



猪源肠外致病性大肠埃希氏菌的生物膜形成能力及耐药性

吴旭光¹ 王红¹ 徐一凡¹ 杨文飞¹ 李瑾年^{*1} 解光艳^{*2}

1 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

2 安徽中医药大学 安徽 合肥 230038

摘要:【背景】猪源肠外致病性大肠埃希氏菌(extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)是一种严重危害养猪业的病原菌,有关其生物膜形成能力与耐药性的研究报道很少。【目的】探讨从病猪肺脏中分离鉴定的3株ExPEC的生物膜形成能力及耐药性,为从抗生物膜形成角度防治猪肠外大肠埃希氏菌病提供参考。【方法】采用96孔板结晶紫染色法结合正交实验优化猪源ExPEC分离株的生物膜形成最佳条件与成膜能力;通过扫描电镜观察各菌株生物膜的形态结构;利用PCR方法检测其携带的生物膜形成相关基因;采用微量肉汤稀释法测定抗生素对生物膜态与浮游态下猪源ExPEC分离株的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。【结果】3株猪源ExPEC的最佳成膜条件并不一致,但在各自最佳条件下均能形成很强的生物被膜且同时携带10个生物膜形成相关基因(*pgaA*, *pgaB*, *pgaC*, *pgaD*, *luxS*, *fimA*, *hipA*, *iha*, *flhC*, *flhD*)。扫描电镜观察显示,菌株SE-1聚集后可形成片状生物膜,菌株SE-2和SE-3聚集后可形成多层结构的生物膜,且聚集体间有明显空隙。部分受试抗菌药物对生物膜态SE-1、SE-2和SE-3菌株的MIC值较对应浮游菌提高了2–32倍,药物敏感性由原来的敏感转为中敏或耐药。【结论】实验结果为从抗生物膜形成角度防治猪肠外大肠埃希氏菌病奠定了基础。

关键词: 猪, 肠外致病性大肠埃希氏菌, 生物膜形成能力, 成膜相关基因, 最小抑菌浓度

Biofilm-forming capability and drug resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased swine

WU Xu-Guang¹ WANG Hong¹ XU Yi-Fan¹ YANG Wen-Fei¹ LI Jin-Nian^{*1}
XIE Guang-Yan^{*2}

1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

2 Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China

Abstract: [Background] Porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), a pathogen seriously endangers the swine industry. However, few studies have reported the biofilm-forming capability

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31672698); Natural Science Foundation of Anhui University of Chinese Medicine (2013zr012); Exploratory Research Project of Anhui University of Chinese Medicine (2017ts006)

***Corresponding authors:** E-mail: LI Jin-Nian: lijinnian2000@163.com; XIE Guang-Yan: fyxgy@126.com

Received: 22-04-2019; **Accepted:** 05-06-2019; **Published online:** 19-06-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31672698); 安徽中医药大学自然科学研究基金(2013zr012); 安徽中医药大学校级探索性科研项目(2017ts006)

***通信作者:** E-mail: 李瑾年: lijinnian2000@163.com; 解光艳: fyxgy@126.com

收稿日期: 2019-04-22; **接受日期:** 2019-06-05; **网络首发日期:** 2019-06-19

and drug resistance of porcine ExPEc. **[Objective]** To study the relationship between the biofilm-forming capability and drug resistance of 3 ExPEc strains isolated from the diseased swine lung, and provide the reference to prevent and treat the porcine ExPEc disease in the perspective of anti-biofilm formation. **[Methods]** The optimal conditions and capability for biofilm formation of porcine ExPEc strains were examined using 96-well plate crystal violet staining combined with orthogonal experiments. The morphologic features of the biofilms produced by each strain were observed using a scanning electron microscopy. Biofilm-forming related genes carried by each strain were detected by PCR, as well as the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotic to porcine ExPEc strains both in floating form and biofilm form were determined by micro-broth dilution method, respectively. **[Results]** The optimal film-forming conditions of 3 ExPEc strains were not consistent, but showed strong biofilm formation under their optimum conditions, and carried synchronously 10 kinds of biofilm-forming related genes (*pgaA*, *pgaB*, *pgaC*, *pgaD*, *luxS*, *fimA*, *hipA*, *iha*, *flhC*, *flhD*). Scanning electron microscopic observation showed that the strain SE-1 aggregated to form a flaky biofilm, while both SE-2 and SE-3 strains aggregated to form multi-layered biofilms, and there was obvious space between aggregates. The MIC values of some tested antibiotics to 3 strains growing in a biofilm were 2–32 times higher than those of corresponding planktonic bacteria, and the drug sensitivity changed from sensitivity to medium or resistance. **[Conclusion]** The result in the study provides a basis for the prevention and treatment of porcine ExPEc infection from the perspective of anti-biofilm formation.

