

研究报告

腹泻仔猪源致病性大肠杆菌生物膜与耐药性及毒力的相关性

陈传荣 韩敏敏 张乃嘉 王婉冰 姚焱彬 肖珊 李郁*

(安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】探讨腹泻仔猪源致病性大肠杆菌生物膜形成能力及其与耐药性、毒力之间的相关性。【方法】收集临床分离鉴定的 129 株致病性大肠杆菌, 采用 96 孔微量板法、K-B 法、微量稀释法、寇氏改良法分别测定体外生物膜形成能力、耐药表型、生物膜菌与浮游菌的最小抑菌浓度(MIC)、对小鼠的半数致死量(LD_{50})。【结果】129 株致病性大肠杆菌生物膜阳性率为 96.1%, 以弱阳性(1+)为主; 分离株对四环素、氟喹诺酮类、阿莫西林的耐药率分别为 92.2%、92.2%、93%, 对亚胺培南的耐药率最低为 1.6%, 共呈现 94 种多重耐药谱, 其中以阿莫西林-氟喹诺酮类-四环素-强力霉素-复方新诺明-甲氧苄啶构成比最大, 为 86.0%, 且其与环丙沙星、氟苯尼考、左氧氟沙星、诺氧沙星、头孢拉定及头孢吡酮的耐药性有相关性($P<0.05$), 环丙沙星和氟苯尼考对生物膜形成菌的 MIC 较对应浮游菌分别提高 2-16 倍和 8-16 倍; 生物膜形成能力 3+ 的菌株 LD_{50} 最大。【结论】腹泻仔猪源致病性大肠杆菌普遍具有生物膜形成能力, 呈现多重耐药, 生物膜形成菌对环丙沙星及氟苯尼考的耐药性与生物膜形成能力呈正相关, 但随着生物膜形成能力的增强, LD_{50} 值则相应增大。

关键词: 致病性大肠杆菌, 腹泻仔猪源, 生物膜, 耐药性, 半数致死量

Association of biofilm formation with drug-resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from diarrhea piglet

CHEN Chuan-Rong HAN Min-Min ZHANG Nai-Jia WANG Wan-Bing
YAO Yan-Bin XIAO Shan LI Yu*

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] To study the association of biofilm formation ability with drug-resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from diarrhea piglets. [Methods] In total 129 strains of

Foundation item: The Key Project of the National Spark Program (No. 2014GA710002); Quality Project of Anhui Province (No. 2013sxzx008); Innovation Fund Project of Anhui Agriculture University (No. 2011220); Anhui Pig Industry Fund Project

*Corresponding author: Tel: 86-551-65786329; E-mail: liyouer@163.com

Received: November 13, 2015; Accepted: January 19, 2016; Published online (www.cnki.net): March 04, 2016

基金项目: 国家星火计划重点项目(No. 2014GA710002); 安徽省质量工程项目(No. 2013sxzx008); 安徽农业大学大学生创新基金项目(No. 2011220); 安徽省生猪产业体系基金项目

*通讯作者: Tel: 86-551-65786329; E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2015-11-13; 接受日期: 2016-01-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-04

clinically isolated and identified pathogenic *E. coli* were collected. The *in vitro* biofilm formation, the drug-resistance phenotype, the minimal inhibitory concentration (MIC) of biofilm bacteria and planktonic, and the median lethal dose (LD_{50}) in mice were then evaluated by the 96-well micro plate method, the K-B method, the micro dilution method, and the Curtiss modified method, respectively.

[Results] The positive rate of biofilm formation was 96.1% among the 129 isolates with the majority of them to be lowly positive. The resistance rate to tetracycline, ampicillin and amoxicillin was 92.2%, 92.2%, and 93%, respectively. The lowest resistance rate to imipenem was 1.6%. Ninety-four multi resistant phenotypes were displayed in the isolates, with 86% of them to be amoxicillin-ampicillin-tetracycline-doxycycline-cotrimoxazole-trimethoprim, which was the most frequent type and was correlated to ciprofloxacin, florfenicol, levofloxacin, norfloxacin, cephradine and cefoperazone ($P<0.05$). The MIC of ciprofloxacin and florfenicol on biofilm bacteria was 2–16 and 8–16 times, respectively, higher than on planktonic bacteria. Isolates with biofilm formation 3+ showed the highest LD_{50} . **[Conclusion]** Pathogenic *E. coli* in diarrhea piglets showed the biofilm formation ability and were multi-resistant. Drug resistance of bacteria with biofilm formation to ciprofloxacin and florfenicol was positively correlated to the biofilm formation ability, and LD_{50} also increased with a stronger biofilm formation ability.

