

研究报告

鹅源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力基因检测

尹有勤¹ 马德慧^{1,2} 李岩松¹ 蒙小刚¹ 霍晓伟¹ 刘锴^{1,2*}

(1. 内蒙古民族大学动物科学与技术学院 内蒙古 通辽 028000)

(2. 内蒙古自治区肉牛疾病防控工程技术研究中心 内蒙古 通辽 028000)

摘要:【背景】奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)是一种人兽共患机会致病菌,革兰氏阴性,兼性厌氧,呈多形性。【目的】探明内蒙古自治区通辽市某养殖场雏鹅发生死亡的病因,研究致病菌的分类地位和毒力基因携带情况。【方法】通过病原菌的筛查和感染试验确定发病原因,对其16S rRNA基因测序,建立病原菌系统进化树,结合BD Phoenix™ 100全自动微生物鉴定仪对病原菌进行分析鉴定,综合判定致病菌的种类及其分类地位;根据已报道的基因序列合成奇异变形杆菌的*ureC*、*zapA*、*mrpA*、*ucaA*、*rsbA*、*pmfA*、*atfA*、*atfC* 8个毒力基因引物,通过PCR扩增研究病原菌毒力基因携带情况。【结果】致病菌的16S rRNA基因与已报道的奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)相似性在99%以上,通过构建系统进化树和BD Phoenix™ 100全自动微生物鉴定仪鉴定,确定该菌株为*P. mirabilis*并编号为AYQ-1;8种毒力基因在该致病菌中均被检测到;雏鹅腹腔注射感染可导致雏鹅死亡,半致死浓度(LD₅₀)为1.51×10⁷ CFU/mL;药敏试验结果显示,该菌对链霉素、氨曲南和氧氟沙星等19种药物敏感,对万古霉素、青霉素和四环素等15种药物耐药。【结论】AYQ-1经鉴定为鹅奇异变形杆菌,毒力基因型为*ureC*(+)、*zapA*(+)、*mrpA*(+)、*ucaA*(+)、*rsbA*(+)、*pmfA*(+)、*atfA*(+)、*atfC*(+)型。

关键词: 鹅, 奇异变形杆菌, 鉴定, 毒力基因

Isolation, identification of goose *Proteus mirabilis* and its virulence genes detection

YIN You-Qin¹ MA De-Hui^{1,2} LI Yan-Song¹ MENG Xiao-Gang¹
HUO Xiao-Wei¹ LIU Kai^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China)

(2. Inner Mongolia Beef & Cattle Disease Control Center, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China)

Abstract: [Background] *Proteus mirabilis* is a Gram-negative and pleomorphic facultative anaerobe, and it is an opportunistic pathogen of zoonosis. [Objective] To confirm the pathogeny that

Foundation item: Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2016MS0310)

*Corresponding author: E-mail: liukai721026@163.com

Received: November 26, 2017; **Accepted:** April 20, 2018; **Published online** (www.cnki.net): May 09, 2018
基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2016MS0310)

*通信作者: E-mail: liukai721026@163.com

收稿日期: 2017-11-26; 接受日期: 2018-04-20; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-09

causes goslings' death at some geese farm in Tongliao, Inner Mongolia Autonomous Region, and characterize the virulence genes of the pathogenic bacteria. **[Methods]** The pathogenic bacteria were confirmed based on the pathogens screening and artificial challenge experiment, and identified according to 16S rRNA genes sequence and biochemical characteristics. Primers of 8 virulence genes (*ureC*, *zapA*, *mrpA*, *ucaA*, *rsbA*, *pmfA*, *atfA*, *atfC*) were designed according to the sequences of *Proteus mirabilis* reported on the GenBank and used to detect the virulence genes of the pathogenic bacteria by PCR amplification. **[Results]** The pathogenic bacteria isolated from infected gosling was proved to be the pathogeny to *Proteus mirabilis*. Analysis of 16S rRNA gene sequences of the AYQ-1 gave highest identity (99%) to *P. mirabilis* and named AYQ-1. This was further supported by phylogenetic tree and biochemical characteristics, AYQ-1 was identified as *P. mirabilis*. AYQ-1 gave positive PCR results for 8 virulence genes. Intraperitoneal injection with AYQ-1 could lead to goslings' death, with a value of the median lethal dose (LD₅₀) of 1.51×10^7 CFU/mL. Antibiotics sensitivity test showed that among 19 antibiotics tested, AYQ-1 was sensitive to 19 antibiotics such as streptomycin, aztreonam and ofloxacin, but it was resistant to 15 antibiotics such as vancomycin, penicillin and achromycin. **[Conclusion]** The pathogen was identified to be *Proteus mirabilis*, and its virulence genotype are *ureC*(+), *zapA*(+), *mrpA*(+), *ucaA*(+), *rsbA*(+), *pmfA*(+), *atfA*(+), *atfC*(+).

Keywords: Geese, *Proteus mirabilis*, Identification, Virulence genes

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)是一种人兽共患的机会致病菌,在自然界分布广泛,人和动物携带致病菌的机率高,存在于污水、泥土、粪便当中^[1-3]。它可致人和动物的尿道感染,引起尿道炎和肾炎^[4]。同时,大量的研究表明,奇异变形杆菌还是引发婴幼儿急、慢性腹泻和成人慢性腹泻的致病菌^[5]。截至目前,有大量关于奇异变形杆菌潜在毒力基因的报道,主要包括菌毛、“雾蔓”迁徙能力、尿素酶、金属蛋白酶及溶血素等^[6]。关于奇异变形杆菌的研究报告呈逐渐上升趋势,对人的健康安全和畜禽养殖的危害越来越大^[7]。

2017年,通辽市某鹅场送检的18只发病和病死雏鹅,发病雏鹅表现为体温升高、精神欠佳、食欲减退、站立不稳、张口呼吸、呼吸急促、咳嗽、打喷嚏、鼻腔流出粘液、排灰白色和浅绿色稀粪。本实验室从送检的病死雏鹅内脏中分离到一株细菌,对其进行了生化鉴定、耐药性分析、人工感染试验、16S rRNA 基因序列分析,综合鉴定为有耐药性和致病性的鹅源奇异变形杆菌并将其编号为AYQ-1。目前关于鹅源奇异变形杆菌的研究报道较少,本研究对其进行了部分毒力基因检测分析,了解AYQ-1的毒力基因型,以期对该病原的研究与临

