌 L 型的生物学特性与致病作用

林诗夫 黄谷良 (审校)

(蚌埠医学院微生物学教研室)

L 型是细菌因变异而产生的细胞壁缺陷型。由于细胞壁缺损,使生物学性状发生改变,对低渗敏感,用常规培养法不易检出,因此对其性状认识不足,常造成临床的漏诊与误诊。L 型是否有致病性争论已久。过去一般认为有致病性的细菌变为 L 型后即不致病。目前已有一些资料表明 L 型亦具有一定的致病性。本文就细菌 L 型的类型、生物学特性、致病作用等加以综述。

L 型的诱导与类型

细菌 L 型在自然情况下偶然可见,可能与其自溶酶有关^[1]。大多细菌 L 型则经诱导产生。一般多用青霉素、杆菌肽、头孢菌素族等干扰细胞壁的合成;或用溶菌酶、溶葡萄球菌素等水解细胞壁的肽键;也可用抗体或补体等诱导 L 型的产生^[2-7]。此外亦有用质粒与噬菌体 DNA 使细菌转为 L 型^[8],还有用胆汁诱导革兰氏阴性菌产生 L 型^[9]。

革兰氏阳性菌细胞壁主要成分为糖肽,溶菌酶能水解糖肽中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸间的 β -1,4 糖苷键,故可使革兰氏阳性菌完全失去细胞壁。这种完全缺壁的细菌称为原生质体 (Protoplast)。原生质体内部的压力很高,必须在高渗的环境中才能存活。革兰氏阴性菌细胞壁糖肽含量较少,失去糖肽后还有外膜,在普通培养基中也能生长。这种细胞壁缺陷型称为圆球体 (Spheroplast)^[10]。因其仍具有一定的细胞壁成分,故仍保留部分菌体抗原及可被噬菌体吸附的特性。有人应用溶菌酶作用于经氯霉素处理过的枯草杆菌时,得到一种暂时仍有细胞壁而对低渗敏感的中间类型,称为拟圆球体 (Quasispheroplast)^[10]。

有人在接种过金黄色葡萄球菌(简称金葡萄)的平板中挖孔加入一定浓度的甲氧苄青霉素。随着药物浓度的减低,平板上细菌型菌落逐渐增加,接近加药部位见有 L 型菌落。在 L 型与细菌型之间可见有颗粒 (G) 型菌落。G 型与 L 型不同,在于菌落无“油煎蛋”的核

心,菌体膨大,革兰氏染色仍为阳性^[11]。

以上几种类型的区别,主要在于细胞壁缺陷程度不同,可以是完全缺失或部分缺少。过去认为圆球体与原生质体的主要区别,在于前者能分裂繁殖,而后者只能在高渗环境中存活不能繁殖。现在已证明原生质体也能在固体培养基中生长成典型的 L 型菌落^[11]。目前认为无论原生质体或圆球体只要能形成 L 型菌落均称为 L 型^[11,12],或称为细胞壁缺陷型。细菌 L 型根据细胞壁缺损的程度可分为原生质体与圆球体;根据是否返祖分为稳定与不稳定 L 型^[12],后者亦有人称之为 L 相变种^[13]。

G 型在培养时因青霉素的浓度不同,界于 L 型与细菌型菌落之间,故可能是一种中间型。但有人试图将此菌转种于含大量甲氧苄青霉素的培养基中,并不能诱导出 L 型。因此提出 G 型可能与 L 型完全无关^[1]。我们曾从数例金葡萄败血症患者血中培养出少量 L 型菌落与大量颗粒型菌落。后者经移种又可出现少量 L 型、细菌型与大量颗粒型菌落。说明三者可以互变。G 型菌形态仍保持多形性,革兰氏染色阳性与阴性都有出现。因此可认为 G 型也是不稳定 L 型的一种形式^[14]。

