

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.02.003

但蕊桐, 谢沐含, 邱羊羊, 等. 5 株牛源奇异变形杆菌致病性及药物敏感性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(2): 26-40.

5 株牛源奇异变形杆菌致病性及药物敏感性分析

但蕊桐, 谢沐含, 邱羊羊, 陈建宇, 李能章, 彭远义

西南大学 动物医学院, 重庆 400715

摘要: 为探究牛源奇异变形杆菌的致病性及药物敏感性差异, 对前期分离到的 5 株试验菌株(SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512)进行了进一步的常规细菌学鉴定及群集运动分析、16S rDNA 序列比对、动物致病性试验和毒力基因检测, 通过药物敏感性试验和耐药基因检测分析其耐药性。结果显示: 5 株试验菌株均为奇异变形杆菌, 均具有在 1.5% 琼脂平板上发生同心圆迁移的群集运动现象, 其中 SPL1511 和 SPL1512 迁移速度快于其他菌株, 群集运动能力更强。致病性试验表明: 只有 SPL1511 和 SPL1512 两株试验菌对小鼠致死。毒力基因检测发现: SPL1511 和 SPL1512 具有特殊的“雾蔓”迁徙能力调节因子(*rsbA*), 验证了该基因是拥有致病性的关键, 同时也验证了群集运动能力越强、其侵袭力也越强。药物敏感性试验结果表明: 5 株试验菌对临床常见的大部分抗生素基本耐药, 其中 SPL569、SPL1502、SPL1504 菌株只对头孢曲松敏感, SPL1511 只对头孢他定敏感, SPL1512 只对头孢哌酮敏感。耐药基因检测结果也与药物敏感性试验结果相符合。

关键词: 奇异变形杆菌; 群集运动; 致病性; 毒力基因; 耐药性; 耐药基因

中图分类号: S855

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2025)02-0026-15

Pathogenicity and Drug Sensitivity Analysis of *Proteus mirabilis* from Five Bovine *Proteus mirabilis* Strains

DAN Ruitong, XIE Muhan, QIU Yangyang,
CHEN Jianyu, LI Nengzhang, PENG Yuanyi

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to explore the differences in pathogenicity and drug resistance among five bovine *Proteus mirabilis* strains, In this study, the five strains (SPL569, SPL1502, SPL1504, SPL1511, SPL1512) isolated previously were further identified by routine bacteriological analysis, swarming motility analysis,

收稿日期: 2023-11-27

基金项目: 国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项(CARS-37)。

作者简介: 但蕊桐, 硕士研究生, 主要从事动物病原微生物与免疫研究。

16S rDNA sequence alignment, animal pathogenicity test and virulence factor detection. Drug resistance was analyzed by drug sensitivity test and drug resistance gene detection. The results showed that the 5 strains were all *Proteus mirabilis*, and all had concentric circle migration on a 1.5% agar plate. SPL1511 and 1512 migrated faster than other strains and had stronger swarming motility. The results of the pathogenicity test showed that only SPL1511 and SPL1512 were lethal to mice. Virulence gene detection showed that only SPL1511 and SPL1512 had unique *rsbA* gene. It not only confirmed that the migration ability regulatory factor (*rsbA*) gene is the key to the pathogenicity, but also verified that the stronger the swarming motility ability, the stronger the invasiveness. The results of the drug sensitivity test showed that the 5 strains were basically resistant to most common antibiotics in clinical practice, among which SPL569, SPL1502, and SPL1504 strains were only sensitive to ceftriaxone, SPL1511 was only sensitive to ceftazidim, and SPL1512 was only sensitive to cefoperazone. The results of drug resistance gene detection were also consistent with the results of drug sensitivity test in this study.

Key words: *Proteus mirabilis*; swarm motility; pathogenicity; virulence genes; drug resistance; drug resistance genes

奇异变形杆菌是一种广泛存在于自然界的食源性条件致病菌,属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)变形杆菌属(*Proteus*),无荚膜,无芽孢,革兰氏染色阴性且具有周期性群集运动现象^[1]。该菌是一种人畜共患病原菌,具有广泛的宿主嗜性,主要导致人和动物腹泻、食物中毒、胸膜炎、脑膜炎、尿道炎、脊髓炎等病症,其中奇异变形杆菌可导致牛出现以腹泻为主症的临床症状,并引起死亡^[2]。近年来,奇异变形杆菌感染动物的相关报道逐年递增,给我国畜牧养殖业带来了不可估量的损失。抗生素类药物滥用及基因组的多样性导致耐药基因和毒力基因频繁转移,为该病的防治带来了巨大挑战^[3]。

本研究对前期分离到的 5 株奇异变形杆菌进行了生物学鉴定、PCR 验证、遗传进化同源分析、药敏试验和动物试验,旨在为该菌的病原学研究及引起疾病的免疫防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本课题组前期分离出的 5 株奇异变形杆菌(SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512),其中 SPL569 分离自重庆忠县采集的牛鼻拭子, SPL1502 与 SPL1504 分离自四川泸州的牛肺脏组织, SPL1511 和 SPL1512 分离自重庆垫江的牛肛门拭子。

1.1.2 主要试剂及试验动物

细菌 DNA 提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司;普通琼脂培养基、马丁肉汤琼脂培养基,海博生物(青岛)公司;肠杆菌生化鉴定管、药物敏感纸片,杭州微生物公司;琼脂凝胶电泳仪, Bio-rad 公司;蛋白成像系统, Tanon 公司;智城 ZWY-2102C 恒温摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;隔水式恒温培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司;雌性 18~22 g 昆明小鼠(4~6 周龄),恩斯维尔公司。本研究涉及的引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成,所有试验操作均在 P2 实验室进行,动物试验加伦理审核编号为 IACUC-20221114-08。

1.2 方法

1.2.1 菌株复苏

从-80℃超低温冰箱中取出冻存菌株,划线于马丁固体培养基上,37℃恒温培养箱培养 18~20 h。待单菌落长出后,挑取单菌落于 5 mL 马丁液体培养基中,37℃恒温摇床 220 r/min 培养 8 h,置于-4℃

冰箱中备用。

1.2.2 生化试验

取马丁固体培养基上的纯培养物分别接种于肠杆菌科细菌微量生化鉴定管中, 37 °C 恒温培养箱培养 24~28 h, 观察并记录试验结果。

1.2.3 PCR 特异性引物扩增

取培养好的菌液 2 mL, 使用细菌 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。查阅 GenBank 中 *ureR* (AM942759) 基因序号, 应用 BioXM 2.6 软件设计奇异变形杆菌特异性引物并对其进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。

表 1 奇异变形杆菌特异性引物

引物编号	引物序列(5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C
<i>ureR</i> -F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	220	60
<i>ureR</i> -R	GGTTACCTTGTTACGACTT		

1.2.4 16S rDNA 的 PCR 扩增与测序

用细菌 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 引物序列见表 2。反应总体系(50 μL): 2×TaqMix 24 μL, 上、下游引物各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 20 μL。反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收产物送生工生物工程(上海)有限公司测序。

表 2 16S rDNA 的通用引物

引物编号	引物序列(5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C
16S-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 450	60
16S-R	GGTTACCTTGTTACGACTT		

1.2.5 16S rDNA 序列同源性分析

将所测试验菌株的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中收录的序列进行比对和同源性分析, 并运用 DNASTar 和 MegaX 软件构建系统发育树。