Keywords: *Escherichia coli*, Diarrhea piglets source, Biofilm, Drug-resistance, LD_{50}

自 2010 年冬季以来,我国许多省份发生了以哺乳仔猪腹泻为主的疫情,主要表现为发病急、发病率和死亡率高的特点。致病性大肠杆菌是引起仔猪腹泻的主要细菌性病原,可加重腹泻的严重程度,增加腹泻仔猪的死亡率。临床上长期乱用或滥用抗生素,以及动物饲料中抗生素添加剂的使用,导致大肠杆菌耐药性的产生且日趋加重,临床用药效果不明显。细菌生物膜(Biofilm)与细菌的浮游状态对应,是细菌附着物体表面形成被自身产生的多聚基质包裹着的结构群体,用以抵抗外界不良环境的一种自我保护行为,如对抗生素的敏感性、毒力等特性的改变,因此给临床疾病的防治带来很大困难。

本实验通过对源自安徽不同地区腹泻仔猪肠道内容物中的 129 株致病性大肠杆菌进行药物敏感性试验、半数致死量(LD_{50})测定及生物膜形成能力检测,旨在了解腹泻仔猪源致病性大肠杆菌的耐药性和毒力特性,为临床治疗提供用药指导,并为研究分析腹泻仔猪源致病性大肠杆菌生物膜形成能力与其耐药性、毒力之间的相关性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 受试菌株

自 2012 年 12 月至 2014 年 1 月,采集安徽不

同地区腹泻仔猪肠道内容物样品共计 601 份,先通过选择性分离培养基初步鉴定大肠杆菌,再进行生化试验确定,最后通过小白鼠感染性试验鉴定致病性大肠杆菌 129 株,并利用大肠杆菌诊断血清做血清型鉴定,见表 1。

1.2 质控菌株

大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 均购自中国药品生物制品检定所,由安徽农业大学动物传染病研究室保存。

1.3 主要试剂和培养基

LB 培养基、水解酪蛋白琼脂(MHA)、水解酪蛋白肉汤(MHB)、1% PBS、结晶紫液、33%冰醋酸、甲醇等购自杭州微生物试剂有限公司。

1.4 生物膜形成能力检测

采用 96 孔微量板法,参考文献[1],略作改动。将待测细菌接种于液体 LB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜,将细菌按 1:100 稀释于液体 LB 中,取 200 μ L 加入 96 微孔板中,37 °C 静置培养 36 h,每株菌设 4 个平行孔,阴性对照为液体 LB 培养基。后弃去上清,甲醇固定 15 min,倒去液体用 PBS 洗 3 次,每孔加 1%结晶紫 200 μ L 染色 5 min,自来水冲洗拍干;用 33%冰醋酸溶解 0.5 h,酶标仪测 A_{570} 值。生物膜形成量判定标准为:以阴性对

表 1 129 株致病性大肠杆菌分离株背景资料
Table 1 The background materials of 129 *E. coli* isolates

大肠杆菌种类 <i>E. coli</i> (species number)	血清型 Serum type	菌株编号 Strains No.	菌株数 Number
肠致病性大肠杆菌 <i>Enteropathogenic E. coli</i> (63)	O55:59	13, 31, 33, 44, 54, 64, 73, 76, 85, 89, 90, 94, 95, 103, 114, 116, 118, 123	18
	O26:K60	12, 20, 27, 36, 42, 83, 91, 92, 93, 105, 115	11
	O125:K70	14, 17, 29, 75, 82, 97, 98, 104, 119, 124	10
	O128:K67	2, 3, 28, 37, 53, 60, 67, 109, 111	9
	O111:K58	10, 46, 102, 120	4
	O86:K61	47, 56, 74	3
	O119:K69	62, 113, 129	3
	O126:K71	30, 96	2
	O44:K74	57	1
	O142:K86	66	1
产肠毒素大肠杆菌 <i>Enterotoxigenic E. coli</i> (23)	O114:K90	69	1
	O6:K15	22, 38, 48, 49, 78, 88, 106, 128	8
	O15:K?	19, 65, 84, 108	4
	O7:K1	52, 86, 107, 121	4
	O8:K40,K47	5, 21, 35	3
	O9:K9	112, 127	2
	O25:K19	55	1
肠侵袭性大肠杆菌 <i>Enteroinvasive E. coli</i> (11)	O20:K17	6	1
	O136:K78	9, 25	2
	O164:K?	1, 99	2
	O29:K?	4	1
	O136:K18	32	1
	O144:K?	43	1
	O152:K?	45	1
	O28:K73	61	1
肠出血性大肠杆菌 <i>Enterohemorrhage E. coli</i> (6)	O143:K?	79	1
	O112:K66	122	1
	O104	8, 11, 15, 39, 50, 51	6
	未定型 Not set (26)	7, 16, 18, 23, 24, 26, 34, 40, 41, 58, 59, 63, 68, 70, 71, 72, 77, 80, 81, 87, 100, 101, 110, 117, 125, 126	26

照 A_{570} 平均值加 3 倍标准差定义为 A_c , 将待测菌株 A 与 A_c 比较, 则菌株生物膜形成能力可分为四类: 阴性(-): 无生物膜形成, $A < A_c$; 弱阳性(1+): $A_c < A < 2A_c$; 中等阳性(2+): $2A_c < A < 4A_c$; 强阳性(3+): $A > 4A_c$ 。