Keywords: Swine, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, Biofilm-forming capability, Film-forming related genes, Minimum inhibitory concentration

肠外致病性大肠埃希氏菌 (extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEc) 是一类定殖于肠道外其他组织中的人畜共患病原菌, 可引起人和动物的肺炎、脑膜炎、败血症和泌尿道感染^[1-2]。自 2004 年以来, 猪源 ExPEc 在猪群中的分离率呈现明显上升趋势, 且常与副猪嗜血杆菌、猪瘟病毒和猪伪狂犬病病毒等其他病原混合感染^[3-5]。由于猪源 ExPEc 也是生物膜感染的常见病原菌, 多表现出多重耐药性, 使得抗生素的效用大大降低, 导致病猪死亡率不断提高, 给我国养猪业造成严重的经济损失。

细菌生物膜 (bacterial biofilm, BF) 是细菌为适应生存环境, 黏附于有生命或无生命物体表面后, 被细菌自身产生的胞外多聚物基质包裹的膜状细菌群体^[6]。据美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 的初步统计, 大约 85% 的细菌性疾病与生物被膜形成有关。由于 BF 具有屏障作用, 可阻止抗生素渗入, 同时其中的细菌生长速度较慢, 对抗生素不敏感, 有的 BF 细菌还能分泌抗生素分解酶、产生抗生素耐药基因, 导致

其耐药性较浮游态细菌增强 10–1 000 倍^[7]。因此, 在研究病原菌生物膜形成能力、调控机制以及生物膜形成与耐药性相关性的基础上, 寻找有效的 BF 抑制剂或清除剂, 对防治细菌生物膜相关感染具有重要意义。

本试验以从肺炎病猪体内分离鉴定的 ExPEc 为研究对象, 通过优化分离株形成生物膜的最佳条件, 检测其生物膜形成能力及携带的成膜相关基因, 比较浮游状态和生物膜状态下分离菌株的耐药性, 探讨生物膜形成与耐药性的关系, 以期从抗生物膜形成角度防治猪肠外大肠埃希氏菌病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细菌菌株

3 株猪源 ExPEc (SE-1、SE-2、SE-3) 由本实验室从患有肺炎病猪的肺脏内分离鉴定并保存。

1.1.2 主要试剂与仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; BHI 培养基、TSB 培养基、MH

培养基和营养肉汤培养基, 杭州微生物试剂有限公司; 头孢噻肟、头孢曲松和庆大霉素等 12 种抗菌药物, 中国兽医药品监察所。

医用低温保存箱, 海尔特种电器有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 贝克曼库尔特公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 扫描电镜, 日立公司。

1.2 分离菌株生物膜形成条件的优化

为了探讨培养基、培养温度、培养时间和初始菌液浓度对分离菌株生物膜形成的影响, 选取培养基种类(BHI、TSB 和营养肉汤)、培养温度(34、37、40 °C)、培养时间(24、36、48 h)和初始菌液浓度(OD_{600} 值 0.2、0.3、0.5) 4 个因素, 每个因素各取 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 进行正交试验(表 1), 采用文献[8]报道的微孔板结晶紫染色法检测细菌生物膜。主要步骤为: 将分离菌株接种不同培养基培养至不同 OD_{600} 值, 取菌液加至 96 孔细胞培养板, 200 μ L/孔, 按表 1 中设置温度与时间进行培养, 共做 3 个复孔, 同时设置培养基作空白对照。培养结束后对生物膜依次进行甲醇固定、0.5% 结晶紫染色、33% 冰醋酸溶解结晶紫、测定溶解液 OD_{570} 值, 通过分析各试验组与空白对照组的平均 OD_{570} , 确定 3 株分离菌株形成生物膜的最佳条件。

1.3 分离菌株的生物膜形成能力检测

1.3.1 微孔板结晶紫染色法检测生物膜形成能力

在最佳成膜条件下采用微孔板结晶紫染色法检测分离菌株形成生物膜能力。根据文献[9]报道, 将空白对照组平均 OD_{570} 值加上其 3 倍标准差(SD)

作为细菌生物膜形成的临界值(OD_c), $OD_{570} \leq OD_c$ 判为无生物膜形成能力, $OD_c < OD_{570} \leq 2OD_c$ 判为生物膜形成能力较弱, $2OD_c < OD_{570} \leq 4OD_c$ 判为生物膜形成能力中等, $OD_{570} > 4OD_c$ 判为生物膜形成能力强。

1.3.2 扫描电镜观察法检测生物膜结构

根据优化的成膜最佳条件, 将 3 株分离菌株(SE-1、SE-2、SE-3)分别接种其最适培养基培养至最适的 OD_{600} 值。然后将菌液加到预先放有细胞爬片的 6 孔细胞培养板中, 2 mL/孔, 在各自最适温度下培养 24 h 或 36 h。培养结束后, 取出细胞爬片依次进行漂洗、2.5% 戊二醛固定、酒精梯度脱水、丙酮脱水、 CO_2 临界点干燥和真空中离子溅射喷金, 在扫描电镜下放大 6 000 倍进行细菌生物膜结构观察并拍照。试验中同时设置浮游态菌作对照。

