

研究报告

长春地区鸡源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力分析

王涛[#], 马轲[#], 张建刚, 蔺小奇, 刘真真, 杨勇军^{*}

吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062

王涛, 马轲, 张建刚, 蔺小奇, 刘真真, 杨勇军. 长春地区鸡源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 4987-4998

Wang Tao, Ma Ke, Zhang Jiangan, Lin Xiaoqi, Liu Zhenzhen, Yang Yongjun. Isolation, identification, and virulence analysis of a *Proteus mirabilis* strain from chicken in Changchun[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 4987-4998

摘要:【背景】奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)是一种机会致病菌,广泛存在于周围环境中,常导致动物和人类感染。【目的】探究吉林省长春地区某养鸡场病鸡死亡原因,为疾病防控提供参考。【方法】从病死青年鸡脏器分离到病原菌 TSA-1,通过革兰氏染色、生化试验和 16S rRNA 基因序列鉴定,并进行药敏试验、毒力基因检测、细胞毒性和黏附性试验、大蜡螟攻毒试验研究。【结果】分离株 TSA-1 在镜下呈短杆状、球状的革兰氏阴性菌,生化特性与奇异变形杆菌相一致,16S rRNA 基因序列比对显示与奇异变形杆菌相似度为 100%;药敏试验结果显示分离株 TSA-1 对氨苄西林、四环素、卡那霉素、头孢唑林等 14 种药物耐药,对环丙沙星、恩诺沙星等 7 种药物敏感;分离株还具有较强的生物被膜形成能力,携带 *ireA*、*ucaA*、*pmfA*、*atfA*、*ptA*、*zapA*、*hpmA* 和 *flhC* 这 8 种毒力基因,并对巨噬细胞 RAW 264.7 表现出细胞毒性,而且对 Caco-2 细胞具有很强的黏附作用;同时对大蜡螟幼虫表现出比禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli* O78, APEC-O78)更强的致死作用。【结论】从病死鸡脏器分离得到的奇异变形杆菌 TSA-1 具有多重耐药性,并携带多种毒力基因,对细胞和大蜡螟幼虫表现出强毒性作用,说明该菌是引起病鸡死亡的主要致病菌之一,应引起重视。

关键词: 鸡; 奇异变形杆菌; 毒力基因; 致病性; 大蜡螟幼虫

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32070119, 31972682)

#对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32070119, 31972682)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: youngjune@jlu.edu.cn

Received: 2022-09-01; Accepted: 2022-09-21; Published online: 2022-10-18

Isolation, identification, and virulence analysis of a *Proteus mirabilis* strain from chicken in Changchun

WANG Tao[#], MA Ke[#], ZHANG Jianguang, LIN Xiaoqi, LIU Zhenzhen, YANG Yongjun^{*}

College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] *Proteus mirabilis* is an opportunistic pathogen ubiquitous in the environment and often causes infections in animals and humans. [Objective] To explore the cause of death of sick chickens in a chicken farm in Changchun city, Jilin province, and provide reference for disease prevention and control. [Methods] The pathogenic bacterial strain TSA-1 was isolated from the organs of dead young chickens and identified by Gram staining, biochemical tests, and 16S rRNA gene sequencing. Furthermore, drug sensitivity test, virulence gene detection, cytotoxicity and adhesion tests, and challenge in larvae of *Galleria mellonella* were performed for this strain. [Results] TSA-1 was a short rod-shaped or spherical Gram-negative bacterium, with the biochemical properties consistent with those of *P. mirabilis*. The 16S rRNA sequence alignment showed that TSA-1 shared the similarity of 100% with *P. mirabilis*. The drug susceptibility test results showed that TSA-1 was resistant to 14 antibiotics including ampicillin, tetracycline, kanamycin, and cefazolin and sensitive to 7 antibiotics including ciprofloxacin and enrofloxacin. The strain had strong biofilm formation ability and carried 8 virulence genes: *ireA*, *ucaA*, *pmfA*, *atfA*, *ptA*, *zapA*, *hpmA* and *flhC*. It showed cytotoxicity to RAW 264.7 macrophages and had strong adhesion to Caco-2 cells. In addition, it had stronger lethal effect on larvae of *G. mellonella* than avian pathogenic *Escherichia coli* O78. [Conclusion] *P. mirabilis* TSA-1 isolated from the organs of dead chickens has multi-drug resistance and carries a variety of virulence genes. It is the one of the major pathogenic bacteria causing chicken death and deserves more attention.

Keywords: chicken; *Proteus mirabilis*; virulence gene; pathogenicity; larvae of *Galleria mellonella*

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)是广泛存在于多种动物肠道中的一种条件致病菌,可以引起动物和人发生食物中毒、泌尿道感染、腹膜炎和败血症等疾病^[1],并对狗、猫和鱼类等动物的尿路感染表现出较高的死亡率^[2]。奇异变形杆菌病在禽类中发病较多,其中种鸡和蛋鸡最容易感染,而且各日龄鸡均可感染,雏鸡感染可导致大规模死亡,青年鸡和成年鸡感染可导致生长缓慢或停止,产蛋下降,给养殖户造成重大的经济损失,近年来报道奇异变形杆菌的耐药性不断增强^[3]。因此,研究鸡源奇异变形杆菌的耐药性、毒力因子、生物被膜形成能力等生物学特性非常必要。

本试验从长春地区养鸡场病死鸡脏器分离得到病原菌 TSA-1,并对分离菌株进行革兰氏染色、生化和 16S rRNA 基因序列鉴定,同时进行药敏试验、毒力基因检测、细胞毒性和黏附性试验、大蜡螟攻毒试验研究,以期对奇异变形杆菌的防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料、实验昆虫及细胞来源

