

支原体与支原体病

名誉主编 赵季文

主 编 曹玉璞 叶元康

副主编 辛颜彬 吴移谋 武济民 宁宜宝

编 委 (按姓氏笔画为序)

丁庆猷 王 栋 叶 辉 叶元康

田克恭 宁宜宝 朱水芳 孙红妹

汪 宁 吴移谋 陈永萱 肖建华

辛颜彬 杨瑞馥 武济民 金开璇

赵季文 胡四海 涂少华 曹玉璞

蒯元璋 谭立志 冀锡霖

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

支原体与支原体病/曹玉璞 叶元康主编. - 北京:
人民卫生出版社, 2000
ISBN 7-117-03697-4

I. 支… II. ①曹…②叶… III. 支原体病-研究
IV. R518.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 15955 号

支原体与支原体病

主 编: 曹玉璞 叶元康

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: [http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)

E - mail: [pmph @ pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)

印 刷: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 21

字 数: 451 千字

版 次: 2000 年 5 月第 1 版 2000 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

印 数: 00 001—3 000

标准书号: ISBN 7-117-03697-4/R·3698

定 价: 30.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

目 录

第一篇 支原体学基础

第一章 概述	(1)
第二章 支原体的分类与鉴定	(6)
第三章 支原体的形态与结构	(25)
第四章 支原体的生理学	(32)
第五章 支原体的致病性	(38)
第六章 支原体的免疫学	(43)
第七章 支原体微生态学	(49)
第八章 支原体的遗传与变异	(57)
第九章 支原体与细菌 L 型及其他微生物的区别	(70)
第十章 组织细胞污染支原体及其预防和清除	(74)
第十一章 抗支原体药物及耐药性	(87)

第二篇 人支原体病

第十二章 肺炎支原体与疾病	(106)
第十三章 解脲脲原体与疾病	(121)
第十四章 人型支原体与疾病	(130)
第十五章 生殖支原体与疾病	(138)
第十六章 发酵支原体与疾病	(151)
第十七章 免疫缺陷常见的支原体病	(162)

第三篇 动物支原体病

第十八章 猪的支原体病	(175)
第十九章 禽的支原体病	(187)
第二十章 牛、羊的支原体病	(205)
第二十一章 实验动物的支原体病	(221)
第二十二章 其他动物的支原体病	(236)

第四篇 植物和昆虫的支原体病

第二十三章 概述	(243)
----------------	-------

第二十四章	桑黄化型萎缩病·····	(252)
第二十五章	枣疯病·····	(257)
第二十六章	泡桐丛枝病·····	(260)
第二十七章	樱桃致死黄化病·····	(264)
第二十八章	翠菊黄化病·····	(268)
第二十九章	其他植原体病·····	(270)
第三十章	螺原体病·····	(275)

第五篇 支原体的实验诊断技术

第三十一章	概述·····	(283)
第三十二章	支原体的形态学检查·····	(284)
第三十三章	支原体的培养方法·····	(292)
第三十四章	支原体的免疫学和分子生物学检测·····	(298)
第三十五章	支原体的单克隆抗体(McAb)制备 ·····	(306)
第三十六章	支原体免疫血清的制备·····	(309)
第三十七章	支原体的药敏试验·····	(310)

第 一 篇

支原体学基础

第一章 概 述

支原体的研究是个既老又新的问题,原因是很早就知道它的存在,知道它引起的一些疾病,并且曾分离到它,但未作深入的研究。对它真正有所认识,并且发展为一门独立的学科,仅是近 30 余年的事。30 余年来支原体学有了长足的发展,但有些方面还不完全清楚。

一、支原体的发展史

支原体的发现是从探索家畜的传染性疾病病原开始的。早在 1898 年法国 Nocard 及 Roux 首先用含动物血清的人工培养基自患牛肺疫的病灶中分离出此种微生物,当时命名为胸膜肺炎微生物(pleuropneumonia organism, PPO)。以后 Dujardin 在固体培养基上传代观察到它的菌落形态,并发现其可滤过性。1923 年 Bride 及 Donatin 第二次自绵羊及山羊无乳症的病灶中分离出同类微生物。1934 年 Shoetensack 再次从患犬瘟疫的犬体内分离出此类微生物。其后还自啮齿类动物(大、小鼠、豚鼠)禽类(鸡)分离出此类微生物,遂统称为类胸膜肺炎微生物(pleuropneumonia like organism, PPLO)。曾认为此类微生物仅是动物的寄生菌或致病菌达 40 年之久。1937 年 Dienes 自妇女下生殖道巴氏腺炎的脓汁中分离出第一株人系支原体,使人们对支原体的宿主关系有了新的认识。由于标本中常混有杂菌,给病原分离造成很大困难,对培养基进行了多方面的改进,加入抑菌剂,加大动物血清量及其他促生长成分后,能从多种宿主及不同组织中分离出多种支原体。自人体陆续分离出人型支原体、发酵支原体及解脲支原体。1962 年 Chanock 用无细胞的人工培养基分离肺炎支原体获得成功,并通过动物及人体实验,第一次明确无误的证实了人类有支原体病,非典型肺炎的病原是 PPLO。从此开展了实验感染、临床检验、血清流行病学及免疫学等方面的研究,大大推动了支原体学的进展。1956 年正式被命名为支原体(Mycoplasma),此字来源于拉丁语及希腊语,Myco 指丝状,Plasma 指多形态及可塑性之意。并在微生物分类中建立了一个独立的新纲——柔膜体纲(Mollicutes),成为一门独立的学科——支原体学。根据 G+C% 含量、基因组大小、胆甾需求及其他生物学特性进行了目、科、属的分类。通过培养技术的不断改进,电镜及诊断新技术的应用,一些难培养的