1.4 分离菌株携带的生物膜形成相关基因检测

根据 GenBank 中收录的大肠埃希氏菌黏附素编码基因 *iha*、I 型菌毛蛋白编码基因 *fimA*、鞭毛编码基因 *flhD/flhC*、毒蛋白编码基因 *hipA*、S-核糖同型半胱氨酸裂解酶编码基因 *luxS* 以及编码 β -1,6-N-乙酰葡聚糖胺合成酶基因(*pgaA*、*pgaB*、*pgaC*、*pgaD*)序列设计合成 10 对特异性引物(表 2), PCR 检测分离菌株是否携带这些生物膜形成相关基因。PCR 反应体系: 2 \times PCR Mix 6 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 4 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 46–54 °C (不同基因的退火温度见表 2) 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并拍照。

表 1 正交试验 $L_9(3^4)$ 的因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment $L_9(3^4)$

水平	因素			
Levels	Factors			
	A 培养时间	B 培养基种类	C 培养温度	D 初始菌液 OD_{600} 值
	Incubation time (h)	Medium types	Incubation temperature (°C)	OD_{600} of initial bacterial suspension
1	24	Nutrient broth	34	0.1
2	36	BHI	37	0.3
3	48	TSB	40	0.5

表 2 本研究中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

基因	引物序列	大小	退火温度
Gene	Primes sequence (5'→3')	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>iha</i>	F: gcttccgtagtcattccc R: atagttcagcgacatccag	2 064	49.6
<i>fimA</i>	F: ctacgacggtaaatggtggg R: cctggaacggaatggtgtt	399	57.86
<i>flhD</i>	F: ccgagacgaacatagcgga R: tgcatacctccgagttgctg	109	53.8
<i>flhC</i>	F: ccgcaagcagaagaagga R: tgggataatatcgcgagga	160	49.6
<i>hipA</i>	F: gtcacttgatgaacaac R: acttactaccgtattctc	1 309	49.6
<i>luxS</i>	F: atgccgtttagatagc R: ctatgatgtgcagttcctg	516	46.9
<i>pgaA</i>	F: gggctttgaaacttctact R: gtatggagtgctgtttctg	2 099	54.65
<i>pgaB</i>	F: tgatgacggctaccagag R: ctgttgaaaactcaggacg	1 658	54.84
<i>pgaC</i>	F: atgattaatgcategtatcg R: ttaacctctcagaatcccac	1 326	49.1
<i>pgaD</i>	F: cgacaatccagtagctttaat R: tacgctcatcctgtggcttt	327	52.5

1.5 抗菌药物对猪源 ExPEc 分离株的最小抑菌浓度(MIC)测定

采用微量肉汤稀释法^[10]检测 12 种抗菌药物对生物膜态与浮游态猪源 ExPEc 分离株的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.5.1 生物膜态猪源 ExPEc 分离株的培养

参考陈迁^[11]报道的培养方法, 将 3 株分离菌株分别接种 MH 肉汤培养液, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 取 50 μL 菌液加至预先置有细胞爬片的 6 孔细胞培养板中, 再加入 5 mL MH 培养液, 37 °C 培养, 每 24 h 换液一次, 连续培养 7 d, 取出细胞爬片用 PBS 冲去表面浮游菌, 用细胞刮刀刮下生物膜态细菌, 并用 MH 培养液将其浓度稀释为 10⁷ CFU/mL, 用于后续 MIC 测定。

1.5.2 浮游态猪源 ExPEc 分离株的培养

将 3 株分离菌株分别接种 MH 培养液, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 并用 MH 培养液将菌液浓度稀释至 10⁷ CFU/mL, 用于后续 MIC 测定。

1.5.3 MIC 测定

抗菌药物用灭菌蒸馏水配制成浓度为 1 280 μg/mL 的药物原液。在 96 孔微量板每排的第 1 孔加 160 μL

MH 培养液, 其余各孔加 100 μL MH 培养液。然后, 向第 1 孔内加入 40 μL 药物原液、混匀, 吸出 100 μL 至第 2 孔进行稀释, 依次类推稀释至第 10 孔, 使 1-10 孔的药物终浓度依次为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 和 0.25 μg/mL, 第 11 孔和第 12 孔分别用作培养液对照和菌液对照。最后, 向 1-10 孔加入 100 μL 浓度为 10⁷ CFU/mL 的生物膜态或浮游态菌液、混匀, 置 37 °C 培养 20 h, 以能使孔内液体澄清、无絮状或沉淀物生成的最低药物浓度为其对测试菌的 MIC。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 猪源 ExPEc 分离株生物膜形成的最佳条件

选取培养基种类、培养温度、培养时间和初始菌液浓度 4 个因素, 设计 4 因素 3 水平正交试验。结果如表 3 所示, 通过比较 4 因素的极差 *R* 值, 发现 3 株猪源 ExPEc 成膜的最佳条件并不一致。其中, 菌株 SE-1 成膜最佳条件为 A₁B₁C₂D₃, 即将 OD₆₀₀ 为 0.5 的起始菌液接种 TSB 培养基, 37 °C 培养 24 h, 可产生最大量的生物膜; 菌株 SE-2 形成的最佳条件为 A₁B₃C₁D₂, 即将 OD₆₀₀ 为

