

致腹泻奇异变形杆菌病原学及其分子特征研究

石晓路 扈庆华 林一曼 邱亚群 李迎慧 江敏 陈琼城

【摘要】 目的 研究致腹泻奇异变形杆菌病原学特征及毒力基因和质粒携带情况,探讨其与耐药性/致病性的关系。方法 对 6 株不同来源(食物中毒、外环境及健康人群)的奇异变形杆菌进行生化、药敏和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析;PCR 检测常见的毒力基因;提取质粒后电泳并切胶回收质粒进行测序分析。结果 不同来源的奇异变形杆菌生化特征基本相同,且均具有常见的毒力基因 *ureC*、*rsmA*、*hpmA* 和 *zapA*。但各菌株 PFGE 分型和药敏结果不同,其携带质粒情况也各异。对其中 2 株菌存在的小质粒测序后发现,该质粒长 2 683 bp,主要编码 *qnrD* 基因,与耐喹诺酮类药物相关。结论 采用传统的生化分析及常见的毒力基因鉴定方法,无法区分不同来源的奇异变形杆菌,可利用 PFGE 和质粒分析。耐药菌株中普遍存在的质粒与菌株的耐药性相关,存在多个质粒的菌株其耐药性更强。

【关键词】 奇异变形杆菌;毒力基因;质粒;耐药

Etiological and molecular characteristics of diarrhea caused *Proteus mirabilis* Shi Xiaolu, Hu Qinghua, Lin Yiman, Qiu Yaqun, Li Yinghui, Jiang Min, Chen Qiongcheng. Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China

Corresponding author: Shi Xiaolu, Email: shixiaolu831@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81302434), the Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (No. B2012323) and the Science and Technology Planning Project of Shenzhen, Guangdong (No. 201302239, No. JCYJ20130329103949651).

【Abstract】 **Objective** To analyze the etiological characteristics, virulence genes and plasmids that carrying diarrhea-causing *Proteus mirabilis* and to assess their relationship with drug resistance and pathogenicity. **Methods** *Proteus mirabilis* coming from six different sources (food poisoning, external environment and healthy people) were analyzed biochemically, on related susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Virulence genes were detected by PCR. Plasmids were extracted and sequenced after gel electrophoresis purification. **Results** The biochemical characteristics of *Proteus mirabilis* from different sources seemed basically the same, and each of them showed having common virulence genes, as *ureC*, *rsmA*, *hpmA* and *zapA*. However, the PFGE patterns and susceptibility of these strains were different, so as the plasmids that they carried. Plasmid that presented in the sequenced strain showed that the 2 683 bp length plasmid encodes *qnrD* gene was associated with the quinolone resistance. **Conclusion** Etiological characteristics and molecular characteristics of *Proteus mirabilis* gathered from different sources, were analyzed. Results indicated that traditional biochemical analysis and common virulence gene identification might be able to distinguish the strains with different sources. However, PFGE and plasmids analysis could distinguish the sources of strains and to identify those plasmids that commonly carried by the drug-resistant strains. These findings also provided theoretical basis for further study on the nature of resistance and pathogenicity in *Proteus mirabilis*.

【Key words】 *Proteus mirabilis*; Virulence gene; Plasmid; Drug-resistant

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.024

基金项目:国家自然科学基金(81302434);广东省医学科研基金(B2012323);深圳市科技计划项目(201302239);深圳市科创委项目(JCYJ20130329103949651)