支原体陆续被分离出来。1967 年日本土居养二等用电镜从植物萎黄病的筛管中发现了支原体样微生物(植原体),1971 年 Salgio 自柑桔中分离出螺原体(*Spiroplasma*),1973 年 Robinson 及 Hungate 自牛、羊瘤胃中分离出厌氧原体(*Anaeroplasm*)、1981 年 Tully 自非淋菌性尿道炎患者尿中分离出生殖支原体(*M. genitalium*),1986 年 Lo 自 AIDS 患者尸体中分离出发酵支原体 *incognitus* 株。1990 年 Lo 自 AIDS 患者尿中分离出穿通支原体(*M. penetrans*),1991 年 Montagnier 自 AIDS 患者原代淋巴细胞培养中分离出梨支原体(*M. pirum*)。迄今已分离出的支原体达 158 种之多,尚有些新种正在鉴定中。已知宿主包括:人、灵长类、畜类、高级野生动物、禽、植物、昆虫、甚至污水、腐生物等。多数支原体为寄生菌或共生菌,部分有致病作用。

二、柔膜体纲微生物的特征

柔膜体纲属于原核生物界中的微生物,是目前所知能独立生活,自行繁殖的最小微生物,其不同于其他原核生物的一个非常重要的特点是缺少细胞壁,代之以三层结构的单位膜。此特点使其具有与此相关的生物学特性,如多形性、可塑性、可滤过性、易溶解性及对青霉素等干扰细胞壁形成抗菌药物的天然抵抗性。由于无细胞壁,支原体非常适宜于作细胞生物学基础问题的研究模型,特别是对生物膜的研究模型。除缺少细胞壁外,柔膜体纲微生物还具有基因组小、结构简单、生物合成及代谢能力有限、在固体培养基上形成特殊的煎蛋状菌落,对四环素及大环内酯类等干扰蛋白质合成的抗菌药物敏感等特性。支原体的基因组为典型的原核型,包括一个环形双股 DNA。基因组大小一般为 600~2200kbp,其中生殖支原体的基因组最小,为 577kbp。螺原体属的 LB12 最大,为 2200kbp。支原体的碱基组成 G+C% 含量为 23~40mol%,肺炎支原体的含量最高,为 39mol%,因而限制了支原体基因信息的传递,缺少很多生物合成途径,也反映其蛋白质的合成是有限的。支原体的基因组中仅有 1~2 个拷贝的 rRNA 基因,大肠杆菌有 7 个。已发现无胆甾原体、人型支原体及螺原体含有质粒。其后又发现山羊丝状支原体丝状亚种所含质粒大小为 1.7~1.8kbp,功能尚未明确。在具有以上共同特征的基础上,各属、种支原体又有其各自不同的特点,如肺炎支原体能发酵葡萄糖产酸,人型支原体能水解精氨酸产氨,解脲脲原体能水解尿素产氨,厌氧原体严格厌氧,螺原体菌体呈螺旋形等。

支原体有高度对宿主、器官和组织的特殊亲和性,人体分离的支原体,一般不寄生于动物(灵长类除外),更不引起疾病。支原体主要寄生或侵犯呼吸系统、泌尿生殖系统粘膜及关节,如肺炎支原体主要侵犯呼吸系统、牛丝状支原体丝状亚种侵犯肺及胸膜,鼠关节炎支原体侵犯滑膜,生殖支原体侵犯泌尿生殖系统,且多呈慢性病程。

支原体的发病机制非常复杂,至今尚未完全清楚,为目前国内外研究的重点。一些有致病性的支原体具有特殊的尖端结构,外膜表面有粘附素,介导其对宿主细胞的吸附,形成粘附、引起细胞损伤的致病机制,有些支原体可侵入细胞内。在有些人系支原体感染时,观察到支原体能引起广泛的免疫异常反应,包括多克隆激活 B 及 T 淋巴细胞、巨噬细胞、NK 细胞及细胞毒性细胞的溶细胞活力,并刺激免疫活性细胞产生细胞因子,造成组

织损伤。很多支原体,包括动物及植物支原体具有丝裂原,能刺激免疫细胞,引起母细胞转化,细胞增殖及过度的免疫反应,对机体起到不利影响。支原体与宿主细胞膜相互作用,引起膜抗原结构改变,招致自身抗体产生。支原体尚能引起免疫抑制,严重者可表现为免疫缺陷综合征。已证明有些支原体(发酵支原体 *incognitus* 株)能增强人类免疫缺陷病毒(HIV)的复制,明显促进 HIV 的细胞毒作用,导致 HIV 感染发展,AIDS 病情加重,以至死亡。Cole 发现鼠关节炎支原体具有一种强有力的超抗原(superantigen)“MAM”,能激发鼠及人 T 淋巴细胞增殖,诱导 T 淋巴细胞释放细胞因子,增强 B 淋巴细胞分泌抗体的能力,引起 T 淋巴细胞介导的自身免疫病。因而有些支原体感染的发病,很可能与超抗原的存在有关。

三、支原体感染造成的危害

支原体感染造成的危害非常广泛,应当引起人们的重视、其影响涉及人、动物、植物、昆虫及组织培养的细胞。从人体分离出的 16 种支原体中,5 种对人有致病性。即肺炎支原体(*M. pneumoniae*)、解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*)、人型支原体(*M. hominis*)、生殖支原体(*M. genitalium*)及发酵支原体(*M. fermentans*)。肺炎支原体除引起原发性非典型肺炎外,还引起上呼吸道感染、支气管炎、肺脓疡及严重的肺外并发症,如免疫性溶血性贫血、脑膜脑炎、心肌炎、心包炎、肾炎等。解脲脲原体可引起非淋菌性尿道炎、子宫内膜炎、绒毛膜羊膜炎、自然流产、早产、低体重新生儿及新生儿肺炎、脑膜炎、败血症。人型支原体可引起盆腔感染、产后热、肾盂肾炎及新生儿脑膜炎、脑脓肿等。生殖支原体主要引起非淋菌性尿道炎及盆腔感染。近年发现的发酵支原体 *incognitus* 株有很强的致病力,能引起人全身感染、多器官功能衰竭及急性呼吸窘迫综合征,病死率很高。另有新近分离出的穿透支原体及梨支原体,检测出其具有较强的细胞毒作用,但对其致病情况尚不了解。