病料来源于 2021 年 6 月长春地区养鸡场病死鸡。大蜡螟幼虫采购于天津惠裕德生物科技有限公司,体重为 250–300 mg,全身为乳白色无黑

色斑点, 7日龄, 放置于 37 °C 黑暗环境下培养。

本试验所用的大肠杆菌 078 (CVCC1418) 由付本懂教授惠赠; 小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW 264.7、人结直肠腺癌细胞系 Caco-2 均由本实验室保藏。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

SS 琼脂培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 胎牛血清、DMEM 培养基干粉, Gemini 公司; 酵母提取物和胰蛋白胨, Oxoid 公司; 琼脂粉, Coolaber 公司; 微量生化发酵管、抗菌药敏纸片, 杭州微生物试剂有限公司; 青霉素、链霉素, 源叶生物有限公司; 0.1% 结晶紫染色液、CCK-8 试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪, 应用生物系统公司; 电泳仪、凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化及培养特性

无菌采集新鲜病死青年鸡的肝脏、脾脏、肺脏和心脏组织, 剪取小块组织放入 2 mL 离心管, 添加磁珠和无菌的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)进行研磨。取出后于 SS 琼脂培养基上划线, 37 °C 倒置培养 12 h。选取形态特征一致且中间有黑色金属光泽的菌落进行划线纯化, 将纯化后的单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 吸取菌液进行革兰氏染色镜检。

1.2.2 分离菌株的生化鉴定

参照文献[4], 将纯化后的分离菌株在 LB 平板上划线, 37 °C 倒置培养过夜, 挑取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 4 h 左右至对数期, 取出后使用无菌 PBS 调节菌液 OD_{600} 值为 1.0 (1×10^9 CFU/mL), 每个生化鉴定管加入 50 μ L 菌液, 封口置于 37 °C 培养 24–48 h, 观察结果。

1.2.3 分离菌株的 16S rRNA 基因序列鉴定及系统发育树分析

使用细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA 作为 PCR 模板, 采用细菌通用引物扩增细菌 16S rRNA 基因片段, 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')由长春库美生物有限公司合成。PCR 反应体系: 2×Premix Taq 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 细菌基因组模板(100 ng/ μ L) 1 μ L, 添加超纯水至 50 μ L。PCR 反应条件按照 TaKaRa 公司 Premix Taq 试剂说明书设定。将 PCR 产物送至长春库美生物有限公司测序。将测序结果使用 NCBI 进行序列相似度分析, 选取相似度较高的前 11 株序列, 利用 MEGA-X 软件的邻接法构建菌株的系统发育树。

1.2.4 分离菌株的生长曲线测定

采用比浊法测定分离菌的生长曲线, 同步步骤 1.2.2 制备 OD_{600} 值为 1.0 的菌液。按 1% (体积分数)转接于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 每隔 1 h 吸取 100 μ L 采用分光光度计测定 OD_{600} 值, 以培养时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标, 使用 GraphPad 7.0 软件绘制菌株生长曲线。

1.2.5 分离菌株的药敏试验

采用 Kirly-Baue 纸片扩散法进行实验, 同步步骤 1.2.2 制备 OD_{600} 值为 1.0 的菌液。吸取 50 μ L 菌液于 LB 平板上涂布均匀, 将药敏纸片贴于平板上, 37 °C 倒置培养 24 h, 观察结果并测量抑菌圈直径, 每个抑菌圈测量 3 次。

1.2.6 分离菌株的部分毒力基因检测

参考 Hernandez 等^[5-6]的毒力基因检测方法, 设计 *ireA*、*mrpA*、*ucaA*、*pmfA*、*atfA*、*ptA*、*zapA*、*hpmA*、*hlyA*、*flhC* 等 10 种毒力基因的引物, 并交由长春库美生物有限公司合成。引物名称及序列、退火温度见表 1, 使用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA 为模板, PCR 扩

表 1 毒力基因引物信息

Table 1 Primer information of virulence gene

基因名称	序列	片段长度	退火温度
Gene name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>ireA</i>	F: ACTACGATAACGAGCGCCAG R: GCCCTAACTGGGGGAATACG	681	60
<i>mrpA</i>	F: GAGCCATTCAATTAGGAATAATCCA R: AGCTCTGTACTTCCTTGACAGA	648	58
<i>ucaA</i>	F: GCTTTTACATCCCCAGCGGT R: GCTGCATTTGCTGGCTCATC	476	60
<i>pmfA</i>	F: CAAATTA ATCTAGAACCACTC R: ATTATAGAGGATCCCTTGAAGGTA	617	54
<i>atfA</i>	F: CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA R: CTGCTTGGATCCGTAATTTTAAACG	382	50
<i>ptA</i>	F: CCACTGCGATTATCCGCTCT R: ATCGGCAGAAGTGACAAGCA	686	60
<i>zapA</i>	F: TATCGTCTCCTTCGCCTCCA R: TGGCGCAAATACGACTACCA	332	59
<i>hpmA</i>	F: GTTGAGGGGCGTTATCAAGAGTC R: GAACTGTTTTGCCCTTTTGTGC	709	55
<i>hlyA</i>	F: AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT R: ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	1 177	63
<i>flhC</i>	F: ATGAGTGAGAAAAGTATCGTCCG R: TCACATTGCAAACCTGTTCAAGAC	512	58

增检测上述 10 种毒力基因。PCR 反应体系：2×Premix Taq 10 μL，上、下游引物(10 μmol/L) 各 1 μL，细菌基因组模板(100 ng/μL) 1 μL，添加超纯水至 20 μL。PCR 反应条件按照 TaKaRa 公司 Premix Taq 试剂说明书设定，PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 分离菌株的生物被膜形成能力检测