作者单位:518055 深圳市疾病预防控制中心 深圳市科创委重大传染病监控重点实验室 深圳市病原微生物资源库建立与应用公共服务平台

通信作者:石晓路, Email: shixiaolu831@163.com

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)为革兰阴性杆菌,作为腐生菌,其广泛存在于泥土、水和被粪便污染的物质中^[1]。该菌可引起人的原发性和继发性感染,被认为是泌尿系统感染的重要病原菌^[2,3]。该菌也可引起腹泻,在目前我国公布的细菌性食物中毒病原谱中,其仅次于副溶血弧菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌,是引起食物中毒的第四大主要病原菌^[4-6]。但目前尚未有证据证实奇异变形杆菌致腹泻的机制,常规检测方法亦无法区分其致腹泻菌株和肠道正常携带菌株。目前已报道的奇异变形杆菌毒力基因有尿素酶基因(*ureC*)、代谢调控基因(*rsmA*)、溶血素基因(*hpmA*)、金属蛋白酶基因(*zapA*)、耐甘露糖样变形杆菌菌毛基因(*mrpA*)等,多集中于泌尿系统感染的致病机制的研究上^[7-14],而对腹泻相关的研究尚未有报道。为此本研究根据流行病学特征选取不同来源的奇异变形杆菌菌株,通过生化、药敏、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、毒力基因筛查及质粒提取、测序等手段,阐明致腹泻的奇异变形杆菌病原学及其分子特征,并探讨其与耐药性或致病性的关系。

材料与方法

1. 材料:

(1)实验菌株:6株奇异变形杆菌包括2株标准菌株(ATCC29906和HI4320,由美国Michigan医学院的Mobley教授馈赠,均分离自尿路感染病例)、2株食物中毒分离株(C05028和C02011,分别分离自2002年和2005年深圳市两起食物中毒病例的粪便和呕吐物)及2株健康人群粪便和外环境拭子分离株(B02005和C02034)。

(2)主要试剂和仪器:PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;10×PCR buffer缓冲液、dNTP、rTaq DNA聚合酶、100 bp DNA ladder、Agarose Regular购自大连宝生物有限公司。API 20E购自法国BIOMERIEUX公司,K-B法药敏纸片购自英国OXOID公司。其他包括PCR仪MJ Research、伯乐GEL DOC2000凝胶成像系统、BioPhotometer Ultrospec-2000紫外可见光蛋白核酸分析仪、法国生物梅里埃公司Densimat电子比浊仪、伯乐脉冲场凝胶电泳系统CHEF DRIII和Minipore纯水过滤系统。

2. 试验方法:

(1)生化试验:用生物梅里埃的API 20E细菌鉴定条对6株奇异变形杆菌进行生化实验,按照说明书操作。

(2)药敏试验:采用K-B纸片法进行药物敏感实验,选取的药物有17种。标准质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922。调节菌液浓度为0.5个麦氏单位,涂布平板并贴好药敏纸片后,置于36℃孵育24h,参照CLSI M100-S23(2013年版)标准判断结果。

(3)毒力基因检测:挑取奇异变形杆菌少量菌苔于200 μl灭菌水中研磨,沸水浴5 min,12 000 r/min离心5 min,吸取上清液作为PCR模板。针对已报道的奇异变形杆菌常见毒力基因自行设计引物(表1),PCR筛查现有菌株基因携带情况。PCR反应总体系为25 μl,内含双蒸水14 μl,模板5 μl,10×PCR缓冲液2.5 μl,3 mmol/L MgSO₄ 1 μl,0.2 mmol/L dNTP 0.5 μl,5 U/μl rTaq DNA聚合酶0.1 μl,上下游引物各2.5 μl。94℃预变性5 min;35个循环(94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸45 s),72℃延伸5 min。PCR产物110 V电泳30 min,EB染色30 min后成像。

表1 奇异变形杆菌毒力基因引物序列

目的基因	引物	引物序列(5'~3')	扩增产物(bp)
<i>ureC</i>	<i>ureC</i> -F	GTATTCGTCGCGAAACCATT	553
	<i>ureC</i> -R	ATATGACGACAGCCCTCCAC	
<i>rsmA</i>	<i>rsmA</i> -F	TAGCGAGTGTGACGAGTGG	562
	<i>rsmA</i> -R	AGCGAGGTGAAGAACGAGAA	
<i>hpmA</i>	<i>hpmA</i> -F	CCAGTGAATTAACGGCAGGT	654
	<i>hpmA</i> -R	CGTGCCAGTAATGGCTAAT	
<i>zapA</i>	<i>zapA</i> -F	AACGCAGGTCAGAATGTTC	553
	<i>zapA</i> -R	TATCTTGTCACGACCACCA	