1.2.6 周期性群集运动的检测

群集运动距离和速度参照 Liaw 等^[4]介绍的方法进行, 比较试验菌株和奇异变形杆菌属性的相符性。为了更好地观察群集运动的轨迹及细胞呼吸状态, 本研究往不同浓度的琼脂培养基中添加了终浓度为 0.005% 的 TTC(2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑); 同时挑取显色区和未显色区的菌苔进行革兰氏染色, 观察二者菌体间的差别。

1.2.7 小鼠致病性试验

取 30 只昆明小鼠, 随机分为 6 组, 设试验组(5 只)和对照组(5 只), 试验组将试验菌 SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512 菌液培养物按 0.1 mL/只(细菌浓度分别为 1.67×10^9 CFU、 1.48×10^9 CFU、 2.36×10^9 CFU、 1.54×10^9 CFU、 1.34×10^9 CFU)剂量腹腔注射小鼠, 对照组腹腔注射无菌液体培养基。各组接种后隔离饲养, 自由饮水进食, 每隔 6 h 观察 1 次小鼠的临床表现, 连续观察 1 周。对各组出现症状及死亡的小鼠进行剖检观察, 分离鉴定病变脏器内的细菌。

1.2.8 菌株毒力基因检测

基于 5 株奇异变形杆菌的致病性存在差异, 为探究致病性与毒力基因间的关系, 通过查阅文献设计了 PM 编码尿素酶(*ureC*)、MRP 菌毛(*mrpA*)、金属蛋白酶(*zapA*)、适温菌毛合成分子(*atfC*)、适温菌毛(*atfA*)、Pmf 菌毛(*pmfA*)、尿道上皮粘附素(*ucaA*)、“雾蔓”迁徙能力调节因子(*rsbA*)等 8 种奇异变形杆菌潜在的毒力基因特异性引物(表 3), 以 5 株试验菌的 DNA 为模板, 对其毒力基因进行 PCR 扩增。

扩增总体系 (20 μL): $2 \times \text{TaqMix}$ 10 μL , 上、下游引物各 1 μL , DNA 模板 1 μL , ddH_2O 7 μL , 反应参数见表 4。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并观察结果。

表 3 奇异变形杆菌毒力基因 PCR 扩增引物序列

毒力基因编号	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C
<i>ureC</i> -F	GTTATTCGTGATGGGATGGG	375	53.1
<i>ureC</i> -R	ATAAAGGTGGTTACGCCAG		51.9
<i>mrpA</i> -F	ATTTTCAGGAAACAAAAGATG	400	44.7
<i>mrpA</i> -R	TTCTTACTGATAAGACATTG		42.8
<i>zapA</i> -F	ACCGCAGGAAAACATATAGCCC	490	57.5
<i>zapA</i> -R	GCGACTATCTTCCGCATAATCA		54.5
<i>atfC</i> -F	AGAAAGGGATCCTACAAATTTAA	470	47.6
<i>atfC</i> -R	TATAGCATGCATTTAAATTGCC		48.3
<i>atfA</i> -F	CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA	365	56.0
<i>atfA</i> -R	CTGCTTGGATCCGTAATTTTAAACG		54.2
<i>pmfA</i> -F	GGATCATCTATAATGAAACTG	535	44.5
<i>pmfA</i> -R	CTGATAATCAACTTGGAAGTT		46.7
<i>ucaA</i> -F	GTAAAGTTGTTGCGCAAAC	585	50.0
<i>ucaA</i> -R	GTAAAGTTGTTGCGCAAAC		53.1
<i>rsbA</i> -F	TCGATTTTCAGTGTGTTGGCCAT	1 647	54.5
<i>rsbA</i> -R	CCGAGCTTCATCATGGCTG		56.7

表 4 奇异变形杆菌毒力基因 PCR 反应参数

目的基因	PCR 运行参数						
	预变性	变性	退火	延伸	循环	再延伸	保存
<i>ureC</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	53 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C
<i>mrpA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	45 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C
<i>zapA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	57 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C
<i>atfC</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	50 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C
<i>atfA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	56 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C
<i>pmfA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	47 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C
<i>ucaA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	54 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C
<i>rsbA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	37 °C 30 s	72 °C 90 s	35	72 °C 10 min	4 °C

1.2.9 药敏试验

采用纸片扩散法 (K-B 法) 在马丁琼脂 (含 10% 马血清) 培养基上测定分离病原菌对药物的敏感性。参照杭州微生物试剂公司《药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准》, 根据抑菌圈的大小将细菌分为敏感 (S)、中介 (I) 和耐药 (R)^[5]。

1.2.10 菌株耐药基因检测

鉴于 SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512 菌株对临床常用抗生素均产生耐药, 为了研究细菌耐药表型与耐药基因之间的关系, 本研究设计了相关耐药基因的特异性引物 (表 5), 以 5 株试验菌的

DNA 为模板, 对其耐药基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系同毒力基因检测, 反应参数见表 6。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并观察结果。

表 5 奇异变形杆菌耐药基因 PCR 扩增引物序列

耐药基因编号	引物序列(5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C
<i>CTX-M-F</i>	CGCTTTGCGATGTGCAG	550	54.0
<i>CTX-M-R</i>	ACCGCGATATCGTTGGT		54.0
<i>TEM-F</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	643	46.7
<i>TEM-R</i>	GACAGTTACCAATGCTTAATC		49.3
<i>SHV-F</i>	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	860	59.5
<i>SHV-R</i>	GATTTGCTGATTTTCGCTCGG		55.5
<i>cmv-F</i>	TGGCCGTTGCCGTTATCTAC	792	57.9
<i>cmv-R</i>	CCCGTTTTATGCACCCATGA		55.6
<i>bla-PSE-F</i>	TAGGTGTTTTCCGTTCTTG	150	48.6
<i>bla-PSE-R</i>	TCATTTGCTCTTCCATT		47.7
<i>bla-OXA-F</i>	TCAACTTTCAAGATCGCA	591	47.9
<i>bla-OXA-R</i>	GTGTGTTTAGAATGGTGA		45.7
<i>sul1-F</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGG	238	60.0
<i>sul1-R</i>	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC		58.4
<i>sul2-F</i>	CGGCATCGTCAACATAACC	722	57.6
<i>sul2-R</i>	GTGTGCGGATGAAGTCAG		56.2
<i>Aac(6')-Ib-cr-F</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	58.1
<i>Aac(6')-Ib-cr-R</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		58.9
<i>aadA-F</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	752	53.6
<i>aadA-R</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		55.2
<i>qnrA-F</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	519	58.4
<i>qnrA-R</i>	GATCGGCAAAGGTCAGGTCA		57.3
<i>qnrB-F</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	513	57.8
<i>qnrB-R</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		59.4
<i>qnrS-F</i>	ACGACATTGTCAACTGCAA	417	56.7
<i>qnrS-R</i>	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		60.0
<i>vanA-F</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC	231	53.9
<i>vanA-R</i>	CGATTCAATTGCGTAGTCCAA		52.8
<i>vanB-F</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC	430	53.9
<i>vanB-R</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC		53.9
<i>vanC-F</i>	TGGTATTGGTATCAAGGAAACC	447	51.8
<i>vanC-R</i>	AGATTGGAGCGCTGTTTTGTCT		55.9
<i>ermB-F</i>	GAAAAGGATCTCAACCAAATA	639	46.7
<i>ermB-R</i>	AGTAACGGTACTTAAATTGTTT		46.1
<i>mefA-F</i>	AGTATCATTAATCACTAGTGC	348	45.8
<i>mefA-R</i>	TTCTTCTGGTACTAAAAGT		43.5
<i>mrsD-F</i>	GCCTCCGGAGCTCCTACTT	500	59.7
<i>mrsD-R</i>	GCGTCCAATGTATCTCTAT		58.1
<i>tetA-F</i>	GTAATTCTGAGCACTGTCTGC	956	53.7