表 3 3 株猪源 ExPEc 的正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of three porcine ExPEc strains

分组 Group	因素 A Factor A			因素 B Factor B			因素 C Factor C			因素 D Factor D			OD_{570}		
	SE-1	SE-2	SE-3	SE-1	SE-2	SE-3	SE-1	SE-2	SE-3	SE-1	SE-2	SE-3	SE-1	SE-2	SE-3
	G1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.22	3.28
G2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1.1	2.44	1.39
G3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1.16	1.68	0.45
G4	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	1.78	1.76	1.91
G5	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	0.53	1.25	1.16
G6	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	1.0	2.9	1.03
G7	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	0.80	0.9	0.71
G8	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	0.35	1.95	2.07
G9	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0.60	1.76	0.94
K_1	1.16	2.47	1.2	1.27	1.98	1.46	0.86	2.71	1.61	0.78	2.01	1.28			
K_2	1.10	1.97	1.37	0.66	1.88	1.54	1.16	1.99	1.54	0.97	2.08	1.04			
K_3	0.58	1.54	1.24	0.92	2.12	0.81	0.83	1.28	0.77	1.1	1.8	1.48			
R	0.58	0.93	0.17	0.61	0.24	0.73	0.33	1.43	0.84	0.31	0.29	0.44			

注: K_1 、 K_2 和 K_3 分别表示每一列“1”、“2”和“3”水平所对应的试验指标平均值; R 表示极差(K_1 、 K_2 、 K_3 中最大值减最小值).

Note: K_1 , K_2 and K_3 are on behalf of the average of the test index for the level of “1”, “2” and “3” in each column. R means extreme difference (the maximum value in K_1 , K_2 and K_3 minus the minimum value).

0.3 的起始菌液接种营养肉汤, 34 °C 培养 24 h; 菌株 SE-3 形成的最佳条件为 $A_2B_2C_1D_3$, 即将 OD_{600} 为 0.5 的起始菌液接种 BHI 培养基, 34 °C 培养 36 h。

2.2 猪源 ExPEc 分离株的生物膜形成能力

在最佳成膜条件下采用微孔板结晶紫染色法检测 3 株猪源 ExPEc 的成膜能力。结果如图 1 所示, 3 株分离菌在孔侧壁与底部均有明显附着, 而空白对照孔内无染液附着。SE-1、SE-2 和 SE-3 菌

株的平均 OD_{570} 值分别为 2.15 ± 0.07 、 4.19 ± 0.06 和 4.30 ± 0.02 , 均显著大于 $4OD_c$ (0.09 ± 0.001), 表明 3 株猪源 ExPEc 的成膜能力均很强。

扫描电镜下可以观察到最佳成膜条件下培养的菌株 SE-1 在细胞爬片表面聚集后形成明显的片状生物膜(图 2A); 菌株 SE-2 和 SE-3 能在细胞爬片表面明显聚集, 形成多层结构的生物膜, 并且聚集体间有空隙(图 2C、E); 浮游态下的 3 株细菌散在细胞爬片上, 无聚集现象(图 2B、D、F)。

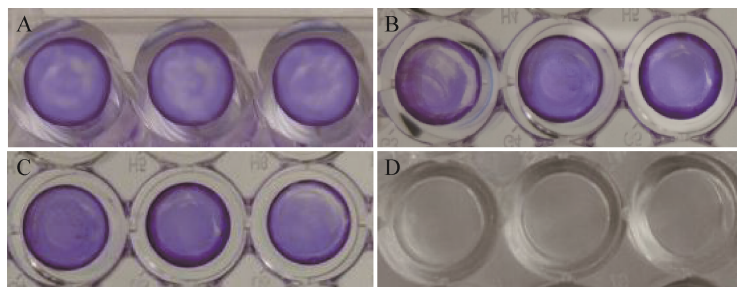


图 1 结晶紫染色的 3 株猪源 ExPEc 生物膜

Figure 1 The biofilms of three porcine ExPEc strains stained with crystal violet

注: A: 菌株 SE-1; B: 菌株 SE-2; C: 菌株 SE-3; D: 培养基空白对照。

Note: A: Strain SE-1; B: Strain SE-2; C: Strain SE-3; D: Blank control of culture medium.