(4)PFGE:用2 ml细胞悬浮液(CSB)调节细菌悬液至4.5麦氏单位,取200 μl细菌悬液加入10 μl蛋白酶K溶液,再加入200 μl的1% Seakem Gold:1% SDS制胶。加入5 ml细胞裂解液(含0.1 mg/ml蛋白酶K),54℃水浴摇床中孵育2 h。模块用纯水洗涤2次,TE缓冲液洗涤3次,每次15 min,50℃慢速振荡洗涤。浸入200 μl酶切体系中(含*sf*I酶50 U),50℃4 h。倒入100 ml熔化的在55℃平衡的1% Agarose Gold,室温凝固30 min。电泳电压为6 V/cm,脉冲时间5.0~50 s,线性转换,电泳时间20 h,电泳温度14℃。将凝胶放入EB染色液中,染色30 min;再放入去离子水中,脱色90 min。采用BioNumerics (Version 5.10)软件(Applied Maths BVBA, Belgium)对电泳图像进行数据分析,得出聚类树状图。

(5)质粒分析:将菌株分别接种于5 ml的LB增菌液,37℃振荡培养过夜,按照Qiagen的质粒提取试剂盒(Qiagen Plasmid Mini Kit,货号12125)说明

书提取质粒。质粒电泳采用 1×TAE 配置 0.82% 的琼脂糖胶,胶两边孔内点样分子质量标准 (invitrogen supercoiled DNA ladder, 货号 15622-012), 质粒点样量为 5 μl。80 V 电泳 4.5 h, EB 染色 30 min, 双蒸水脱色过夜后成像。将电泳后的琼脂糖胶上的质粒条带切割至离心管内, 用 Qiagen 纯化试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit, 货号 28704) 胶回收纯化, 送 TaKaRa 大连宝生物公司测序。

结 果

1. 病原学特征:

(1) 生化试验: HI4320 和 C02011 各有一个生化反应与其他菌株不同, 另 4 株菌的生化反应结果与 ATCC29906 一致。HI4320 不产 H₂S, 其他菌株均产 H₂S; C02011 的蔗糖 (SAC) 发酵试验为阳性, 其他菌株均为阴性。

(2) 药敏试验: 不同来源菌株药敏结果有差异, 其中 3 株对氯霉素耐药。所有菌株对头孢他啶、头孢曲松和阿米卡星敏感。外环境分离株 C02034 的耐药率最高, 对 11 种药物耐药 (表 2)。

表 2 6 株奇异变形杆菌药敏试验

抗菌药物	ATCC29906	HI4320	C05028	C02011	B02005	C02034
头孢他啶	S	S	S	S	S	S
头孢曲松	S	S	S	S	S	S
阿米卡星	S	S	S	S	S	S
环丙沙星	S	S	S	S	S	R
左氧氟沙星	S	S	S	S	S	R
卡那霉素	S	S	S	S	S	R
庆大霉素	S	S	S	S	S	R
氨苄西林	S	S	S	S	S	R
阿莫西林	S	S	S	S	S	R
头孢西丁	S	S	S	R	S	S
头孢噻吩	S	S	S	R	S	S
头孢吡肟	R	S	S	S	S	S
萘啶酸	R	S	S	S	S	R
复方新诺明	S	S	R	S	S	R
甲氧苄啶	S	S	R	S	S	R
链霉素	S	S	R	S	S	R
氯霉素	R	S	R	S	S	R

注: R 耐药; S 敏感

(3) 毒力基因检测: 6 株菌采用 PCR 筛查现已报道的 *ureC*、*rsmA*、*hpmA*、*zapA* 等毒力基因, 发现所有菌株均存在这些毒力基因。