续表 5

耐药基因编号	引物序列(5'→3')	产物大小/bp	退火温度/℃
<i>tetA</i> -R	CTGCCTGGACAACATTGCTT		56.0
<i>tetM</i> -F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406	54.7
<i>tetM</i> -R	CGGTAAAGTTTCGTCACACAC		55.8
<i>cmlA</i> -F	TGTCATTTACGGCATACTCG	900	52.0
<i>cmlA</i> -R	ATCAGGCATCCCATTCCCAT		56.4
<i>stcM</i> -F	CACGTTGAGCCTCTATATGG	890	52.6
<i>stcM</i> -R	ATGCAGAAGTAGAACGCGAC		53.7
<i>floR</i> -F	TCCTGAACACGACGCCCGCTAT	960	63.8
<i>floR</i> -R	TCACCGCCAATGTCCCGACGAT		53.7

表 6 奇异变形杆菌耐药基因 PCR 反应参数

目的基因	PCR 运行参数						
	预变性	变性	退火	延伸	循环	再延伸	保存
<i>CTX-M</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	54 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>TEM</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	50 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>SHV</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	57 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>cmv</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	58 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>bla-PSE</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	50 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>bla-OXA</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	48 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>sul1</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	58 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>sul2</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	58 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>Aac(6')-Ib-cr</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	58 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>aadA</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	55 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>qnrA</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	58 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>qnrB</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	58 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>qnrS</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	58 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>vanA</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	55 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>vanB</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	55 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>vanC</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	55 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>ermB</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	48 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>mefA</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	48 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>mrsD</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	55 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>tetA</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	56 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>tetM</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	56 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>cmlA</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	56 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>stcM</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	55 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃
<i>floR</i>	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s	60 ℃ 30 s	72 ℃ 90 s	35	72 ℃ 10 min	4 ℃

2 结果与分析

2.1 生化鉴定结果

菌株生化试验结果见表 7。参考《伯杰氏系统细菌学手册》，初步判定 5 株试验菌均属于奇异变形杆菌科^[6]。

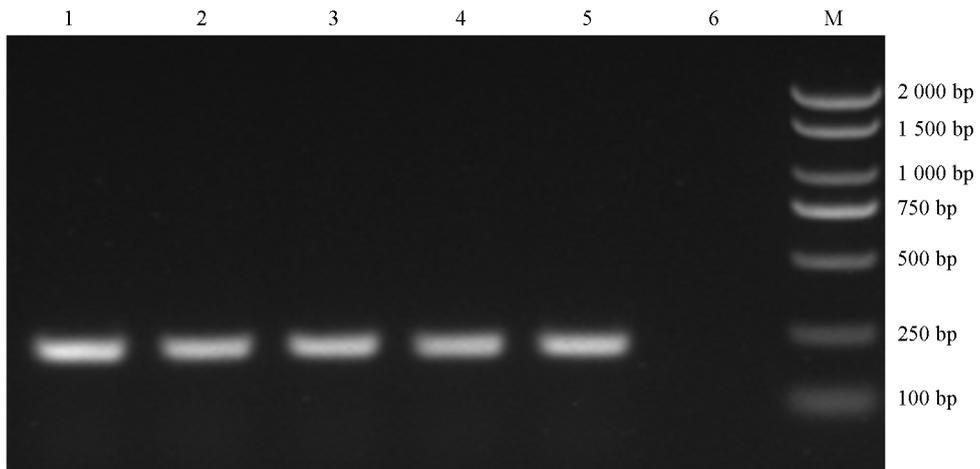
表 7 试验菌株的生化特性

项目	SPL569	SPL1502	SPL1504	SPL1511	SPL1512
硫化氢	+	+	+	+	+
苯丙氨酸	+	-	+	-	+
葡萄糖酸盐	+	+	+	+	+
蛋白胨水	+	+	+	+	+
甲基红	+	+	+	+	+
枸橼酸盐	-	-	-	+	-
尿素	+	+	+	+	+
半固体琼脂	+	+	+	+	+
葡萄糖(产气)	-	-	+	+	+
赖氨酸	+	+	+	+	+
鸟氨酸	+	+	+	+	+
棉子糖	-	-	-	-	-
山梨醇	-	-	-	-	-
侧金盏花醇	-	-	-	-	-
木糖	+	+	+	+	+
接触酶	-	-	-	-	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

2.2 奇异变形杆菌特异性引物 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 1% 凝胶电泳后结果见图 1，条带大小与预期结果相符，结合生化试验结果可以判定 5 株试验菌均为奇异变形杆菌。

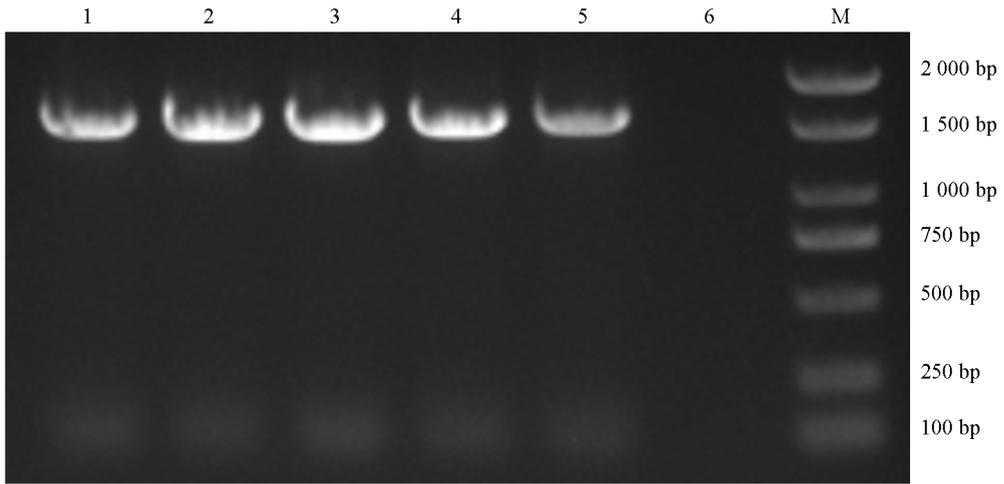


M 为 DNA 分子量标准(DL2000)，1~5 为试验菌株 SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512，6 为阴性对照。

图 1 特异性引物扩增结果

2.3 16S rDNA PCR 扩增结果及测序分析

分别以试验菌株 SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512 的总 DNA 为模板, 利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 得到大小为 1 450 bp 的扩增片段, 结果符合预期大小(图 2)。



M 为 DNA 分子量标准(DL2000), 1~5 为试验菌株 SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512, 6 为阴性对照。

图 2 16S rDNA PCR 扩增结果

将扩增产物测序所得的序列在 NCBI 上进行 Blast 比对, 下载同源性较高的序列通过 Clustral W 比对后, 使用 MegaX 进行进化树的构建, 建树方法为 NJ, 选择变形杆菌科 5 个已经命名的种属与试验菌株进行同源分析。从进化树结果(图 3)可以看出, 5 株试验菌均与奇异变形杆菌的亲缘关系最近。