从动物体内分离并鉴定出了几十种支原体,其中仅禽类就分离出 24 种,大部分对动物不致病,仅少部分引起不同程度的疾病,其中能造成严重危害的有四种,即:①由丝状支原体丝状亚种引起的牛传染性胸膜肺炎;②由鸡毒支原体引起的家禽慢性呼吸道疾病;③由猪肺炎支原体引起的猪喘气病和④由丝状支原体山羊亚种引起的山羊传染性胸膜肺炎。牛传染性胸膜肺炎给畜牧业造成过极严重的经济损失。猪喘气病及鸡毒支原体引起的鸡和火鸡慢性呼吸道疾病给养猪业及养鸡业造成的直接经济损失每年可达十余亿元。尚有其他支原体引起的畜禽疾病,也不同程度的影响着畜牧、家禽养殖业的健康发展。实验动物中主要有鼠肺炎支原体,引起小鼠肺炎及生殖系统疾病,鼠关节炎支原体能引起大鼠多发性关节炎,溶神经支原体能侵害小鼠脑和中枢神经,表现为旋转病。此外豚鼠支原体也可引起大鼠关节炎。实验动物的支原体感染给科研工作造成不利影响。

细胞培养感染支原体的问题也很严重。传代细胞支原体污染率可高达 85%。受支原体感染的细胞,可影响细胞内病毒繁殖,使受染细胞产生病变,形成空斑,常被误认为是病毒所致,作出错误结论。尚可阻碍杂交瘤细胞的融合,给科研及生物制品工作带来很多

麻烦。

支原体广泛分布于植物及昆虫中,可引起各种作物、蔬菜、花卉、中草药及果林、木本作物的病害,造成农林生产的巨大损失。已发现有 300 余种植物有支原体寄生。引起植物和昆虫病害的支原体有植原体(Phytoplasma)及螺原体(Spiroplasma)两大类。均寄生于植物韧皮部筛管细胞中。植原体目前还不能在人工培养基上培养生长,只能在电镜中观察到,其形态结构及大小与引起人及动物疾病的支原体类似,但营养和生理、生化性状还不清楚。螺原体的特征为螺旋形,可以分离培养。植物感染支原体后的主要表现为叶片黄化,发育畸形,花器变绿、果实小而畸形,品质变劣。植物中以桑树、泡桐、桔柑、马铃薯等受害最为明显。农作物、菜蔬及果树发育、桑蚕事业及木材生长均受影响。植物支原体与昆虫有密切关系,几乎所有的植物支原体病都是由昆虫介体传病的。一些昆虫支原体也能在植物上存在。已经有许多植原体和螺原体在昆虫体内观察到,同时也在许多昆虫,如蚊、蝇、蜜蜂、黄蜂、叶蝉、壁虱等体内及植物花的表面分离到螺原体属的支原体。

四、国内在支原体方面的研究情况

我国在动物支原体方面的研究开始于 30 年代。研究工作主要集中在实验诊断技术的建立,血清流行病学调查和疾病的预防控制方面。对一些危害严重的动物支原体病的研究,已取得了突破性的进展,特别在疾病的预防和控制方面取得了很好的成绩。通过全面推广应用我国自行研制的疫苗和严格的监控,已消灭了危害我国近百年之久的牛传染性胸膜肺炎;有效的控制了山羊传染性胸膜肺炎的流行。采用生物诱变的方法,经过兔体连续传代 700 余次,经历 30 余年,在世界上第一个在我国培育出猪肺炎支原体弱毒肺炎疫苗制造株,生产出安全有效的疫苗,为控制猪喘气病的流行创造了条件。近年来又研制出鸡毒支原体弱毒疫苗,为预防鸡慢性呼吸道感染提供了有力的保证。在血清学诊断方面,对猪的支原体感染建立了微量间接血凝试验;对禽支原体感染建立了血清平板凝集试验、血凝抑制试验和酶联免疫吸附试验;对牛、羊支原体感染建立了补体结合试验和凝集试验;对鼠支原体感染建立了补体结合试验、酶联免疫吸附试验及检测特异性核酸的聚合酶链反应(PCR)。

我国在植物支原体方面的研究开始于 50 年代。1957 年造成桑树严重病害的桑萎缩病被列入农业部和国家科技攻关课题。70 年代初期,中国农科院、中国科学院、中国林科院以及各省市的有关科研单位联合进行植物黄化病的研究。历经 40 年,发现在大部分植物黄化病组织中能分离出植原体。对造成桑树病害的病原体黄化型萎缩植原体(Mulberry yellow dwarf phytoplasma)的鉴定方法、传染途径、发病规律、诊断技术、抗病品种以及培育无病苗木等方面进行了系统研究,制订出防治技术方案,推广应用,使桑业生产得以顺利发展。对植原体引起的泡桐丛枝病、枣疯病和翠菊黄化病的诊断方法和防治措施进行了系统研究。并证实我国也存在蜜蜂螺原体病。还发现引起我国樱桃黄化病的病原是一种国际上尚未报道的植原体新种。此外,在粮食作物水稻、蔬菜、牧草、花卉、中药等