细菌生物被膜形成根据 Han 等^[7-8]的检测方法，同步骤 1.2.2 制备 OD_{600} 值为 1.0 的菌液。使用 LB 培养基调节菌液 OD_{600} 值为 0.1，吸取 200 μL 菌液加入 96 孔板中，设置 4 个重复，使用 LB 设置 3 个阴性对照。37 °C 培养 24 h 后弃掉上清，用 PBS 洗 3 次，每孔加入 200 μL 0.1% 结晶紫染色液，37 °C 培养箱静置 30 min，取出后弃结晶紫染液，每孔加入 200 μL PBS 洗涤，重复 3 次，室温倒置 5 min 晾干孔内液体，每孔加入 100 μL 95%乙醇脱色 20 min，使用酶标

仪测定 OD_{570} 值。

1.2.8 分离菌株上清对 RAW 264.7 细胞的毒性作用

根据 Konowalchuk 等^[9]的细胞毒性检测方法，将分离菌株在 LB 平板上划线，37 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中，37 °C、200 r/min 培养 24 h，4 °C、13 000×g 离心 10 min 收集无细菌上清液(cell-free culture supernatant, CFS)，使用 0.22 μm 的滤膜过滤备用。将 RAW 264.7 细胞消化后加入 96 孔板中，浓度为 1×10^5 cell/孔，置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h。弃掉细胞培养基，将过滤的细菌上清使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基按 10、4、2 倍稀释，加入 96 孔板中，使用相应稀释后的 LB 液体培养基为阴性对照，每个梯度设置 3 个重复，置于细胞培养箱中孵育 48 h。取出后弃掉细胞培养基，每孔添加

100 μL 无胎牛血清的 DMEM 培养基, 10 μL CCK-8 检测试剂, 细胞培养箱孵育 1–1.5 h, 酶标仪测定 OD_{450} 值。

1.2.9 分离菌株对 Caco-2 细胞的黏附作用

根据 Cravioto 等^[10-11]评估菌株对 Caco-2 细胞的黏附性, 同步步骤 1.2.2 制备 OD_{600} 值为 1.0 的菌液。按 1% 转接于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 4 h 至对数期, 取出后 7 000 $\times g$ 离心 3 min 收集菌体, 加入无菌的 PBS 重悬, 离心后弃 PBS, 重复洗涤 2 次, 用无血清和双抗的 DMEM 培养基调节菌液 OD_{600} 值为 1.0, 并将菌液进行 10^2 、 10^3 、 10^4 稀释。将消化计数后的 Caco-2 细胞按每孔 1×10^4 cell/孔加入 96 孔板中, 细胞培养箱中孵育 12 h 待其贴壁, 弃掉细胞培养基, 使用无血清和双抗的 DMEM 培养基洗 2 次, 每孔加入使用 DMEM 培养基稀释的 100 μL 菌液, 设置 3 个稀释度, 分别为 10^2 、 10^3 、 10^4 稀释, 使得细菌与细胞的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100、10、1, 每个稀释度设置 3 个重复, 分别设置 3 个阳性和阴性对照孔。细胞培养箱中孵育 3 h, 弃掉 DMEM 培养基, 使用无菌的 PBS 洗 3 次, 加入 100 μL 过滤除菌的 0.1% Triton X-100 溶液处理 5 min。然后使用移液器反复吹打, 吸出后用无菌的 PBS 溶液 10 倍稀释, 取 100 μL 在 LB 琼脂平板上涂布均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 统计菌落数, 计算每孔细菌数相对于初始菌落数的百分比, 即为黏附率。

1.2.10 分离菌株的大蜡螟幼虫毒性试验

根据 Alghoribi 等^[12]的方法评估菌株对大蜡螟的毒性大小。大蜡螟幼虫从公司购买后在黑暗中储存, 在一周内使用, 选择重量在 250–300 mg、通体乳白色、无黑色斑点的幼虫进行分组, 将分离菌株和禽致病性大肠杆菌 (APEC-O78) 在 LB 平板上划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养

过夜。挑取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 6 h 至对数期。然后用无菌 PBS 调节菌液 OD_{600} 值为 1.0, 按 1% 转接于 3 mL LB 液体培养基中培养 4 h 至对数期。取出后 7 000 $\times g$ 离心 3 min 收集菌体, 加入无菌的 PBS 重悬, 再次离心后弃置 PBS, 重复洗涤 2 次, 将分离株菌液浓度调节为 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 CFU/mL, 将 APEC-O78 的菌液浓度调节为 1×10^6 CFU/mL 作为阳性对照, 设置 PBS 对照组, 共 7 组, 每组 10 只大蜡螟幼虫。使用微量注射泵和注射器在每只大蜡螟幼虫左下后腹足注射 10 μL 菌液, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境中培养, 每 12 h 观察记录幼虫死亡数量, 当使用移液器枪头轻轻刺激幼虫未表现出任何动作时就认为幼虫已经死亡, 重复 3 次实验, 统计数据。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离鉴定及培养特性

选取 SS 琼脂培养基上生长为中间略凸起、光滑且具有黑色中心的菌落于 LB 琼脂培养基上划线继续纯化(图 1A), 可见其在 LB 琼脂培养基上呈迁徙性生长现象(图 1B), 挑取单菌落革兰氏染色镜检, 可观察到呈球状、棒状、长杆状不规则的革兰氏阴性菌(图 2), 编号为 TSA-1。

2.2 分离菌株的生化鉴定结果

生化鉴定结果如表 2 所示, TSA-1 菌株能发酵木糖、葡萄糖, 分解尿素、精氨酸和鸟氨酸, 产生硫化氢, 不能发酵麦芽糖和蔗糖, 不产生靛基质, 氧化酶试验阴性, 初步判定为奇异变形杆菌。

