



研究报告

鸡源奇异变形杆菌分离鉴定及生物学特性

贾沅铮^{1,2} 胡剑刚² 王志豪² 蒋蔚² 陈兆国² 韩先干^{*2} 周昕^{*1}

1 扬州大学兽医学院 江苏 扬州 225009

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

摘要:【背景】奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, PM)是人畜共患病原菌,在自然界分布广泛。近年来,随着畜禽奇异变形杆菌病发病率上升和耐药性增强,亟需开展对该菌的防控研究。【目的】分离鉴定鸡源奇异变形杆菌,鉴定其耐药性、致病性、生物被膜形成能力等生物学特性。【方法】采用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法鉴定了从2019–2020年病鸡中分离的52株临床奇异变形杆菌。分别采用药敏试验、PCR、结晶紫染色法对临床菌株的耐药性、毒力基因及生物被膜的形成进行研究。【结果】选择14株代表性菌株进行16S rRNA基因测序,结果表明所测分离菌株均为奇异变形杆菌。所有分离菌株均对克林霉素、阿奇霉素、红霉素、四环素和利福平耐药,对氯霉素和头孢曲松外的抗生素耐药性均高于50%。对分离的奇异变形杆菌的13个毒力基因检测表明,所有菌株均能检测到*hpmA*、*hpmB*、*rpoA*、*mrpA*、*fliL*、*zapA*、*ureC*、*atfC*、*atfA*、*pmfA*,而*ucaA*和*rsbA*检出率分别为19.23% (10/52)和48.08% (25/52),*hlyA*未检出。对分离株生物被膜形成能力检测结果表明,所有菌株均能形成生物被膜,19.23% (10/52)的分离菌株形成生物被膜能力强,而且25℃条件下成膜能力比37℃更强。【结论】鸡源奇异变形杆菌携带多种毒力基因,具有较强生物被膜形成能力,耐药模式多样且日趋严重,应进一步加强对奇异变形杆菌在动物致病性和耐药性方面的监控,以降低其感染风险。

关键词: 奇异变形杆菌, 分离鉴定, 耐药性, 毒力基因, 生物被膜

Foundation items: Shanghai Science and Technology Commission Research Project (18140900700); National Natural Science Foundation of China (32072829); Shanghai Agricultural Applied Technology Development Program (G20150109); National Agricultural Product Quality Safety Risk Assessment Program of China (GJFP2019027)

***Corresponding authors:** HAN Xiang: Tel: 86-21-34293157; E-mail: hanxgan@163.com
ZHOU Xin: E-mail: zhouxin99@vip.126.com

Received: 22-11-2020; **Accepted:** 06-04-2021; **Published online:** 25-05-2021

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划(18140900700); 国家自然科学基金(32072829); 上海科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2015)第1-9号); 国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2019027)

***通信作者:** 韩先干: Tel: 021-34293157; E-mail: hanxgan@163.com
周昕: E-mail: zhouxin99@vip.126.com

收稿日期: 2020-11-22; **接受日期:** 2021-04-06; **网络首发日期:** 2021-05-25

Isolation, identification and biological characteristics of a *Proteus mirabilis* from chicken

JIA Yuanzheng^{1,2} HU Jiangang² WANG Zhihao² JIANG Wei² CHEN Zhaoguo²
HAN Xiangan^{*2} ZHOU Xin^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

2 Shanghai Veterinary Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: [Background] *Proteus mirabilis* (PM) is a zoonotic pathogen, which is widely distributed in environment. In recent years, diseases caused by PM and the drug tolerance to PM has gradually increased, raising the importance on the prevention and control of PM. [Objective] To isolate and identify PM from chicken, and to analyze its biological characteristics, such as drug resistance, pathogenicity, and biofilm formation ability. [Methods] Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify 52 clinical PM strains which were isolated from sick chicken between 2019 and 2020. The drug resistance, virulence genes and biofilm formation of the clinical strains on PM were investigated by the drug-resistance phenotype, PCR, crystal violet staining method respectively. [Results] The results of 16S rRNA gene sequencing on 14 selected representative strains indicated that all the detected strains were PM. All isolates were resistant to clindamycin (CLDM), azithromycin (AZI), erythromycin (EM), tetracycline (TET) and rifampin (RFP), and the resistance rates of drugs other than chloramphenicol and ceftriaxone was higher than 50%. The results of detection of 13 virulence genes showed that all PM strains contained *hpmA*, *hpmB*, *rpoA*, *mrpA*, *fliL*, *zapA*, *ureC*, *atfC*, *atfA* and *pmfA*, while the detectable rates of *ucaA*, *rsbA* and *hlyA* were 19.23% (10/52), 48.08% (25/52) and 0.0% (0/52), respectively. The results of biofilm formation ability showed that all strains could form biofilm. 19.23% (10/52) of the isolates had strong ability of biofilm formation and the 25 °C temperature condition had stronger ability of biofilm formation than at 37 °C. [Conclusion] PM from avian harbored various virulence genes, and had strong biofilm formation ability. The drug resistance to PM has increased significantly and resistance patterns were complex. It suggested that the tighter monitor on pathogenicity and drug resistance of PM should be carried out to reduce the risk of PM infection.

Keywords: *Proteus mirabilis*, isolation and identification, drug resistance, virulence genes, biofilm

奇异变形杆菌为肠杆菌科变形杆菌属，杆状、短杆状或球状，无荚膜和芽孢，有鞭毛及菌毛的革兰氏阴性菌^[1]。该菌在 LB 琼脂培养基上呈迁徙生长，在 LB 琼脂培养基中加入 0.4% 的硼酸可抑制其迁徙运动。在 SS 培养基可呈现周边光滑，中心呈黑色的单个菌落^[2]。

PM 是一种广泛存在于土壤、污水、食品及动物肠道中的条件致病菌，可导致人和动物食物中毒或引起伤口、眼部、胃肠道、尿路等部位发生感染^[3-5]。细菌生物被膜(Biofilm, BF)可使细菌在不利生长环境中(如干燥、紫外线、消毒剂等)生存，增强其致病性^[6]。PM 具有多种毒力基

因，能促进其对细胞的黏附、生物被膜和耐药性的形成^[7]。近年来，养殖场发病鸡群中致病性耐药 PM 分离率升高^[8]，表明 PM 对养禽业危害性逐渐升高。

随着近年来 PM 耐药性不断增强，研究鸡源 PM 的分子流行病学特征、耐药性和生物被膜形成能力等生物学特性尤为重要。本研究通过对来自沈阳、安徽的养鸡场病死鸡采集病料进行 PM 分离，并对分离菌株进行耐药性、毒力基因、生物被膜形成能力等检测与分析，初步探究鸡源 PM 的生物学特性，为禽类的 PM 预防及治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

