

# 腋毛杆菌与微小棒状杆菌和微小诺卡氏菌的鉴别研究

马复先 蔡瑞康 高继台

(解放军总军总医院,北京)

周 方 李 俐

(解放军军事医学科学院,北京)

**摘要** 本文报告腋毛癣病原菌在我国首次分离成功。从 487 例腋毛癣患者病毛中检出病原菌 189 株,检出率为 38.8%。从形态学、生长条件、生化反应、免疫试验和菌体成份等方面,将该菌与微小棒状杆菌和微小诺卡氏菌进行了鉴别研究。三种细菌有明显差别,将腋毛癣病原菌暂命名为腋毛杆菌。

目前,国际上对腋毛癣(感染)的病原菌报道不一致,较多学者认为是微小棒状杆菌或微小诺卡氏菌<sup>[1-3]</sup>。我们根据初步的研究认为,我国南方人所感染的腋毛杆菌不属于这两种菌,而是另一种。现将研究结果报道如下。

**关键词** 腋毛杆菌;微小棒状杆菌;微小诺卡氏菌;鉴别

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

1. 样品的采集: 1984 年 10 月—1986 年 11

月,我们对南方边防人员进行腋毛、阴毛和头发等项的检查,患腋毛癣者居多。以无菌手续取其腋毛和阴毛样品,共采样 487 例,每例取病毛数根。另取 50 例正常者为对照。每例取 2—3

根毛作分离培养,其余样品放无菌试管中,置室温下保存,供其它试验用。

2. 培养基: 腋毛杆菌原代培养用新鲜兔脑浸液营养管及兔脑浸液羊血琼脂平板,传代培养基是羊血琼脂平板。生化反应以新鲜兔脑浸液为基础培养基。

3. 试剂: 细菌生化反应用美国 Kodak 公司和军事医学科学院五所提供的系列试剂。细菌固定液为 2% 戊二醛 PBS 液 pH7.4 和 1% 锇酸二甲胍缓冲液。细菌电子染色试剂用 1% 醋酸氧铀和 3% 枸橼酸铅。

4. 仪器: 日本 S<sub>30</sub> 型扫描电镜连结美国的 EDX<sub>910</sub> 能谱仪。国产 DXB<sub>1-12</sub> 型透射电镜,瑞典 LKB 超薄切片机,分光光度计和气相色谱仪等。

## (二) 试验方法

1. 形态学检查: 分别取分离的腋毛杆菌一株代表株和微小棒状杆菌(日本引进)、微小诺卡氏菌(中科院微生物研究所提供)标准株,作形态学检查。

(1) 革兰氏与鞭毛、芽孢、荚膜、抗酸和异染颗粒等染色检查。

(2) 扫描电镜检查: 取三种细菌之菌落,经戊二醛和锇酸液双重固定,乙醇和丙酮系列脱水,镀金后在扫描电镜下观察表面结构。

(3) 超微结构观察: 经上述双重固定和系列脱水的菌体,用 EPON<sub>812</sub> 包埋,在超薄切片机上切片,切片厚度为 600 Å,以醋酸氧铀和枸橼酸铅双重染色,在透射式电镜下观察其超微结构。

### 2. 生长条件和生化反应试验:

(1) 分离培养: 取上述腋毛、阴毛接种于新鲜兔脑浸液营养管内,每例接种 3 管,每管一根毛,在 37℃ 下孵育 7 天。然后转种于含新鲜兔脑浸液羊血琼脂培养基上,按上述条件孵育 5—7 天。取典型菌落经增菌培养后作形态学、生化反应和菌体成份测定等。

(2) 将三种细菌分别接种于羊血琼脂和 1% 亚硝酸钾血琼脂及马铃薯血琼脂等培养基上,在 37℃ 条件下孵育。观察其生长状况和菌

落特点,完成 22 项生化反应试验,每项试验重复三次。

3. 免疫试验: 取正常家兔 5 只,分别取其血清与腋毛杆菌进行凝集反应,其效价均 <1:10。取浓度为 10<sup>7</sup> 的腋毛杆菌灭活菌悬液,按 0.1、0.3—1ml 递增的办法进行免疫注射,每周注射 2 次。2 周后维持量为 1ml,4 周后取血清作免疫吸收试验。