2.3 分离菌株 16S rRNA 基因序列鉴定及系统发育树分析

以分离菌株 TSA-1 的 DNA 为模板, 使用细菌 16S rRNA 基因序列通用引物扩增, 可见

大小约为 1 460 bp 的特异性条带(图 3), 扩增产物送至长春库美生物有限公司测序, 测序结果使用 NCBI 的 BLAST 进行序列相似性比对, 结果与奇异变形杆菌 ATCC 29906 (NR_114419.1) 16S rRNA 基因序列相似度为 100%, 挑选 11 株

序列相似度高的参考菌株序列, 使用 MEGA-X 软件进行同源性比对, 采用邻接法构建菌株 TSA-1 的系统发育树(图 4), 结果显示, 菌株 TSA-1 为奇异变形杆菌。

表 2 菌株 TSA-1 生化鉴定结果

Table 2 Biochemical identification results of strain TSA-1

检测项目	结果	检测项目	结果
Test item	Result	Test item	Result
精氨酸水解酶	+	靛基质	-
Arginine hydrolase		Indol	
鸟氨酸脱羧酶	+	β -半乳糖苷酶	-
Ornithine decarboxylase		β -galactosidase	
赖氨酸脱羧酶	+	蔗糖	-
Lysine decarboxylase		Sucrose	
氧化酶 Oxidase	-	麦芽糖 Maltose	-
Citrate	-	木糖 Xylose	+
硝酸盐(还原)	-	葡萄糖	+
Nitrate (reduction)		Glucose	
尿素	+	硫化氢产生	+
Urea		Hydrogen sulfide generation	

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

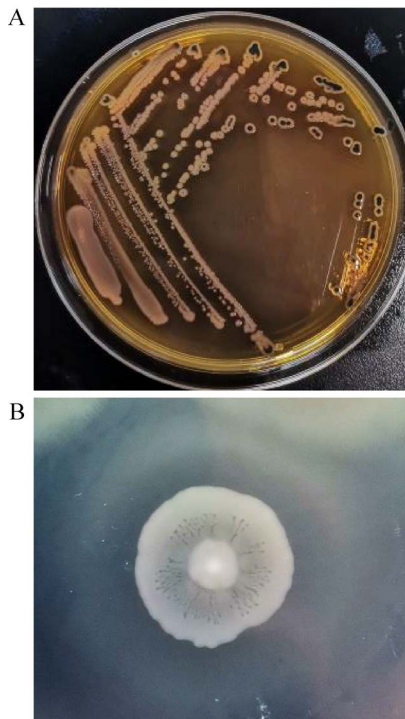


图 1 分离菌的形态特征 A: SS 培养基上的菌落形态; B: LB 琼脂培养基上的菌落形态

Figure 1 Morphological characteristics of isolated bacteria. A: Colony morphology on SS medium; B: Colony morphology on LB agar medium.

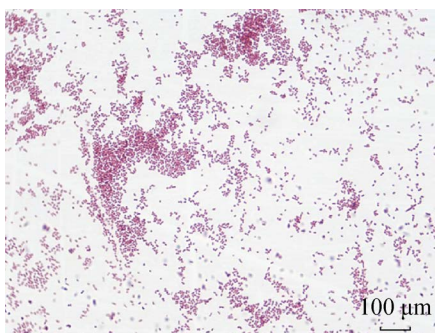


图 2 TSA-1 菌株革兰氏染色镜检图(100 \times)

Figure 2 Gram staining microscopic examination of TSA-1 strain (100 \times).

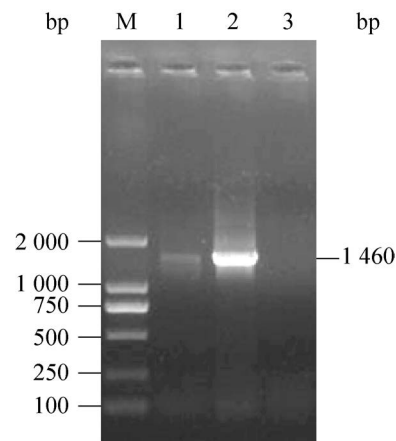


图 3 TSA-1 菌株 16S rRNA 基因序列扩增 M: DL2000 DNA Marker; 1-2: TSA-1 16S rRNA 基因扩增产物; 3: 阴性对照

Figure 3 Amplification of 16S rRNA gene sequence of TSA-1 strain. M: DL2000 DNA Marker; 1-2: TSA-1 16S rRNA gene amplification products; 3: Negative control.