先后在沈阳、安徽某鸡场分批采集病死鸡肝、肠样品 340 份, 分别装入无菌采样袋后置于冰盒中, 在 18 h 内带回实验室处理。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

Oxoid 酵母粉、Oxoid 胰蛋白胨, 上海斐拓生物科技有限公司; BD 琼脂粉, 上海少辛生物科技有限公司; 氯化钠, 生工生物工程(上海)股份有限公司; SS 琼脂培养基, 青岛海博生物技术有限公司; DL2000 DNA Marker、2×HieffTM PCR Master Mix, 上海翊圣生物科技有限公司; 药敏纸片, 杭州天和微生物试剂有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。恒温培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 无菌操作台, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 恒温振荡培养箱, 北京创新思成科技有限公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 核酸电泳仪、凝胶成像系统, Alpha Technologies 公司; 分光光度计, Bio-Rad 公司。

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母粉 5.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后置于常温或 4 °C 备用, 用于分离菌株的常规增殖培养。

LB 琼脂培养基: 在 LB 液体培养基的成分基础上加入 15 g 琼脂粉, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后每个平皿中倒入 15 mL, 冷却凝固备用, 用于细菌的培养或菌落形态观察。

SS 琼脂培养基(g/L): SS 琼脂粉 63.6, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后每个平皿中倒入 15 mL, 冷却凝固备用, 用于细菌的分离培养。

1.3 细菌分离及鉴定

PM 的分离、鉴定参考文献[9], 略作调整。无菌条件下将每份采集的病料剪取少量放入灭菌离心管中, 加入磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)并研磨后, 接种于 LB 液体培养基中

并置于 37 °C、200 r/min 条件下培养至浑浊, 以该浑浊菌液为模板进行 PCR 检测, 将电泳结果中含有疑似奇异变形杆菌条带的样品直接划线于 SS 琼脂培养基上, 经 37 °C 恒温培养 16 h 左右后, 挑取形态特征为黑色光滑的可疑菌落, 革兰氏染色后镜检。同时将黑色菌落接种于 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养 8 h, 参照细菌基因组提取试剂盒说明书提取细菌的基因组, 保存于 -40 °C 备用。用于鉴定奇异变形杆菌的 *atpD* 基因特异性引物参考文献[10], 由上海桑尼生物科技有限公司合成。以提取的基因组为模板, 以 *atpD*-F 和 *atpD*-R 为引物进行 PCR 鉴定, 引物信息见表 1。PCR 反应体系(20 μ L): 2×PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 20 ng, ddH₂O 补至 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在凝胶成像系统下拍照记录结果。

1.4 16S rRNA 基因扩增及分析

挑选 10 株沈阳分离株(Prom-1、Prom-2、Prom-6、Prom-8、Prom-10、Prom-16、Prom-18、Prom-19、Prom-20、Prom-22)与 4 株安徽分离株(Prom-28、Prom-34、Prom-37、Prom-40), 参考文献[11]方法, 以 1.3 中冻存备用的 PM 基因组为模板, 由上海桑尼生物科技有限公司合成细菌 16S rRNA 通用引物 27F 和 1492R。对实验菌株的目的片段进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(20 μ L): 2×PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 20 ng, ddH₂O 补至 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。反应结束后将 PCR 产物送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

将测序结果在 NCBI 上利用 BLAST 进行比对, 利用 DNA Star 软件中的 MegAlign 将 14 株 PM

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物 Primers (5'→3')	基因功能 Gene function	产物长度 Product length (bp)
<i>atpD</i>	F: CTGGTGGCTCATTTCATCT R: ACAGTTAGGCGGTGGTAT	用于 PM 的鉴定 Used for PM identification	509
16S rRNA	27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1492R: GGTACCTTGTTACGACTT	16S rRNA 基因通用引物 16S rRNA gene universal primer	1 465
<i>hpmA</i>	F: GAGGTATTGGTGGTGGTC R: CGGTTCTGTGCGTTCAT	溶血素相关 Hemolysin-related	234
<i>hpmB</i>	F: CAGTGGATTAAGCGCAAATG R: CCTTCAATACGTTCAACAAACC	溶血素相关 Hemolysin-related	422
<i>rpoA</i>	F: GATCATGGCTCAGATTGAAC R: TGCGGGTAACGTCAATTGAC	溶血素相关 Hemolysin-related	456
<i>mrpA</i>	F: ACACCTGCCCATATGGAAGATACTGGTACA R: AAGTGATGAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGAGTAAGTCACC	溶血素相关 Hemolysin-related	550
<i>fliL</i>	F: CTCTGCTCGTGGTGGTGTGTCG R: GCGTCGTCACCTGATGTGTC	菌毛结构相关 Fimbriae structure related	770
<i>zapA</i>	F: AGATATTATTTTATTAATAATAAGGATTAC R: AATATCCTCCAGATATAAATTTAGGTTAAGTTTATT	编码菌毛相关 Encoding fimbriae related	480
<i>ureC</i>	F: GTTATTCGTGATGGGATGGG R: ATAAAGGTGGTTACGCCAG	金属蛋白酶相关 Metalloproteinase related	375
<i>atfC</i>	F: AGAAAGGGATCCTACAAATTAA R: TATAGCATGCATTAAATTGCC	尿素酶相关 Urease related	472
<i>atfA</i>	F: CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA R: CTGCTTGGATCCGTAATTTTAAACG	菌毛合成相关 Fimbriae synthesis related	365
<i>pmfA</i>	F: GGATCATCTATAATGAAACTG R: CTGATAATCAACTTGGAAGTT	菌毛结构亚单位 Fimbriae structural subunit	534
<i>rsbA</i>	F: TCGATTTTCAGTGTGTTGGCCAT R: CCGAGCTTCATCATGGCTG	迁徙相关 Migration related	2 200
<i>ucaA</i>	F: GTAAAGTTGTTGCGCAAAC R: TTGAGCCACTGTGGATACA	尿道上皮黏附 Urethral epithelial adhesion	587
<i>hlyA</i>	F: AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT R: ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	溶血素相关 Hemolysin-related	1 177

