

• 论 著 •

1 株抗酸阳性丙酸杆菌的分离和鉴定

姜清明¹, 屈平华², 陈 茶², 陈默蕊³

(1. 粤北第二人民医院检验科, 广东韶关 512028; 2. 广东省中医院检验医学部, 广东广州 510006;

3. 南方医科大学附属潮州市中心医院检验实验中心, 广东潮州 521000)

摘 要:目的 对 1 株乳腺脓肿标本分离的缓慢生长革兰阳性抗酸杆菌进行菌种鉴定。方法 采用细菌的 16S 核糖体核糖核酸(rRNA)基因测序分析, 结合细菌的菌体形态、生长特征、API 20A 和手工生化实验进行菌种鉴定。结果 该菌为厌氧的、无芽孢、直或弯曲的多形性杆菌, 革兰和抗酸染色为阳性。血平板培养 5 d 形成直径大于 2 mm、米黄色、圆形、光滑、突起、边缘整齐、 β 溶血性菌落。但 16S rRNA 基因测序分析发现, 该菌与贪婪丙酸杆菌的同源性为 100%, API 20A 生化编码为 44365062, VP 试验的阳性, 符合贪婪丙酸杆菌的特征。结论 该乳腺脓肿的病原菌为贪婪丙酸杆菌, 其抗酸染色阳性, 为国内首次报道。

关键词:丙酸杆菌; 抗酸性; 细菌鉴定; 序列分析

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 09. 026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1219-02

Characterization of one strain of acid-fast Propionibacterium isolated from the breast abscess samples

Jiang Qingming¹, Qu Pinghua², Chen Cha², Chen Morui³

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Yuebei, Shaoguan, Guangdong 512028, China;

2. Department of Laboratory Medicine, the Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine,

Guangzhou, Guangdong 510006, China; 3. Laboratory Medical Center, Chaozhou

Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong 521000, China)

Abstract: Objective To identify one acid-fast bacteria isolated from wound secretion of breast abscess. Methods The acid-fast strain was identified by the morphological characteristics, API 20A strips, classical biochemical reaction, and 16S rRNA gene sequencing. Results Cells of the strain was anaerobic, non-spore-forming, pleomorphic, straight or curved rods, which Gram and acid-fast stain both were positive. After incubation for 5 days on sheep blood agar, colonies were than 2 mm in diameter, circular, smooth, entire, bump, rice cream-like with β -hemolysis. The 16S rRNA gene sequences were 100% identity to Propionibacterium avidum. The API 20A profile was 44365062 with positive Voges-Proskauer test, which was also consistent to Propionibacterium avidum. Conclusion The pathogens of breast abscess is Proionibacterium avidum, which is the first acid-fast Propionibacterium reported in China.

Key words: Propionibacterium; acid-fast; bacteria identification; sequence analysis

抗酸阳性杆菌通常指的是结核分枝杆菌和其他一些非结核分枝杆菌(NTM), 其广泛存在于水、空气、土壤等医院相关环境中, 可引起肺结核、麻风、导管相关性血流感染、伤口感染。抗酸阳性杆菌的典型特征是菌体含有大量脂质, 主要为分枝菌酸, 革兰染色时结合结晶紫的能力差, 甚至不着色, 但采用抗酸染色时, 其与石炭酸复红结合牢固, 能抵抗酸性乙醇的脱色作用, 并保持复红的颜色。除分枝杆菌外, 一些诺卡菌属和棒状杆菌属细菌, 以及其他一些放线菌也具有弱抗酸性, 但较为少见。2011 年, 从 1 例分枝杆菌培养的乳腺分泌物标本中检出 1 例抗酸阳性细菌, 最初错误鉴定为快生长分枝杆菌, 后经 16S rRNA 基因测序, 确定为贪婪丙酸杆菌, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 门诊患者, 男, 38 岁, 左乳腺表层溃疡和深部蜂窝性组织炎, 脓肿体积为(3×3×2.5)cm, 穿刺有脓液。微生物检查: 脓液直接涂片发现抗酸阳性杆菌; 细菌培养和分枝杆菌培养均检出无芽孢、直或弯曲的、多形性的抗酸阳性杆菌, 最初误报为快生长分枝杆菌。临床治疗采用脓腔引流和头孢西丁抗感染治疗, 预后不详。