2. PFGE 分型: 利用 *sfI* I 酶的 PFGE 可将奇异变形杆菌酶切产生分子质量大小在 20~700 kb 的 7~12 条带, 电泳图谱清晰可辨。各菌株的 PFGE 图谱不同, 差异明显 (图 1)。

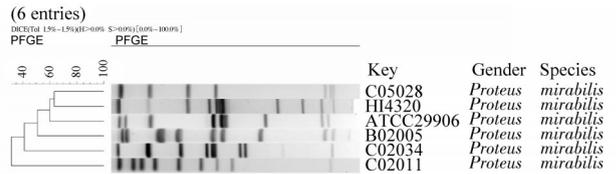
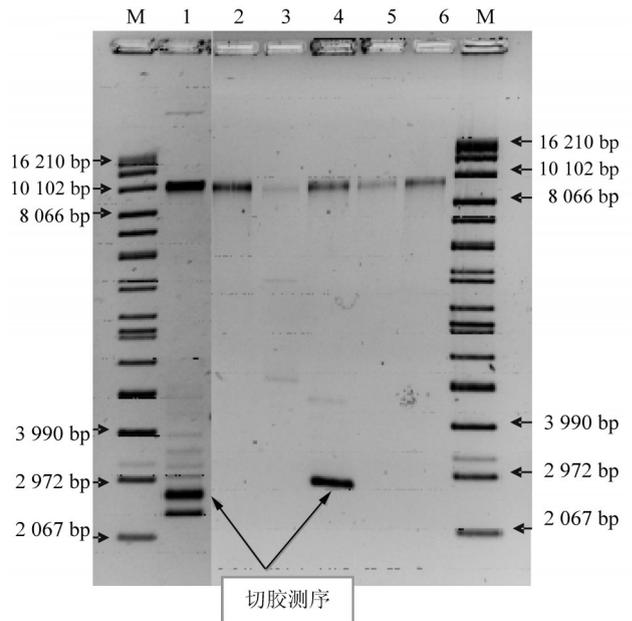


图 1 6 株奇异变形杆菌 PFGE 聚类分析

3. 质粒分析:

(1) 质粒电泳: 所有菌株均有 1 个约 10 100 bp 的大质粒, C05028 存在 2 个质粒, 分别约为 10 100 bp 和 2 700 bp。C02034 存在 3 个质粒, 分别约为 10 100 bp、2 700 bp 和 2 300 bp (图 2)。



注: 1: C02034, 2: ATCC29906, 3: HI4320, 4: C05028, 5: C02011, 6: B02005, M: invitrogen supercoiled DNA ladder

图 2 6 株奇异变形杆菌质粒电泳结果

(2) 质粒测序: C05028 和 C02034 的小质粒测序结果均为 2 683 bp, 与 *Proteus* sp. 3M plasmid p3M-2B, complete sequence (NCBI Reference Sequence: NC_019374.1) 的同源性达到 99%。该质粒包含 4 个可能的开放读码框 (ORF), 分别为 *qnrD*、*hp1*、*hp2* 和 *hp3*。其中 *qnrD* 基因为喹诺酮耐药基因, 长度为 645 bp, 与菌株对喹诺酮类药物的耐药表型相关。*hp1*、*hp2* 和 *hp3* 所编码的蛋白在 GenBank 中无法检索到有意义的同源蛋白, 暂定为功能未知。该质粒的全序列分析结果见图 3。

讨 论

本研究显示不同来源的奇异变形杆菌生化特征基本相同, 且均具有常见的毒力基因 *ureC*、*rsmA*、

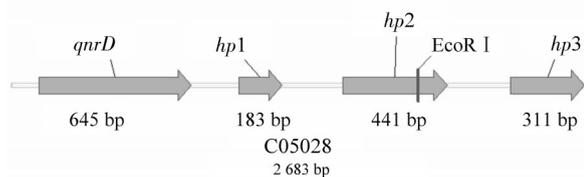


图3 奇异变形杆菌质粒全序列分析

hpmA 和 *zapA*。在后续研究中对收集的 100 多株不同来源(包括健康人群和外环境分离株)奇异变形杆菌菌株,采用 PCR 筛查其毒力基因,发现所有被检菌株均存在这些毒力基因。说明这些基因无特异性,不能区分致病菌株和非致病菌株。除了已知的这些毒力基因外,致腹泻的奇异变形杆菌的基因组中可能还存在其他特别的毒力因子,是否为造成食物中毒的主要原因,还有待进一步证实。