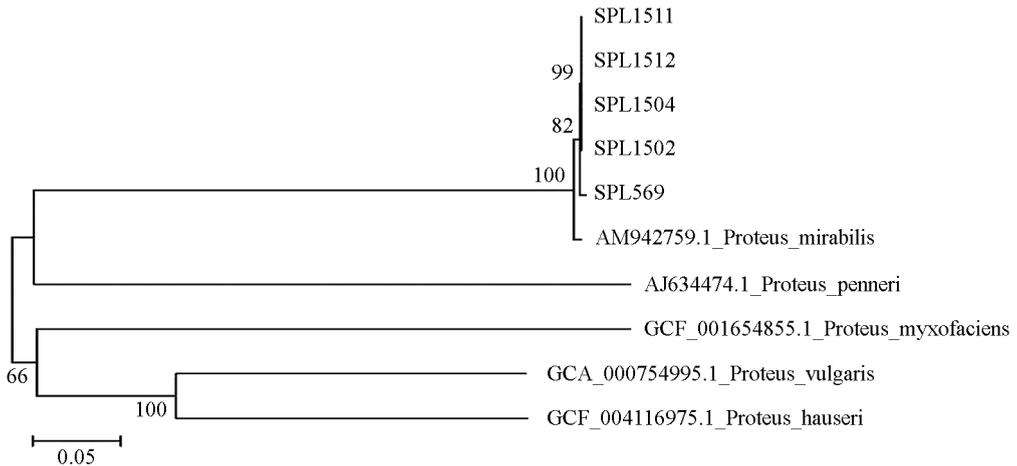
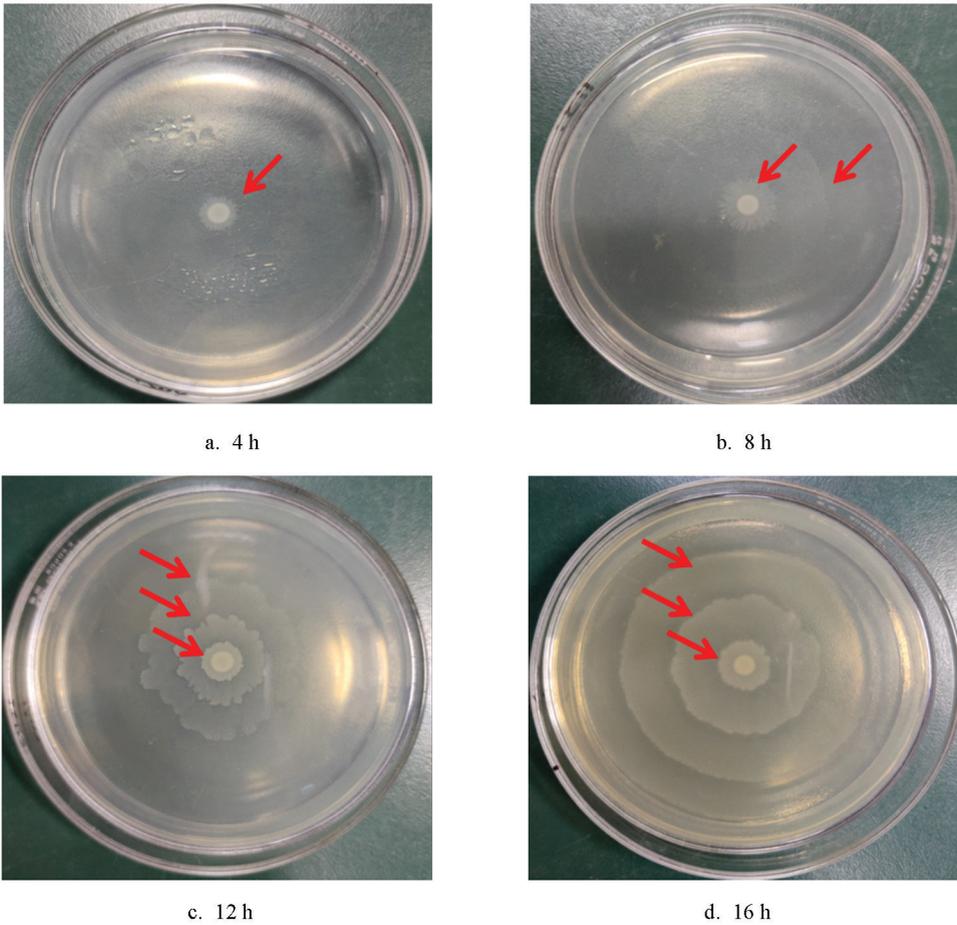


图 3 试验菌株 16S rDNA 系统进化树

2.4 群集运动分析

将试验菌株接种于 1.5% 琼脂 LB 固体培养基中心, 4 h 后菌斑由透明变成乳白色并向四周迁移扩散, 16 h 后在培养基表面形成多圈状扩散同心圆菌苔(图 4)。分离株培养至 4 h 左右开始发生群集迁移运动, 迁移距离随着时间的延长而增大, 在 14 h 时基本达到生长停滞期(图 5)。迁移速度呈锯齿样波动, 在 8~12 h 迁移加快, 随后开始下降, 最终在 15 h 后达到最小值 0, 其中 SPL1511 和 SPL1512 迁移速度相对较快, 推测可能跟后面检测到的“雾蔓”迁移基因 *rsbA* 有关(图 6)。将试验菌株分别接种于含 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 琼脂的 LB 固体培养基上 37 °C 培养 8 h, 在 0.5% 琼脂培养基上迁移距离最远, 呈现出琼脂浓度越高, 迁移距离越短的现象(图 7)。选取迁移现象明显的 SPL1511 和 SPL1512 接种

于含 TCC 指示剂的 1.5%琼脂 LB 固体培养基上, 试验菌株形成了红色同心圆扩散现象, 清晰地展示了在群集运动过程中呼吸酶活性的周期性变化, 红环代表的是呼吸酶活性正常将 TCC 还原成红色不溶物的现象, 不显色区域是呼吸酶被抑制的结果(图 8)。革兰氏染色可以看到, 在不显色区域的菌体呈长杆状, 显色区域的菌体呈短杆状, 与预期相符。



