

哌拉西林诱导铜绿假单胞菌 L 型形成的实验研究

陈登宇, 陈艺林, 徐萍萍

[摘要] 目的: 观察哌拉西林诱导铜绿假单胞菌变异为 L 型的情况。方法: 采用平板纸片法和液体浓度梯度法, 利用哌拉西林药物纸片诱导铜绿假单胞菌标准菌株变异为 L 型, 并稳定传代。结果: 铜绿假单胞菌可被哌拉西林诱导为典型 L 型, 在诱导因素存在下可稳定传代。结论: 哌拉西林可诱导铜绿假单胞菌变异为稳定 L 型。

[关键词] 假单胞菌属; 假单胞菌, 铜绿; L 型菌; 哌拉西林

[中国图书资料分类法分类号] R 378.991 **[文献标识码]** A

Induction of *Pseudomonas aeruginosa* L-forms with piperacillin

CHEN Deng-yu, CHEN Yi-lin, XU Ping-ping

(Department of Microbiology, Bengbu Medical College;

Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity at Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the induction of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) L-forms with piperacillin. **Methods:** In plate and liquid media within antibiotic piperacillin, *P. aeruginosa* was induced into L-forms which would go down to posterity stably. **Results:** *P. aeruginosa* was induced to typical and stable L-forms by piperacillin. **Conclusions:** *P. aeruginosa* L-form is an important existing form of *P. aeruginosa*.

[Key words] *Pseudomonas*; *Pseudomonas, aeruginosa*; L forms; piperacillin

铜绿假单胞菌 L 型 (PA-L 型) 在临床感染中经常被作为病原菌检出, 说明 PA-L 型有致病性^[1]。PA-L 型可逃避 β -内酰胺类抗生素、抗体、补体和溶菌酶杀伤, 是该菌的一种重要生存状态。本实验用治疗铜绿假单胞菌感染的常用抗生素哌拉西林将铜绿假单胞菌标准菌株诱导为 L 型, 观察 PA-L 型形态学变化, 获得稳定传代的 PA-L 型菌株, 为致病性研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种 铜绿假单胞菌标准菌株: CMCC 10104 株, 购于中国药品生物制品检定所。

1.2 主要试剂 哌拉西林为齐鲁制药有限公司产品。

1.3 PA-L 型的诱导 参照文献[2] 并加以改进。

(1) 制备每片 500 μg 哌拉西林药物纸片: 用无菌生理盐水稀释药粉, 取含 0.1 g 哌拉西林干粉的水溶液 3 ml 均匀滴加在 200 片无菌小纸片上, 干燥后制成。(2) L 型培养基制备: 制备 85-7 无血浆 L 型固

体平板培养基和 L 型高渗液体增菌培养基。(3) L 型的诱导: 采用平板纸片法, 在 L 型平板上用每片 500 μg 哌拉西林药物纸片不断传代诱导 PA-L 型, 逐日观察, 取生长物涂片作革兰染色和细胞壁染色, 观察细菌形态及染色性的变化。(4) PA-L 型在液体培养基中的诱导采用浓度梯度法, 在 5 ml L 型液体培养基中加入哌拉西林药物纸片, 使药物终浓度分别为 100、200、300、400、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 接种铜绿假单胞菌原菌 10^8 CFU/ml 菌液 0.1 ml, 后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 逐日观察。(5) 细菌 L 型检测: 采用细胞壁染色法, 细菌涂片后自然干燥, 先加 10% 鞣酸水溶液固定 15 min, 水洗后加 0.5% 甲紫溶液染 3 min, 水洗, 干后镜检。细菌型菌体仅细胞壁着色呈空泡状, 示细胞壁完整; 细菌 L 型因细胞壁缺损, 菌体浓染。

2 结 果

2.1 平板纸片法诱导 PA-L 型 在 L 型平板上药物抑菌圈处, 诱导 2~3 代后开始发现有细菌 L 型颗粒状菌落, 涂片染色见细菌为革兰阴性, 有许多长丝体缠绕在一起, 未见圆球体和巨形体, 此时的 L 型不稳定、易返祖; 铜绿假单胞菌细菌型革兰染色可见革兰阴性短小杆菌、细胞壁染色可见仅细胞壁着色的空泡状短小杆菌 (见图 1), PA-L 型革兰染色可见革兰阴性长丝体, 着色不均, 细胞壁染色可见长丝体, 菌体浓染 (见图 2); 继续诱导传代, 细菌生长速度减慢, 抑菌圈变小; 传至 7~9 代, 可见许多典型的

[收稿日期] 2009-06-05

[基金项目] 安徽省高等学校省级自然科学研究资助项目 (KJ2009B220Z); 蚌埠医学院科研项目 (BY0802)

[作者单位] 蚌埠医学院 病原生物学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 陈登宇 (1978-), 男, 硕士, 讲师。

油煎蛋样菌落,涂片可见长丝体大为减少,多为长出长丝的巨形体,革兰染色阴性,菌体中央浓染、着色不均;细胞壁染色,菌体浓染、呈紫色,此时的 L 型较稳定,在诱导因素存在下可稳定传代,在无诱导因素培养基中 2~3 代才完全返祖;继续传代,菌体形状变化不大,此时的 L 型菌株已属较稳定的细菌 L 型(见图 3)。实验中,始终未发现绝对稳定不回复

的 L 型菌株。

2.2 液体浓度梯度法诱导 PA-L 型 在 L 型液体培养基中,哌拉西林在 200~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时有 PA-L 型生长,细菌黏附药物纸片沉淀生长(见图 4),涂片多见长丝体,较平板法诱导出的 PA-L 型稳定性和典型性差。药物浓度低时,只见细菌型 PA 生长,液体混浊;药物浓度高时,无菌生长,细菌全被杀灭。