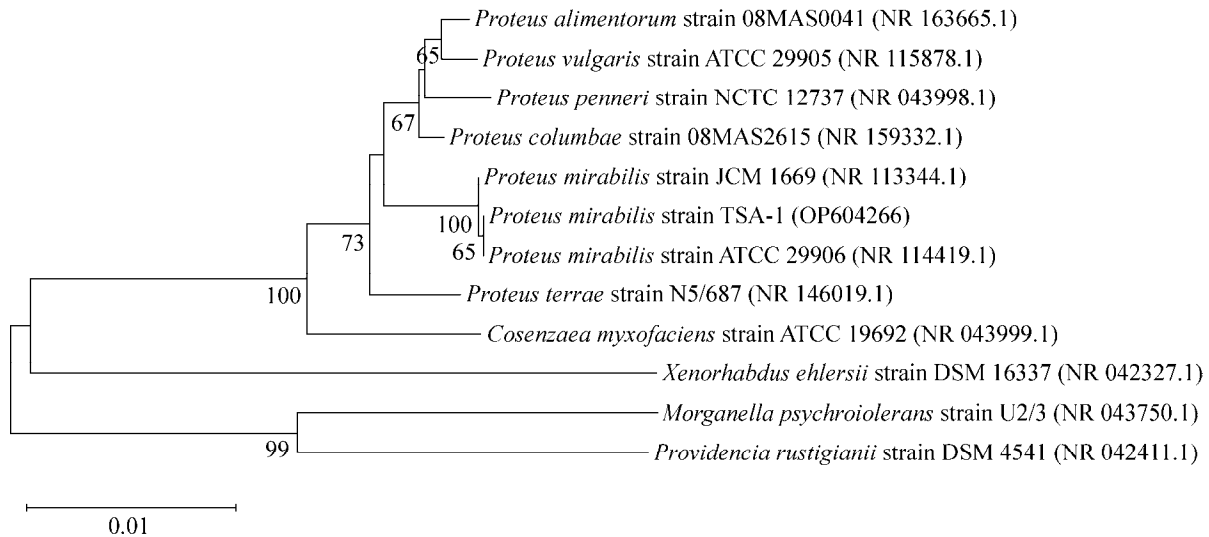


图4 分离菌株 TSA-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 标尺为序列差异的分支长度; 节点处的数字为 bootstrap 值; 括号内的数字为 GenBank 登录号

Figure 4 Phylogenetic tree of isolated strain TSA-1 based on 16S rRNA gene sequence. Bars indicate nucleotide; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; Numbers in parenthesis represent GenBank accession number.

2.4 分离菌株的生长曲线

使用紫外分光光度计测定后绘制分离菌株 TSA-1 的生长曲线(图 5), 显示该菌株的对数生长期为 2-8 h, 稳定期为 8-36 h, 36 h 后进入衰亡期。

2.5 分离菌株的药敏试验结果

选用 22 种药敏片对分离菌株 TSA-1 进行药敏试验, 根据美国临床实验室标准化委员会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 药敏试验判定标准(<https://>

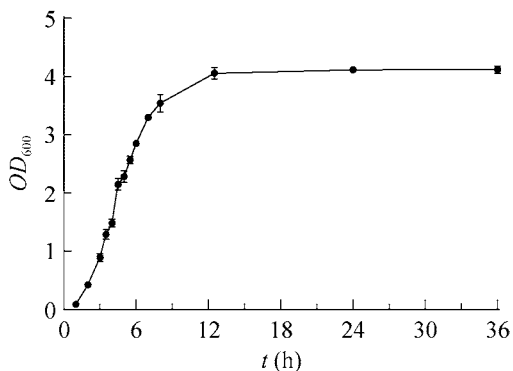


图5 分离菌株 TSA-1 的生长曲线

Figure 5 Growth curve of isolated strain TSA-1.

clsi.org/), 结果显示, 菌株 TSA-1 对氨苄西林、羧苄西林、头孢唑林、氯霉素、卡那霉素等 14 种药物耐药, 对头孢他啶、丁胺卡那、环丙沙星等 7 种药物敏感(表 3)。表明分离菌株 TSA-1 具有多重耐药性。

2.6 分离菌株的部分毒力基因检测结果

以分离菌株 TSA-1 基因组 DNA 为模板, 采用设计的特异性引物通过 PCR 检测毒力基因(图 6)。结果显示, *ireA* (681 bp)、*ucaA* (476 bp)、*pmfA* (617 bp)、*atfA* (382 bp)、*ptA* (686 bp)、*zapA* (332 bp)、*hpmA* (709 bp)、*flhC* (512 bp) 这 8 种毒力基因均能扩增出相应条带, 而且与预期片段大小一致, *mrpA* (648 bp) 和 *hlyA* (1 177 bp) 毒力因子未检测出相应条带。

2.7 分离菌株的生物被膜形成能力检测结果

根据 Han 等^[7-8]的方法评估 TSA-1 的生物被膜形成能力, 以 OD_0 为评判基准, 即 OD_0 为空白对照孔的平均 OD_{570} 值加上 3 倍的标准差(SD),

表 3 菌株 TSA-1 药敏试验结果

Table 3 Results of drug sensitivity test of strain TSA-1

名称 Name	药敏片含量 Disc concentration ($\mu\text{g}/\text{pill}$)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感性 Sensitivity	名称 Name	药敏片含量 Disc concentration ($\mu\text{g}/\text{pill}$)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感性 Sensitivity
羧苄西林 Carbenicillin	10	14.81 \pm 0.22	R	丁胺卡那 Amikacin	30	17.21 \pm 0.31	S
氨苄西林 Ampicillin	10	—	R	新霉素 Neomycin	30	10.22 \pm 0.04	R
哌拉西林 Piperacillin	100	21.78 \pm 0.06	S	氯霉素 Chloramphenicol	30	12.12 \pm 0.24	R
头孢唑林 Cefamezin	30	9.82 \pm 0.30	R	米诺环素 Minocycline	30	7.83 \pm 0.05	R
头孢呋辛 Cefuroxime	30	10.12 \pm 0.03	R	庆大霉素 Gentamicin	10	9.44 \pm 0.02	R
头孢曲松 Ceftriaxone	30	23.25 \pm 0.04	S	卡那霉素 Kanamycin	30	—	R
头孢哌酮 Cefoperazone	75	21.83 \pm 0.25	I	诺氟沙星 Norfloxacin	10	18.12 \pm 0.23	S
头孢拉定 Cephadrine	30	9.12 \pm 0.02	R	氧氟沙星 Ofloxacin	5	17.11 \pm 0.15	S
头孢他啶 Ceftazidime	30	22.93 \pm 0.25	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	22.42 \pm 0.23	S
复方新诺明 Sulfamethoxazole	30	—	R	头孢氨苄 Cephalexin	30	12.36 \pm 0.03	R
四环素 Tetracycline	30	—	R	多西环素 Doxycycline	30	—	R

注：—：无抑菌圈；R：耐药；I：中度敏感；S：敏感

Note: —: No inhibition zone; R: Resistant; I: Moderately susceptible; S: Susceptible.