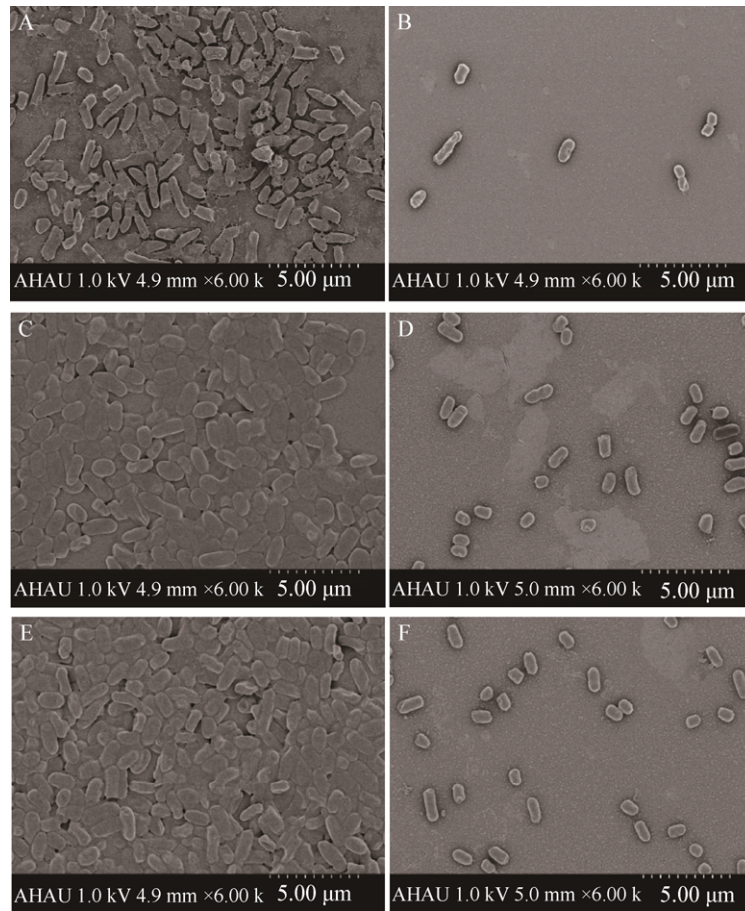


图 2 3 株猪源 ExPEc 生物膜的扫描电镜观察(6 000×)

Figure 2 The biofilms of three porcine ExPEc strains observed by scanning electron microscopy (6 000×)

注: A: 生物膜态 SE-1 菌株; B: 浮游态 SE-1 菌株; C: 生物膜态 SE-2 菌株; D: 浮游态 SE-2 菌株; E: 生物膜态 SE-3 菌株; F: 浮游态 SE-3 菌株。

Note: A: Biofilm of strain SE-1; B: Planktonic strain SE-1; C: Biofilm of strain SE-2; D: Planktonic strain SE-2; E: Biofilm of strain SE-3; F: Planktonic strain SE-3.

2.3 猪源 ExPEc 分离株携带的生物膜形成相关基因

以 3 株猪源 ExPEc 基因组 DNA 为模板, PCR 检测生物膜形成相关基因。结果如图 3 所示, 从 3 株分离菌中均扩增到 *pgaA*、*pgaB*、*pgaC*、*pgaD*、*luxS*、*fimA*、*hipA*、*iha*、*flhC* 和 *flhD* 基因, 说明它们均同时携带所检测的 10 个生物膜相关基因。

2.4 抗菌药物对猪源 ExPEc 分离株的 MIC 值

结果如表 4 所示, 与浮游态细菌相比, 头孢噻肟、头孢曲松、环丙沙星、恩诺沙星和氟苯尼考对生物膜态 SE-1 菌株的 MIC 值分别提高了 8、

32、32、32 和 4 倍, 且该菌株形成生物膜后对后 4 种药物的敏感性由原来敏感转为中敏或耐药。头孢噻肟、头孢曲松、氨苄西林、庆大霉素、安普霉素、恩诺沙星、阿奇霉素和氟苯尼考对生物膜态 SE-2 菌株的 MIC 值分别提高了 16、32、8、16、2、8、16 和 16 倍, 其对头孢噻肟、头孢曲松、氨苄西林、庆大霉素和恩诺沙星的敏感性由原来敏感或中敏转为中敏或耐药。头孢噻肟、头孢曲松和恩诺沙星对生物膜态 SE-3 菌株的 MIC 值分别增加了 4、16 和 8 倍, 其对头孢曲松和恩诺沙星的敏感性由原来敏感转为耐药。