4. 菌体成份测定: 取腋毛杆菌、棒状杆菌和诺卡氏菌各 3 株用热变性温度法和气相色谱分析法,分别测定三种细菌 DNA 中 G+C Mol% 和细胞的类脂及酶类成份分析。

## 结 果

### (一) 形态特征比较

1. 染色检查: 三种细菌均为革兰氏阳性菌,无鞭毛、荚膜和芽孢。诺卡氏菌为部份抗酸性染色阳性,棒状杆菌为异染颗粒染色阳性,其余两种菌均为阴性。

2. 扫描电镜观察: 三种细菌均未找到菌毛。腋毛杆菌的表面较粗糙,有的部位凹凸不平或粗细不均,偶见附着胶状物,大小较一致。诺卡氏菌的表面较光滑,粗细和长短并不一致,有的呈丝状,偶见偏端有附着物。棒状杆菌的大小与形态并不完全一致,表面较光滑,多见偏极膨大,偶见呈典型的棒状结构。

3. 透射式电镜观察: 三种细菌都具有一般革兰氏阳性杆菌的超微结构特点,均未找到芽孢、荚膜、鞭毛、菌毛、线粒体和内质网等结构(图 1、2、3),但它们之间的部份微细结构并不



图 1 腋毛杆菌超微结构相 (×20000)



图2 微小棒状杆菌超微结构相 (×20000)



图3 微小奴卡氏菌超微结构相 (×20000)

完全一致(见表1)。

## (二) 生长条件与分离培养基选择

从487例中分离出腋毛杆菌189株,检出率为38.8%,未查出微小棒状杆菌和微小诺卡氏菌。在50例对照中均未分离出三种细菌。

1. 三种细菌适宜生长温度为37℃,在室温下也可生长,但较缓慢,培养基pH 7.2—7.6,对培养基营养成分要求不同。腋毛杆菌原代培养必须在含有新鲜兔脑浸液营养培养基中方能生长;经反复转种约2—3代后方可在血琼脂平板、普通琼脂平板等培养基上生长;在硝盐培养基上不生长。诺卡氏菌在马铃薯培养基上生长良好;沙氏琼脂培养基或普通琼脂培养基上也可生长;但较缓慢;在硝盐培养基上不生长。棒状杆菌在羊血琼脂培养基及玉米琼脂培养基上生长良好;在含硝盐培养基上可生长。

从上述可以看出,三种细菌均为需氧菌,对培养基的要求不同。

### 2. 在培养基上生长特点的比较

(1) 在新鲜兔脑浸液羊血琼脂培养基上: 三种细菌的菌落形态、大小及颜色和菌落的形

表1 三种细菌超微结构比较

	胞壁	胞膜	核质区	横隔	胞质电子染色	附着物
腋毛杆菌	清楚较宽而疏松	清楚	较宽而不清楚	未见到	深致密	可见在菌体外
诺卡氏菌	清楚较窄、致密	清楚	清楚	多见	较淡染不均匀	可见在菌体外
棒状杆菌	不清楚、较窄致密	清楚	多见清楚	较多见清楚	较深染均匀	未见

表2 三种细菌在兔脑浸液羊血琼脂培养基上的菌落特点比较

	菌落形成时间(天)	颜色	形态大小	溶血	性状
腋毛杆菌	原代3—5 仿代1—2	黄色	圆形光滑中等大小	β溶血	易混悬于盐水中,挑取时不呈丝状
诺卡氏菌	5—7	浅黄	圆形较粗糙中等大小	不	不易混悬于盐水,挑取时可呈丝状
棒状杆菌	1—2	灰白	圆形粗糙较小	不	不易混悬于盐水中,质地硬挑取时可取下整个菌落

成时间等不同,对羊红细胞溶血也不一样(见表2)。

(2) 在新鲜兔脑、马铃薯浸液营养液体培养基上(见表3):

从表3可以看出:三种细菌在液体培养基中均可生长,但培养基的变化并不一致。

### 3. 生化反应结果比较:

表3 三种细菌在液体培养基上生长特点比较

	菌膜	沉淀(管底)	培养基混浊度	培养基中酚红指示剂颜色
腋毛杆菌	无	有(多)	较透明	不变
诺卡氏菌	有(少)	无	上部混浊下部澄清	不变
棒状杆菌	无	有(少)	稍混浊	黄色