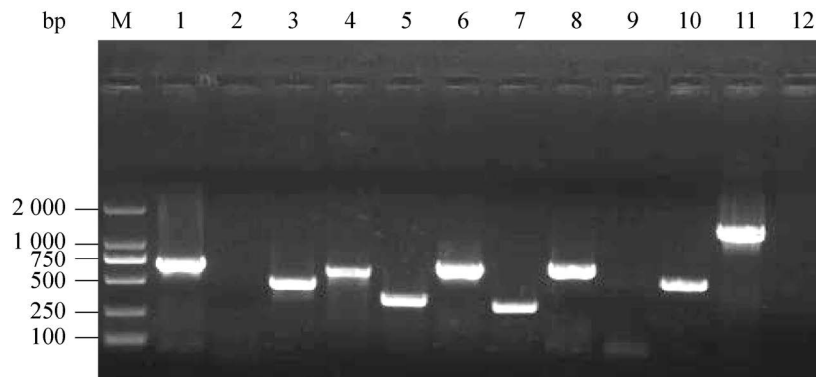


图 6 TSA-1 菌株的毒力因子检测 M: DL2000 DNA Marker; 1: *ireA*; 2: *mrpA*; 3: *ucaA*; 4: *pmfA*; 5: *atfA*; 6: *ptA*; 7: *zapA*; 8: *hpmA*; 9: *hlyA*; 10: *flhC*; 11: 阳性对照; 12: 阴性对照

Figure 6 Detection of virulence factors on TSA-1 strain. M: DL2000 DNA Marker; 1: *ireA*; 2: *mrpA*; 3: *ucaA*; 4: *pmfA*; 5: *atfA*; 6: *ptA*; 7: *zapA*; 8: *hpmA*; 9: *hlyA*; 10: *flhC*; 11: Positive; 12: Negative.

当 $OD_{570} < OD_0$ 时不产生生物被膜, 当 $OD_0 < OD_{570} < 3OD_0$ 时为弱生物被膜形成能力, 当 $OD_{570} > 3OD_0$ 时为强生物被膜形成能力。试验结果表明, 分离菌株 TSA-1 具有强生物被膜形成能力。

2.8 分离菌株上清对 RAW 264.7 细胞的毒性作用结果

根据 Konowalchuk 等^[9]的方法所得的图 7 结果显示, 当分离菌株 TSA-1 的 CFS 占比为 50% 时, RAW 264.7 细胞的存活率仅为 34.67%, 表明培养 24 h 的 TSA-1 分离株 CFS 对 RAW 264.7 细胞具有细胞毒性。

2.9 分离菌株对 Caco-2 细胞的黏附作用结果

根据 Rocha-Mendoza 等^[11]的评估方法和图 8 结果显示, 当 MOI=1 时, 菌株 TSA-1 对 Caco-2 细胞的黏附率为 98%, 具有很强的黏附作用。

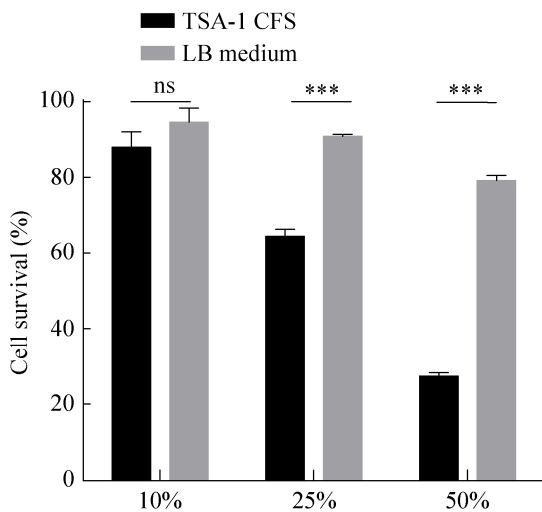


图 7 TSA-1 菌株培养上清的细胞毒性检测 ns: 试验组与对照组无差异; ***: 试验组与对照组差异极显著 ($P < 0.001$)

Figure 7 Cytotoxicity test of TSA-1 strain culture supernatant. ns: No difference between the test group and the control group; ***: Difference between the test group and the control group is extremely significant ($P < 0.001$).

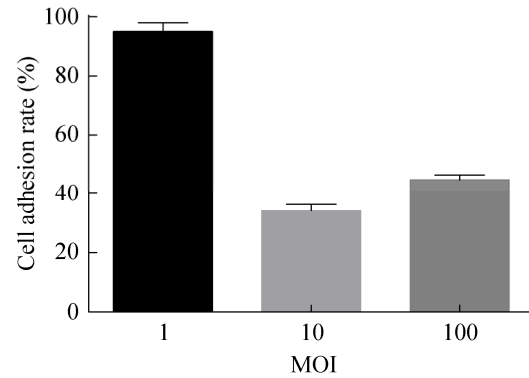


图 8 TSA-1 菌株对 Caco-2 细胞的黏附作用
Figure 8 Adhesion of TSA-1 strain to Caco-2 cells.