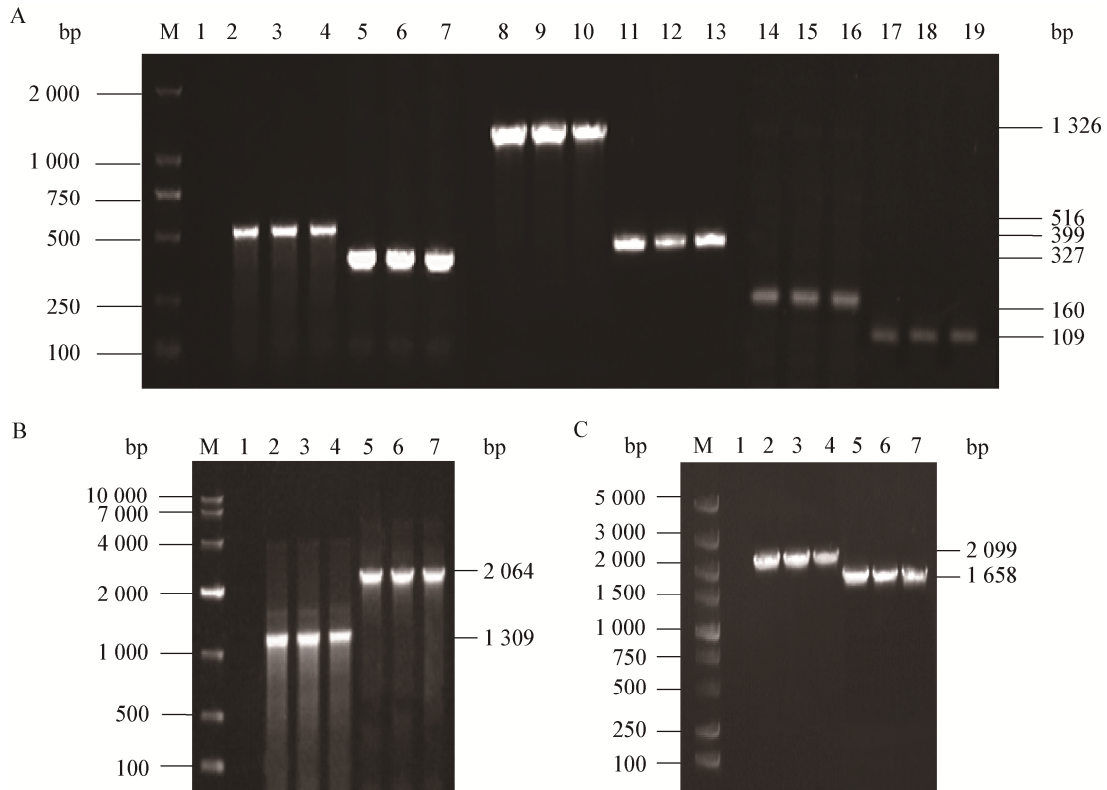


图3 3株猪源 ExPEc 携带的生物膜相关基因 PCR 检测

Figure 3 Detection of biofilm-related genes from three porcine ExPEc strains by PCR

注: A: *luxS*、*fimA*、*pgaC*、*pgaD*、*flhC* 和 *flhD* 基因; B: *hipA* 与 *iha* 基因; C: *pgaA* 与 *pgaB* 基因。M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2-4: SE-1、SE-2 和 SE-3 菌株 *luxS*、*hipA* 及 *pgaA* 基因的 PCR 产物; 5-7: SE-1、SE-2 和 SE-3 菌株 *fimA*、*iha* 及 *pgaB* 基因的 PCR 产物; 8-19: SE-1、SE-2 和 SE-3 菌株 *pgaC*、*pgaD*、*flhC* 及 *flhD* 基因的 PCR 产物。

Note: A: *luxS*, *fimA*, *pgaC*, *pgaD*, *flhC* and *flhD* genes; B: *hipA* and *iha* genes; C: *pgaA* and *pgaB* genes. M: DNA Marker; 1: Negative control; 2-4: PCR products of *luxS*, *hipA* and *pgaA* from SE-1, SE-2 and SE-3 strains; 5-7: PCR products of *fimA*, *iha* and *pgaB* genes from SE-1, SE-2 and SE-3 strains; 8-19: PCR products of *pgaC*, *pgaD*, *flhC* and *flhD* genes from SE-1, SE-2 and SE-3 strains.

3 讨论与结论

近年来,有关猪源 ExPEc 分离鉴定的文献报道较多^[4,12-13],但猪源 ExPEc 生物膜形成能力与耐药性的研究鲜有报道。夏京津等^[14]研究发现细菌生物膜的形成受菌株、菌液初始浓度、营养条件、培养条件等多种因素影响。对此,本研究首先设计 4 因素 3 水平的正交实验探讨菌液初始浓度、培养基种类、培养温度及培养时间对 3 株猪源 ExPEc 生物膜形成的影响,结果显示 3 株猪源 ExPEc 的最佳成膜条件并不一致。其中,SE-1 菌株的最佳成膜条件是将 OD_{600} 为 0.5 的起始菌液接种 TSB 培养基,37 °C 培养 24 h; SE-2 菌株的最佳

成膜条件是将 OD_{600} 为 0.3 的起始菌液接种营养肉汤,34 °C 培养 24 h; SE-3 菌株的最佳成膜条件是将 OD_{600} 为 0.5 的起始菌液接种 BHI 培养基,34 °C 培养 36 h。最佳成膜条件的确定,为后续检测其生物膜形成能力及生物膜态下细菌的耐药性奠定基础。

大肠埃希氏菌生物膜的形成与其黏附、运动、群体感应及代谢等均有关系,受多种相关基因的调控。已有研究报道^[15-16]外膜蛋白 Iha 和 I 型菌毛蛋白是致病性大肠埃希氏菌的重要黏附素,其编码基因 *iha* 和 *fimA* 是重要的生物膜形成相关基因。张祥武^[17]研究发现鞭毛调控基因 *flhD/flhC* 通