均有植原体或螺原体病发生。20年来,获得许多重大成果,大大减少了农林业生产的损失,不少成果和论文是国内外首次报道,在国际学术交流中获得好评。

我国对人支原体的研究起步较晚,1979年首次用自制的盐酸消化的猪胃脘和牛肉浸液自肺炎患儿咽部分离出肺炎支原体,同时还分离出唾液支原体(*M. salivarium*)及口腔支原体(*M. orale*)。对分离的肺炎支原体进行膜蛋白分析,蛋白成分及免疫成分与国际标准FH株基本一致,均存在有分子量190kDa的多肽(P_1 粘附蛋白),能被 P_1 单克隆抗体识别。11例经肺炎支原体间接血凝试验证明为支原体肺炎患儿的血清中均测出了 P_1 蛋白的抗体,健康儿童阴性。血清学诊断方面建立了生长抑制试验、代谢抑制试验、间接血凝试验、间接免疫荧光试验及酶联免疫吸附试验等抗体检测技术。通过血清流行病学调查证明肺炎支原体感染在我国各省市、各地区普遍存在,而且是我国急性呼吸道感染的常见病原之一。1983年首次自妇女生殖道分离出解脲脲原体,开展了解脲脲原体对泌尿生殖道感染、不育症及低体重新生儿关系的研究。1985年自妇女生殖道分离出人型支原体。1995年以来开展了生殖支原体分离培养及PCR技术进行快速诊断的研究。通过以上研究发现解脲脲原体在我国已婚妇女宫颈或阴道携带率相当高,为33%~75.8%。人型支原体携带率为2%~10%。生殖支原体培养的难度甚大,但通过钻研和努力,终于从尿道及呼吸道分离成功。此外还开展了解脲脲原体及人型支原体感染的血清流行病学调查,肺炎支原体及解脲脲原体单克隆抗体诊断技术、解脲脲原体分型研究、支原体抗菌药物敏感试验、肺炎支原体抗原基因克隆和表达的研究等等。

五、展 望

支原体学是一门新兴的学科,尚有很多方面待探索研究。根据我国目前情况,应在下述几个方面加强研究。

1. 支原体种类繁多,影响面广,造成的危害相当大,目前对它的重视尚不足,仅有少数单位具有从事支原体培养及诊断技术的条件。今后应在提高诊断技术的同时,建立快速、可靠、简便、便于推广及廉价的诊断方法,以期能得到广泛的应用,有利于更多单位开展研究。
2. 引进国外近年来发现的支原体新种,以研究这些新种的感染在我国是否存在,致病情况、临床表现及流行特点如何。
3. 有条件的单位开展有关支原体发病机制的研究,特别是支原体的抗原成分、基因结构、基因诊断、支原体与宿主细胞,包括免疫间的相互作用关系,感染后引起的免疫反应及免疫病理等。应用分子生物学技术推动这一领域的科研工作。
4. 提高对动物支原体感染的诊断技术,搞清我国一些主要动物支原体的血清型别,为免疫预防提供可靠依据。开展更广范围的疫苗研究,使更多的动物支原体病得到有效的预防。
5. 探索更有效的对植物及昆虫支原体病害的预防措施。寻找更有效的方法包括化学制剂,以期达到完全彻底消除植物支原体病害的目的。

[附]主要支原体的分离年度表

- 1898 Nocard 及 Roux 首次在传染性牛胸膜肺炎病灶中分离出支原体,命名 PPO
1900 Dujardin-Beaumetz 在固体培养基上观察到支原体菌落及其可滤过性
1923 Bride 及 Donatien 分离出绵羊及山羊无乳症的支原体
1934 Shoetensack 分离出犬瘟病的支原体
1936 Laidlaw 及 Elford 自污水中分离出莱氏无胆甾原体
1937 Dienes 及 Edsall 首次自人体巴氏腺中分离出 PPLO
1952 Wenthoholt 分离出发酵支原体
1953 Nicol 及 Edward 分离出人型支原体
1954 Shepard 分离出 T 株(解脲脲原体)
1956 Edward 及 Freundt 命名 Mycoplasma
1962 Channock, Hayflick 及 Barile 在无细胞的人工培养基上培养出肺炎支原体
1967 土居养二在电镜下观察到植物黄变的筛管中支原体样微生物(MLO),即植原体
1970 Gourlay 分离出支原体病毒(MVLI)
1971 Salgio 等自柑桔树和昆虫体分离出螺原体
1973 Rabinson 及 Hungate 自牛羊瘤胃中分离出厌氧原体
1976 Tully 等自昆虫体内分离出引致乳鼠白内障的螺原体
1981 Tully 自非淋菌性尿道炎患者尿中分离出生殖支原体
1986 Lo 自 AIDS 患者尸体中分离出发酵支原体 incognitus 株
1990 Lo 自 AIDS 患者尿中分离出穿透支原体
1991 Montagnier 自 AIDS 患者原代淋巴细胞培养中分离出梨支原体

(曹玉璞)

第二章 支原体的分类与鉴定

一般的分类学(Taxonomy)包括鉴定(Identification)、鉴别(Classification)、命名(Nomenclature)和保存(Conservation)。随着分子生物学技术的进步,群体遗传学(Population genetics)在分类学中的作用越来越受到重视。鉴定、鉴别和命名是识别一种细菌的连续过程,命名和鉴别是鉴定的结论。保存也作为分类的一个内容是因为没有菌种也就丧失了承认和验证鉴定和鉴别结果的凭据。