床诊断和临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品与试验动物

病死雏鹅由通辽市某鹅场送检,55只1周龄的健康雏鹅(购自于某大型雏鹅孵化场)用于人工感染试验,在实验室暂养7d。

1.1.2 主要试剂和仪器

麦康凯琼脂、SS琼脂、酵母浸粉、葡萄糖、氯化钠、蛋白胨、普通营养琼脂,青岛海博生物技术有限责任公司;16S rRNA 基因引物和8种毒力基因引物均由吉林省库美生物有限公司合成;无菌脱纤维兔血,上海信裕生物技术有限公司;Rxn Buffer、dNTPs、MgCl₂、Taq 酶、6×DNA Loading Buffer, Invitrogen 公司;JM109、18-T Vector、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、EB 终结者、内切酶、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),北京天根生化科技有限公司。电泳仪, Bio-Rad 公司;凝胶成像系统,北京原平皓生物技术有限公司;PCR 仪, Thermo Fisher Scientific 公司;BD Phoenix™ 100 全自动微生物鉴定仪、革兰氏阴性菌鉴定板、鉴定肉汤管, BD 医疗器械有限公司。

1.1.3 参考菌株

从 GenBank 下载了 12 株已发表的奇异变形杆菌的 *atfA*、*atfC*、*pmfA*、*ucaA*、*ureC*、*rsbA*、*zapA*、*mrpA* 基因序列, 作为参考的对比序列(表 1)。

1.1.4 培养基

琼脂浓度为 1% 的普通营养琼脂平板(g/L): 普通营养琼脂 33.0, 琼脂粉 10.0; 普通营养琼脂平板(g/L): 普通营养琼脂 33.0, 琼脂粉 20.0; 麦康凯平板(g/L): 麦康凯琼脂 52.0, 琼脂粉 20.0; SS 平板(g/L): SS 琼脂 62.5, 琼脂粉 20.0; LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 5.0, 氯化钠 5.0; X-Gal 培养基(g/L): 普通营养琼脂 33.0, 琼脂粉 10.0, 20 μg/L 二甲基甲酰胺溶液, 238.31 g/L IPTG; Amp LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 5.0, 氯化钠 5.0; 50 μg/L Amp 溶液; 5% 的脱纤维兔血平板(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂粉 20.0, 50 mL/L 无菌脱纤维兔血。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的鉴定

(1) 病原菌的分离与培养。无菌采集症状典型的雏鹅肝脏和脾脏, 并接种在脱纤维兔血平板中, 37 °C

厌氧培养 24 h 后挑取脱纤维兔血平板上生长的细菌菌落, 涂片、革兰氏染色和显微镜检查; 再将其接种于普通营养平板进行分离、纯化。

(2) 生长特性观察。挑取 1.2.1(1)中在普通营养平板上纯化后的单个菌落接种于麦康凯平板、琼脂浓度为 1% 的普通营养平板、SS 琼脂平板, 37 °C 厌氧培养 24 h 后再观察分离株在各培养基上的生长特性。

(3) 生化鉴定。使用 BD Phoenix™ 100 全自动微生物鉴定仪对菌株进行生化特性鉴定和药物敏感性测试。用无菌棉签从纯培养过夜的普通营养琼脂平板上挑取单个菌落, 在鉴定肉汤管中制成 0.6 麦氏单位的菌悬液, 将制备好的鉴定肉汤管菌悬液倒入革兰氏阴性菌鉴定板中对应的鉴定孔中, 封闭。检测板准备完毕后, 扫描板条, 输入资料, 将检测板放入仪器中反应。试验重复 2 次, 反应结束后仪器自动读卡并打印最终的结果。

1.2.2 人工感染试验

挑取 1.2.1 (1)中纯化后的单菌落于 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 恒温培养 24 h, 用无菌生理盐水 10 倍稀释法稀释菌悬液并进行细菌计数。取健康的雏鹅 55 只(7 日龄), 随机分成 6 组(5 组实

表 1 不同源奇异变形杆菌分离株的背景信息

Table 1 Background information of the downloaded *Protues mirabilis* strains

Strains	Accession No.	Regions	Year	Hosts	Isolation sources
BB2000	CP004022.1	America	2013	-	-
T18	CP017085.1	Zhejiang, China	2017	Homo sapiens	Urine
T12	CP017082.1	Zhejiang, China	2017	Homo sapiens	Sputum
AR_0155	CP021694.1	America	2017	-	-
AR_0159	CP021550.1	America	2017	-	-
AR_0059	CP020052.1	America	2017	-	-
AR_0156	CP021852.1	America	2017	-	-
HI4320	AM942759.1	UK	2008	-	-
CYPV1	CP012675.1	Taiwan, China	2015	Homo sapiens	Urine
CYPM1	CP012674.1	Taiwan, China	2015	Homo sapiens	Urine
AOUC-001	CP015347.1	Italy	2016	Homo sapiens	Blood
Pm7	HM217133.1	Shandong, China	2011	-	Marine environments

注: -: 未找到相关信息。

Note: -: No information.