1.2 仪器与试剂 TE 9600 基因扩增仪(珠海黑马公司); 恒温金属浴器(杭州博日公司); 快速革兰染色液和抗酸染色液(Baso); API 20A 鉴定试条(法国梅里埃); E-test 纸条(安徽淮

北宏远); Premix Ex Taq 酶体系(大连 Takara 公司); 细菌 16S rRNA 基因扩增通用引物 27f(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')与 1492r(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')由上海英韦创津广州公司合成。

1.3 细菌培养和形态学观察 伤口分泌物标本分区划线接种血平板、普通巧克力、麦康凯平板, 置于含 5% 二氧化碳的培养箱中 35℃ 恒温孵育, 每天观察平板的生长状态。按常规的细菌检验方法, 进行革兰染色和抗酸染色, 油镜下观察其菌体形态照相记录。

1.4 16S rRNA 基因扩增及测序鉴定 采用碱裂解法提取细菌的基因组 DNA。细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增条件参考文献[1]。扩增产物经电泳检测后送与上海英韦创津广州公司进行扩增产物的纯化及基因测序。获得的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 的 GenBank 库中进行 Blast 同源性比对初步确定其分类位置。

1.5 生化鉴定 生化鉴定包括 API 20A 鉴定、伏-普(VP)实验和厌氧生长实验等, 主要参考试剂说明书进行。

2 结 果

2.1 细菌培养结果 分离到 1 种革兰阳性杆菌, 菌体呈杆状或弧状; 其生长速度缓慢, 初次培养 5 d 在血平板上可形成直径大于 2 mm、米黄色、圆形、光滑、突起、边缘整齐、 β 溶血性菌

落;麦康凯平板上不生长;抗酸染色阳性见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 16S rRNA 基因测序鉴定及结果分析 扩增得到 16S rRNA 基因的全序列,大小约 1 500 bp。PCR 产物送与上海英韦创津广州公司进行测序,由获得的毛细管电泳峰谱来看,其基因序列的荧光峰图正常,无杂带、无背景信号干扰见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。以 DNA MAN 软件对基因序列的拼接,得到 1 394 bp 的有效序列,以 Blast (www. ncbi. him. nih. gov/blast)的 16S rRNA 序列库(细菌和真菌)进行分析,显示与贪婪丙酸杆菌 DSM 4901(核酸登录号 NR 118647)相似率为 100%,与丙酸丙酸杆菌 DSM 43307(核酸登录号 NR 025277)相似率为 99. 4%,与丙酸杆菌属其他种的相似度则均低于 99. 0%。按 CLSI MM-18 通用解释标准,可初步鉴定为贪婪丙酸杆菌^[2],但需进一步排除丙酸丙酸杆菌。

2.3 生化实验结果和分析 分离株为兼性厌氧菌,其在厌氧环境中生长优于需氧环境,且 VP 试验阳性,符合丙酸杆菌的特征。采用 API 20A 试验,分离株吡啶实验阴性、脲酶阴性、葡萄糖发酵实验阳性、甘露醇发酵实验阴性、乳糖发酵实验阴性、蔗糖发酵实验阳性、麦芽糖发酵实验阳性、柳醇发酵实验阳性、木糖发酵实验阴性、阿拉伯糖发酵实验阴性、明胶液化实验阳性、七叶灵水解实验阳性、甘油发酵实验阳性、纤维二糖发酵实验阴性、甘露糖发酵实验阳性、松三糖发酵实验阴性、棉子糖发酵实验阴性、山梨醇发酵实验阴性、海藻糖发酵实验阳性、触酶实验阳性,生化编码为 44365062。分离株与相关菌种生化实验的比较见表 1。其中“+”为阳性、“-”为阴性、“V”为可变、“ND”为未检测,相关菌株的试验资料来自参考文献^[3]。

表 1 分离株与丙酸杆菌相关菌种的生理生化特征比较						
菌名	七叶灵 水解	明胶 液化	触酶	吡啶	硝酸盐 还原	蔗糖 发酵
分离株	+	+	+	-	-	+
贪婪丙酸杆菌	+	+	+	-	-	+
丙酸丙酸杆菌	-	V	-	-	+	+
痤疮丙酸杆菌	-	+	V	+	+	-
产酸丙酸杆菌	-	-	-	-	-	+
产丙酸丙酸杆菌	+	-	V	-	+	+
澳大利亚丙酸杆菌	+	-	-	-	+	-
环己脂酸丙酸杆菌	+	-	-	-	-	+
费氏丙酸杆菌	+	-	+	-	V	-
颗粒丙酸杆菌	-	-	+	-	-	+
詹氏丙酸杆菌	+	-	V	-	-	+
微需氧丙酸杆菌	-	ND	-	ND	+	ND
特氏丙酸杆菌	+	-	+	-	-	+