分离株的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 中收录的 10 株 PM 菌株[HNXY160420 (KX437623.1)、SH (KX230763.1)、Isolate3-1-32 (AB932526.1)、ALK043 (KC456538.1)、ALK044 (KC456539.1)、ALK428 (KC456557.1)、BAB-199 (KF535110.1)、YCY34 (JF775423)、ALK418 (IKC456548.1)和 NCTC11938 (NR_043997.1)]进行系统发育进化树构建及相似性分析。

1.5 药敏试验

采用 Kirby-Baue 纸片法进行药敏试验, 依据药敏纸片说明书所给出的范围对其敏感性进行判定。将各菌株划线于 LB 平板上, 于 37 °C 培养 10 h, 挑取单菌落于含有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 置于 37 °C、200 r/min 培养 4–6 h 至对数生长期, 5 600 r/min 离心 10 min 后用无菌 PBS 洗 2 次, 然后重悬并调节至 0.5 麦氏比浊标准,

取 100 μL 涂布于 LB 平板上, 每板贴 5 个药敏纸片, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 h 后测量抑菌圈直径, 判断分离菌株对药物的敏感性。药敏纸片种类的选择参照美国临床和实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制定的抗菌药物敏感性试验标准, 选取 16 种药物: 复方新诺明、克林霉素、新霉素、氨苄西林、利福平、氯霉素、头孢噻吩、环丙沙星、红霉素、大观霉素、阿奇霉素、四环素、头孢曲松、头孢拉定、庆大霉素、卡那霉素。

1.6 毒力基因检测

毒力基因的设计参照文献[12-13], 由上海桑尼生物科技有限公司合成。分别为 *hpmA*、*hpmB*、*rpoA*、*mrpA*、*fliL*、*zapA*、*ureC*、*atfC*、*atfA*、*pmfA*、*rsbA*、*ucaA*、*hlyA*, 序列见表 1。对 52 株 PM 的 13 个毒力基因进行 PCR 检测, PCR 反应体系与 1.4 中一致, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在凝胶成像系统下拍照记录结果。

1.7 生物被膜形成能力测定

生物被膜的检测方法参照文献[14], 将各菌株划线于 LB 平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取单菌落于含有 5 mL LB 液体培养基的试管中置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 4–6 h 至对数生长期, 5 600 r/min 离心 10 min, PBS 洗 2 次后用 LB 重悬使 OD_{600} 为 0.1, 将菌液吸取 200 μL 于 96 孔细胞培养板, 每株菌设置 4 个重复并设置阴性对照, 培养 24 h 后用 PBS 洗涤 3 遍, 每孔加 0.1% 结晶紫 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱染色 30 min, 染色结束后用 PBS 洗 3 次, 室温倒置晾干, 每孔加入 95% 乙醇 200 μL 脱色 20 min, 酶标仪测定 OD_{595} 值。

参照文献[14]的方法分析菌株生物被膜形成能力, 以阴性对照的平均 OD 值加上 3 倍的标准差(s), 即为 OD_C 为基准, $OD < OD_C$ 为不形成生物被膜; $1OD_C < OD < 2OD_C$ 为弱生物被膜形成能力;

$2OD_C < OD < 4OD_C$ 为形成生物被膜能力中等; $OD > 4OD_C$ 则为强生物被膜形成能力。

1.8 不同培养条件对 PM 生物被膜形成的影响

为进一步研究不同培养条件对 PM 生物被膜形成的影响, 选择 3 株生物被膜形成能力强的菌株, 将 3 株菌分别划线于 LB 平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取单菌落于含有 5 mL LB 液体培养基的试管中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 4–6 h, 5 600 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗 2 次后用 LB 液体培养基重悬使 OD_{600} 为 0.1, 吸取该菌液 200 μL 于 96 孔细胞培养板, 每株菌设置 4 个重复并设置阴性对照, 分别置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 和 48 h, 检测其 BF 形成能力。BF 检测方法与所述一致, 在培养时长分别达到 24 h 或 48 h 的 96 孔细胞培养板取出, 用 PBS 洗涤 3 遍, 每孔加 0.1% 结晶紫 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min, 染色结束后用 PBS 洗 3 次, 室温倒置晾干, 每孔加入 95% 乙醇 200 μL 脱色 20 min, 酶标仪测定 OD_{595} 值。

菌株生物被膜形成能力的分析方法与 1.7 中一致。

2 结果与分析

2.1 细菌分离及染色

将病料中分离的 PM 疑似菌落分别在 LB 平板和 SS 平板划线, 分离的 PM (Prom-1) 在 LB 上可呈迁徙生长(图 1A), 而在 SS 平板则可形成大小为 1–2 mm、光滑且中间呈黑色的圆形菌落, 而且无迁徙现象(图 1B)。镜检见革兰氏染色阴性, 杆状或短杆状菌(图 2)。通过对 PM 特异性基因 *atpD* 的 PCR 扩增, 共分离到 52 株 PM, 分别编号为 Prom-1–Prom-52, 部分奇异变形杆菌 *atpD* 基因扩增结果见图 3。

2.2 分离菌株 16S rRNA 基因相似性分析

如图 4 所示, Prom-1、2、6、8、16、18、20、22、40 与 HNX Y160420 (中国河南)以及 SH (中国四川)聚在同一分支; Prom-10、37 与

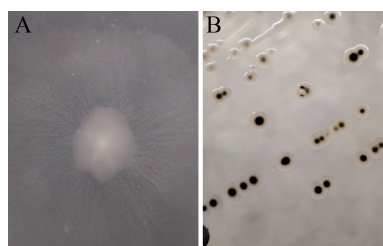


图 1 Prom-1 在 LB 培养基(A)和 SS 培养基(B)上的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of Prom-1 on LB culture medium (A) and SS culture medium (B)

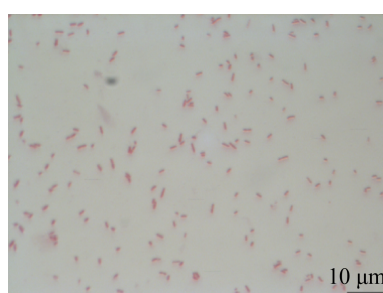


图 2 Prom-1 经革兰氏染色后在油镜下的形态(1 000×)

Figure 2 The morphology of Prom-1 after Gram staining under oil microscope (1 000×)