红色箭头为群集运动扩散圈。

图 4 试验菌株在 1.5%琼脂 LB 固体培养基上的生长情况

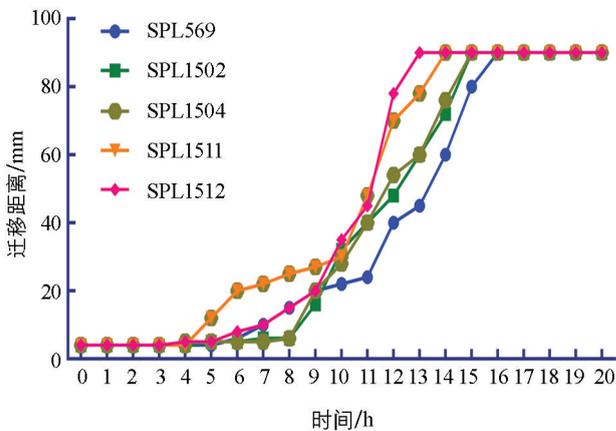


图 5 试验菌株在 1.5%琼脂 LB 固体培养基上的迁移距离与时间的关系

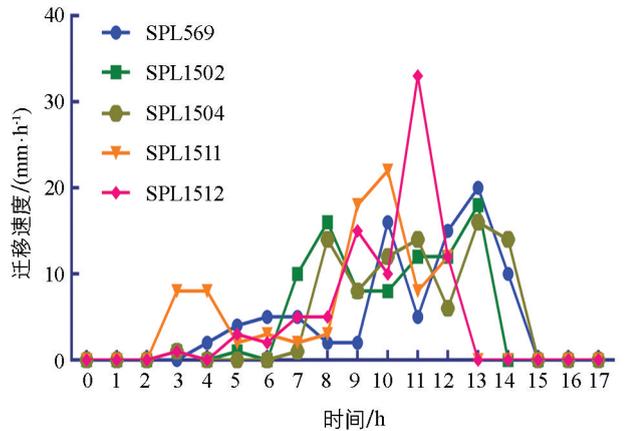


图 6 试验菌株在 1.5%琼脂 LB 固体培养基上的迁移速度与时间的关系

2.5 小鼠致病性试验结果

试验菌人工腹腔感染试验鼠, 每 2 h 观察 1 次, 记录其临床表现。2 h 后试验组 SPL1511、SPL1512 出现了精神沉郁、毛发杂乱、蜷缩抱团、眼角出现分泌物等临床表现, 其他组未见明显症状。菌株 SPL1511 组最早 6 h 出现死亡现象, 48 h 内全部死亡; 菌株 SPL1512 组最早 4 h 出现死亡现象, 24 h 后全部死亡; 对照组无明显临床症状, 全部存活(表 8)。对试验组死亡的小鼠进行无菌病理剖检采集病料, 从小鼠的心血、肝脏、肾脏、肺脏中均分离到一致的菌株, 且菌落形态、菌体形状、16S r DNA PCR 结果以及基础的理化特征与感染的试验菌株一致(图 9); 对照组小鼠对应的脏器中未分离到细菌。

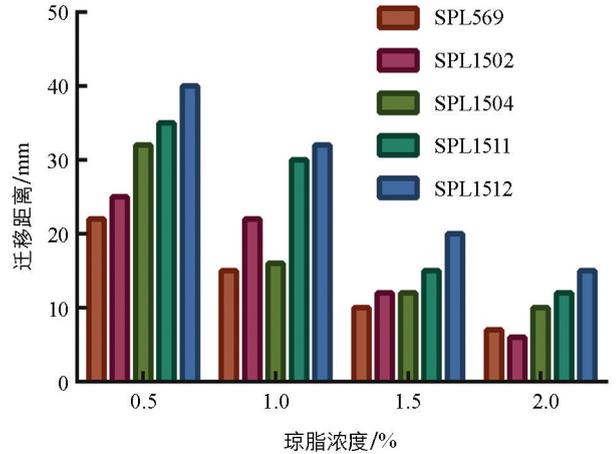
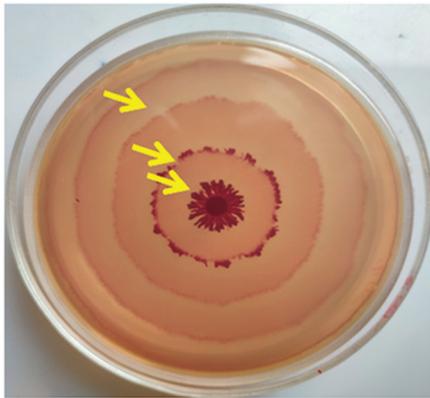
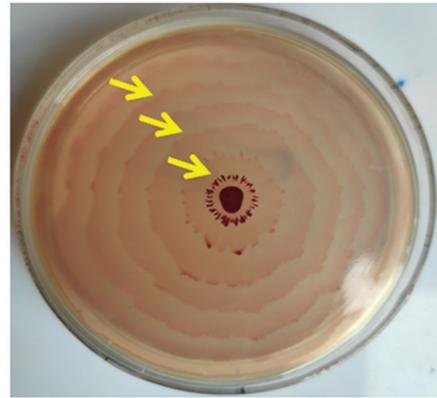


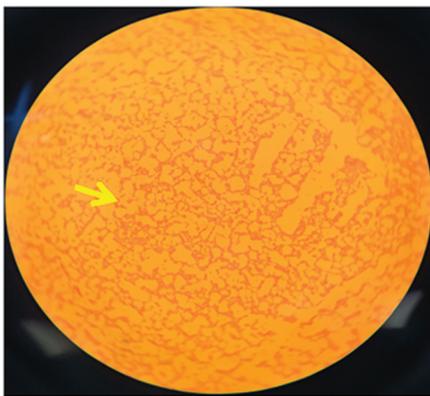
图 7 试验菌株迁移距离与琼脂浓度的关系



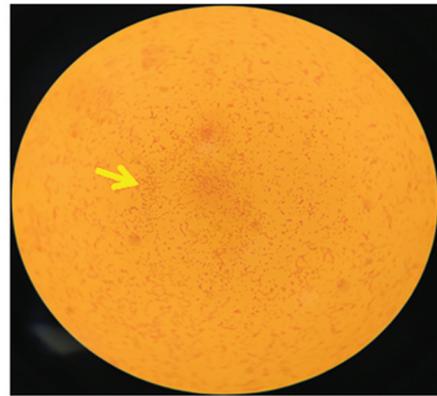
a. SPL1511在LB培养基上细胞的生长情况



b. SPL1512在LB培养基上细胞的生长情况



c. 不显色区域菌苔的革兰氏染色结果



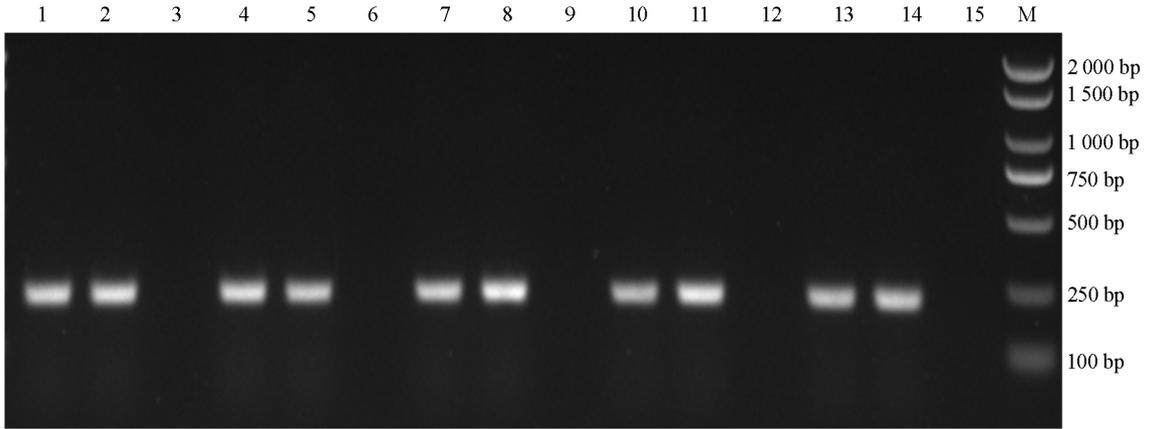
d. 显色区域菌苔的革兰氏染色结果

黄色箭头为部分显色区域。

图 8 试验菌株细胞呼吸状态观察

表 8 试验菌株对小鼠致病性试验

菌株	试验组(死亡数/试验数)	死亡率/%	死亡时间/h	对照组(死亡数/试验数)
SPL569	0/10	0	无	0/10
SPL1502	0/10	0	无	0/10
SPL1504	0/10	0	无	0/10
SPL1511	10/10	100	48	0/10
SPL1512	10/10	100	24	0/10