表 4 抗菌药物对不同类型猪源 ExPEc 的 MIC 值

Table 4 MIC value of antibiotics to different types of porcine ExPEc strains ($\mu\text{g/mL}$)

抗菌药物 Antibiotics	细菌类型 Bacterial type	菌株 Strain		
		SE-1	SE-2	SE-3
头孢噻肟 CEF	Biofilm	8/S	16/I	8/S
	Plankton	1/S	1/S	2/S
头孢曲松 CRO	Biofilm	8/R	8/R	4/R
	Plankton	<0.25/S	<0.25/S	<0.25/S
氨苄西林 AMP	Biofilm	32/R	128/R	128/R
	Plankton	32/R	16/I	> 128/R
庆大霉素 GEM	Biofilm	2/S	32/R	4/S
	Plankton	2/S	2/S	4/S
阿米卡星 AMK	Biofilm	2/S	4/S	4/S
	Plankton	2/S	4/S	4/S
安普霉素 APR	Biofilm	8/I	16/I	8/I
	Plankton	8/I	8/I	8/I
多西环素 DOX	Biofilm	8/I	8/I	2/S
	Plankton	8/I	8/I	2/S
四环素 ET	Biofilm	64/R	64/R	32/R
	Plankton	64/R	64/R	32/R
环丙沙星 CIP	Biofilm	8/R	<0.25/S	<0.25/S
	Plankton	<0.25/S	<0.25/S	<0.25/S
恩诺沙星 ENR	Biofilm	8/R	2/R	2/R
	Plankton	0.25/S	<0.25/S	<0.25/S
阿奇霉素 AZM	Biofilm	0.5/S	4/S	0.5/S
	Plankton	0.5/S	<0.25/S	0.5/S
氟苯尼考 FLO	Biofilm	8/I	4/S	<0.25/S
	Plankton	2/S	<0.25/S	<0.25/S

注: S: 敏感; I: 中敏; R: 耐药.

Notes: S: Sensitivity; I: Intermediation; R: Resistance.

过调控大肠埃希氏菌运动性而影响其生物膜形成。赵俊桥^[18]证实大肠埃希氏菌毒素——抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统中的 *hipA* 基因可通过影响胞外 DNA 浓度而影响生物膜形成。Vuotto 等^[19]报道了 *LuxS* 和 *pga* 操纵子(A/B/C/D)是大肠埃希氏菌群体感应系统(quorum sensing, QS)中的两个重要调节基因, 它们分别编码 QS 信号分子合成酶和生物膜中多糖主要成分 β -1,6-N-乙酰葡聚糖胺合成酶, 在细菌生物膜形成过程的初始黏附和成熟过程中发挥调节作用。本研究采用 PCR 方法检测猪源 ExPEc 分离株携带生物膜形成相关基因情况, 结果显示它们均同时携带上述 10 种生物膜形成相

关基因, 这一结果从基因层面初步揭示了 3 株猪源 ExPEc 成膜能力强的主要原因, 这也预示着可将抑制成膜基因的表达或研制其编码蛋白的结构竞争物来抑制生物膜的形成, 从而作为一种抗菌治疗的研究方向达到抗生物膜细菌感染的目的。

MIC 值是美国国家临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, NCCLS)制定的体外试验敏感与耐药的判断标准。本研究检测了 12 种抗菌药物对浮游态与生物膜态猪源 ExPEc 分离株的 MIC 值, 结果发现, 与浮游菌相比, 头孢曲松、环丙沙星、恩诺沙星和氟苯尼考对生物膜态 SE-1 菌株的 MIC 值分别提高了 4–32 倍, 药

物敏感性由敏感转为中敏或耐药；头孢噻肟、头孢曲松、氨苄西林、庆大霉素和恩诺沙星对生物膜态 SE-2 菌株的 MIC 值分别提高了 8–32 倍，由敏感转为中敏或由中敏转为耐药；头孢曲松和恩诺沙星对生物膜态 SE-3 菌株的 MIC 值分别增加了 8–16 倍，由敏感转为耐药。上述结果表明仅以浮游菌所做的药敏试验结果可能并不能真实评估抗菌药物对生物膜细菌的耐药性，在临床上判断抗菌药物治疗效果应依据实际造成感染的细菌状态来确定。

已有研究认为细菌的生物膜形成能力与耐药性是密切相关的，一方面生物膜胞外多糖可阻止外源抗生素进入膜内，降低了抗生素对膜内细菌的抑制或杀伤作用^[20]；另一方面细菌生物膜内营养缺乏使细菌生长与代谢较游离态缓慢，导致其对抗生素不敏感^[21]。此外，生物膜内细菌的群体感应系统与一些耐药基因可协同表达而导致耐药^[22]。药物外排泵和超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum β -lactamase, ESBLs) 的产生分别是细菌对喹诺酮类药物和头孢曲松耐药的主要机制之一^[23-24]，本研究 3 株生物膜态猪源 ExPEc 对头孢曲松和喹诺酮类药物均呈现耐药，我们认为这些分离株可能是通过表达 *LuxS* 基因和 *pga* 操纵子，协同表达了外排泵基因和 ESBLs 基因而导致耐药性的产生，但其内在的相关性机制有待于进一步研究。猪源 ExPEc 生物膜形成能力与耐药性的关系仍需使用大样本进行广泛深入研究，才能得到客观、准确的评价。