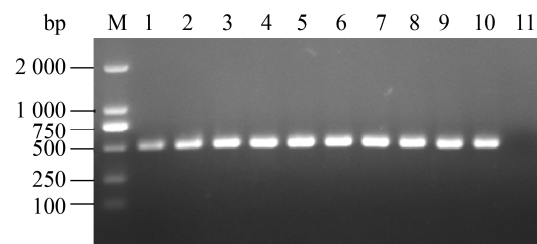


图 3 部分奇异变形杆菌 *atpD* 基因 PCR 扩增结果

Figure 3 The PCR amplification result of *atpD* gene of partially *Proteus mirabilis*

注: M: DL2000 DNA Marker; 1-10: PM 分离菌株 Prom-1-Prom-10; 11: 为阴性对照

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1-10: PM isolates Prom-1-Prom-10; 11: Negative control

Isolate 3-1-32 (日本)处于同一分支, Prom-28 与 ALK-043、044、428 及 BAB-199、YCY-34 聚在同一分支; Prom-19 与 NCTC11938 处在同一分支。

相似性分析结果显示, 14 株分离菌与 10 株 PM 收录菌株之间均有很高的相似性, 任何 2 株相互之间核苷酸序列相似性均可达 99.0%以上, 相似性最高达 99.9%。

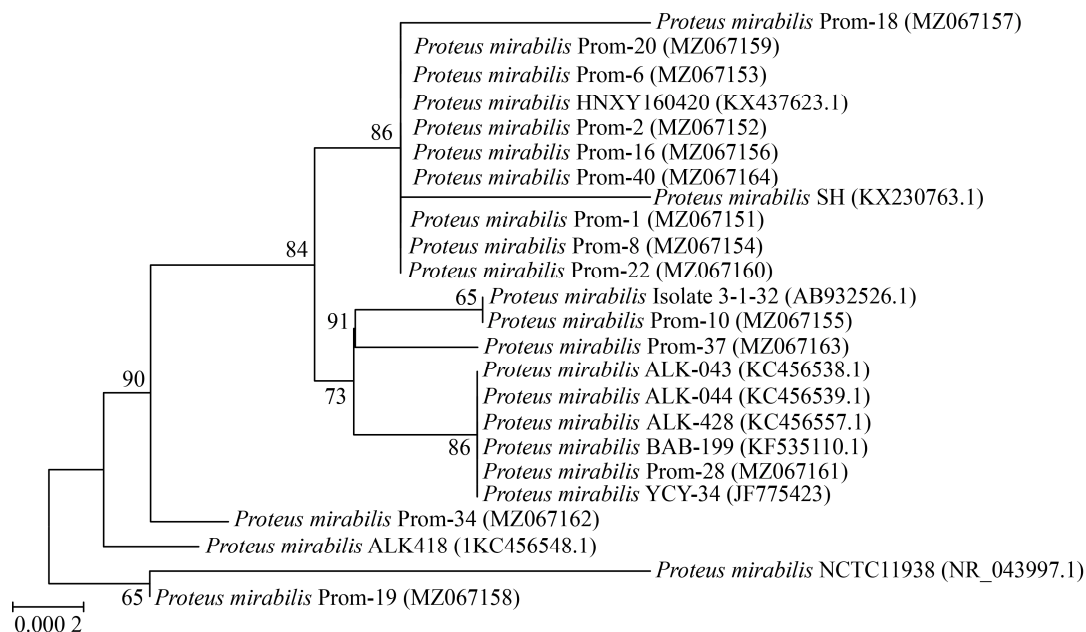


图 4 *Proteus mirabilis* 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of *Proteus mirabilis* based on 16S rRNA gene sequences

注: 标尺为序列差异的分支长度; 节点处的数字为 Bootstrap 值; 括号内的数字为 GenBank 登录号

Note: Bar: Nucleotide divergence; Numbers at the branch points indicated the Bootstrap values; Numbers in parenthesis represented GenBank accession number

2.3 分离菌株药敏试验结果

对 52 株 PM 的药敏检测结果表明, 分离菌株对克林霉素、利福平、阿奇霉素、四环素、红霉素的耐药性最高, 耐药率均为 100%; 对头孢拉定、新霉素、环丙沙星、复方新诺明、氨苄西林、头孢噻吩、庆大霉素、大观霉素、卡那霉素的耐药性次之, 耐药率均在 50%及以上; 对氯霉素和头孢曲松的耐药率低于 50% (表 2)。

多重耐药分析表明(表 3), 所有分离菌株均有

多重耐药的特点, 11 重以上耐药菌株占比高达 80.77%, 其中 Prom-8、12、13、15、47、48、49、50、51 对所测 16 种药物均耐药。

2.4 分离菌株毒力基因检测结果

对 52 株 PM 的毒力基因检测结果表明, 52 株 PM 分离株均含有 *hpmA*、*hpmB*、*rpoA*、*mrpA*、*fliL*、*zapA*、*ureC*、*atfA*、*utfC* 和 *pmfA*, 42 株菌含有 *ucaA*, 27 株菌含有 *rsbA*, 而 *hlyA* 基因在所有分离株中均未被检测到(图 5、表 4)。

表 2 药敏试验结果

Table 2 Results of drug sensitivity test

药品名称 Drug name	耐药率 Drug resistance rate (%) (n/n)	中介菌株比例 Percentage of intermediate (%) (n/n)	敏感菌株比例 Percentage of sensitivity (%) (n/n)
克林霉素 Clindamycin	100 (52/52)	0 (0/52)	0 (0/52)
利福平 Rifampin	100 (52/52)	0 (0/52)	0 (0/52)
阿奇霉素 Azithromycin	100 (52/52)	0 (0/52)	0 (0/52)
四环素 Tetracycline	100 (52/52)	0 (0/52)	0 (0/52)
红霉素 Erythromycin	100 (52/52)	0 (0/52)	0 (0/52)
头孢拉定 Cefradine	92.16 (47/52)	9.62 (5/52)	0 (0/52)
新霉素 Neomycin	84.31 (43/52)	17.31(9/52)	0 (0/52)
环丙沙星 Ciprofloxacin	80.77 (42/52)	0 (0/52)	19.23 (9/52)
复方新诺明 Sulfamethoxazole	78.85 (41/52)	3.85 (2/52)	17.31 (9/52)
氨苄西林 Ampicillin	75.00 (39/52)	7.69 (4/52)	17.31 (9/52)
头孢噻吩 Cephalothin	71.15 (37/52)	1.92 (1/52)	26.92 (14/52)
庆大霉素 Gentamicin	67.31 (35/52)	32.69 (17/52)	0 (0/52)
大观霉素 Spectinomycin	63.46 (33/52)	15.38 (8/52)	21.15 (11/52)
卡那霉素 Kanamycin	50.00 (26/52)	46.15 (24/52)	3.85 (2/52)
氯霉素 Chloramphenicol	44.23 (23/52)	36.54 (19/52)	19.23 (10/52)
头孢曲松 Ceftriaxone sodium	36.54 (19/52)	38.46 (20/52)	25.00 (13/52)