验组, 1 组对照组), 实验组每组 10 只, 对照组 5 只。将菌悬液制成 4.75×10^4 – 4.75×10^8 CFU/mL 5 个稀释度, 每个稀释度肌肉注射 1 mL; 另外选取 5 只雏鹅肌肉注射无菌 LB 培养基作为对照组。每组雏鹅进行常规的隔离饲养, 并观察雏鹅的临床症状并记录死亡数量, 连续观察 5 d, 取死亡雏鹅的内脏再次进行细菌的分离、纯化和鉴定, 参照熊浩明等方法^[8]计算半数致死量(LD₅₀)。

1.2.3 药物敏感性测试

采用 K-B 纸片扩散法, 用移液枪无菌吸取培养过夜的新鲜菌悬液于普通营养琼脂平板中, 再使用一次性无菌涂布棒将其均匀涂布于整个平板。用无菌镊子取药敏片轻轻贴附于培养基上, 试验设立 2 个平行, 37 °C 培养 18–24 h 后观察并测量抑菌圈直径。试验选用红霉素、氧氟沙星、环丙沙星等多种药物。

1.2.4 16S rRNA 基因 PCR 鉴定

(1) 煮沸法提取细菌 DNA 模板。挑取 1.2.1(2) 中麦康凯平板上的单个菌落, 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养过夜。取菌液 1 mL 于 1.5 mL 的离心管中, 室温 12 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清。加入 1 mL 蒸馏水, 将菌沉淀重新悬浮, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清。再次用相同体积的蒸馏水重悬菌沉淀 2 次, 然后加入 150 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 100 °C 水浴 3 min, 10 000 r/min 离心 2 min 后取上清作为 DNA 模板, –20 °C 或 –80 °C 保存 DNA 提取物^[9]。

(2) 16S rRNA 基因 PCR 扩增。PCR 扩增反应的总体系为 25 μL: ddH₂O 15 μL, 50 ng/μL DNA 模板 1 μL, 10 mmol/L 上、下游引物各 1 μL, 10×Rxn buffer 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 50 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 5 U/μL Taq 酶 2 μL。PCR 扩增条件参照 Shukla 等^[10](94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 退火温度见表 2, 30 s, 72 °C 延伸时间见表 2, 35 个循环; 72 °C 10 min)。取 5 μL PCR 产物于含 EB 终结者的

1.5%的琼脂糖凝胶中 85 V 电泳 35 min, 后在凝胶成像系统下观察结果。

(3) PCR 产物胶回收纯化、连接转化。用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物, 具体操作参照说明书进行。回收 PCR 产物后用 18-T 载体连接后转化至大肠杆菌 JM109 感受态中, 接菌于 X-Gal 培养基 37 °C 培养 18–24 h 后, 挑取白色阳性菌落接菌于 Amp (50 μg/mL)抗性的 LB 培养基中, 培养 12–16 h 后取菌液用质粒提取试剂盒提取质粒。将所提取的质粒酶切鉴定正确后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.5 毒力基因 PCR 检测

(1) 细菌基因组 DNA 的提取参照 1.2.4 (1) 中的方法提取。

(2) 毒力基因引物设计与合成。根据已报道的文献[11], 设计奇异变形杆菌编码尿素酶的功能亚单位(*ureC*)、金属蛋白酶的主要功能亚单位(*zapA*)、MPR 菌毛主要结构亚单位(*mrpA*)、尿道上皮粘附素结构亚单位(*ucaA*)、“雾蔓”迁徙能力调节因子(*rsbA*)、Pmf 菌毛主要结构亚单位(*pmfA*)、适温菌毛结构亚单位(*atfA*)、适温菌毛合成分子引物编码的(*atfC*)等 8 种潜在的毒力基因引物, 由吉林省库美生物有限公司合成。反应条件及引物信息见表 2, PCR 反应体系参照 1.2.4(2), PCR 产物用含 EB 终结者的 1.5%的琼脂糖凝胶中 85 V 电泳 35 min。

1.2.6 16S rRNA 基因与毒力基因序列分析

(1) 16S rRNA 基因序列分析。测序成功后将测得的序列提交至 GenBank 进行 BLAST 比对分析, 然后选取得分最高的几条序列利用 DNASTar 8.0 软件中的 MegAlign 与所测序列进行相似性比对, 并建立系统进化树。

(2) 毒力基因序列分析。将测序所得的 8 种毒力基因序列利用 DNASTar 8.0 软件中的 MegAlign 与表 1 中 12 株参考菌株序列进行相似性比对, 并建立系统进化树, 再利用 MEGA 7.0 进行氨基酸序列分析。

表 2 引物序列及 PCR 扩增条件

Table 2 Sequences of primers and amplification conditions

目的基因 Target gene	引物 Primers	序列 Primers sequence (5'→3')	参考文献 References	PCR 扩增条件 Amplification condition
16S rRNA gene	27F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	[10]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>ureC</i>	<i>ureC</i> -F <i>ureC</i> -R	GTTATTCGTGATGGGATGGG ATAAAGGTGGTTACGCCAG	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>mrpA</i>	<i>mrpA</i> -F <i>mrpA</i> -R	ATTTTCAGGAAACAAAAGATG TTCTTACTGATAAGACATTG	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 39 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>zapA</i>	<i>aapA</i> -F <i>zapA</i> -R	ACCGCAGGAAAACATATAGCCC GCGACTATCTTCCGCATAATCA	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>atfC</i>	<i>atfC</i> -F <i>atfC</i> -R	AGAAAGGGATCCTACAAATTA TATAGCATGCATTTAAATTGCC	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>atfA</i>	<i>atfA</i> -F <i>atfA</i> -R	CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA CTGCTTGATCCGTAATTTTAAACG	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>ucaA</i>	<i>ucaA</i> -F <i>ucaA</i> -R	GTAAAGTTGTTGCGCAAAC TTGAGCCACTGTGGATACA	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>pmfA</i>	<i>pmfA</i> -F <i>pmfA</i> -R	GGATCATCTATAATGAAACTG CTGATAATCAACTTGAAGTT	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min
<i>rsbA</i>	<i>rsbA</i> -F <i>rsbA</i> -R	TCGATTTTCAGTGTGGCCAT CCGAGCTTCATCATGGCTG	[11]	94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 105 s, 35 个循环; 72 °C 10 min

2 结果与分析

2.1 分离株鉴定结果

2.1.1 分离株菌落形态

在麦康凯琼脂平板上形成扁平、边缘不整齐、圆形、无色(不发酵乳糖)半透明菌落(图 1); 在 SS 琼脂培养基上 37 °C 培养过夜, 形成扁平、圆形、

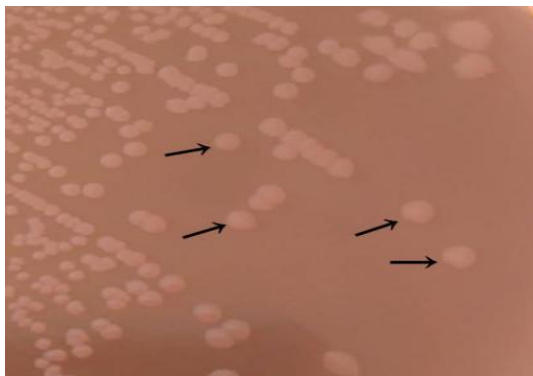


图 1 AYQ-1 在麦康凯培养基上菌落形态

Figure 1 Colony morphology of AYQ-1 on MacConkey culture medium

注: 箭头所指为 AYQ-1 菌落。

Note: The arrows refer to colony morphology of AYQ-1.

