

## 诺卡氏菌 L 型

张元和 黄谷良

(蚌埠医学院微生物教研室, 安徽蚌埠 233003)

诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 属于放线菌目 (*Actinomycetales*), 广泛分布于土壤。多数属非致病菌; 致病菌主要有星型诺卡氏菌 (*N. asteroides*)、巴西诺卡氏菌 (*N. brasiliensis*) 和豚鼠诺卡氏菌 (*N. caviae*) 等。诺卡氏菌病主要是该菌吸入肺或侵入伤口引起化脓性感染<sup>[1]</sup>, 感染后可以急性发作引起死亡, 也可很轻转为慢性。在临床上很难从诺卡氏菌病患者分离到该菌, 有的需要经多次反复检查才能查到, 有的要到尸检时才能分离到。有人认为, 这是由于诺卡氏菌在机体内受各种因素的影响转变为 L 型引起的。如 Beaman<sup>[2]</sup> 从 1 例肺部感染后应用激素治疗的患者脑脊液中分离到诺卡氏菌 L 型。

细菌 L 型是细菌的细胞壁缺陷型。细菌由于失去细胞壁变为多形性。细菌 L 型对渗透压非常敏感, 必须在高渗透压培养基中才能生长<sup>[3]</sup>。这也是从诺卡氏菌病患者不易分离到诺卡氏菌的原因之一。

诺卡氏菌为革兰氏阳性菌, 菌体呈丝状, 有分枝, 末端不膨大<sup>[4]</sup>。该菌成为 L 型后革兰氏染色可由阳性转为阴性, 菌体变为大小不等的圆球状。比原菌大的称巨形体, 与原菌大小相当的称圆球体, 亦有细长的丝状体<sup>[5]</sup>。

### (一) 诺卡氏菌 L 型的体外诱导

诺卡氏菌的细胞壁结构比较复杂。除有  $\beta$ -N-Z 肽葡萄糖胺-1,4-N-羟乙酰胞壁酸组成的多糖链与 L-丙氨酸-D-谷氨酰胺-DAP-D-丙氨酸组成四肽链相互交联成肽聚糖外<sup>[6,7]</sup>, 与一般细菌不同的, 还有阿拉伯半乳糖的多聚体由磷酸二酯桥与胞壁酸相连<sup>[8]</sup>, 以及分枝菌酸再连接于阿拉伯糖上。一般用于诱导细菌的

诱导剂: 溶菌酶、青霉素与 D-环丝氨酸等不能单独用于诱导诺卡氏菌变为 L 型。若在加有 0.35mol/L 蔗糖或 5% NaCl 作稳定剂的高渗透压培养基中同时加入 2% 甘氨酸, 则该菌在形态上便迅速形成 L 型。因为稳定剂可防止 L 型的裂解, 甘氨酸则有促进诱导剂的作用, 而且甘氨酸能替代丙氨酸结合到细胞壁肽聚糖的肽链上, 从而阻碍了正常肽聚糖中肽链的交联<sup>[9]</sup>。EDTA (乙二胺四乙酸) 加溶菌酶不能诱导诺卡氏菌, 但用奎纳克林 (Quinacrine) 则诱导成功<sup>[10]</sup>。

Beaman 与 Shankel<sup>[8]</sup> 将红色诺卡氏菌 (*N. rubra*) 接种在脑心浸液中, 不加诱导剂, 可见菌体逐渐变为膨大的圆球形, 产生的横隔不规则, 在低渗透压下容易破裂; 若接种在含大量 DL 丙氨酸 (0.5%)、阿拉伯糖 (5%)、半乳糖 (5%) 与甘氨酸 (4%) 的高渗透压培养基中, 也可产生 L 型。Webley 等<sup>[9]</sup>报道, 珊瑚诺卡氏菌 (*N. corallina*) 在缺铁、镁或锌的培养基中可以出现 L 型, 而在缺铜、钼或硼的培养基中则不出现 L 型。Webb 等<sup>[10]</sup>报道, 诺卡氏菌在 35℃ 或增加 CO<sub>2</sub> 也能引起形态上的变化。这说明诱导诺卡氏菌形成 L 型的因素<sup>[11]</sup> 多样的。