3 讨 论

丙酸杆菌是一类厌氧的、不产生芽孢的革兰阳性杆菌,正常存在于人体皮肤表面。该菌营养类型为异养厌氧型,但可以耐受微量氧气,由于可发酵糖类产生乳酸和转化为丙酸,故命名为丙酸杆菌^[4],VP 实验阳性是该菌的一个重要特征。临床上,丙酸杆菌主要引起痤疮和术后感染^[5];近年来,有多例贪婪丙酸杆菌引起乳腺炎的临床报告^[6-8]。在本例研究中,分离株为兼性厌氧革兰阳性杆菌,VP 试验阳性,符合丙酸杆菌的特

点,API 20A 生化实验结果与贪婪丙酸杆菌一致,且 16S rRNA 基因与贪婪丙酸杆菌相似率为 100%,故可以确定为贪婪丙酸杆菌。

目前还没有丙酸杆菌抗酸阳性的相关报道。就抗酸染色的原理来看,该脓液标本直接涂片抗酸阳性,可能与皮肤皮脂腺的油脂环境和丙酸杆菌致病特性有关。有研究发现,痤疮丙酸杆菌分泌的磷脂酶可以将人体皮脂中的三酰甘油降解为游离脂肪酸,使其黏附在细胞表面,并具有以下作用:(1)营养作用;(2)生物被膜保护作用;(3)在皮肤毛囊中的黏附和泊位作用。因此,痤疮丙酸杆菌的脂肪酸被膜,可能是其与石炭酸复红牢固结合而不被酸性乙醇脱色的主要原因^[9-10]。从已有的文献资料来看,丙酸杆菌可通过菌体形态和革兰染色的着色情况、血平板溶血、厌氧生长、VP 试验等与其他抗酸阳性的分枝杆菌和诺卡菌进行区分:(1)丙酸杆菌为革兰阳性杆菌,菌体微弯曲;诺卡菌亦为革兰阳性杆菌,菌体可见分枝;分枝杆菌为着色不良的革兰阳性杆菌。(2)丙酸杆菌可发酵葡萄糖产生丙酸(因故而命名为丙酸杆菌),其 VP 实验阳性,而分枝杆菌和诺卡菌的 VP 实验为阴性。(3)丙酸杆菌为厌氧菌,而分枝杆菌和诺卡菌为严格需氧菌。(4)丙酸杆菌在血平板上通常可形成β溶血,分枝杆菌和诺卡菌在血平板上通常不溶血。

参考文献

[1] 屈平华,赵红波,黄彬,等. 卫生部微生物室间质评 1 012 菌的鉴定与放线菌属的系统发生分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34 (1): 814-819.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. MM18-A Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

[3] Downes J, Wade WG. Propionibacterium acidifaciens sp. nov., isolated from the human mouth[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(11): 2778-2781.

[4] Kusano K, Yamada H, Niwa M, et al. Propionibacterium cyclohexanicum sp. nov., a new acid-tolerant omega-cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoiled orange juice [J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(3): 825-831.

[5] 张智,滕婷婷,程奕星. 痤疮丙酸杆菌生理生化特性及其致病性综述[J]. 当代医学, 2008, 142(6): 12-14.

[6] 林新瑜,段西凌. 痤疮丙酸杆菌及相关性疾病[J]. 临床皮肤科杂志, 2009, 38(2): 133-134.

[7] Panagea S, Corkill JE, Hershman MJ, et al. Breast abscess caused by Propionibacterium avidum following breast reduction surgery: case report and review of the literature[J]. J Infect, 2005, 51(5): 253-255.

[8] Bradbury RS, Warren SJ, Jones DA, et al. Propionibacterium avidum causing native breast abscess[J]. Clin Mic New, 2011, 33 (19): 150-151.

[9] Kritikos A, Pagin M, Borens O, et al. Identification of Propionibacterium avidum from a breast abscess; an overlooked etiology of clinically significant infections[J]. New Microbes New Infect, 2014, 4(1): 9-10.

[10] Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. Biofilm formation by Propionibacterium acnes is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors [J]. Res Microbiol, 2007, 158(4): 386-392.

(收稿日期: 2015-10-28)