表 3 PM 多重耐药结果

Table 3 Results of multi-drug resistance test of *Proteus mirabilis* strains

耐药菌株号 Drug resistance pattern	耐药重数 Multiple	耐药菌株数 Number of resistance	耐药菌株比例 Percentage of resistant strains (%)
Prom-8, 12, 13, 15, 47, 48, 49, 50, 51	16	9	17.31
Prom-1, 4, 5, 10, 16, 18, 28, 32, 45	15	9	17.31
Prom-2, 9, 11, 19, 25, 30, 31	14	7	13.46
Prom-3, 6, 20, 21, 26, 29, 33, 40	13	8	15.38
Prom-7, 14, 17, 22, 24, 27, 39	12	7	13.46
Prom-23, 52	11	2	3.85
Prom-34, 35, 36, 41, 44, 46	7	6	11.54
Prom-37, 38, 42, 43	6	4	7.69

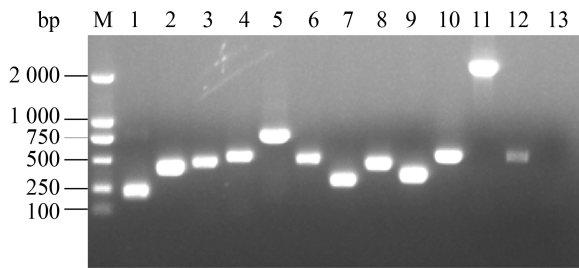


图 5 Prom-1 毒力基因的检测
Figure 5 Virulence gene detection of Prom-1
注: M: DL2000 DNA Marker; 1: *hpmA* 扩增产物; 2: *hpmB* 扩增产物; 3: *rpoA* 扩增产物; 4: *mrpA* 扩增产物; 5: *fliL* 扩增产物; 6: *zapA* 扩增产物; 7: *ureC* 扩增产物; 8: *atfC* 扩增产物; 9: *atfA* 扩增产物; 10: *pmfA* 扩增产物; 11: *rsbA* 扩增产物; 12: *ucaA* 扩增产物; 13: 空白对照
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: *hpmA*; 2: *hpmB*; 3: *rpoA*; 4: *mrpA*; 5: *fliL*; 6: *zapA*; 7: *ureC*; 8: *atfC*; 9: *atfA*; 10: *pmfA*; 11: *rsbA*; 12: *ucaA*; 13: Negative control

表 4 毒力基因检测结果
Table 4 Virulence gene test results

毒力基因名称	携带毒力基因的菌株数	携带毒力基因菌株占比
Virulence gene	Number of strains carrying the virulence gene (n/n)	Percentage of strains carrying the virulence gene (%)
<i>hpmA</i>	52/52	100
<i>hpmB</i>	52/52	100
<i>rpoA</i>	52/52	100
<i>mrpA</i>	52/52	100
<i>fliL</i>	52/52	100
<i>zapA</i>	52/52	100
<i>ureC</i>	52/52	100
<i>atfC</i>	52/52	100
<i>atfA</i>	52/52	100
<i>pmfA</i>	52/52	100
<i>ucaA</i>	42/52	80.77
<i>rsbA</i>	27/52	51.92
<i>hlyA</i>	0/52	0

2.5 分离株生物被膜检测结果

PM 在 96 孔板培养后可见一层半透明薄膜, 该膜可在细菌生长过程中起抵御环境不利因素的作用, 如图 6 所示, A 为 Prom-1 生物被膜正常形态, 可见在孔底部有一层灰白色膜状物质; B 为空白对照, 孔底部没有形成膜状物质; C 为 Prom-1

生物被膜经结晶紫染色后的形态, 可见孔底有一层黄色膜状物质; D 为空白对照, 底部没有膜状物质。

对分离的 52 株 PM 菌进行生物被膜形成能力检测结果表明(图 7), 所有分离株均能形成生物被膜($OD_{595}>0.57$, OD_C 为 0.57), 其中 Prom-1、Prom-4、Prom-15、Prom-18、Prom-19、Prom-25、Prom-26、Prom-30、Prom-34 和 Prom-35 分离株表现强生物被膜形成能力($OD_{595}>2.28$), 占 19.23% (10/52), 其余分离株表现出中等生物被膜形成能力($1.14\leq OD_{595}\leq 2.28$), 占 84.62% (44/52)。

2.6 不同温度和培养时长对 PM 生物被膜形成的影响

依据 2.5 结果, 选取 3 株强生物被膜形成能力的 PM 分离株 Prom-4、Prom-30 和 Prom-34, 用 LB 培养基分别在 25 °C 和 37 °C 培养条件下进行检测, 结果表明, 在培养 24 h 后 PM 生物被膜形成能力最强, 而培养 48 h 的生物被膜与 24 h 相比增长不显著。对不同培养温度的检测结果表明, 生物被膜在 25 °C 条件下成膜能力比在 37 °C 更强($P<0.05$) (图 8、图 9)。

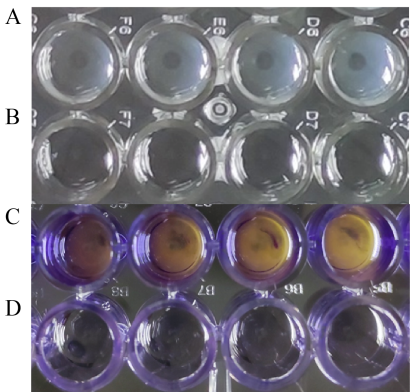


图 6 Prom-1 生物被膜在 96 孔细胞培养板上的形态
Figure 6 Morphology of biofilm of Prom-1 on 96-well cell culture plates

注: A: 生物被膜未染色的形态; C: 生物被膜经结晶紫染色后的形态; B、D: 空白对照组

Note: A: The morphology of the biofilm without staining; C: The morphology of the biofilm after crystal violet staining; B and D: The corresponding control group of A and C