L 型的生物学特性

(一) 形态与培养特性

1. 菌落:典型的 L 型菌落呈“油煎蛋”样。低倍镜观察中心部位致密。透光度差,嵌入培养基生长不易刮下;周边由透明大颗粒组成。不同菌形成的 L 型菌落外观不尽相同^[15,16]。电镜扫描观察金葡萄 L 型菌落表面高低不平如浪花样。

L 型菌落生长缓慢,一般需经 2—7 天方见到针尖样小菌落。在液体培养基中呈颗粒状生长,颗粒可粘附于管壁或沉淀于管底。我们曾吸出颗粒置玻片上低倍镜观察,亦可见 L 型或 G 型细菌落。

2. 形态: L 型菌落超薄切片电镜检查可见菌体形

状不规则、大小不等的颗粒,小的仅 $0.05\sim 0.5\mu\text{m}$ 称原生小体;大的可达 $1\sim 50\mu\text{m}$ 称巨形体,多形性,内有核样物质,呈网状,分散颗粒或块状,经DNA酶或RNA酶作用后消失^[17]。细胞质内尚存有内含物及折叠环状的中间体^[18]。菌落涂片染色可见L型菌为革兰氏阴性,呈膨大的圆或卵圆、杆或丝状等多种形态,有的呈盘绕的长丝体。可能由于细胞壁缺失由膜折叠成的中间体伸展所致。电镜观察证明中间体伸展后可将粘附于其上的核质粒到细胞的周围^[14,17]。

应用不同孔径滤器测定L型的大小,发现各种细菌L型差别很大。有人发现滤膜孔径在 $0.45\mu\text{m}$ 以上金葡菌L型能100%通过,但在滤液中见有少量 $0.8\sim 1.7\mu\text{m}$ 的L型菌,这可能与L型无细胞壁、菌体柔软有可塑性有关;孔径在 $0.01\sim 0.1\mu\text{m}$ 时则不能通过。

(二) 生长繁殖与返祖

L型的形成除需要有抑制细胞壁的诱导剂外,培养基中需要10—20%马或人血清。有些细菌原浆的渗透压与血清相似,有的则高于血清3倍^[11],故需大量蔗糖与氯化钠以维持环境的渗透压。

L型的繁殖方式尚不明确。Diene观察到拟杆菌L型在培养初期呈短杆状,数小时后即长成短丝并开始分裂。在初期由于分裂不完全而不易断开,有些节段一端膨大,膨大部位相互吻合,形成巨形体^[19]。亦有认为这种膨大的细胞可能是菌丝间的性融合^[20]。有人观察L型生长曲线表明最初4小时菌数不增加,以后上升,2—3天稳定,与原菌一样可能亦以二分裂方式繁殖^[21];有人见到巨形体内有原生小体堆积,认为原生小体在巨体内繁殖,当后者破裂时释放出来,其中有些具有完整基因信息的小体可以长大繁殖^[21]。有认为巨形体可通过出芽或不对称的分裂繁殖,由于分裂不均匀故颗粒大小不一,有的甚至不一定有生命^[22]。故L型似兼有细菌与真菌等多种繁殖形式。

Толмачева注意到布氏杆菌L型诱变1—4代后在无青霉素培养基中只需经1—2代即可返祖,而诱变5—8代后则需3—5次传代方能返祖^[23]。可能因L型的变异一部分仅为表型的变异。不稳定的L型因细胞壁成分残留较多,可以作为新细胞合成的引物,容易在适宜环境下返祖。若持续损失细胞壁合成,或长期存在诱导因素等可能不再返祖^[24],或因基因突变而产生细胞壁缺陷经转种选择可获得稳定L型^[24]。

返祖与培养基理化性状有关,液体比固体更易返祖^[11]。有人以25%明胶代替琼脂,可使50%枯草杆菌L型在4小时内返祖^[25]。返祖与培养基的营养条件亦有关,含血清牛肉汤琼脂平板比肉膏汤平板对金葡菌L型的返祖更为有利。