2.10 分离菌株的大蜡螟毒性试验结果

根据图 9 试验结果显示, 当大蜡螟注射 $10 \mu\text{L}$ TSA-1 菌液浓度为 1×10^3 CFU/mL 时, 致死率为 100%; 当 TSA-1 菌液浓度为 1×10^2 CFU/mL 时, 致死率仍然达到了 80%; 而注射 $10 \mu\text{L}$ APEC-O78 菌液浓度为 1×10^4 CFU/mL 时, 大蜡螟死亡率为 40%, 表明分离株 TSA-1 对大蜡螟具有很强的致死作用。

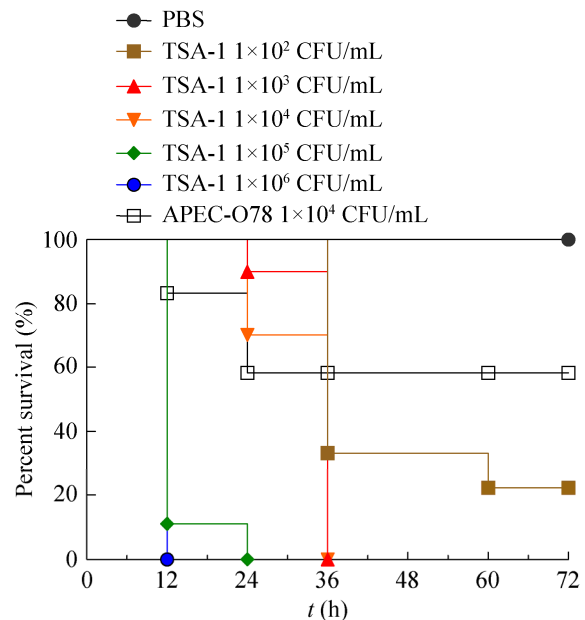


图 9 TSA-1 菌株对大蜡螟幼虫的毒性试验
Figure 9 Toxicity test of TSA-1 strain to larvae of *Galleria mellonella*.

3 讨论

防治细菌性疾病最有效的措施之一是选择合适的抗菌药物,本试验从长春地区养鸡场病死鸡分离得到的奇异变形杆菌 TSA-1 对氨苄西林、四环素等 14 种药物耐药,但有研究显示,奇异变形杆菌对氨苄西林、四环素、哌拉西林等药物敏感,该菌株耐药率明显高于早期研究中的报道^[13]。奇异变形杆菌 TSA-1 耐药率为 63.6%,杨霞等^[14]报道的鸭源奇异变形杆菌 GZGY2020 耐药率为 88.9%,而且耐药性与本试验结果一致,耐药形势严峻。因此,在畜禽养殖过程中应严格遵守兽医管理部门制定的抗生素使用条例,响应国家禁抗、限抗的号召,合理使用抗菌药物,避免更多耐药性的产生。奇异变形杆菌 TSA-1 对第一代和第二代头孢类药物均产生了耐药性,对第三代头孢类药物头孢他啶、头孢曲松敏感,对头孢哌酮为中度敏感,表明其对第三代头孢类药物逐步产生耐药性,这与张萍等^[15]报道的奇异变形杆菌对头孢类药物敏感不同。

奇异变形杆菌的致病力与携带的毒力因子相关,如菌毛、溶血素、蛋白酶、铁载体等蛋白的毒力因子^[16]。其中菌毛可以增强细菌和细胞之间的黏附作用;蛋白酶可以降解宿主细胞产生的各种结构蛋白和相关免疫分子,如 IgA 和 IgG,使细菌逃避宿主的免疫清除机制^[17];溶血素可以导致宿主细胞裂解,使得细菌具有多种细胞毒性;铁载体基因使细菌可以获取宿主的 Fe⁺用于自身的生长繁殖^[18]。本试验参考已经报道的奇异变形杆菌毒力基因^[6],使用 PCR 扩增了 *ireA*、*ucaA*、*pmfA*、*atfA*、*ptA*、*zapA*、*hpmA*、*flhC*、*mrpA*、*hlyA* 这 10 种毒力基因,检测菌株 TSA-1 毒力因子的携带情况,发现该菌携带了 8 种毒力基因,包括铁载体受体基因

ireA, 菌毛基因 *ucaA*、*pmfA*、*atfA*、*flhC*, 蛋白酶基因 *ptA*、*zapA*, 溶血素基因 *hpmA*, 未检测出溶血素基因 *hlyA*, *hpmA* 基因比 *hlyA* 基因更常见^[19],这可能是大蜡螟幼虫未表现黑化的原因。奇异变形杆菌 TSA-1 表现出强生物被膜形成能力,生物被膜是细菌为了适应不良环境而形成的一种保护模式,可以增强细菌的生存能力,使其产生耐药性,奇异变形杆菌强生物被膜的形成可能是导致其具有多重耐药性的原因之一^[20]。细胞毒性也是细菌感染过程中的一个重要因素,尤其是在泌尿系统疾病中,分离株 TSA-1 的培养上清显现了对巨噬细胞的毒性作用,有研究表明,奇异变形杆菌的细胞毒性是由于溶血素 *HpmA* 基因的表达^[21],这与我们的试验结论一致。细菌的感染能力还取决于对上皮细胞的定殖能力,由于 Caco-2 细胞系与小肠上皮细胞具有相似的功能结构,选用 Caco-2 细胞系评估分离株 TSA-1 的黏附能力,发现当 MOI 为 1 时,黏附率达到了 98%,这可能是由于其具有黏附相关的菌毛基因 *ucaA* 等。

大蜡螟(*Galleria mellonella*)是一种成熟的哺乳动物先天免疫系统模型,已经广泛应用于检测各种病原体的毒力,通过表皮直接注射大蜡螟幼虫感染获得的结果与类似的哺乳动物试验结果^[22]一致。本试验使用大蜡螟幼虫评估分离菌株 TSA-1 的毒力,相较于 Sullivan 等^[23]发现强毒株尿路致病性大肠杆菌对大蜡螟幼虫的 LD₅₀ 为 1.17×10⁴ CFU,注射 10 μL 分离株 TSA-1 浓度为 1×10³ CFU/mL 的菌液时,大蜡螟幼虫仍然表现出 100% 的死亡率,表现出分离株 TSA-1 对大蜡螟幼虫的强毒作用。Hernandez 等^[5]在检测病原体毒力时也发现奇异变形杆菌对大蜡螟幼虫具有高致死率,并通过全基因组序列分析发现该菌株携带了菌毛相关毒力因子 *flhC*。分离株 TSA-1 也携带了 *flhC* 毒力基因,