中央为黑色, 周围不平整且半透明的菌落(产硫化氢)(图 2)。在普通营养琼脂平板上呈辐射性生长(图 3)。

2.1.2 分离株形态学观察

显微镜观察可见形状不一的革兰氏阴性菌, 其形状多为单个或成对的球状、杆状、球杆状、长杆状的无芽孢菌(图 4)。

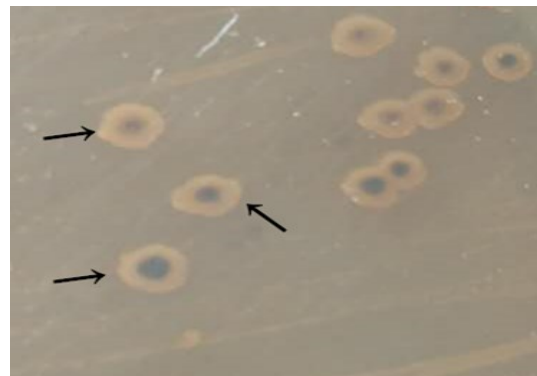


图 2 AYQ-1 在 SS 培养基上的菌落形态

Figure 2 Colony morphology of AYQ-1 on SS culture medium

注: 箭头所指为 AYQ-1 菌落。

Note: The arrows refer to colony morphology of AYQ-1.

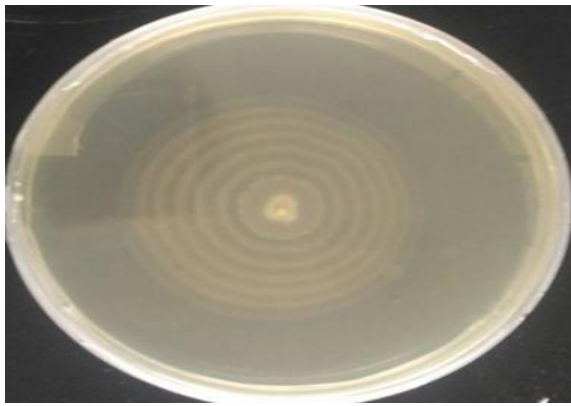


图3 AYQ-1在1%琼脂的普通营养平板上生长情况
Figure 3 Growth situation of AYQ-1 on 1% agar of general nutrition medium

2.2 人工感染及病原菌的再分离

健康的雏鹅腹腔注射菌株 AYQ-1 后, 实验组雏鹅出现精神不振、站立不稳等症状。每天观察雏鹅出现的症状和人工感染死亡数(表 3), 参照熊浩明等^[8]方法计算出 AYQ-1 的 LD₅₀ 为 1.51×10^7 CFU/mL。从死亡雏鹅的内脏内可分离到菌落形态、生化特性、16S rRNA 基因序列都与菌株 AYQ-1 相同的菌株。

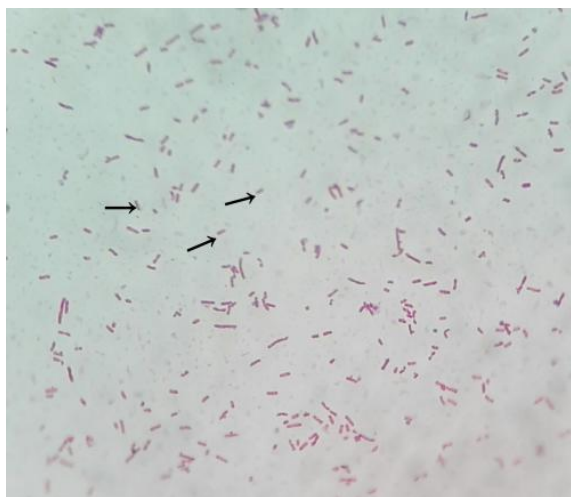


图4 AYQ-1菌体形态(1 000×)
Figure 4 Morphology thallus of AYQ-1 (1 000×)

注: 箭头所指为 AYQ-1 菌体。

Note: The arrows refer to thallus of AYQ-1.

表3 雏鹅腹腔注射感染菌株 AYQ-1 死亡情况统计表
Table 3 Mortality of goslings challenged with isolate AYQ-1 by intraperitoneal injection

注射菌含量 Bacterial dose (CFU/mL)	每日死亡量 Number of goslings dead					死亡数 Mortality
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
4.75×10^4	0	0	0	0	0	0
4.75×10^5	0	0	0	0	0	0
4.75×10^6	0	0	0	0	3	3
4.75×10^7	0	0	2	3	0	5
4.75×10^8	0	3	5	0	0	8
Control group	0	0	0	0	0	0

2.3 生化鉴定结果

利用 BD PhoenixTM 100 全自动微生物鉴定仪对 AYQ-1 进行生化鉴定, AYQ-1 被鉴定为奇异变形杆菌(表 4), 置信度为 99%。

2.4 药物敏感性试验结果

试验采用了 K-B 纸片扩散对菌株 AYQ-1 进行药物敏感性测试, 结果显示: 菌株 AYQ-1 对链霉素、氧氟沙星和氨曲南等 12 种药物高度敏感, 对庆大霉素、新霉素和诺氟沙星等 7 种药物表现为中度敏感, 对万古霉素、青霉素和四环素等 15 种药物耐药(表 5)。

2.5 毒力基因和 16S rRNA 基因 PCR 鉴定结果

16S rRNA 基因的 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像系统下观察 PCR 结果, 可在 1 000–2 000 bp 之间观察到一条带, 与试验预期相符, 测定的产物大小为 1 443 bp (图 5)。