(三) 生化反应

L型菌因有细胞壁缺陷故形态、培养、生化反应等与原菌不同^[14,26]。亦有认为L型的生化反应与原菌

同,在体外亦能产生同样的毒素^[27]。我们获得的金葡菌L型稳定株,其凝固酶、甘露醇发酵、溶血反应均转阴,色素亦缺失^[27],提示细胞壁与细菌的代谢活动有关。各学者报告不同,可能与L型稳定程度不同有关。

(四) 抗原性

一般认为细菌的重要抗原都在细胞壁与表面附件(如鞭毛)上。革兰氏阴性菌的圆球体因其仍有部分细胞壁残留,故仍保留部分菌体抗原^[11]。我们用溶菌酶加EDTA处理甲型副伤寒、纽波特等沙门氏菌获得的圆球体证明O抗原性减弱,而H抗原性无明显变化^[27]。提示随着细胞壁糖肽的缺损,附着在其上的外膜也有一定程度的缺失。鞭毛附着在细胞质的基础颗粒上,因此糖肽的缺损不影响H抗原。细菌变为L型后抗原性减弱,提示其在体内有可能逃避免疫攻击而得以长期存活,此与疾病转为慢性及复发可能有关。

(五) L型对抗菌素的敏感性^[27]

由于细胞壁缺陷,L型对抗菌素的敏感性往往与原菌不同。以葡萄球菌为例,青霉素类、头孢菌素族等主要作用于细胞壁,只能抑制细菌型,能诱导出L型。卡那霉素、庆大霉素、链霉素等氨基甙类抗菌素能干扰细菌蛋白质的合成,故对L型的抑制比细菌型大。红霉素、四环素等能抑制细胞质内蛋白质的合成,但不易穿过细胞壁,故对L型的作用比细菌型强。氯霉素除能阻断蛋白质的合成而且细胞壁不能妨碍其进入,故对细菌型、L型均有效。实验证明链球菌、葡萄球菌L型与细菌型比较,前者对青霉素明显耐药,而对氯霉素、红霉素、四环素则较敏感^[27,28]。我们曾从1例发热月余,常规培养阴性的脓毒血症患者的血、骨髓、胸水中培养出金葡菌细菌型与L型,二者均对氯霉素敏感。给予氯霉素治疗3天,热退清,10天后血培养转阴^[29]。

L型与支原体的关系与鉴别

L型菌与支原体均缺细胞壁,在形态、菌落外观、对青霉素不敏感等方面很相似。对于支原体的来源有二种看法:有人认为支原体是微生物中一个独立的纲,其中各种均从同一进化过程中发生而来,它是一种未能产生细胞壁糖肽的最原始的细菌后代;另一种看法认为支原体是由各种不同的细菌演化而来,L型可能是细菌与支原体中的一个过渡型^[11]。Neimark证明在无支原体与链球菌之间有一定关系。二磷酸果糖醛缩酶与甘油醛-3-磷酸脱氢酶的抗原结构上有交叉反应。据Prager等证明二种蛋白质的氨基酸顺序有25—40%不同即失去交叉免疫反应。既然二者有交叉反应,表明二者的酶至少有60%以上的氨基酸顺序是相同的^[30]。此外,肺炎支原体患者血清中见有MG链球菌的凝集素,且此菌首先是肺炎支原体患者尸体中

分离出来的,因此认为细菌转变为L型后若稳定下来即成为支原体。但二者也有一定的区别:①MG链球菌的L型抗体不能抑制肺炎支原体,且二者的核苷酸顺序不同^[11]。②用Diene染色法二种菌落均呈蓝色,支原体不易退色,而L型易退色^[19]。③Yamamoto发现有些细菌如链球菌与绿脓杆菌的L型之间也有共同抗原,能起交叉反应,但与支原体之间无交叉反应^[30]。