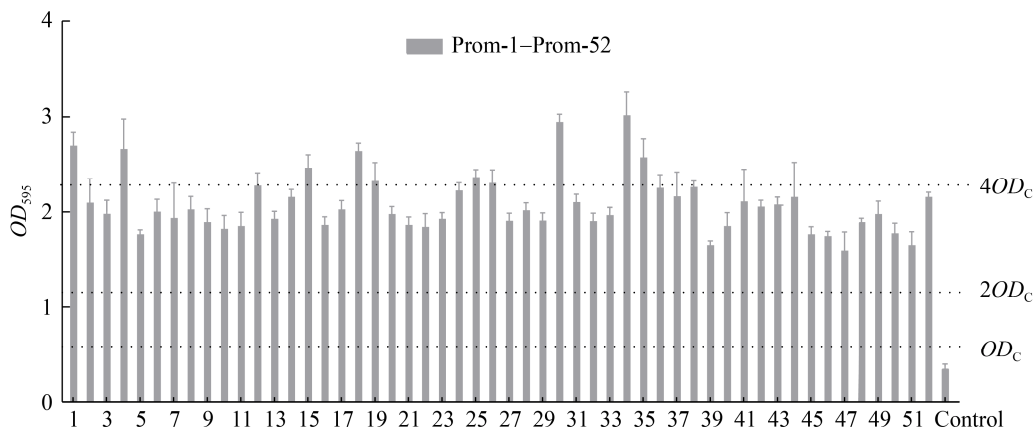


图7 分离株在 37 °C 生长 24 h 生物被膜形成能力

Figure 7 Biofilm formation ability of isolates grown at 37 °C for 24 h

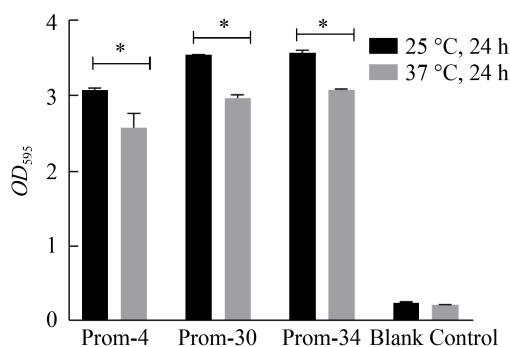


图8 PM 分别在 25 °C 和 37 °C 培养 24 h 后生物被膜形成差异

Figure 8 Difference of BF formation after PM cultured at 25 °C and 37 °C for 24 h

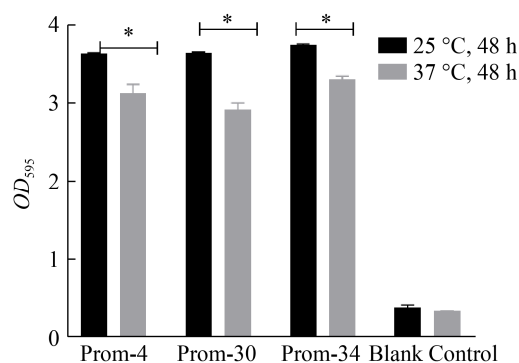
注: *: 表示数据存在显著差异($P<0.05$)Note: *: Indicate that there is a significant difference in the data ($P<0.05$)

图9 PM 分别在 25 °C 和 37 °C 培养 48 h 后生物被膜形成差异

Figure 9 Difference of BF formation after PM cultured at 25 °C and 37 °C for 48 h

注: *: 表示数据存在显著差异($P<0.05$)Note: *: Indicate that there is a significant difference in the data ($P<0.05$)

3 讨论与结论

PM 广泛存在于自然界, 是一种条件致病菌, 其在宿主体内的持续繁殖是导致宿主患病的主要原因^[15], 该菌会引起人的食物中毒、尿路感染、腹膜炎、呼吸道感染等疾病^[16], 也能引起动物发病。江益民等首次分离国内鸡源 PM^[17]。病鸡表现出食欲下降、咳嗽和腹泻等症状^[18]。本研究从 340 份禽病料中共分离出 52 株 PM, 分离率为 15.29%, 与已报道相比有所上升(如袁东芳^[11]在山东养鸡场中的分离率为 11.82%, 陈明非等^[19]在

大连肉鸡养殖场的分离率为 13.1%, 贾纪美等^[20]在肉鸡养殖、屠宰、加工等环节的分离率为 11.9%), 表明在国内养殖过程中鸡源 PM 的感染率较高, 需引起重视。对 52 株 PM 耐药性检测表明, 分离株的耐药性与已有研究^[21-22]相比均有不同程度上升, 而且 11 重耐药以上的菌株占比高达 80.77%。可能是由于在畜牧养殖中抗生素不合理使用导致耐药 PM 的增多^[23], 因此, 临床筛选治疗药物时, 应增加对 PM 的药敏检测, 选择合适的抗生素, 降低用药盲目性, 减少 PM 耐药

性的产生。

PM 的致病性与其携带的毒力基因相关(如编码菌毛、尿素酶和溶血素等蛋白的基因),如 PM 可利用菌毛对宿主细胞进行黏附,进而破坏细胞表面一些保护性蛋白,也能通过菌毛黏附细胞进而入侵至细胞内部,释放毒素,导致宿主发病^[24],此外,这些毒力基因可调控相关因子,通过增强其黏附性,形成生物被膜来促进感染的扩散和逃避抗生素的作用^[25]。开展对 PM 毒力基因的检测,可为分析 PM 的致病性和耐药性提供参考。对分离的 52 株鸡源 PM 的 13 种毒力基因检测结果表明, *hpmA*、*hpmB*、*rpoA*、*mrpA*、*fliL*、*zapA*、*ureC*、*atfA*、*atfC* 和 *pmfA* 在不同来源的 PM 中均有检出,无地域性差异^[13,26],而黏附素相关基因 *ucaA*、“雾蔓”迁徙能力相关基因 *rsbA* 也有较高检出率。研究结果表明, *ureC* 和 *atfC* 基因与头孢氨苄耐药有关, *atfA* 基因与磺胺甲恶唑耐药有关, *hpmA*、*ureC*、*rpoA*、*atfC*、*mrpA* 与头孢曲松和呋喃妥因耐药有关, *atfA* 与呋喃妥因耐药有关,推测 PM 耐药性的增加可能与上述基因的广泛存在有关,但仍需进一步验证^[25]。溶血素相关基因 *hlyA* 在 PM 中未检出,研究表明溶血素在 PM 中并不常见^[27],但在泌尿系统分离的变形杆菌可以检测到大肠杆菌溶血素类似基因 *hlyA*^[28],推测 *hlyA* 可能与 PM 在宿主特定组织的定殖有关。