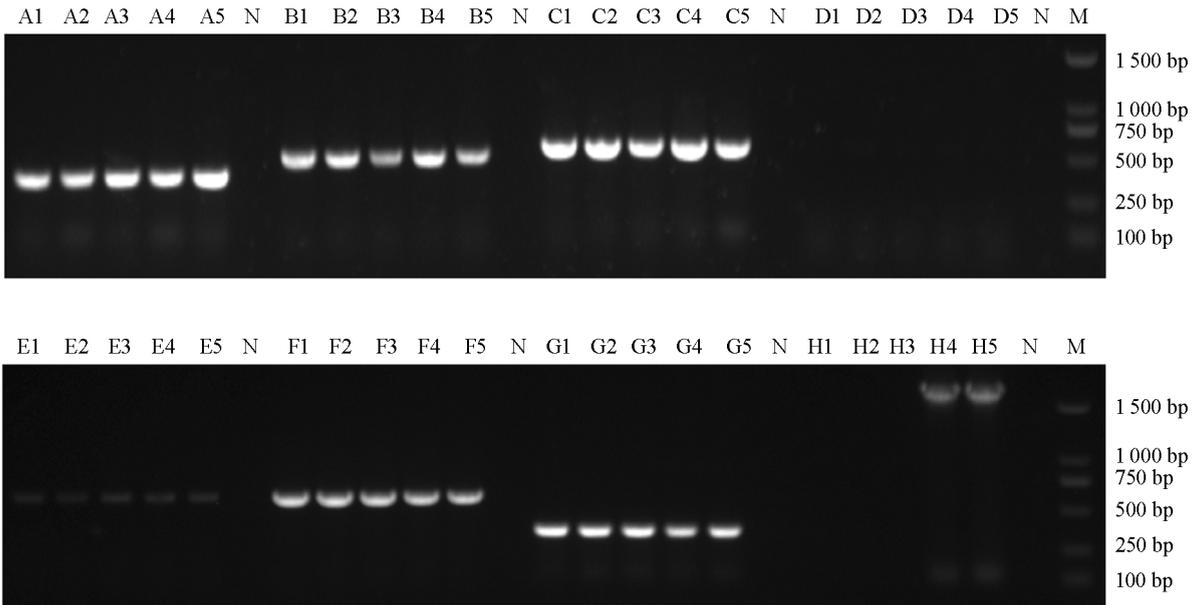


M 为 DNA 分子量标准(DL2000); 3、6、9、12、15 为阴性对照; 1、4、7、10、13 为分离菌株 SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512; 2、5、8、11、14 为致病性试验小鼠体内分离出的 SPL569、SPL1502、SPL1504、SPL1511、SPL1512 菌株。

图 9 特异性引物扩增结果

2.6 试验菌株毒力基因检测结果

5 株试验菌毒力基因的检测结果(图 10)显示, 毒力基因 *atfA*、*atfC*、*zapA*、*pmfA*、*ureC*、*ucaA* 的携带率为 100%, 未携带毒力基因 *mrpA*, 而毒力基因 *rsbA* 的阳性携带率为 40%, 仅 LPS1511、LPS1512 携带。



M 为 DNA 分子量标准(DL2000); N 为阴性对照; A 为 *atfA*、B 为 *atfC*、C 为 *zapA*、D 为 *mrpA*、E 为 *ureC*、F 为 *pmfA*、G 为 *ucaA*、H 为 *rsbA*。

图 10 试验菌株毒力基因 PCR 扩增结果

2.7 药物敏感性试验结果

临床常用的 20 余种抗菌药物的敏感性试验结果(表 9)显示: 5 株试验菌对临床常用的大部分抗菌药物均有一定的耐药性, 其中 SPL569、SPL1502、SPL1504 菌株只对头孢曲松敏感, SPL1511 只对头孢他定敏感, SPL1512 只对头孢哌酮敏感。

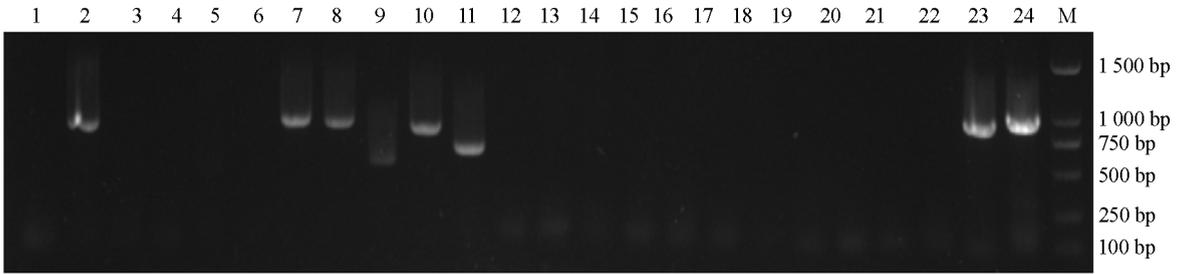
表 9 试验菌株的药物敏感性

药物名称	剂量/ μg	SPL569	SPL1502	SPL1504	SPL1511	SPL1512
青霉素	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
苯唑西林	1	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
氨苄西林	10	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
羧苄西林	100	R(1.5)	R(1.6)	R(1.6)	R(1.0)	R(1.5)
哌拉西林	100	R(1.1)	R(1.2)	R(1.6)	R(1.5)	R(1.6)
头孢氨苄	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
头孢唑林	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
头孢拉定	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
头孢呋辛	30	I(1.6)	I(1.5)	R(1.2)	R(0.0)	I(1.6)
头孢他定	30	R(0.8)	R(0.8)	R(1.3)	S(1.8)	R(1.4)
头孢曲松	30	S(1.8)	S(2.0)	S(2.1)	R(0.0)	R(1.1)
头孢哌酮	75	I(1.7)	I(1.5)	I(1.5)	R(1.1)	S(2.2)
丁胺卡那	30	R(1.2)	R(1.3)	R(1.0)	R(1.3)	R(1.2)
卡那霉素	30	R(1.0)	R(1.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(1.0)
新霉素	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
四环素	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
多西环素	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
米诺环素	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
红霉素	15	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
麦迪霉素	30	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
环丙沙星	5	R(1.1)	R(1.2)	R(0.0)	R(1.0)	R(0.0)
多粘菌素 B	300 IU	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
复方新诺明	3.75/1.25	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)
克林霉素	2	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)	R(0.0)

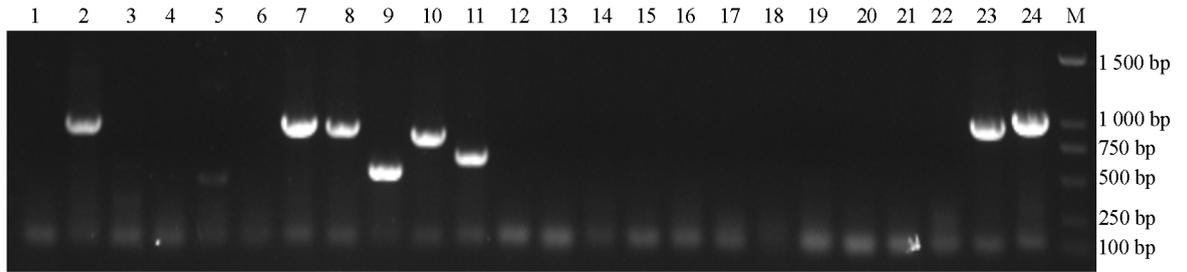
注: S 为敏感, I 为中介, R 为耐药; 括号内数值为抑菌圈直径(cm)。