### (二) 诺卡氏菌 L 型的体内诱导

用豚鼠诺卡氏菌对小鼠作滴鼻感染, 使其患急性致死性肺炎。将患肺炎的死鼠肺接种于脑心浸液琼脂培养基中, 培养基上无菌生长; 若取该鼠肺组织作革兰氏染色, 可见肺内有大小及染色不一的圆球体。进一步将上述死鼠肺接种在适合于 L 型生长的 BYE-L (Barile, Yaguchi and Eveland agar) 培养基上, 可分离出大量的 L 型菌落, 而很少分离出正常的诺卡氏菌<sup>[11]</sup>。

这主要是因为诺卡氏菌进入肺泡后,被肺泡内巨噬细胞吞噬,失去细胞壁变为L型从而导致肺部的炎症和突变,这种症状可维持一年以上。与此同时,以用等量的福尔马林杀死诺卡氏菌作为对照,则不能引起这种变化。

### (三) 诺卡氏菌 L 型的特征

#### 1. 诺卡氏菌 L 型的结构与菌落类型

诺卡氏菌 L 型在高渗透压液体培养基中生长比正常菌株缓慢,加 3%  $\text{CO}_2$  可促进 L 型的生长。诺卡氏菌经人工诱导形成的 L 型,在液体培养基中生长时可变为膨大的圆球形,具有高度折光性。这种膨大的圆球内部能长出许多小颗粒,有的小颗粒在圆球表面向外突出。诺卡氏菌 L 型在液体与固体培养基上培养一周后,有些可见许多圆球聚集成核心,周围有许多较小圆球围绕形成典型的“油煎蛋”菌落,称为 L 型或 L 型的 A 型;不能形成的称为 L 型变异株或 L 型的 B 型<sup>[2]</sup>。这二种 L 型的细胞结构不同。A 型细胞内有大量颗粒,颗粒外有膜包围,分布在细胞周围,细胞周围没有细胞壁。B 型细胞在细胞膜外还有少量细胞壁,但细胞壁中的肽聚糖已消失,故不能维持原来的形态。B 型细胞对渗透压敏感,经革兰氏染色和抗酸性染色均为阴性,但细胞中的颗粒则均为阳性,用苏丹黑 B (Sudan B) 染色(用于检测脂质)也为阳性<sup>[5]</sup>。

#### 2. 诺卡氏菌 L 型回复株的特性

细菌 L 型在脱离诱导剂后又可以部分地回复到原菌。Beaman<sup>[5]</sup> 发现,星形诺卡氏菌 L 型的回复株在菌落和菌体的形态、代谢、分枝菌酸的组成以及对动物的致病性等方面,至少有 1 或 2 个以上的特性与原菌不同。如有的分枝菌酸与肽脂发生改变;有的是糖、脂肪酸、特别是分枝菌酸发生改变。由于这些细胞表面结构的改变影响了细胞间的相互关系,致使菌落形态、营养吸收、生长速度以及与宿主间的相互关系也受到影响。这种生理生化特性的改变往往比较稳定,脱离诱导剂传代培养,不容易回复为原菌,说明诺卡氏菌 L 型的形成与回复已涉及到遗传物质的改变。这种改变属于多功能的突变