生物被膜是细菌适应不良环境而形成的保护模式,影响生物被膜形成的因素包括耐药性、胞外多糖和温度等^[29]。通常细菌的耐药性有利于生物被膜的形成,生物被膜中的细菌极易形成耐药性^[30],其对抗生素的耐受性可提高 10–1 000 倍^[31]。本研究分离的 52 株 PM 均具有广泛的耐药性和较强生物被膜的形成能力,为了确定温度对 PM 生物被膜形成的影响,选取 3 株强生物被膜形成能力的 PM 菌在 25 °C 和 37 °C 下培养,结果显示 PM 在 25 °C 形成的生物被膜强于 37 °C,可能是有类似副溶血弧菌在较低的环境温度下胞外多糖和胞

外蛋白的分泌增加,其生物被膜形成能力增强的机理^[32];此外,虽然 37 °C 是多数细菌的最适生长温度,但此温度下细菌胞外多糖黏性降低,与黏附聚集相关的胞外蛋白聚合物分泌受到抑制,导致生物被膜形成能力降低,如与沙门菌生物被膜形成相关的卷曲菌毛通常在 30 °C 以下时合成能力更强^[33],但仍需深入研究。

本研究通过对鸡源 PM 进行 16S rRNA 基因测序、耐药性、毒力基因、生物被膜检测,为鸡源 PM 的临床诊断、临床用药、遗传变异研究及耐药性防控提供参考。

REFERENCES

- [1] Yu ZR, Yang KK, Wang YH, Zhang Q, Su L, Lu ZM, Zhang XQ, Liu ZM, Li CF, Liu GQ, et al. Isolation and identification of *Proteus mirabilis* from Muscovy ducks and analysis of its virulence genes[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2020, 28(3): 14-20 (in Chinese)
俞赵荣, 杨侃侃, 王元红, 张谦, 苏莉, 鲁智敏, 张学琪, 刘自敏, 李传峰, 刘光清, 等. 1 株番鸭源奇异变形杆菌的分离鉴定及其毒力基因分析[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(3): 14-20
- [2] Pan JY, Peng L, Luo S, Wu XM. Study of single colony culture method for *Proteus mirabilis*[J]. Journal of Tropical Medicine, 2015, 15(1): 24-27 (in Chinese)
潘嘉韵, 彭亮, 罗苏, 吴晓蔓. 奇异变形杆菌单个菌落培养方法的探讨[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(1): 24-27
- [3] Liang ZL, Wang ZY, Yang XR, Chen LZ, Bi SL. Analysis of antimicrobial resistance and ERIC-PCR genotyping of *Proteus mirabilis* clinical isolates[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2018, 28(24): 3718-3721, 3737 (in Chinese)
梁紫璐, 王宗源, 杨小蓉, 陈林珍, 毕水莲. 奇异变形杆菌临床分离株的药敏分析及 ERIC-PCR 分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(24): 3718-3721, 3737
- [4] Wang Y, Zhang SY, Yu JY, Zhang H, Yuan ZQ, Sun YS, Zhang L, Zhu YF, Song HB. An outbreak of *Proteus mirabilis* food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing[J]. Food Control, 2010, 21(3): 302-305
- [5] Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection[J]. EcoSal Plus, 2018, 8: ESP-9
- [6] Zhang XT, Deng YM, Dong DL, Du WQ, Wu XY, Tang SZ. Effect of culture conditions on the biofilm of *Proteus mirabilis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 88-93 (in Chinese)
张晓婷, 邓一秒, 董冬丽, 杜文琪, 吴希阳, 唐书泽. 培