L型的致病性

L型菌的致病性问题争论已久,由于研究的方法不同结果很不一致,有下列几种看法:①有人认为有致病性的细菌变为L型后即不致病。如有人用金葡菌L型稳定株静注小鼠不引起肾脏病变,而细菌型则引起肾脏肿^[31]。②Linnemann认为L型菌所引起的炎症系L型颗粒的非特异性刺激^[11]。他以稳定的金葡菌L型注入兔膝关节引起的滑膜炎与培养基对照引起的炎症仅程度上的差异。③有人认为L型菌本身致病性弱,其致病与返祖有关。如Yamamoto用羧苄青霉素治疗呼吸道绿脓杆菌感染,细菌转阴而出现L型。停药二周后感染复发。作者认为系L型返祖所致^[30]。有人在28例慢性肾盂肾炎患者尿中证明有L型存在。在46次复查中,13次仅分离出细菌型。作者认为复发与L型返祖有关,而L型的持续存在则与疾病的慢性过程有关^[33]。④日前有许多资料证明L型有一定的致病作用。如有人在114例肺空洞而未检出结核杆菌患者痰标本中10.5%分离出结核杆菌L型^[34]。有人从心内膜炎、脓肿、化脓性关节炎等患者分离出金葡菌L型^[35]。Клобничкая曾从105例风湿热患者血中88例分离出链球菌L型(常规培养仅3%左右分离出细菌型),并认为其来源可能与慢性病灶有关^[36,37]。⑤抗菌素的使用与病程中细菌转变为L型可能有关。有人总结502例肾盂肾炎患者中105例分离出L型,其中除16例外均用过抑制细胞壁的抗菌素^[16]。我们曾从长期发热的败血症患者8例、硬脑膜外脓肿1例、慢性肾盂肾炎患者2例中分离出L型,这些患者全都用过青霉素。因此对于L型是该病的动因还是使用抗菌素治疗所诱导的结果尚难确定。但L型未被消除,可能与疾病的持续有关。⑥也有一些学者从大量的临床标本中分离不到L型,因而认为L型的致病性可能很小^[31]。Fair以稳定L型感染动物未获成功^[38]。L型能否致病可能与感染途径有关。我们曾以金葡菌L型稳定株经腹腔、静脉、皮内感染小鼠未获成功,但滴鼻感染小鼠17只中有16只肺部出现炎症,均重新分离出L型。其中4只同时培养出细菌型。后者肺部病变与细菌引起的小叶性肺炎相似;而在12只仅分出L型的小鼠中,11只表现有如支原体、病毒等没有细胞壁的微生物所引起的间质性肺炎图象^[17]。表明L型确有

一定的致病作用。

感染患者常用作用于细胞壁的抗菌素,可使细菌转为L型,照理L型并不罕见,但由于L型培养需要一定条件,对L型的性状又认识不足,没有引起医务界的足够重视,故临床漏诊较多。北医附院周惠平等统计9年中2661份血培养细菌检出率仅17.8%^[39]。蚌埠市卫生防疫站统计三个医院10年中8793份血、骨髓培养细菌检出率亦仅18.5%^[40]。我们统计5年中414份脓标本细菌培养阳性率72.5%^[40]。漏诊除可能系厌氧菌或其他微生物感染外,与未做L型检查亦有一定关系。因此培养阴性而临床症状迁延的病人以及风湿热有间歇发热者,在做血培养的同时应常规加做L型培养以免漏诊。血、各种抽出液等通常无菌标本可种入高渗肉汤增菌,微混或见沉淀生长时移种L型平板及血平板,疑为尿路感染可取清洁中段尿0.1ml(比接种环大50—100倍)直接种上述二种平板即可,污染材料可预先通过0.45 μ m滤膜过滤后移种。典型的L型菌落应呈油煎蛋样。但新从病人身上分离出的L型菌落常不典型^[11]。我们从败血症患者分离出L型菌,除有少量典型L型菌落外,大多呈不典型颗粒型菌落。但涂片仍呈多形性证明有细胞壁缺损现象,经返祖证明为金葡菌,提示颗粒型菌落也不应忽视,以免漏诊。