2.8 5 株试验菌的耐药基因检测结果

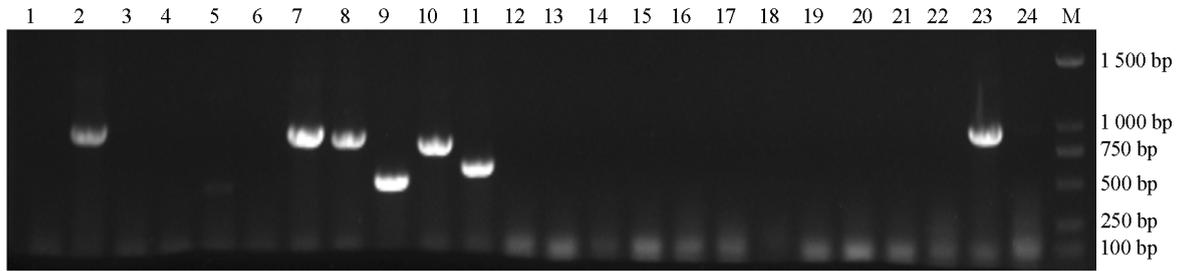
为探究 5 株试验菌耐药表型与耐药基因之间的关系, 本研究对奇异变形杆菌的 8 大类 24 种耐药基因进行验证, 分别为 β -内酰胺类(*CTX-M*、*TEM*、*SHV*、*cmv*、*bla PSE*、*bla OXA*), 磺胺类(*sul1*、*sul2*), 氨基糖苷类(*Aac(6')-Ib-cr*、*aadA*), 喹诺酮类(*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*), 多粘菌素类(*vanA*、*vanB*、*vanC*), 大环内酯类(*ermB*、*mefA*、*mrsD*), 四环素类(*tetA*、*tetM*), 氯霉素类(*cmlA*、*stcM*、*floR*)^[7]。分别以 5 株试验菌的基因组 DNA 为模板对耐药基因进行扩增(图 11), 其中 β -内酰胺类 *TEM*、*bla PSE*、*bla OXA* 基因, 磺胺类 *sul1*、*sul2* 基因, 氨基糖苷类 *Aac(6')-Ib-cr*、*aadA* 基因, 喹诺酮类 *qnrA* 基因, 氯霉素类 *cmlA*、*stcM*、*floR* 基因均被检测到, 且 *TEM*、*sul1*、*sul2*、*Aac(6')-Ib-cr*、*aadA*、*stcM* 等耐药基因的携带率为 100%, 耐药基因和耐药表型相符。



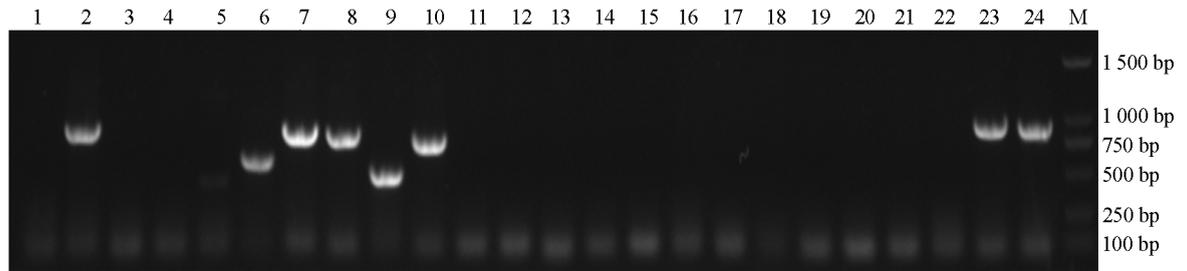
a. SPL569



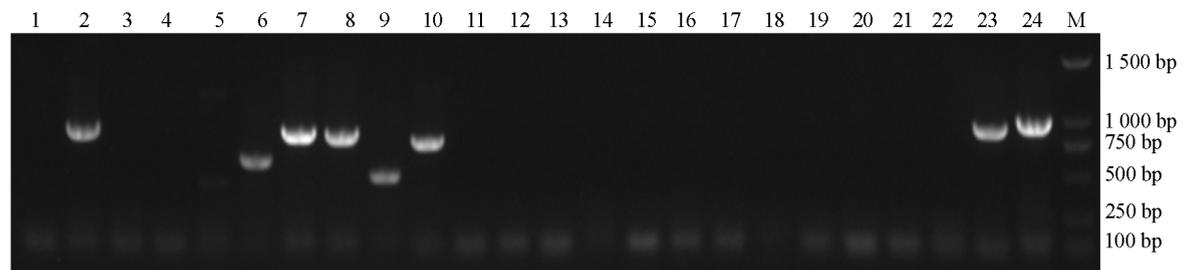
b. SPL1502



c. SPL1504



d. SPL1511



e. SPL1512

M 为 DNA 分子量标准(DL2000), 1 为 CTX-M, 2 为 TEM, 3 为 SHV, 4 为 *cmv*, 5 为 *bla* PSE, 6 为 *bla* OXA, 7 为 *sul1*, 8 为 *sul2*, 9 为 *Aac*(6')-Ib-cr, 10 为 *aadA*, 11 为 *qnrA*, 12 为 *qnrB*, 13 为 *qnrS*, 14 为 *vanA*, 15 为 *vanB*, 16 为 *vanC*, 17 为 *ermB*, 18 为 *mefA*, 19 为 *mrsD*, 20 为 *tetA*, 21 为 *tetM*, 22 为 *cmlA*, 23 为 *stcM*, 24 为 *floR*。

图 11 试验菌株耐药基因 PCR 扩增结果

3 讨论与结论

变形杆菌属归于肠杆菌科^[8], 已命名的有 5 个种, 分别为奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、潘氏变形杆菌(*Proteus penneri*)、粘化变形杆菌(*Proteus myxofaciens*)和豪氏变形杆菌(*Proteus hauseri*), 其中又以奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)与临床关系尤为密切^[9]。该菌主要有内源性和外源性两种感染方式, 内源性感染主要是当机体因外界环境变化导致免疫力下降时, 体内的奇异变形杆菌大量繁殖而导致发病; 外源性感染主要是被污染的水源、食物或空气经消化道、呼吸道等方式进入感染宿主^[10]。猪、犬、羊等家畜都是易感动物, 关于牛感染奇异变形杆菌的报道也在逐年增加, 且多以继发感染为主, 给我国养殖业发展带来了阻碍。值得注意的是, 该菌同样可以感染人, 可导致腹泻、脊髓炎、尿道炎、败血症等疾病^[11]。本研究将分离出的 5 株奇异变形杆菌通过革兰氏染色、生化试验鉴定、特异性引物扩增和 16S 序列同源分析等方法进行了验证, 发现 5 株试验菌与奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)的同源性最高。