分类学中的分类等级由高及低分为:界(Kingdom)、门(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)和种(Species)。种是细菌分类的基本单元。种以下的分类单元(如血清型和生物型等)在分类上没有合法的分类地位。界的分类变动较大,从开始认识的动植物两界到较为流行的六界分类系统,又发展为目的的三域理论。六界分类法包括病毒界(Vi-ra)、原核生物界(Procaryotae)、原生生物界(Protista)、真菌界(Fungi)、植物界(Plantae)和动物界(Animalia)。下面我们要讨论的支原体就分类于原核生物界。这种认识一直持续

到 90 年代初,随着分子生物学技术的发展,尤其是细菌“16S rRNA 工程”的不断发展,使人们接受了 Woese 提出的三原界(Urkingdom)理论,即将生物分成真细菌原界(Eubacteria)、古细菌原界(Archaeobacteria)和真核生物原界(Eucaryote)。后来人们又以“域(Domain)”代替了“原界”的称谓。继而认为生物是由细菌域(Bacteria)、古生菌域(Archia)和真核生物域(Eucaria)组成。尽管对新提出的最高分类单元域能否凌驾于界之上仍有不同看法,但三域理论已广为接受。按目前的认识,支原体应属于细菌域。

界的下一级分类单元是门,目前国际系统细菌学委员会承认的门有四个,即硬壁菌门(Firmicutes)、薄壁菌门(Gracilicutes)、疵壁菌门(Mendosicutes)和柔壁菌门(Tenericutes)。过去将柔膜体纲(Mollicutes)归类于柔壁菌门,但是,系统细菌学的研究证明,柔膜体纲应归类于硬壁菌门中低 G+C% 含量的革兰氏阳性细菌分支。

支原体(mycoplasma)是一俗名,一般泛指柔膜体纲中的任何一个种。对柔膜体纲的分类与描述,国际上专门有一称为“柔膜体纲分类分委会”的组织负责对此进行修订。他们先后三次修订了“支原体目新种描述最低标准”的建议。该建议首次于 1972 年发表,并于 1979 年修正,1995 年修正时,将标题改为“柔膜体纲(柔膜菌门)新种描述最新标准”,同时废止了 1972 年和 1979 年的标准。

柔膜体纲的主要特征如下:①缺乏胞壁,在固体培养基上有形成油煎蛋菌落的倾向;②可通过 450nm 和 220nm 微孔滤膜;③基因组较小,富含 A-T;④在合适条件下无胞壁菌株不能恢复成有壁菌。在鉴定目、科和属中的位置时,主要依赖于形态、宿主来源、最适生长温度、培养和生化特征。在描述新种时,需进行详尽的血清学分析以及培养和生化特征的描述,主要要求有:①命名合适的模式株;②指定在该纲内目、科和属的位置,并选定合适的种加词进行种的命名;③列出模式株及近缘株与以前发表种不同的特征;④将模式株培养物保藏到国际认可的菌种保藏所。另外,种应发表在发行量大的杂志上。如果不是在《国际系统细菌学杂志》(IJSB)上发表,必须给该杂志社寄一份您论文的复印件,以使该菌名及时登在确认目录中,否则,您的菌种不会得到分类学上的合法地位。

柔膜体纲支原体仅由一层包膜包裹,无胞壁,也不能合成胞壁前体(如胞壁酸和二氨基庚氨酸)。该纲内支原体微小,某些活的球状支原体直径在 300nm 内,活螺旋原体直径小于 200nm,形态从球形至螺旋或线性。某些种是多形的,少数呈线形的支原体种可产生分支丝体状。多数情况下,细胞形态与培养基的营养质量和渗透压及培养时间相关。某些种有专门的顶端结构,其上有粘附素,介导对真核细胞和组织的吸附。

柔膜体纲的基因组复制不一定与细胞分裂同步进行。因此,可见线形支原体的发芽和分段结构及传统二分裂状态。支原体可以运动或不运动,不形成芽胞,也不出现有壁期,到目前为止几乎所有描述的种都能在人工培养基上生长,只有植原体(phytoplasma)尚不能人工培养,因此,本文对此不作详述。

多数可培养柔膜体纲是兼性厌氧的,但少数为专性厌氧。在固体培养基上形成 1~2mm 的菌落,有的可小至 0.01mm,生长时有穿透固体培养基生长的趋势。在适宜条件下,许多不运动种形成油煎蛋菌落,具有运动性的支原体形成的菌落常常呈扩散状,附近

有卫星菌落。

该纲内支原体对青霉素及其类似物有绝对的抗性,对利福平亦有抗性。对青霉素的抗性及向固体培养基内生长的趋势均与无胞壁有关。

G + C% 在 23% ~ 35% 之间,少数种可达 40%,基因组在 600 ~ 2200kbp 之间。

柔膜体纲支原体可能是共生菌,也可能是直接或间接的致病菌,某些种是脊椎动物、无脊椎动物或植物的致病菌,植物致病菌是在昆虫体内繁殖和传播的。

以前将对植物致病的大量柔膜体纲菌称为支原体样生物,现冠之以“植原体(phytoplasma)”。一些螺原体种也对植物致病,这些菌在宿主植物硬皮组织和同翅昆虫生物内存活。经 16S rRNA 测序证实植原体是真正的柔膜体纲支原体,但因尚未被培养出,对此属内的种命名时应小心,应暂时放在后选菌属内。