将三种细菌分别接种在生化试验培养基

中, 于 37℃ 条件下, 孵育 1、3 和 7 天观察结果。结果表明, 除腋毛杆菌 7 天迟缓分解葡萄糖外, 其余生化反应三个不同时间观察结果一致(见表 4)。

糖外, 其余生化反应三个不同时间观察结果一致(见表 4)。

表 4 三种细菌生化反应结果比较

	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	果糖	木糖	半乳糖	卫矛醇	肌醇	山梨醇	侧金盞醇	阿拉伯糖	酒石酸	VIP	甲基红	吲哚	尿素酶	丙二酸盐	七叶树苷	硝酸盐还原	菊糖
腋毛杆菌	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
诺卡氏菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
棒状杆菌	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

从 22 项生化反应结果看出, 三种细菌不同, 其中只有腋毛杆菌硝酸盐还原为阳性。在糖发酵试验中, 棒状杆菌对葡萄糖、麦芽糖、果糖和半乳糖为阳性, 腋毛杆菌葡萄糖迟缓发酵, 其余均为阴性。

### (三) 免疫试验结果

1. 血清凝集试验: 取经注射腋毛杆菌 4 周的 5 只家兔血清与其菌悬液作凝集反应, 与注射前相比, 凝集效价均有不同程度升高, 注射前均 <1:10, 注射后有 3 只升高为 1:160, 另 2 只均为 1:320。将此血清分别与棒状杆菌和诺卡氏菌反应, 效价均 <1:10, 说明注射腋毛杆菌与这二种细菌无关。

2. 免疫吸收试验: 将三种细菌分别加入上述 5 只家兔的混合血清中进行免疫吸收试验。结果表明, 腋毛杆菌可使混合血清效价下降至 1:20; 棒状杆菌和诺卡氏菌对血清效价无变化。

以上二项试验说明, 三种细菌之间无交叉凝集反应或无共同抗原现象。

### (四) 三种细菌 DNA 中 G + C Mol% 的比较

由于不同菌属之间 DNA 中 G+C Mol% 有差别且较固定, 是目前比较公认的鉴别或鉴定细菌属别的重要手段之一。三种细菌测定结果(每种菌的 3 株数值一致)是:

腋毛杆菌:  $T_m = 84.2^\circ\text{C}$ ,  $G + C \text{ mol}\% = 73.9$

诺卡氏菌:  $T_m = 81.5^\circ\text{C}$ ,  $G + C \text{ mol}\% = 67.3$

棒状杆菌:  $T_m = 78.5^\circ\text{C}$ ,  $G + C \text{ mol}\% = 60$

三种细菌的结果不同, 说明腋毛杆菌与诺卡氏菌和棒状杆菌无属关系。

### (五) 腋毛杆菌细胞成份分析

用气相色谱分析法, 分别对三种细菌的细胞成分(主要是脂肪酸和醣)进行分析, 结果是:

1. 脂肪酸: 三种细菌脂肪酸的含量有明显差别。

腋毛杆菌: 主要含 18—24 碳酸

诺卡氏菌: 主要含 15—18 碳酸

棒状杆菌: 主要含 15—16 碳酸

2. 细胞醣类: 通过气相色谱对菌体醣类分析, 三种细菌在记录纸上描绘出的图形不一样, 说明醣的含量有差别。

## 小 结

通过上述实验可以看出, 三种细菌的特殊染色、表面及超微结构、生长条件、菌落特点、生化反应、G + C 含量百分率及脂肪酸和醣等均有明显差别。腋毛杆菌的抗血清与棒状杆菌和诺卡氏菌无交叉凝集现象, 说明我们在南方分离出的腋毛杆菌既不属棒状杆菌又不是诺卡氏菌, 而是另一种细菌。暂命名为腋毛杆菌。

### 参 考 文 献

[1] 沈鼎鸿等编译: 临床真菌学, 上海科技出版社, p. 283, 1957。  
[2] N. F. Conant D. T. Smith et al.: Manual of Clinical Mycology, 1954.

[ 3 ] Crissey J. T. et al.: *J. Invest Dermatol* 19: 187—  
197, 1952.

[ 4 ] Montes L. F. et al.: *J. Invest Derm* 54. 338—345,

1970.

[ 5 ] Damonkos A et al.: *Andriwa Diseases of the skin*,  
p. 958, 1982.