毒力基因用设计的 8 种毒力基因特异性引物进行 PCR 扩增, 经过琼脂凝胶电泳后, 8 种毒力基因均被检测到: *ureC* (292 bp)、*mrpA* (520 bp)、*zapA* (510 bp)、*atfC* (439 bp)、*atfA* (331 bp)、*pmfA* (537 bp)、*ucaA* (764 bp)、*rsbA* (2 297 bp) (图 6)。

2.6 16S rRNA 基因同源性与遗传进化树分析

测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比较分析, 结果与奇异变形杆菌的相似性达 98% 以上。选

取得分较高的奇异变形杆菌序列进行相似性分析,构建系统发育树(图 7)。结果表明:AYQ-1 和 10 个代表菌株相似性均在 98%以上,与 CP017085.1 (中国浙江株)和 CP017082.1 (中国浙江株)相似性最高,分别为 99.7%和 99.8%。系统进化树中分离菌株与 CP017085.1 和 CP017082.1 处于同一分支,亲缘关系较近,进一步证明分离株 AYQ-1 为奇异变形杆菌。

2.7 毒力基因序列分析

毒力基因的测序结果在 NCBI 进行对比分析,结果如下: *ureC* 基因与 *P. mirabilis* (CP017085.1 和

CP017082.1)的相似性达 99%; *mrpA* 基因与 *P. mirabilis* (CP021852.1 和 CP021694.1)的相似性达 99%; *zapA* 基因与 *P. mirabilis* (CP021852.1 和 CP015347.1)的相似性 99%; *atfC* 基因与 *P. mirabilis* (CP004022.1 和 CP026571.1)的相似性达 99%; *atfA* 基因与 *P. mirabilis* (CP026051.1 和 CP026581.1)的相似性达 99%; *pmfA* 基因与 *P. mirabilis* (CP026059.1 和 CP021694.1)的相似性达 100%; *ucaA* 基因与 *P. mirabilis* (CP004022.1 和 CP021852.1)的相似性达 99%; *rsbA* 基因与 *P. mirabilis* (CP017085.1 和 CP017082.1)的相似性达 99%。

表 4 菌株 AYQ-1 生化实验结果

Table 4 Results of biochemical test of strain AYQ-1

生化实验项目 Biochemical tests	结果 Results	生化实验项目 Biochemical tests	结果 Results
BETA-阿洛糖 BALL	-	多粘菌素 B PXB	+
BETA-龙胆二糖 BGEN	-	L-苯丙氨酸-AMC LPHET	-
DEDXTROSE DEX	+	4MU-N-乙酰-BD-氨基葡萄糖苷 NAG	-
D-半乳糖 DGAL	+	L-谷氨酸-AMC LGTA	+
D-果糖 DFRU	-	鸟氨酸 ORN	+
D-葡萄糖 DGUA	+	L-脯氨酸-NA LPROT	+
D-蜜二糖 DMLB	-	GAMMA-L-谷氨酰胺-NA LGGH	+
L-阿拉伯糖 LARA	-	七叶酸乙酸 ESC	-
甲基-B-葡萄糖苷 MBGU	-	福寿草醇 ADO	-
N-乙酰-氨基半乳糖 NGA	-	丙二酸 MLO	-
N-乙酰-葡萄糖胺 NGU	+	ALPHA-酮戊二酸 KGA	+
山梨醇 DSBT	-	顺芷酸 TIG	-
蔗糖 DSUC	-	赖氨酸-丙氨酸-AMC LYALD	-
半乳糖醛酸 GRA	-	戊二酰-甘氨酸-精氨酸-AMC GUGAH	-
麦芽酮糖 MTU	-	甘氨酸-脯氨酸-AMC GLPRB	-
L-鼠李糖多粘菌素 E LRHA	-	乙酸 ACT	+
D-甘露醇 DMNT	-	甘氨酸-AMC GLYB	-
柠檬酸盐 CIT	+	精氨酸-精氨酸-AMC ARARR	+
多粘菌素 CLST	+	L-亮氨酸-AMC LLEUH	+
L-色氨酸-AMC LTRY	-	尿素 S_URE	+
L-焦谷氨酸-AMC LPYR	-	BIS (PNP)磷酸盐 BPHO	+
L-脯氨酸-AMC LPORB	-	PNP-BD=葡萄糖苷 BDGLU	-
L-精氨酸-AMC LARGH	-	H ₂ S	+

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

表 5 药敏试验结果

Table 5 Results of antimicrobial susceptibility tests

抗菌药物 Drugs	药物浓度 Dosage ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感性 Sensitivity
红霉素 Erythromycin	15.00	0	R
庆大霉素 Gentamicin	10.00	14.00	I
新霉素 Norfloxacin	30.00	14.00	I
头孢曲松 Ceftriaxone	30.00	18.00	I
诺氟沙星 Norfloxacin	10.00	13.50	I
氯霉素 Chloramphenicol	30.00	12.00	R
哌拉西林 Piperacillin	100.00	14.20	R
丁胺卡那 Amikacin	30.00	12.00	R
青霉素 Penicillin	10U	0	R
四环素 Achromycin	30.00	0	R
链霉素 Streptomycin	10.00	19.00	S
氧氟沙星 Ofloxacin	5.00	28.00	S
呋喃妥因 Furadantin	300.00	12.30	R
多西环素 Doxycycline	30.00	6.00	R
万古霉素 Vancomycin	30.00	0	R
氨苄西林 Ampicillin	10.00	16.00	I
卡那霉素 Kanamycin	30.00	7.50	R
头孢拉定 Cefradine	30.00	7.00	R
头孢噻肟 Cefotaxime	30.00	25.00	I
甲氧苄氨嘧啶 Trimethoprim	5.00	20.00	S
氨曲南 Aztreonam	10.00	21.00	S
克拉维酸 Clavulanate	3.00	15.00	S
氨苄青霉素 Ampicillin	10.00	18.00	S
头孢唑啉 Cefazolin	30.00	18.00	S
头孢他啶 Ceftazidime	30.00	0	R
粘菌素 Colistin	300.00	15.50	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5.00	16.30	S
亚胺培南 Imipenem	10.00	16.00	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	5.00	18.00	S
莫西沙星 Moxifloxacin	5.00	12.30	I
美罗培南 Meropenem	10.00	17.50	S
头孢吡肟 Cefepime	30.00	8.00	R
复方新诺明 Cotrimexazole	23.00	0	R
阿莫西林 Amoxicillin	20.00	6.00	R

注: R: 耐药; I: 中等敏感; S: 敏感.