表 2-1 为目前柔膜体纲的分类情况及其主要特性。

表 2-1 目前柔膜体纲的分类情况及其主要特性

分 类	已 承 认 种 数	G + C%	基因组 (kbp)	胆甾醇 需求	宿 主	其它明显特征
支原体目(Mycoplasmatales)						
支原体科(Mycoplasmataceae)						
支原体属 (Mycoplasma)	100	23 ~ 40	600 ~ 1350	+	人、动物	最适生长温度 37℃
脲原体属 (Ureaplasma)	6	27 ~ 30	760 ~ 1170	+	人、动物	水解尿素
虫原体目(Entomoplasmatales)						
虫原体科(Entomoplasmataceae)						
虫原体属(Entomoplasma)	5	27 ~ 29	790 ~ 1140	+	昆虫、植物	最适生长温度 30℃
中间原体属(Mesoplasma)	12	27 ~ 30	870 ~ 1100	+	昆虫、植物	最适温度 30℃,只有在 0.04% Tween80 存在时,于无血清培养基中生长才受抑制
螺原体科(Spiroplasmataceae)						
螺原体属(Spiroplasma)	17	25 ~ 30	940 ~ 2240	+	昆虫、植物	螺旋线状,最适生长温度 30 ~ 37℃
无胆甾原体目(Acholeplasmatales)						
无胆甾原体科(Acholeplasmataceae)						
无胆甾原体属 (Acholeplasma)	13	26 ~ 36	1500 ~ 1650	-	动物、某些 植物、昆虫	最适生长温度 30 ~ 37℃
厌氧原体目(Anaeroplasmatales)						
厌氧原体科(Anaeroplasmataceae)						
厌氧原体属(Anaeroplasma)	4	29 ~ 34	1500 ~ 1600	+	牛和羊瘤胃	对氧敏感的厌氧菌
无甾醇支原体属 (Asteroleplasma)	1	40	1500	-	牛和羊瘤胃	对氧敏感的厌氧菌

(引自 Tully J.G. et al: IJSB 43(2):378 ~ 385,1993)

新的柔膜体纲菌种应证实属于此纲,可分类于某一已有菌属或新菌属,与以前发表种明显不同,纯培养物对鉴定研究是必需的,在发表资料中应提供下列数据:

(一)菌株的纯化和初步克隆化

做模式株的新分离纯培养物肯定是由多种柔膜体菌组成的,这些柔膜体菌存在于未克隆株的培养物中,至少要经三次克隆传代才能纯化。每次包括肉汤之小心过滤(滤膜孔径尽量小,一般为 200~300nm),滤膜及其稀释液,接种固体培养基,挑取单一菌落,如此重复三次,以确保模式株是来自一个细胞,用有限稀释法克隆三次也不失为一种替代方法,所有分类学描述必须依据一个克隆株。

(二)柔膜体纲水平上的鉴定

1. 无回复突变型 如细菌为 L 型,则应在克隆自行回复突变试验,克隆菌在合适条件下(无抗生素等致 L 突变因素存在)不会回复成有壁菌,用于回复试验的培养应为标准的细菌肉汤,半固体和传统的血琼脂。

应指出的是,细菌 L 型突变体转为典型细菌的能力在不同种,直至同种不同株间也有很大区别,也与培养条件相关,回复常常易发生于液体和半固体培养基,有氧条件对某些菌的回复更有利,G+C%测定和过滤试验亦有助于 L 突变体的鉴别。

2. 有限细胞膜的超微结构 将微生物分类于柔膜体纲需要用超薄切片电镜观察显示其仅为一层包膜,无胞壁,此数据和无回复突变 L 以及不是古生菌的证据可初步判断此菌属于柔膜体纲。应注意的是,不同自然生态系统中存在着大量非可培养和无壁细菌,因此有可能发现一种无壁(但不是古生菌),且遗传发育上与柔膜体纲无关的细菌。

3. 过滤性 应测定能使活生物通过的最小孔径,高压过滤,可使无壁菌通过比其直径小的孔径,因此不能用此法,目前描述的柔膜体纲细菌均可通过 450nm 孔径(用液体培养基培养菌试验)。多数种亦可通过 300~200nm 孔径,尽管通过此孔径后,滴度明显降低。L 型细菌一般不能通过 300nm 孔径,即使通过,滴度也大大降低,但几乎不能通过 200nm 孔径。

4. 核酸方法 下述三法也常用于将细菌分类于柔膜体纲:

- GC%测定:对新种描述是必需的指标,若 $G + C\% > 40\%$ 则此菌很可能不属此纲
- 基因组大小:一般为 600~2200kbp,无胞壁,基因组 > 3000kbp 为细菌 L 型
- 16SrDNA 测序:可提供一确凿证据,可通过真细菌保守引物克隆测序,并可与基因文库中 16S rRNA 序列比较

(三)目和科水平的鉴定

柔膜体纲内目和科的确定通过甾醇需求试验,总体细胞形态、菌落外观、最适生长温度、基因组大小和对氧需求来确定的,下列试验是必须遵循的。

1. 甾醇需求 生长对胆固醇的需求常常直接于有和无胆固醇条件下培养比较获得, 这些试验要求含不同脂肪酸和白蛋白的无血清培养基, 加浓度时应逐渐增加可溶性胆固醇($1\sim 20\mu\text{g/ml}$), 生长反应则通过测出总细胞蛋白或在固体培养基上菌落而测定: 支原体科成员, 虫原体科、螺原体科的多数成员在无血清培养基中生长极少, 甚至忽略不计, 但随胆固醇量增加, 其生长量亦增加。无胆甾原体属, 中间原体属, 无甾醇支原体及某些螺原体可于无血清培养基中单独生长良好, 于加 Tween 80 的培养基中生长亦较好。

另一种改良的胆固醇需求比较是: 将试验菌株种无血清培养基(加或不加 0.01% Tween80 或 15% 胎牛血清)。通过 23 次 10 倍系列稀释以维持传代生存。最低浓度即为理论稀释因子, 还可排除由于接种所致的胆固醇污染。非螺旋状柔膜体不能在无血清肉汤而于含 Tween 80 培养基中进行功能代谢即可分类为中间原体属, 这一试验亦有助于螺原体对胆固醇需求的测定。