- 养条件对奇异变形杆菌生物膜生长的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 88-93
- [7] Fusco A, Coretti L, Savio V, Buommino E, Lembo F, Donnarumma G. Biofilm formation and immunomodulatory activity of *Proteus mirabilis* clinically isolated strains[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(2): 414
- [8] Lu JQ, Zhang RM, Cheng K, He B, Liao XP, Sun J, Liu YH, Fang LX. Prevalence and dissemination of *fosA3* gene in *Proteus mirabilis* isolates from a pigeon field[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(2): 303-310 (in Chinese)
- 路佳琦, 张荣民, 程珂, 何冰, 廖晓萍, 孙坚, 刘雅红, 方亮星. 鸽源奇异变形杆菌中磷霉素耐药基因 *fosA3* 的流行与传播特征[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(2): 303-310
- [9] Pang HZ, Zhang ZX, Zhang HL, Li PG, Li YY, Jia QH, Zhang XZ. Identification and drug sensitivity test of pathogenic *Proteus mirabilis* isolated from chicken[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(12): 96-98 (in Chinese)
- 庞洪泽, 张召兴, 张海龙, 李佩国, 李蕴玉, 贾青辉, 张香斋. 雏鸡源致病性奇异变形杆菌的鉴定与药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(12): 96-98
- [10] Wang ZH, Zuo JK, Gong JS, Hu JG, Jiang W, Mi RS, Huang Y, Chen ZG, Phouthapane V, Qi KZ, et al. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous and rapid detection of six pathogenic bacteria in poultry[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 185
- [11] Yuan DF. Isolation and identification of *Proteus mirabilis* and its 16S rRNA gene sequence analysis in broiler breeding[J]. Shandong Journal of Animal Science And Veterinary Medicine, 2020, 41(6): 7-9 (in Chinese)
- 袁东芳. 肉鸡养殖中奇异变形杆菌的分离鉴定及其 16S rRNA 基因序列分析[J]. 山东畜牧兽医, 2020, 41(6): 7-9
- [12] Yin YQ, Ma DH, Li YS, Meng XG, Huo XW, Liu K. Isolation, identification of goose *Proteus mirabilis* and its virulence genes detection[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2152-2163 (in Chinese)
- 尹有勤, 马德慧, 李岩松, 蒙小刚, 霍晓伟, 刘锴. 鹅源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2152-2163
- [13] Guo YM, Pan Z, Qin LY, Ju HD. Detection of virulence genes and analysis of drug sensitivity in *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2016, 26(18): 2671-2673 (in Chinese)
- 郭玉梅, 潘琢, 秦丽云, 剧慧栋. 奇异变形杆菌毒力基因检测和药物敏感性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(18): 2671-2673
- [14] Han XG, Liu L, Fan GB, Zhang YX, Xu D, Zuo JK, Wang SH, Wang XL, Tian MX, Ding C, et al. *Riemerella anatipestifer* lacks *luxS*, but can uptake exogenous autoinducer-2 to regulate biofilm formation[J]. Research in Microbiology, 2015, 166(6): 486-493
- [15] Wang SH, Xia YJ, Dai JJ, Shi ZY, Kou YH, Li HQ, Bao YL, Lu CP. Novel roles for autotransporter adhesin AatA of avian pathogenic *Escherichia coli*: colonization during infection and cell aggregation[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2011, 63(3): 328-338
- [16] Lin YQ, Chen MY, You QX. Clinical distribution and change of drug resistance of *Proteus mirabilis* in our hospital from 2016 to 2018[J]. The Medical Forum, 2020, 24(10): 1341-1343 (in Chinese)
- 林燕青, 陈梅英, 游琴秀. 2016–2018 年我院奇异变形杆菌的分布及耐药性变迁[J]. 基层医学论坛, 2020, 24(10): 1341-1343
- [17] Jiang YM, Long T, Hou YZ, Qin CL, Wang MC, Ding JS. Isolation and identification of *Proteus mirabilis* from chicken[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 1990, 19(7): 31-33 (in Chinese)
- 江益民, 龙塔, 侯玉泽, 秦翠丽, 王满仓, 丁建山. 鸡奇异变形杆菌病原的分离与鉴定[J]. 河南农业科学, 1990, 19(7): 31-33
- [18] Su WY, Li XN, Han JZ. Drug-resistance research and elimination of drug resistance plasmids of 10 strains of chicken source *Proteus mirabilis*[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014(10): 5-9 (in Chinese)
- 苏葳艺, 李欣南, 韩镌竹. 10 株鸡源奇异变形杆菌的质粒消除及耐药性研究[J]. 现代畜牧兽医, 2014(10): 5-9
- [19] Chen MF, Li W, Zhao YW, Liu W. Analysis on the epidemic situation of broiler bacterial diseases in Dalian[J]. China Animal Industry, 2017(13): 53-55 (in Chinese)
- 陈明非, 李巍, 赵怡雯, 刘威. 大连肉鸡细菌病流行情况分析[J]. 中国畜牧业, 2017(13): 53-55
- [20] Jia JM, Zhu JS, Luo YB, Li LL, Hu M, Zhao M, Yang SF, Liu XW, Dai MX, Qi J, et al. Isolation, identification and antimicrobial resistance analysis of main antibiotic-resistant strains in broiler industrial chain[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(7): 13-19 (in Chinese)
- 贾纪美, 朱见深, 骆延波, 李璐璐, 胡明, 赵敏, 杨胜福, 刘晓文, 戴美学, 齐静, 等. 肉鸡产业链主要抗药性菌株的分离鉴定与抗药性分析[J]. 山东农业科学, 2018, 50(7): 13-19
- [21] Lu YT, Wang SK, Qiao Y. Analysis of the drug resistance of *Proteus mirabilis* from 2015 to 2017[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2019, 26(1): 143-146 (in Chinese)
- 陆玉婷, 王胜奎, 乔昀. 2015–2017 年奇异变形杆菌耐药情况分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(1): 143-146

- [22] He XY, Xu R, Ren L, Tang Q. Isolation, identification and drug sensitivity test of chicken pathogenic *Proteus mirabilis*[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018(7): 10-15 (in Chinese)
何欣怡, 徐睿, 任丽, 唐强. 鸡源致病性奇异变形杆菌分离鉴定及药敏试验[J]. 现代畜牧兽医, 2018(7): 10-15
- [23] Bie LY. Study on mobile genetic elements related to antibiotic resistance dissemination and antibiotic stress response strategy in bacteria[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2019 (in Chinese)
别路垚. 细菌中耐药性传播相关的可移动遗传元件和抗生素响应策略的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2019
- [24] Liu YY, Chai JQ. Research progress of *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2017, 37(1): 196-200 (in Chinese)
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
- [25] Hussein EI, Al-Batayneh K, Masadeh MM, Dahadhah FW, Al Zoubi MS, Aljabali AA, Alzoubi KH. Assessment of pathogenic potential, virulent genes profile, and antibiotic susceptibility of *Proteus mirabilis* from urinary tract infection[J]. International Journal of Microbiology, 2020(98): 1-5
- [26] Yang QL, Gao J, Luo LP, Han B. Virulence test of canine *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(8): 60-63 (in Chinese)
杨巧玲, 高健, 罗立平, 韩博. 犬源性奇异变形杆菌的毒力试验[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(8): 60-63
- [27] Cestari SE, Ludovico MS, Martins FH, Da Rocha SP, Elias WP, Pelayo JS. Molecular detection of *hpmA* and *hlyA* hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis*[J]. Current Microbiology, 2013, 67(6): 703-707
- [28] Swihart KG, Welch RA. Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin *hpmA*[J]. Infection and Immunity, 1990, 58(6): 1861-1869
- [29] Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernandes Júnior A, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH, Rall VLM. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures[J]. Food Control, 2014, 35(1): 386-391
- [30] Chen Y, Wang W, Guan SS. Analysis of distribution and drug resistance of *Proteus mirabilis* in patients with urinary tract infection[J]. Chinese Remedies & Clinics, 2019, 19(3): 496-498 (in Chinese)
陈燕, 王维, 管桑桑. 尿路感染患者奇异变形杆菌分布及耐药性分析[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(3): 496-498
- [31] Lv XL. Biofilm formation and its related regulation genes in avian pathogenic *Escherichia coli*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2017 (in Chinese)
吕小龙. 禽致病性大肠杆菌生物被膜形成及其相关调控基因研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2017
- [32] Zhao AJ, Fu JJ, Song XY, Sun XH, Pan YJ, Zhao Y. Analysis of biofilm formation by pathogenic and no-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* at various temperatures and contact surfaces[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(1): 7-14 (in Chinese)
赵爱静, 付娇娇, 宋雪迎, 孙晓红, 潘迎捷, 赵勇. 致病性与非致病性副溶血性弧菌在不同温度和接触材料表面生物被膜形成情况分析[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(1): 7-14
- [33] Shatila F, Yaşa İ, Yalçın HT. Biofilm formation by *Salmonella enterica* strains[J]. Current Microbiology, 2021, 78(4): 1150-1158