奇异变形杆菌的群集迁移运动(Swarming motility, SM)与其致病性及抵抗外界侵袭能力息息相关^[12]。当 SM 发生时, 奇异变形杆菌分化成潜生体(Cryptic growth cell, CGC)和繁殖体(Vegetative cell, VC)两种形态^[13]。当细胞感受到来自外界环境变化的信号后表面开始诱导分化, 此时 VC 生长活跃产生大量酸性代谢物, 环境不利于细菌生长, 因此转录活化因子 FlhD/FlhC 被激活, 抑制了细胞呼吸酶的活性, 细胞分裂受到抑制; 为适应环境变化, VC 开始分化成 CGC, 大量鞭毛蛋白由菌细胞合成并在鞭毛旋转运动信号的控制下向代谢废物浓度较低的外围扩散; 待其扩散至代谢物少、营养丰富区域时, FlhD/FlhC 由于半衰期短已被水解, 呼吸酶活性再次增强, CGC 向 VC 转化, 此过程的交替反复出现导致了同心圆菌苔的产生, 迁移速度也呈现锯齿样波动^[14]。奇异变形杆菌的迁移速度与培养基表面的水分及琼脂的浓度密切相关, 当琼脂浓度较低时(0.5%、1.0%), 培养基表面水分较多, 有利于代谢物扩散, 奇异变形杆菌在接种处生长成 VC 状态, 由于 CGC 亲水性较强, 并迅速向外扩散, 等 CGC 状态铺满整个板面时再转化成 VC 状态; 当琼脂浓度较高时(1.5%、2.0%), 代谢物不容易扩散, VC 和 CGC 状态交替出现, 形成了透明和乳白色同心圆现象。细菌在正常呼吸过程中脱氢酶会产生氢, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(简称四唑或 TTC)可以在细胞的还原过程中与氢结合发生氢化作用生成一种不溶于水、稳定的、不扩散的红色物质三苯基甲(TTCH)。脱氢酶活性与细胞的呼吸有关, 而 TTCH 的生成量与细菌代谢活力的强弱又呈正相关, 因此, 可根据红色深浅所反映的脱氢酶活性作为细菌代谢活力的指标^[15]。奇异变形杆菌的群集迁移能力减弱会导致侵袭能力减弱, 而没有群集迁移能力的菌群甚至会丧失侵袭能力。本试验 5 株试验菌中 SPL1511 和 SPL1512 群集迁移能力比其他 3 株强, 且只有 SPL1511 和 SPL1512 对小鼠致死, 进一步验证了群集运动能力是影响其侵袭力和致病性的关键。

细菌的毒力因子是宿主致病的重要因素。据报道奇异变形杆菌的毒力因子主要有: 菌毛、溶血素、脲酶、免疫逃避、金属摄取等^[16]。本研究选取相关的 8 个毒力基因 *ureC*、*zapA*、*ucaA*、*rsbA*、*mrpA*、*pmfA*、*atfA*、*atfC* 进行验证, 最终 *atfA*、*atfC*、*zapA*、*pmfA*、*ureC*、*ucaA* 均被检测到, MRP 菌毛主要结构亚单位 *mrpA* 基因未被检测到。有趣的是, 只在 SPL1511 和 SPL1512 菌株中检测到独特的“雾蔓”迁徙能力调节因子(*rsbA*)。“雾蔓”迁徙能力是奇异变形杆菌的一种非常重要的毒力特征, *rsbA* 与“雾蔓”迁徙能力密切相关, 群集运动试验结果也显示这 2 株菌的迁移能力强于其他菌株, 而群集迁移能力又与侵袭力正相关, 再结合致病性试验结果, 得出这 2 株菌具有强致病性, 推测 *rsbA* 基因与奇异变形杆菌的致病性有关, 具体作用机制还有待进一步研究。

群集运动有助于细菌逃避抗菌剂及免疫系统的杀伤作用, 使细菌产生耐药性。众所周知, 细菌在高细胞密度时可以耐受较高的抗菌剂浓度, 但是运动能力及速度赋予了其更大的生存优势^[17]。获得性耐药与运动速度存在直接关系, 细菌运动速度越快, 暴露在抗菌剂中的时间越短, 越不容易死亡, 耐药性就越强, 因

此具有群集运动的细菌表现出更高的耐药性。本研究结果表明, 5 株试验菌均具有群集运动现象, 对临床常见的大部分抗生素都表现出耐药性, 其中具有更强群集运动能力的 SPL1511 和 SPL1512 对比其他 3 株试验菌对头孢曲松表现出更强的耐药性。对 8 类 24 种耐药基因的检测发现, 耐药表型跟耐药基因型符合率较高。由此可见, 5 株试验菌表现出的耐药性与奇异变形杆菌的群集运动存在一定的联系。通过药敏试验表明, 耐药基因介导了耐药表型的发生, 通过耐药基因与表型的共筛选从而对敏感药物进行预测, 可为临床用药提供可靠的理论指导, 减少多重耐药菌株的产生。

参考文献:

- [1] 陈灿雄, 黄伊, 陈文萍, 等. *modA* 基因对奇异变形杆菌群集迁移运动和侵袭尿路上皮细胞的影响 [J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2021, 9(4): 205-210.
- [2] 陈柯颖, 左之才, 姚彩霞, 等. 牛源奇异变形杆菌的分离、鉴定及耐药性分析 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(4): 629-634.
- [3] 刘燕云, 柴家前. 奇异变形杆菌研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2017, 37(1): 196-200.
- [4] LIAW S J, LAI H C, HO S W, et al. Characterisation of P-nitrophenylglycerol-resistant *Proteus Mirabilis* Super-swarming Mutants [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2001, 50(12): 1039-1048.
- [5] 孙宝良, 李之光, 张敏. 常用抗生素对大肠埃希菌和克雷伯菌属的抗菌谱观察分析 [J]. 疾病预防控制通报, 2011, 26(4): 92-94.
- [6] 阮继生. “伯杰氏系统细菌学手册(第二版)”第 5 卷与我国的放线菌系统学研究 [J]. 微生物学报, 2013, 53(6): 521-530.
- [7] 于丽洁, 李学义, 马梦娟, 等. blaCMY-2 阳性禽源奇异变形杆菌的多重耐药特征 [J]. 河南农业大学学报, 2024, 58(2): 239-248.
- [8] DRECHSEL H, THIEKEN A, REISSBRODT R, et al. Alpha-Keto Acids are Novel Siderophores in the Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* and are Produced by Amino Acid Deaminases [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(9): 2727-2733.
- [9] MEYER S A, SCHLEIFER K H. Rapid Procedure for the Approximate Determination of the Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Micrococci, Staphylococci, and other Bacteria [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1975, 25(4): 383-385.
- [10] 张兴民. 四川部分地区山羊腹泻主要病原菌检测及山羊源志贺菌部分生物学特性研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2018.
- [11] 张振江, 夏钰淇, 罗博炜, 等. 树鼩源奇异变形杆菌的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 动物医学进展, 2019, 40(8): 131-136.
- [12] BUTLER M T, WANG Q F, HARSHEY R M. Cell Density and Mobility Protect Swarming Bacteria Against Antibiotics [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(8): 3776-3781.
- [13] HARSHEY R M, MATSUYAMA T. Dimorphic Transition in *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*: Surface-Induced Differentiation into Hyperflagellate Swarmer Cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(18): 8631-8635.
- [14] 赵振鹏, 杨振, 林伟东, 等. 猪源奇异变形杆菌的分离鉴定及集群运动分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10): 219-224.
- [15] 贾雄飞. 奇异变形杆菌周期性群集运动研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2005.
- [16] 岳雷. 山羊源奇异变形杆菌的分离鉴定及其主要毒力基因的检测 [D]. 成都: 西南民族大学, 2016.
- [17] 赵龙华, 杨维青. 细菌群集运动与生物被膜和耐药性的关系 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(17): 1986-1988.