参 考 文 献

- [1] Wilson, G. S. et al.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity (6th ed.) Vol. 1, Edward Arnold Publishers, pp. 48, 1975.
- [2] Kagan, B. M.: The Staphylococcus (ed by S. O. Cohen,) Wiley Interscience, New York, pp. 65, 1972.
- [3] Cate, T. R.: Manual of Clinical Microbiology (2nd ed., Ed by E. H. Lennette et al.) American Society for Microbiology, pp. 338, 1974.
- [4] Salle A. J.: Fundamental Principle of Bacteriology (7th ed) pp. 115, 1973.
- [5] Цыбин, Б. Л. и др.: ЖМНН, 4: 66, 1979.
- [6] Bourgeois, L. et al.: J. Bacteriol. 127: 584, 1976.
- [7] 倪浩星等: 蚌埠医学院学报, 8: 104, 1983.
- [8] White, T. B. et al.: Abstract of Annual Meeting of American Society for Microbiology, Abst. 458, 1981.
- [9] 林特夫等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1: 324, 1981.
- [10] Miller, I. L. et al.: J. Gen. Microbiol. 49: 513, 1967.
- [11] Classner, H.: Ann. Rev. Microbiol. 26: 55, 1972.
- [12] Karch, H.: Infect. Immun. 30: 349, 1980.
- [13] Blaine, L. B.: Infect. Immun. 29: 244, 1980.
- [14] 林特夫等: 中华医学杂志 8: 502, 1983.
- [15] Diene, L.: Recent Progress in Microbiology (Ed by N. E. Gibbon) University of Toronto Press,

- pp. 511, 1963.
- [16] Domingue, G. J. et al.: *J. Urol.* **104**: 790, 1970.
- [17] Okuda, K.: *Microbial Immunol.* **21**: 1, 1977.
- [18] Консмантиннова, Н. Д. и др.: *ЖМЭИ*, **2**: 58, 1975.
- [19] Takanshi, T. et al.: *Japan. J. Exp. Med.* **49**: 355, 1979.
- [20] Bisset, K. A.: The Cytology and Life-history of Bacteria (2nd ed.) E and S Livingstone, Edinburgh, pp. 124, 1955.
- [21] Кач, Л. И. и др.: *ЖМЭИ*, **10**: 108, 1977.
- [22] Ryter, A. et al.: *J. Bacteriol.* **88**: 455, 1964.
- [23] Толмачев, Т. А.: *ЖМЭИ*, **8**: 63, 1979.
- [24] Sonnenwirth, A. C. et al.: Microbiology (3rd ed., Ed by B. D. Davis, et al.) Harper and Row Publisher, Cambridge, pp. 798. 1980.
- [25] Landman, O. E. et al.: *J. Bacteriol.* **96**: 2154, 1968.
- [26] Rinno, G. et al.: *J. Bacterol.* **141**: 822, 1980.
- [27] 岡奇則男等: 日本細菌学杂志, **36**: 695, 1981.
- [28] Neimark, H. et al: *J. Bacteriol.* **150**: 1259, 1982.
- [29] Blair, J. E.: Manual of Clinical Microbiology, pp. 255, 1970.
- [30] Yamamoto, A. et al.: *Japan. J. Exp. Med.* **49**: 361, 1979.
- [31] Watanakunakorn, L.: *J. Antimicrobial Chemotherapy*, **5**: 239, 1979.
- [32] Linnemann, C. C.: *Arthritis Rheumatism*, **17**: 603, 1974.
- [33] Кочемасова, З. Н. и др.: *ЖМЭИ*, **4**: 103, 1975.
- [34] 董天光摘: 国外医学内科分册, **9**: 148, 1982.
- [35] Charache, P. et al.: *Clin. Res.* **13**: 293, 1965.
- [36] Клобничкая, С. Н.: *ЖМЭИ*, **4**: 119, 1978.
- [37] Клобничкая, С. Н.: *ЖМЭИ*, **9**: 127, 1977.
- [38] Phair, J. P. et al.: *Amer. J. Clin. Pathol.* **62**: 60, 1974.
- [39] 周惠平等: 北京医学, **4**: 315, 1982.
- [40] 黄谷良等: 医学微生物学免疫学图说, 安徽科技出版社。pp. 33, 1982。