Note: R: Resistance; I: Moderate; S: Sensitivity.

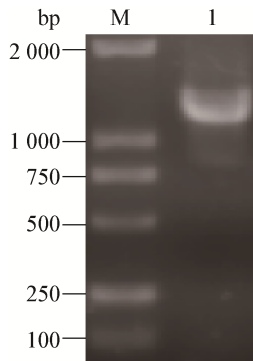


图5 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

Figure 5 Results of 16S rRNA gene by PCR

Note: M: DNA marker DL2000; 1: Product 16S rRNA gene by PCR.

同源性分析结果表明, 菌株 AYQ-1 的 *atfA*、*atfC*、*mrpA*、*pmfA*、*rsbA* 和 *ureC* 基因序列与表 1 中的参考菌株中国台湾株 CYPV1 (CP012675.1)、中国浙江株 T18 (CP017085.1)、中国台湾株 CYPM1 (CP012674.1)、英国株 HI4320 (AM942759.1)、美国株 BB2000 (CP004022.1) 对应基因序列的相似性为 96.9%–99.7%, 遗传进化树处于同一分支, 与表 1 中其它参考菌株相似性均低于 50%; 而 AYQ-1 的 *ucaA* 和 *zapA* 基因序列与参考菌株美国株 AR_0059 (CP020052.1)、美国株 AR_0155 (CP021694.1)、意

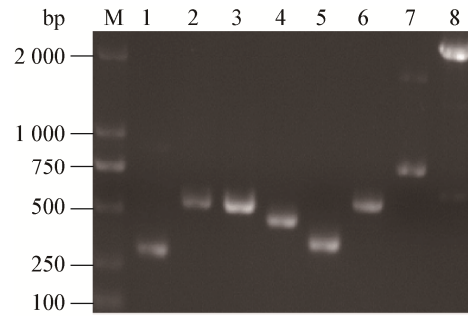


图6 8个毒力基因 PCR 扩增结果

Figure 6 The PCR results of eight kinds of virulence genes

注: M: Marker; 1、2、3、4、5、6、7 和 8 分别用 *ureC*、*mrpA*、*zapA*、*atfC*、*atfA*、*pmfA*、*ucaA*、*rsbA* 基因的引物进行扩增所获的 PCR 产物。

Note: M: DNA marker DL2000; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8: PCR amplification used the primers of *ureC*, *mrpA*, *zapA*, *atfC*, *atfA*, *pmfA*, *ucaA* and *rsbA* gene respectively.

大利株 AOUC-001 (CP015347.1)、中国浙江株 T12 (CP017082.1)、美国株 AR_0159 (CP021550.1)、美国株 AR_0156 (CP021852.1) 对应基因序列的相似性为 97.7%–98.4%, 遗传进化树显示也处于同一分支, 与表 1 中其它参考菌株相似性均低于 50%; 氨基酸序列分析显示, *atfA*、*atfC*、*ureC* 和 *pmfA* 基因未检出变异, *rsbA* 基因序列在 8 位存在碱基 C 的

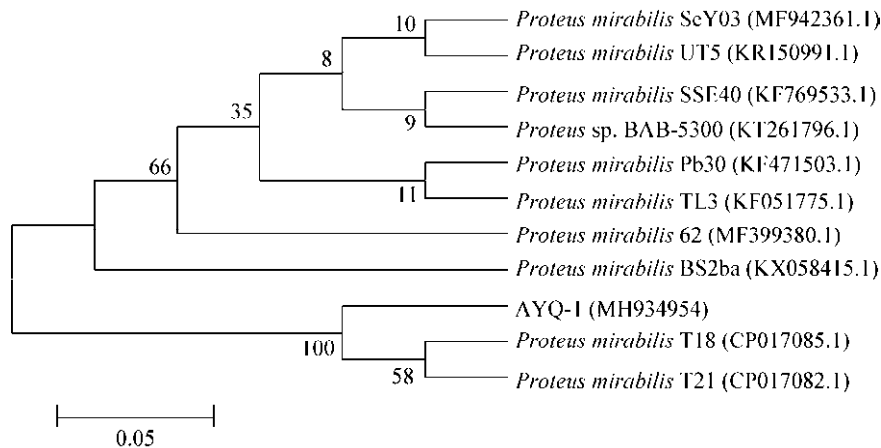


图7 菌株 AYQ-1 的 16S rRNA 基因系统进化树

Figure 7 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain AYQ-1

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

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

缺失, 其所在位置的遗传密码子 CCT 编码脯氨酸, 导致脯氨酸的缺失; *ucaA* 基因序列在 7 位存在碱基 T 的缺失, 其所在位置的遗传密码子 ACT 编码苏氨酸, 导致苏氨酸的缺失; *zapA* 基因序列在 13 位碱基 A 的缺失, 其所在位置的遗传密码子 ATA 编码异亮氨酸, 导致异亮氨酸的缺失, 在 4 位存在 A→G 点突变, 其所在位置的遗传密码子 GAA 编码谷氨酸, GGA 编码甘氨酸; *mrpA* 基因序列在 514、515、516 位存在 A→C、A→G、T→A 点突变, 突变所在位置的遗传密码子 CAA/TAT 分别编码谷氨酰胺和酪氨酸, CAC 编码组氨酸, TGA 为终止密码子, 且在 521 位存在碱基 T 的缺失, 导致异亮氨酸的缺失。

3 讨论与结论

随着畜禽养殖的规模化, 高密度的养殖模式导致各种传染疾病频发, 奇异变形杆菌病日益严重。奇异变形杆菌可感染猪、鸡、鸭、水貂、羔羊和人^[12], 是一种人兽共患机会致病菌。但近几年关于鹅感染奇异变形杆菌的报道是空白的, 本研究首次报道鹅养殖过程中感染奇异变形杆菌致死的病例, 这表明 *P. mirabilis* 的宿主范围在扩大, 需要引起足够的重视^[13]。