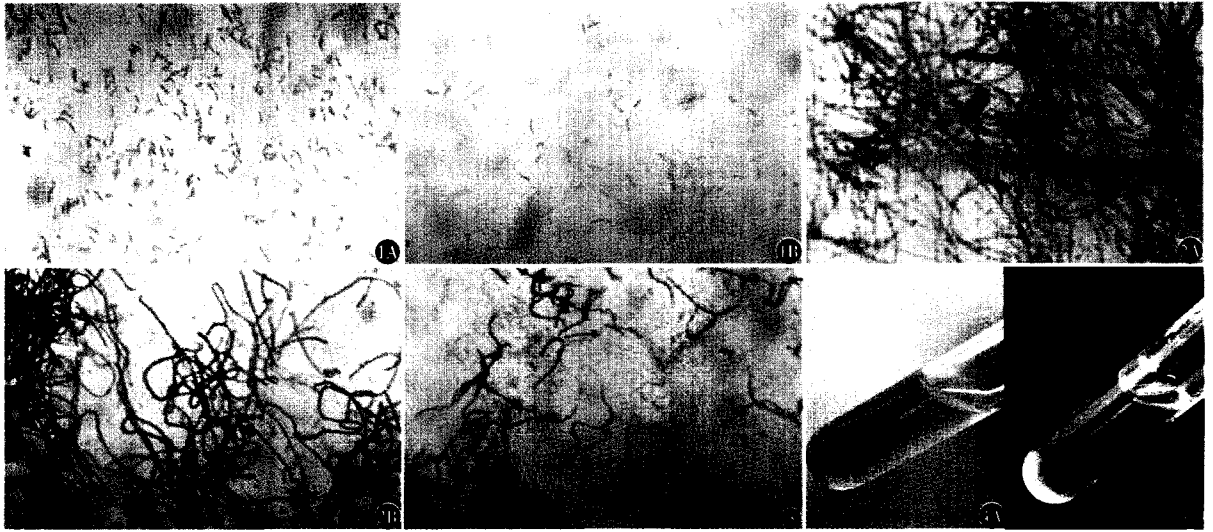


图 1A PA 革兰阴性短小杆菌(革兰染色 $\times 1\ 000$) 图 1B PA 仅细胞壁着色的空泡状短小杆菌(细胞壁染色 $\times 1\ 000$) 图 2A PA-L 型革兰阴性长丝体,着色不均(革兰染色 $\times 1\ 000$) 图 2B PA-L 型长丝体,菌体浓染(细胞壁染色 $\times 1\ 000$) 图 3 稳定的 PA-L 型呈长丝体、巨形体(革兰染色 $\times 1\ 000$) 图 4A PA 细菌型在液体培养基中混浊生长,有菌膜 图 4B PA-L 型在液体培养基中沉淀生长

3 讨论

铜绿假单胞菌,俗称绿脓杆菌,毒力因子多、耐药性严重,现已成为医院感染的主要致病菌之一,多见于肺部感染、伤口感染、败血症。PA-L 型在临床感染中经常被作为病原菌检出,因此研究 PA-L 型对于铜绿假单胞菌感染防治是有价值的。细菌 L 型是细胞壁缺陷型细菌,是细菌在体内、外多种因素作用下失去细胞壁中的肽聚糖层而形成,仍可生长繁殖并具有致病性^[3]。

哌拉西林是临床常用治疗铜绿假单胞菌感染的首选抗生素,为青霉素类广谱抗生素、对革兰阴性杆菌有效,作用于细菌细胞壁,抑制转肽酶活性、影响肽聚糖层的合成,发挥杀菌作用。本实验采用哌拉西林诱导铜绿假单胞菌成稳定的 L 型,实验中对 PA-L 型在诱导过程中形态变化进行观察,发现诱导早期不稳定 PA-L 型为纤长的长丝体,继续诱导得到的稳定 PA-L 型为较短的长丝体和巨形体。这是因为细菌 L 型稳定程度与细胞壁中肽聚糖的缺损程度有关^[3],推测诱导早期不稳定 PA-L 型因细胞壁肽聚糖合成轻度受阻,细菌分裂时隔壁形成障碍,以至数十个菌体连接形成长丝体;继续诱导传代为

稳定 L 型时,肽聚糖层将大部分丢失甚至几乎完全丧失,为长出长丝的体积庞大的巨形体。巨形体系细胞壁肽聚糖合成严重受阻,细胞壁严重缺陷导致细菌染色体分裂后细胞质不能分离的许多原生质的聚合体,裂解后可形成许多原生小体。因细胞壁合成基因位于细菌染色体上^[4],细菌仍有合成细胞壁的能力,去除形成 L 型的诱因,可回复为原菌。

本实验获得了稳定的 PA-L 型菌株,为 PA-L 型的生物学性状和致病机制的研究打下了基础;用哌拉西林可诱导铜绿假单胞菌成稳定的 L 型,说明哌拉西林的使用可使细菌变异为 L 型,逃避药物的杀伤,造成细菌耐药,此点应该引起临床用药的注意,治疗时勿单作用于细胞壁的药物而应联合用药,避免 L 型的产生导致病情迁延。

[参 考 文 献]

- [1] 李杰,吕美荣,申晓铭,等. 铜绿假单胞菌及其 L 型医院感染 180 例分析[J]. 蚌埠医学院学报,1998,23(1):57.
- [2] 黄谷良,林特夫. 细菌 L 型与疾病[M]. 北京:学苑出版社,1991:49-65.
- [3] 李凡. 医学微生物学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:14-15.
- [4] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. Nature, 2000, 406(8):959-964.