REFERENCES

- [1] Dezfulian H, Batisson I, Fairbrother JM, et al. Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(4): 1375-1385
- [2] Maynard C, Bekal S, Sanschagrín F, et al. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(12): 5444-5452
- [3] Zhang QX, Xu YD, Wang ZF, et al. Identification and drug resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from pig origin[J]. *Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Newsletter*, 2017(6): 6-9 (in Chinese)
- [4] Zhu YC, Dong WY, Ma JL, et al. Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China[J]. *BMC Veterinary Research*, 2017, 13(1): 94
- [5] Zhu XT. Isolation and identification of porcine extracorporeal pathogenic *Escherichia coli* and pathogenicity evaluation[D]. Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese)
朱雪婷. 猪源肠外致病性大肠杆菌的分离鉴定及致病性评价[D]. 安徽农业大学硕士学位论文, 2018
- [6] Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance[J]. *Endodontic Topics*, 2010, 22(1): 2-16
- [7] Abdullahi UF, Igwenagu E. Intrigues of biofilm: a perspective in veterinary medicine[J]. *Veterinary World*, 2016, 9(1): 12-18
- [8] Pál Z, Urbán E, Dósa E, et al. Biofilm formation on intrauterine devices in relation to duration of use[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54(12): 1199-1203
- [9] Stepanović S, Vuković D, Dakić I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40(2): 175-179
- [10] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48(S1): 5-16
- [11] Chen Q. Research progress on experimental methods of bacterial biofilm[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1997, 2(4): 295-298,304 (in Chinese)
陈迁. 细菌生物被膜实验方法的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学杂志*, 1997, 2(4): 295-298,304
- [12] Tang XB, Tan C, Zhang X, et al. Antimicrobial resistances of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from swine in China[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2011, 50(5): 207-212
- [13] Jahanbakhsh S, Smith MG, Kohan-Ghadr HR, et al. Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2016, 48(2): 194-202
- [14] Xia JJ, Zhang HY, Xu R, et al. Establishment of *in vitro* biofilm model and influence factors of *Aeromonas veronii*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2015, 49(10): 10-14 (in Chinese)
夏京津, 张海月, 许瑞, 等. 维氏气单胞菌生物膜体外模型的建立及影响因素的研究[J]. *中国兽药杂志*, 2015, 49(10): 10-14
- [15] Wang JY, Stanford K, McAllister TA, et al. Biofilm

- formation, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of nine serogroups of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2016, 13(6): 316-324
- [16] Dong J. Cloning and expression of *fimA* from uropathogenic *Escherichia coli*[D]. Master's Thesis of Tianjin Medical University, 2011 (in Chinese)
董杰. 尿道致病性大肠杆菌 *fimA* 基因的克隆与表达[D]. 天津医科大学硕士学位论文, 2011
- [17] Zhang XW. The role of *E. coli* density-sensing regulator C (QseC) in the expression of flagellum-regulated gene *flhDC*[D]. Master's Thesis of Kunming Medical University, 2015 (in Chinese)
张祥武. 大肠杆菌密度感应调节子 C (QseC)在鞭毛调控基因 *flhDC* mRNA 表达中的作用研究[D]. 昆明医科大学硕士学位论文, 2015
- [18] Zhao JQ. The TA system gene *hipBA* in *Escherichia coli* affects biofilm formation and DNA release[D]. Master's Thesis of Shandong University, 2012 (in Chinese)
赵俊桥. 大肠杆菌 TA 系统基因 *hipBA* 对生物膜的形成以及 DNA 释放的影响[D]. 山东大学硕士学位论文, 2012
- [19] Vuotto C, Longo F, Pascolini C, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(4): 1003-1018
- [20] Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(7): 1818-1824
- [21] Szomolay B, Klapper I, Dockery J, et al. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilm[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1186-1191
- [22] Ehrlich GD, Ahmed A, Earl J, et al. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution *in situ* during chronic bacterial biofilm infectious processes[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2010, 59(3): 269-279
- [23] Shao LP, Zhang JY. Research advances on antibacterial activity and bacterial resistance of quinolones[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(9): 2773-2782 (in Chinese)
邵莉萍, 张继瑜. 喹诺酮类药物的抗菌活性与细菌耐药性研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(9): 2773-2782
- [24] Li CQ, Yao XK, Zhou QX. Analysis of literatures about drug resistant trend of pathogens causing urinary tract infection to ceftriaxone[J]. *Chinese Journal of Pharmacoepidemiology*, 2015, 24(12): 746-749 (in Chinese)
李长青, 姚欣凯, 周岐新. 尿路感染病原菌对头孢曲松耐药的文献分析[J]. *药物流行病学杂志*, 2015, 24(12): 746-749