本实验从病死的雏鹅体内分离出致病菌, 通过细菌形态学观察、动物致病性试验、BD PhoenixTM 100 全自动微生物鉴定仪检测, 初步鉴定为奇异变形杆菌。再用分子生物学方法测定 16S rRNA 基因序列, 16S rRNA 基因具有的高度保守性和特异性是种属鉴定的分子生物学基础^[14]。16S rRNA 基因序列在 NCBI GenBank 上进行 BLAST 在线比对进一步证明分离菌株 AYQ-1 为 *P. mirabilis*, 同源性比对和系统进化树结果显示菌株 AYQ-1 与人尿源 CP017085.1 (中国浙江株) 的相似性为 99.8%, 遗传进化树处于同一分支, 说明其亲缘关系较近。选择 10 株来源不同的奇异变形杆菌菌株, 来自人、动物和环境, 其中 KR150991.1 株与 CP017082.1 的来源相同, 但地理位置不同, 与分离株 AYQ-1 的相

似性差别较大; KF051775.1 和 MF942361.1 与分离株 AYQ-1 的地理位置相差不大, 但其来源不同, 与分离株 AYQ-1 的相似性也不高。这表明奇异变形杆菌的亲缘关系与地理位置分布和种属之间有一定的关系。

本次试验选取测试的药物并非均适用于养殖, 其中氯霉素、万古霉素、呋喃妥因和头孢类等药物已被农业部列为禁药, 结合养殖场所常用的药物, 推荐使用甲氧苄氨嘧啶、链霉素、氨苄青霉素和环丙沙星对鹅奇异变形杆菌病进行治疗。在本次试验中 AYQ-1 表现耐受的药物的 44%, 这说明 AYQ-1 对多数药物产生了抗药性。奇异变形杆菌产生 β -内酰胺酶^[15-17], 分布于世界各地且类型众多, 包括超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、头孢菌素酶(AmpC)、金属 β -内酰胺酶和碳青霉烯酶^[18-19]。近年来, 奇异变形杆菌对第三代头孢菌素的耐药性^[20]不断攀升, 产 ESBLs 和 AmpC 是奇异变形杆菌对第三代头孢菌素耐药的最重要机制。尤其是一些养殖场长期不合理地使用抗生素, 使得细菌的耐药性变得更加严重^[21], 同时也增加了治疗的难度。因此, 对于该病的预防和治疗显得尤为重要, 当发生感染时, 应当依据药敏试验筛选出来的敏感药物进行治疗^[22]。

杨巧玲等^[11]对 32 株犬腹泻源性的奇异变形杆菌进行了 8 种潜在毒力基因检测, 结果显示 32 株奇异变形杆菌均含有 *atfA*、*atfC*、*mrpA*、*pmfA*、*ureC* 和 *zapA* 基因, 27 株菌含有 *rsbA* 基因, 25 株菌含有 *ucaA* 基因。从 GenBank 上下载了 11 株参考菌株的 *atfA*、*mrpA*、*rsbA*、*pmfA*、*ucaA*、*atfC* 和 *ureC* 基因序列, 下载了 12 株参考菌株的 *zapA* 基因序列, 参考菌株的对应毒力基因间的相似性在 39.8%–100%, 遗传进化树都分为 2 个大分支, 这表明参考菌株间存在一定的差异性, 这可能与不同的血清型和亚型群有关。8 种毒力基因分别与参考菌株对应毒力基因之间存在较大的差异, 说明这 8 种毒力基因保守度不高, 不可作为奇异变形杆菌 PCR 检测的特异性

引物。氨基酸序列分析显示, AYQ-1 的 *atfA*、*atfC*、*ureC* 和 *pmfA* 基因未检出变异, *rsbA*、*ucaA*、*zapA* 和 *mrpA* 基因存在少部分碱基点突变和碱基缺失, 与部分参考菌株相似性较高, 表明从通辽地区雏鹅脏器分离到的 AYQ-1 的这几个毒力基因没有发生大的变异。对病原菌毒力特征的掌握可为其致病性、传播性提供基础^[23], 可为进一步研究核酸疫苗、亚单位疫苗和快速检测试剂盒的开发奠定基础, 为该菌的快速检测和防治奠定基础^[24]。本次试验从病原菌中检测出 *P. mirabilis* 的 8 种潜在毒力基因, 对该菌毒力基因的携带情况有了进一步的了解。

雏鹅感染奇异变形杆菌发病后, 虽然经过及时治疗控制了疫情, 后续没有再发生死亡, 但是会影响雏鹅后期的生长发育, 如果诊断治疗不及时就会造成雏鹅的死亡, 将会造成巨大的经济损失。奇异变形杆菌为条件致病菌, 当动物机体抵抗力下降, 尤其发生其他疾病时更易继发感染或混合感染, 且该菌血清型多达 340–360 个^[25], 免疫预防难度较大。加强对该病原菌引起动物的临床症状、防治技术和免疫原性的研究十分重要, 而本研究为鹅奇异变形杆菌感染的临床诊断、防治提供了一定的基础数据。