与胆固醇或甾醇需求试验有关的注意事项: 尽管测定对毛地黄皂苷(digitonin)和多聚茴香脑硫酸钠(sodium polyanethol sulfonate)的敏感性有助于对胆固醇需求的亦可判定, 但并不是绝对的。柔膜体菌在对甾醇生长需求不能仅通过简单几次传代判定, 因有可能是接种物中胆固醇及其它甾醇类污染, 对新种此项指标的测定应加甾醇需求株与不需求株做对照来测试, 在甾醇需求试验中螺原体生长量不能仅用暗视野测定螺旋数, 因某些螺原体不形成螺旋状, 有些支原体科或螺原体的种可能生长要求苛刻, 同传统无血清培养基加胆固醇仍达不到营养最低要求, 在这种情况下, 加不同量的胆固醇和动物血清的比较试验可用于判定对甾醇的需求。

2. 细胞形态 应指出的是, 柔膜体纲细菌之形态很大程度上依赖于培养基成份和培养时间。柔膜体纲新种的分类位置确定需检测其对数生长期时的典型形态, 一般用暗视野相差显微镜, 螺原体科成员在多数液体培养情况下为螺旋状, 他们显示柔韧性, 有时为平移运动。镜下, 非螺旋菌为多形态的, 一般为小的拟球体, 双极状, 和(或)精细分支或不分支线状, 长度变化较大, 甲醇固定菌用 Giemsa 液染色有助于某些支原体属种的形态的观察。由于非螺旋和螺旋菌可显示运动性, 因此, 检测活菌是必需的。

电镜观察用的固定剂常常改变螺原体的螺旋形态, 因此, 用暗视野显微镜检测活的和固定细胞是有益的。尽管形态描述是必需的, 但不能仅依此指标来鉴定此纲内细菌。

3. 菌落形态 必需描述待研究菌在固体培养基上生长状况及其形态, 至少多数非螺旋柔膜体纲细菌可形成油煎蛋菌落, 但是, 许多螺原体属细菌种和少数非螺旋状菌在目前条件下不形成这种典型菌落, 螺原体常形成扩散菌落, 易形成卫星菌落, 这是具有运动性细菌生长的特征, 因此, 对螺原体科是正常的, 需指出的是不运动的螺原体可形成此种菌落。

4. 最适生长温度 生长温度可用于区分某些科。螺体目的螺原体属, 中间原体属和螺原体属及无胆甾原体目的某些种于 $30\sim 32^{\circ}\text{C}$ 生长最佳, 而柔纲内其它种则于 37°C 生长最好。

5. 需氧和厌氧生活 厌氧生活和对氧敏感的柔膜体纲细菌分为厌氧支原体科、其对

应单一目为厌氧支原体目,目前,这种菌仅在羊和牛胃中发现。

6. 密码子的使用 如果有条件建立 UGA 密码子使用的实验,此信息对分类微生物至目和(或)科是有意义的,但它不是必需的,支原体目和螺原体目使用 UGA 作为色氨酸密码子,而在无胆甾原体目和厌氧支原体目成员仅用 UGG 编码色氨酸。

(四)属水平的鉴定

将柔膜体菌正确鉴定到目和科对正确鉴定属是非常有意义的。

1. 支原体属 支原体包括来自脊椎动物的非螺旋柔膜体菌,特征如下:①不是专性厌氧;②需胆固醇或甾醇才能生长;③最适生长温度为 37℃ 或以上;④不水解尿素;⑤基因组大小为 600~1350kbp。

2. 脲原体属 与上述支原体属相同,但它能水解尿素,基因组大小 760~1170kbp,由于分解尿素产氨使 pH 升高是判定该属的最低要求,尽管还不知道有其它菌具有此酶活性,但有些其它属细菌可产生尿素,故使培养基 pH 升高,因此,仅靠培养基变红来判定结果太武断了。脲原体属的特性如表 2-2 所示。

表 2-2 脲原体属特性

特 性	结 果
菌体呈球形至卵形,线形较少见	+
菌体直径(平均值 nm)	100~850(330)
菌落直径(μm)	15~60
在空气、 N_2 或 H_2 中含 5%~15% CO_2 环境中生长良好	+
在有氧条件下生长不良	+
最适 pH	6.0 ± 0.5
肉汤培养每 ml 活菌数一般少于 10^7	+
37℃ 时的平均繁殖时间(分)	50~105
基因组大小(dalton)	$4.1 \sim 4.8 \times 10^9$
mol% (G+C%)	26.9~30.2
最适生长温度(℃)	37
生长对胆固醇的需求	+
对毛地黄皂苷敏感	+
酶活性	
尿素酶	+
精氨酸脱亚氨酶	-
氨肽酶	+
脂酶	+
α -磷酸甘油脱氢酶	+
L-组氨酸氨裂解酶	+
苹果酸脱氢酶	+
乳酸脱氢酶	-
ATPase	+
RNase	+

续表

特 性	结 果
DNase	+
磷酸酶	+
触酶	-
裂解蛋白质活性	+
碳水化合物发酵	-
红细胞裂解	+
红细胞吸附	+
对红霉素和四环素的敏感性	+
有氧和厌氧条件下的四唑还原	-