(Polyfunction mutation)。

### (四) 诺卡氏菌 L 型的致病性

人与动物体被诺卡氏菌感染后,从机体内分离到该菌的 L 型,说明机体的防御机能可以诱导诺卡氏菌变为 L 型。Beaman<sup>[2]</sup> 将豚鼠诺卡氏菌菌液 ( $> 6 \times 10^6 \text{CFU}$ ) 给小鼠静脉注射,该菌在脑、脊髓、肾脏内迅速增殖,引起急性发病,多数死亡。生存者逐渐恢复后于半年至 1 年又可再次发病,病程缓慢,数月后死亡。病程中主要表现为足菌肿 (Mycetoma),病灶中可找到肉眼可见的细小颗粒。取颗粒镜检可见,在由革兰氏阴性圆球体组成的菌落周围,有革兰氏阳性长丝围绕;在颗粒周围有巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞。感染后 1—2 个月可从脑、肾和脊髓中分离出诺卡氏菌;3 个月后才能从脑、脊髓中发现 L 型,病程持续一年。在此期间,其他脏器(肝、脾、心、肺或血)中未发现 L 型和原菌。若用免疫小鼠试验,在感染后急性期诺卡氏菌生长,并引起巨噬细胞、中性粒细胞与淋巴细胞的免疫应答。2—3 周后,该菌逐渐变为 L 型。L 型对巨噬细胞与中性粒细胞释放的酶有抵抗力。在疾病静止期,宿主反应减弱,无病理学改变;但在机体组织中仍可发现该菌 L 型,而且数目逐渐增多,出现大量圆球积聚成诺卡氏菌颗粒,有些圆球逐渐回复成有壁的诺卡氏菌,此时机体不再将其清除,进而发展为足菌肿。由此说明,疾病的潜伏和迁延不愈,均与诺卡氏菌转变为 L 型有关。

### (五) 临床标本中诺卡氏菌 L 型的检查

从临床患者或动物的组织标本中分离和识别诺卡氏菌 L 型非常困难,其原因是诺卡氏菌 L 型的不同株所适应的培养基不同,如适合星形诺卡氏菌 GUH5 株的培养基并不适合于 GUH2 株 L 型的生长。Beaman<sup>[2]</sup> 曾对多株星形诺卡氏菌、巴西诺卡氏菌与豚鼠诺卡氏菌的 L 型试用 300 种不同配方的培养基进行诱导分离,结果只有不足 20% 的诺卡氏菌 L 型株能生长。较适宜培养基为 BYE 琼脂培养基。其成分主要以脑心浸液为基础,配加 15—18% 蔗糖、3% NaCl、10% 马血清(有些 L 型株加胎

牛血清生长更好)、0.2% 酵母浸膏和 0.8% 琼脂。但该培养基制备的不同批次, 分离 L 型结果也不相同(使用时必须注意批次)。生长在该培养基上的 L 型菌落, 呈“油煎蛋”样者称 A 型, 革兰氏阴性; 不呈“油煎蛋”样、只有核心而无边缘者称 B 型。两种不同菌落的 L 型转种后均可回复为原菌, 有的转种 8—9 代才能回复, 有的则转种 2—3 代后即不再生长。这主要是由于某些 L 型在生长过程中不能合成某些必要的代谢产物的缘故<sup>[2]</sup>。

鉴定诺卡氏菌 L 型的方法有: (1) 用气相色谱检查分离出的 L 型结核硬脂酸; (2) 用高温气相色谱检测分枝菌酸; (3) 应用特异性抗体作免疫荧光染色, 使 L 型回复成原菌后进行鉴定。这些方法以 (3) 的结果最为可靠<sup>[11,13]</sup>。

## 参 考 文 献

1. 孙鹤龄: 医学真菌鉴定初编, 第 330 页, 1987。
2. Beaman BL: Nocardiosis, In: Domingue GJ (ed), Cell wall deficient bacteriology, Addison-Wesley, Massachusetts 231, 1982.
3. 黄谷良、林特夫等: 细菌 L 型与疾病, 第 5 页, 1991。
4. Beaman BL: *J. Bacteriol*, 123: 1235, 1975.
5. Beaman BL et al: *J Bacteriol* 148: 600, 1981.
6. Azoma L et al: *JPN J Microbiol*, 17:154, 1973.
7. Hammes W et al: *J Bacteriol*, 116: 1029, 1973.
8. Beaman BL and Shaukel BM: *J Bacteriol*, 99: 876, 1969.
9. Webley DM: *J. gen. Microbiol*, 23: 87, 1960.
10. Webb RB et al: *J Bacteriol*, 67: 498, 1954.
11. Beaman BL: *Infect immun*, 29: 244, 1980
12. Beaman BL: Cell wall-deficient forms of nocardia in: Madoffs (ed), *Bacteriol L-form*, Marcel Lékter, NY, 203, 1986.
13. Bourgeois H and Beaman BL: *J Bacteriol*, 127: 584, 1976.