REFERENCES

- [1] Lee CC, Wang JL, Lee CH, et al. Clinical benefits of antimicrobial de-escalation in adults with community-onset monomicrobial *Escherichia coli*, *Klebsiella* species and *Proteus mirabilis* bacteremia[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017, 50(3): 371-376
- [2] Zhang WW, Niu ZL, Yin K, et al. Quick identification and quantification of *Proteus mirabilis* by polymerase chain reaction (PCR) assays[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(2): 683-689
- [3] Wang HJ, Ni L, Yang HJ, et al. Isolation and identification of *Proteus mirabilis* from goat and the analysis of 16S rDNA and ZapA gene by PCR-RFLP[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(11): 1594-1598 (in Chinese)
王豪举, 倪莉, 杨红军, 等. 山羊奇异变形杆菌的分离鉴定及 16S rDNA 和 ZapA 基因的 PCR-RFLP 分析[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(11): 1594-1598
- [4] Li XN, Xia X, Li YC, et al. The research progress of *Proteus mirabilis* animal origins[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2011(12): 73-75 (in Chinese)
李欣南, 夏欣, 李永才, 等. 奇异变形杆菌研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2011(12): 73-75
- [5] Christopoulos G, Christopoulou V, Routsias JG, et al. Greek rheumatoid arthritis patients have elevated levels of antibodies against antigens from *Proteus mirabilis*[J]. Clinical Rheumatology, 2017, 36(3): 527-535
- [6] Senior BW, Anderson GA, Morley KD, et al. Evidence that patients with rheumatoid arthritis have asymptomatic 'non-significant' *Proteus mirabilis* bacteriuria more frequently than healthy controls[J]. The Journal of Infection, 1999, 38(2): 99-106
- [7] Barbour EK, Hajj ZG, Hamadeh S, et al. Comparison of phenotypic and virulence genes characteristics in human and chicken isolates of *Proteus mirabilis*[J]. Pathogens and Global Health, 2012, 106(6): 352-357
- [8] Xiong HM, Wei BQ, Wei RJ, et al. Calculation of median lethal dose (LD₅₀) for *Yersinia pestis* by SPSS package[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(11): 1127-1130 (in Chinese)
熊浩明, 魏柏青, 魏荣杰, 等. 用 SPSS 软件计算鼠疫菌半数致死量 (LD₅₀) [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(11): 1127-1130
- [9] Xia LX, Sun WJ, Shen Z, et al. Comparison of genomic DNA extraction from bioleaching acidophiles by two methods: Boiling and kit methods[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(1): 31-35, 17 (in Chinese)
夏乐先, 孙文娟, 沈振, 等. 煮沸裂解法和试剂盒法提取浸矿菌基因组 DNA 的比较[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(1): 31-35, 17
- [10] Shukla J. 16S rRNA PCR for differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospira isolates[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2003, 21(1): 25-30
- [11] Yang QL, Gao J, Luo LP, et al. Virulence tests 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, 等. 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
- [12] Kaca W, Arabski M, Fudala R, et al. Human complement activation by smooth and rough *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides[J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2009, 57(5): 383-391
- [13] Zhang XZ, Zhang ZX, Chang CY, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Proteus mirabilis* from raccoon dog[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(12): 193-195 (in Chinese)
张香斋, 张召兴, 常超越, 等. 貉源奇异变形杆菌分离鉴定及系统发育分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(12): 193-195
- [14] Zhu MH, Zhu RL, Ma RD, et al. Isolation, identification of chicken *Proteus mirabilis* and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(6): 804-808 (in Chinese)
朱明华, 朱瑞良, 马荣德, 等. 鸡奇异变形杆菌的分离鉴定和 16S rRNA 基因序列测定与系统进化分析[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(6): 804-808

- [15] Liu YQ. Analysis of resistance to antibiotics and detection of inducible β -lactamase produced in *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2015, 27(10): 1195-1198 (in Chinese)
刘英其. 奇异变形杆菌 β -内酰胺酶检测及耐药性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(10): 1195-1198
- [16] Lee CC, Lee CH, Hong MY, et al. Propensity-matched analysis of the impact of extended-spectrum β -lactamase production on adults with community-onset *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Proteus mirabilis* bacteremia[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2017, DOI: 10.1016/j.jmii.2017.05.006
- [17] Li WJ, Liu YH, Zhou CL, et al. Distribution and drug resistance of *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2017, 27(12): 2660-2663 (in Chinese)
李文静, 刘晔华, 周春雷, 等. 奇异变形菌分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(12): 2660-2663
- [18] Su GJ, Wang GQ. Detection of ESBLs and AmpC β -lactamase producing *Enterobacter cloacae* and *Proteus mirabilis* and analysis of drug resistance[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2015, 19(5): 719-722 (in Chinese)
苏国娟, 王国庆. 阴沟肠杆菌、奇异变形杆菌 AmpC 酶和 ESBLs 的检测及其耐药性研究[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(5): 719-722
- [19] Sun L. Study on the biological characters, molecular typing and carbapenem resistant mechanisms of *Proteus mirabilis* deficient in swarming motility[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
孙龙. 无迁徙生长碳青霉烯耐药奇异变形杆菌生物学特性、耐药机制及分子分型研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016
- [20] Ying CM, He C, Wang YP, et al. The genotypes of extended-spectrum β -lactamases in 119 clinical isolates of *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2009, 9(5): 343-346 (in Chinese)
应春妹, 何澄, 汪雅萍, 等. 奇异变形杆菌产超广谱 β 内酰胺酶基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5): 343-346
- [21] Tao SL. Study on the resistance and molecular epidemiology in *P. mirabilis* isolates[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Medical University, 2012 (in Chinese)
陶胜来. 临床分离奇异变形杆菌的耐药性及分子流行病学研究[D]. 合肥: 安徽医科大学硕士学位论文, 2012
- [22] Wu XR, Zhou H, Yang Q, et al. Resistance of *Proteus mirabilis* and clinical features of infection by imipenem non-susceptible strains[J]. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26(9): 1035-1039 (in Chinese)
吴晓茹, 周华, 杨青, 等. 奇异变形杆菌耐药性及亚胺培南不敏感株感染的临床特点研究[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(9): 1035-1039
- [23] Cheng JM, Wan MY, Zhou JY, et al. Identification and virulence genes detection of *Edwardsiella tarda* isolated from *Carassius auratus gibelio*[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2380-2390 (in Chinese)
程俊茗, 万明月, 周晋扬, 等. 鲫源迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其毒力基因的检测[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2380-2390
- [24] Cui GL. Phyletic evolution analysis, distribution regularity in chick and the subunit vaccine development of *Proteus mirabilis*[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
崔国林. 奇异变形杆菌的系统发育分析、在雏鸡体内分布规律及亚单位疫苗研制[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2013
- [25] Kaca W, Glenska J, Lechowicz L, et al. Serotyping of *Proteus mirabilis* clinical strains based on lipopolysaccharide O-polysaccharide and core oligosaccharide structures[J]. Biochemistry (Moscow), 2011, 76(7): 851-861