如果要验证对大蜡螟幼虫具有致死作用的毒力基因, 还需要进一步研究。

4 结论

本试验通过 16S rRNA 基因序列和生化鉴定, 从临床病死鸡分离得到奇异变形杆菌 TSA-1, 并发现其具有多种毒力因子, 而且对氨苄西林、卡那霉素等 14 种常用抗生素具有耐药性, 有很强的生物被膜形成能力, 该菌株培养上清对巨噬细胞有细胞毒性, 对 Caco-2 细胞的黏附率接近 100%, 大蜡螟毒性试验表明分离株 TSA-1 对大蜡螟幼虫具有很强的致死作用。

REFERENCES

- [1] 贾沅铮, 胡剑刚, 王志豪, 蒋蔚, 陈兆国, 韩先干, 周昕. 鸡源奇异变形杆菌分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3013-3024
Jia YZ, Hu JG, Wang ZH, Jiang, Chen ZG, Han XG, Zhou X. Isolation, identification and biological characteristics of a *Proteus mirabilis* from chicken[J]. Microbiology China, 2021, 48(9): 3013-3024 (in Chinese)
- [2] Marques C, Belas A, Aboim C, Trigueiro G, Cavaco-Silva P, Gama LT, Pomba C. Clonal relatedness of *Proteus mirabilis* strains causing urinary tract infections in companion animals and humans[J]. Veterinary Microbiology, 2019, 228: 77-82
- [3] 刘盼盼, 贺洞杰, 徐国伟, 王学智, 王胜义, 张宝锁, 孙研, 崔东安. 一株种鸡源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力基因分析[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(10): 1287-1294
Liu PP, He JJ, Xu GW, Wang XZ, Wang SY, Zhang BS, Sun Y, Cui DA. Isolation, identification and virulence gene analysis of *Proteus mirabilis* from chicken[J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(10): 1287-1294 (in Chinese)
- [4] Breed RS, Murray EG, Hitchens AP. The outline classification used in the bergey manual of determinative bacteriology[J]. Bacteriological Reviews, 1944, 8(4): 255-260
- [5] Hernandez RJ, Hesse E, Dowling AJ, Coyle NM, Feil EJ, Gaze WH, Vos M. Using the wax moth larva *Galleria mellonella* infection model to detect emerging bacterial pathogens[J]. Peer J, 2019, 6: e6150
- [6] Sanches MS, Baptista AAS, De Souza M, Menck-Costa MF, Justino L, Nishio EK, Oba A, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, Rocha SPD. *Proteus mirabilis* causing cellulitis in broiler chickens[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(3): 1353-1362
- [7] 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
- [8] Hu QH, Han XG, Zhou XJ, Ding SY, Ding C, Yu SQ. Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer*[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 144(3/4): 429-436
- [9] Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*[J]. Infection and Immunity, 1977, 18(3): 775-779
- [10] Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes[J]. Current Microbiology, 1979, 3(2): 95-99
- [11] Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Miyagusuku-Cruzado G, Giusti MM, Jiménez-Flores R, García-Cano I. Growth of lactic acid bacteria in milk phospholipids enhances their adhesion to Caco-2 cells[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(9): 7707-7718
- [12] Alghoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson SA, Upton M. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101547
- [13] Sun YD, Wen SS, Zhao LL, Xia QQ, Pan Y, Liu HH, Wei CW, Chen HY, Ge JW, Wang HB. Association among biofilm formation, virulence gene expression, and antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolates from diarrhetic animals in northeast China[J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 176
- [14] 杨霞, 张飘, 曾茂芹, 刘妍罕, 程振涛, 文明. 1 株鸭源奇异变形杆菌的分离鉴定与毒力基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(3): 1084-1092
Yang X, Zhang P, Zeng MQ, Liu YH, Cheng ZT, Wen M. Isolation, identification and virulence gene detection of a strain of *Proteus mirabilis* from ducks[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(3): 1084-1092 (in Chinese)
- [15] 张萍, 程悦宁, 张海威, 乔连江, 周玉成, 徐丽, 候庆

- 丰, 杨艳玲. 狐狸流产奇异变形杆菌的分离鉴定及特征分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(11): 3370-3377
- Zhang P, Cheng YN, Zhang HW, Qiao LJ, Zhou YC, Xu L, Hou QF, Yang YL. Isolation, identification and characteristics analysis of a *Proteus mirabilis* from the aborted foxes[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(11): 3370-3377 (in Chinese)
- [16] Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection[J]. EcoSal Plus, 2018. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-10.1128/ecosalplus0009-2017.
- [17] Belas R, Manos J, Suvanasuthi R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(9): 5159-5167
- [18] Schaffer JN, Pearson MM. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections[J]. Microbiology Spectrum, 2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013
- [19] Swihart KG, Welch RA. The HpmA hemolysin is more common than HlyA among *Proteus isolates*[J]. Infection and Immunity, 1990, 58(6): 1853-1860
- [20] Rodrigues SV, Laviniki V, Borges KA, Furian TQ, Moraes HLS, Nascimento VP, Salle CTP. Biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli* is not related to *in vivo* pathogenicity[J]. Current Microbiology, 2019, 76(2): 194-199
- [21] Mobley HL, Chippendale GR, Swihart KG, Welch RA. Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(6): 2036-2042
- [22] Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis[J]. Journal of Visualized Experiments, 2012(70): e4392
- [23] Sullivan NL, Septer AN, Fields AT, Wenren LM, Gibbs KA. The complete genome sequence of *Proteus mirabilis* strain BB2000 reveals differences from the *P. mirabilis* reference strain[J]. Genome Announcements, 2013, 1(5): e00024-e00013