3. 螺原体科内的属 来自节支动物和植物表面的非螺旋状柔膜体菌,特征如下:①不是专性厌氧;②需甾醇生长;③最适生长温度于 30℃ 附近;④基因组大小为 790~1140kbp;⑤与螺原体之遗传发育近缘,这些菌归为螺原体属。而来源相同,特征与上类似,还是如下特征者为中间原体属:在含 0.04% 聚乙烯山梨醇聚糖的无血清培养基中能生长,以上两个属构成了螺原体科,从节支动物;植物表面和植物硬皮组织中分出的螺旋状柔膜体菌,具有如下特征者归螺原体属和螺原体科(a):不是专性厌氧菌;(b)需要或不需要甾醇;(c)基因组大小达 940~2200kbp。需指出的是,因支原体科成员很少来自植物,理论上,从脊椎动物中分出是有可能的,因此,尽管支原体对分类是重要线索,还必需实验其关键特性以正确分类,并评估此菌依什么从此处分出。

4. 无胆甾原体属 从脊椎动物、植物或节支生物分离出的非螺旋状柔膜体菌,如具有如下特性可分类为无胆甾原体属:①不是专性厌氧;②可在无甾醇的培养基中生长;③最适生长温度为 30~37℃;④基因组大小 1500~1650kbp。

5. 厌氧支原体科的属 从脊椎动物分离出的非螺旋状柔膜体菌,营专性厌氧生活,并需要甾醇生长的归为厌氧支原体属,而不需甾醇的专性厌氧菌属于无甾醇支原体属。

(五)种水平的鉴定

种的定义,柔膜体纲成员种的概念就象所有其它原核生物分类一样,依赖于武断的标准,较为理想的是:柔膜体种可认为是一样形态上和生物学上菌相似的菌,其基因组同源性>70%。实际上,对菌株的广泛杂交是不现实的,因此,常常需要建立检测表型标志来判断菌株间相互关系的方法,这些方法包括:血清学和代谢技术,或分子生物学技术(如 Southern 杂交,DNA 测序,PCR 等),在做种描述时,必需提供下列信息:

1. 一般生物学信息 描述新种的基础,应详细描述模式株和相关菌株及其来源,也应指出任何细菌需要的特殊生长因子或培养基成分,应讨论培养中可能遇到的问题,给出支持细菌繁殖的培养基,提供青霉素抗性依据,接种温度(包括生长的温度范围和最适温度),pH 需求,气体条件均为完整描述的关键所在。

应提供对天然宿主致病或不致病的资料,同时也应描述栖息信息和对脊椎动物、无脊椎动物或植物的实验致病机制应当进行下列试验亦正确描述种。

2. 血清学相似度 由于仅有少数特性可用于鉴定,因此,血清学方法更为重要,待分析菌应与可疑属内所有种做血清分析,如果所分析菌不能分类于在一属,则应与柔膜体纲内所有已知种比较分析,至少要用2种血清学方法分析菌株,推荐对非螺旋菌用生长抑制试验和琼脂板免疫荧光试验,而对螺旋菌而言,应做生长抑制实验,代谢抑制试验和螺原体变形试验。

对新柔膜体菌的血清学分析特性最常用的技术是生长抑制试验。一般不需对可能属内血清和抗血清做交叉试验,但在对可疑新种的抗原应对以前描述种的特异抗血清做测试,然而,如果一个属内仅少数种被描述了,应做交叉试验。如所分析菌在琼脂上生长不良,可用代谢抑制试验代替,此法已成功地用于脲原体属或螺原体属的鉴定。

琼脂平板免疫荧光试验可用直接或间接荧光抗体试验,与生长抑制试验一样,待分析菌琼脂菌落应与可疑菌属内以前描述种的特异或混合血清进行试验比较。某些柔膜体菌(尤其是螺原体属种)在某些琼脂配方中显示非特异自发荧光,此时,应进行变形试验,变形-代谢抑制试验结合的使用已用于了螺原体种的鉴别。

应注意的是,某些种(如人型支原体和衣阿华支原体)的血清学反应异质性较大,因此,某些分离株可能不与模式株血清交叉,此时,应用对不同株的分型血清用至少两种以上方法试验。

3. 葡萄糖发酵 应评估细菌分解葡萄糖产酸的能力,最好在厌氧和有氧条件的分解能力,培养基的成分,温度和孵育时间应固定。

4. 精氨酸水解 应评估细菌水解精氨酸产氨使 pH 升高的能力,用 2~10g/L 精氨酸不同浓度实验的改良法,因某些菌可被高浓度精氨酸抑制,应注意的是,在某些情况下,螺原体中精氨酸水解的证明仅于同时提供葡萄糖或其它能源时才能获得,最常用方法为加浓度葡萄糖(0.1%),于含精氨酸培养中培养,尽管此技术可产生起始较低的 pH,但它会随螺原体生长而增加。

需强调的是,进行这种试验时,应设一不加底物的对照培养管,并做一已知利用该物的阳性菌对照。

5. β -D-葡萄糖苷酸的检测 在不同无胆甾原体中此酶的水平可用于区分种,此酶试验依赖于其对七叶苷(esculin)或对苯二酚葡萄糖苷(arbutin)利用。

6. 遗传特征 对所分析种至少应测定 G+C% 和基因组大小,DNA 培养基成分至少要用下述推荐方法测定: T_m 浮力密度,高效液相和密度梯度离心法,最近研究证明,柔膜体纲菌种基因组大小的测定可用 PEGE 精确测量。

(1)支原体属不同种特性:支原体属目前已描述了 100 个种和 4 个亚种。该属包括基因组具有高度同源性的形态上相似的一群微生物。该属内中的确定应根据形态、培养、营养、生化、血清和遗传特征,其中以血清学相似度最为重要,生长抑制试验、直接/间接免疫荧光和(或)代谢抑制试验常常用于种的区分。柔膜体纲分委会认为,G+C% 含量是鉴别种必需的指标,而种间 DNA 杂交研究较少。已有研究表明,种间杂交率在 10%~40%。支原体中,种加词的命名常常有生态学上的意义,多数种都与特定微生物相关。目前柔膜