不同来源菌株的 PFGE 分型和药敏结果不同,携带的质粒也各异。在传染病的监测、暴发识别和追踪溯源方面,分子分型方法对病原学的分析有着重要的作用。PFGE 已成为细菌传染病分子流行病学研究技术的“金标准”^[15-18]。本研究利用 PFGE 对奇异变形杆菌分子分型, *sfI* I 酶可以将奇异变形杆菌酶切产生分子质量大小在 20~700 kb 的 7~12 条带,同一起食物中毒分离株(病例标本和剩余食品分离株)的 PFGE 图谱一致,说明此次食物中毒可能是由奇异变形杆菌引起。从健康人群及外环境分离的奇异变形杆菌与食物中毒病例分离的菌株 PFGE 图谱不同:前者不同菌株之间的图谱差异明显,后者不同菌株之间图谱相似度高或基本一致(identical)。由此可见,食物中毒病例分离的奇异变形杆菌菌株不同于健康人群分离株,在基因组上存在很大差异。

研究还发现,奇异变形杆菌分别存在着 1~3 个不同大小的质粒。最大的质粒约为 10 100 bp,且在所有菌株中普遍存在。而 C05028 和 C02034 中均存在着 1 个约 2 700 bp 的小质粒,测序后发现,该质粒长 2 683 bp,有 4 个开放读码框,其中 645 bp 的 *qnrD* 基因为喹诺酮耐药基因,这与该 2 株菌的耐药表型也一致,由此可见该质粒的存在与菌株的耐药性相关。质粒介导的喹诺酮耐药基因 *qnrD* 在沙门菌、肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中早有报道,而在奇异变形杆菌中发现该质粒的报道在 2012 年后才出现^[19]。本研究的菌株分别分离自 2002 年和 2005 年,说明该质粒早已从其他肠杆菌科的细菌水平转移进入奇异变形杆菌中,其水平转移机制使得奇异变形杆菌的耐药性日益严重。

环境分离菌株 C02034 携带的质粒最多(3 个),

其耐药性也最强,对喹诺酮类(环丙沙星、左氧氟沙星、萘啶酸)、磺胺类(复方新诺明)、氨基糖苷类(链霉素、卡那霉素、庆大霉素)、 β -内酰胺类青霉素(阿莫西林、氨苄西林)等均为耐药,由此推论其携带的另 2 个质粒也可能编码耐药基因,这有待进一步验证。

本研究表明,凭借传统的生化分析及常见的毒力基因鉴定无法区分菌株的来源,难以确定是食物中毒菌株还是健康人群自身携带(或外环境中存在)的菌株;但 PFGE 和质粒分析可区分菌株来源。本研究还发现了奇异变形杆菌菌株中普遍存在的质粒,为其耐药及致病性研究提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Rashid T, Ebringer A. Rheumatoid arthritis is linked to *Proteus*-the evidence[J]. Clin Rheumatol, 2007, 26(7): 1036-1043.
- [2] Hola V, Peroutkova T, Ruzicka F. Virulence factors in *Proteus* bacteria from biofilm communities of catheter-associated urinary tract infections [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(2): 343-349.
- [3] O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(4): 534-546.
- [4] Li CY, Yang RY, Liu YF, et al. 82 cases of food poisoning caused by *Proteus* in China from 2000 to 2010 [J]. Asia Pacific Trad Med, 2010, 8: 181-182. (in Chinese)
李春艳, 杨闰媛, 刘雅菲, 等. 2000—2010 年中国 82 起变形杆菌致食物中毒案例分析[J]. 亚太传统医药, 2010, 8: 181-182.
- [5] Lyu JH, Liu XJ. Data analysis of food poisoning in Daxing district from 1982 to 2001 [J]. Liferatue Infor Prev, 2002, 5: 602. (in Chinese)
吕建化, 刘晓军. 北京市大兴区 1982—2001 年食物中毒资料分析[J]. 预防医学文献信息, 2002, 5: 602.
- [6] Wang YL, Liu Y, Tao Y, et al. Study of biological characteristics and genotyping of *Proteus* from food poisoning [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 9: 1952-1954. (in Chinese)
汪永禄, 刘燕, 陶勇, 等. 食物中毒变形杆菌的生物学特性及分子分型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 9: 1952-1954.
- [7] Pearson MM, Sebaihia M, Churcher C, et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility [J]. J Bacteriol, 2008, 190(11): 4027-4037.
- [8] Li WJ, Wang ZQ. Virulence factors of *Proteus mirabilis* [J]. Chin J Zoonoses, 2001, 17(2): 80-86. (in Chinese)
李文建, 汪正清. 奇异变形杆菌的毒力因子[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(2): 80-86.
- [9] Dattelbaum JD, Lockett CV, Johnson DE, et al. *UreR*, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections [J]. Infect Immun, 2003, 71(2): 1026-1030.

- [10] Aneas MA, Portaro FC, Lenrun I, et al. *ZapA*, a possible virulence factor from *Proteus mirabilis* exhibits broad protease substrate specificity [J]. *Brazilian J Med Biol Res*, 2001, 34(11): 1397-1403.
- [11] Liaw SJ, Lai HC, Ho SW, et al. Role of *RsmA* in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* [J]. *J Med Microbiol*, 2003, 52(Pt 1): 19-28.
- [12] Fraser GM, Claret L, Furness R, et al. Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* hpmBA haemolysin operon [J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2002, 148(Pt 7): 2191-2201.
- [13] Toth V, Emody L. *Proteus* virulence: involvement of the pore forming alpha-hemolysin (a short review) [J]. *Acta Microbiol Immunol Hungarica*, 2000, 47(4): 457-470.
- [14] Li X, Johnson DE, Mobley HL. Requirement of *MrpH* for mannose-resistant *Proteus*-like fimbria-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis* [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(6): 2822-2833.
- [15] Chen H, Yu MH, Huang RM, et al. Classification study on a food poisoning of *Proteus* through pulsed field gel electrophoresis [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007(7): 1203-1204. (in Chinese)
陈辉, 俞慕华, 黄锐敏, 等. 脉冲场凝胶电泳技术对一起变形杆菌引起的食物中毒的分型研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007(7): 1203-1204.
- [16] Wu J, Diao BW, Huang CH, et al. Analysis of *Proteus mirabilis* isolates from two cases of food poisoning using pulsed-field gel electrophoresis [J]. *Dis Surveill*, 2008 (10): 646-647. (in Chinese)
吴捷, 刁保卫, 黄昌和, 等. 脉冲场凝胶电泳技术对海南省两起奇异变形杆菌引起的食物中毒分析 [J]. *疾病监测*, 2008(10): 646-647.
- [17] Zhuo F, Zhao JL, Wen FL, et al. Using PFGE to identify the foodborne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* and *Proteus mirabilis* [J]. *Pract Prev Med*, 2007(3): 895-896. (in Chinese)
卓菲, 赵洁玲, 文凤兰, 等. 用 PFGE 方法鉴别分析同时检出副溶血性弧菌和变形杆菌的食物中毒 [J]. *实用预防医学*, 2007(3): 895-896.
- [18] Chen H, Yu MH, Huang RM, et al. Classification study of proteus mirabilis through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technology [J]. *Mod Prev Med*, 2008 (13): 2484-2486. (in Chinese)
陈辉, 俞慕华, 黄锐敏, 等. 奇异变形杆菌的脉冲场凝胶电泳分型研究 [J]. *现代预防医学*, 2008(13): 2484-2486.
- [19] Mazzariol A, Kocsis B, Koncan, et al. Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18, E46-48.

(收稿日期: 2014-01-05)

(本文编辑: 张林东)