1.5 体外生物膜生长曲线的测定

根据生物膜形成能力测定结果选择 8 株分离菌

株, 菌株编号分别为: 85、119 (3+); 67、73 (2+); 95、97 (1+); 100、124 (-), 按 1.4 方法, 测定该 8 株菌在 6、12、24、36、48、60、72 h 生物膜的形成, 即生物膜培养物乙醇脱色液的 A_{570} 值。以时间为横坐标, A_{570} 值为纵坐标绘制生物膜体外生长曲线。每株细菌均测定 2 次。

1.6 药物敏感性实验——K-B 纸片法

根据美国临床实验室标准委员会(CLSI/NCCLS) 2010 版执行标准判定结果。23 种抗菌药分别为氨苄西林(AMP)、阿莫西林(AMX)、头孢拉定(RAD)、头孢曲松(CRO)、头孢哌酮(CFP)、庆大霉素(GM)、阿米卡星(AN)、甲氧苄啶(TMP)、复方新诺明(SXT)、四环素(TET)、强力霉素(DOX)、诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)、呋喃妥因(FT)、氟苯尼考(FFC)、左氧氟沙星(LVX)、妥布霉素(TM)、加替沙星(GAT)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、氨基糖苷(ATM)、头孢吡肟(FEP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、亚胺培南(IPM), 均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.7 生物膜菌与浮游菌最小抑菌浓度(MIC)测定

根据生物膜形成能力检测和药敏实验结果, 选择 2 株生物膜形成 3+ 的分离菌株 编号为 85 和 119, 测定其生物膜菌与浮游菌 MIC。参考文献[2]制备生物膜细菌, 参考文献[3]制备浮游菌。用 M-H^[1]培养液在 96 孔板上采用微量稀释法测定两者的 MIC, 37 °C 培养 16–24 h, 观察直至无细菌生长的最小稀释浓度为 MIC。

1.8 不同时间形成生物膜菌 MIC 测定

按 1.7 方法, 测定 2 株生物膜形成 3+ 的致病性大肠杆菌分离菌株 85 和 119 在 6、12、24、36、48、60、72 h 形成生物膜时的 MIC。

1.9 半数致死量(LD₅₀)测定

选择 8 株生物膜形成能力不同的致病性大肠杆菌分离菌株, 菌株编号分别为: 85、119 (3+); 67、73 (2+); 95、97 (1+); 100、124 (-), 采用平板菌落计数法分别测定该 8 株菌在 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 的菌落总数, 每个时间点选择 3–5 个稀释度进行菌落计数, 每个稀释度涂布 2 块平板, 且每次设定一个生理盐水为对照, 测定每毫升菌液中细菌数, 并以测定时间为横坐标, 细菌浓度的对数为纵坐标, 绘制体外生长曲线, 每株细菌均测定 2 次。

采用寇氏改良法测定分离株的 LD₅₀, 所用 1 200 只清洁级昆明小鼠(18–22 g)均购自安徽医科

大学实验动物中心。

1.10 数据分析

实验中所有数据用 SAS 9.0 软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 生物膜形成能力的检测

129 株致病性大肠杆菌生物膜形成阳性率为 96.1% (124/129), 其中 19 株(14.7%)为 3+, 27 株(20.9%)为 2+, 78 株(60.5%)为 1+, 结果显示生物膜形成能力以 1+ 为主, 见表 2。

2.2 体外生物膜生长曲线的测定

依据生物膜形成能力选择 3+ (85、119)、2+ (67、73)、1+ (95、97)和- (100、124)等 8 株致病性大肠杆菌进行生物膜生长曲线的测定, 结果显示 36 h 是生物膜形成能力最强的时间点, 见图 1。

2.3 药物敏感性实验

129 株致病性大肠杆菌对 TET、AMP、AMX、DOX、SXT、TMP 的耐药率分别为 92.2%、92.2%、93%、90.7%、89.1%、87.6%, 而对 IPM、TZP、

表 2 129 株致病性大肠杆菌生物膜形成能力
Table 2 Biofilm-formation ability of 129 *E. coli* isolates

生物膜形成能力 Biofilm-formation ability	致病性大肠杆菌 <i>E. coli</i>	
	菌株数 Numbers	百分比 Rate (%)
3+	19	14.7
2+	27	20.9
1+	78	60.5
-	5	3.9

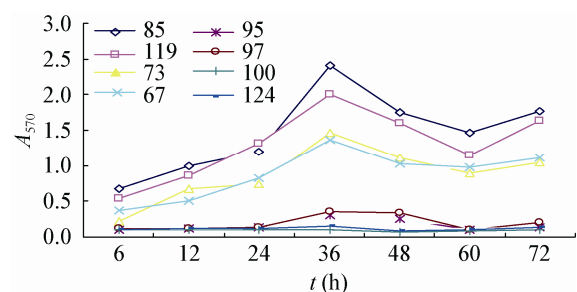


图 1 8 株致病性大肠杆菌体外生物膜生长曲线
Figure 1 Biofilm growth curve of 8 *E. coli* isolates *in vitro*

FT、FEP 的耐药率则分别为 1.6%、11.6%、11.6%、13.2%，其中 124 株致病性大肠杆菌与 CIP、FFC、LVX、NOR、RAD 和 CFP 的耐药性有相关性 ($P<0.05$)，而与其它抗生素的耐药性无相关性 ($P>0.05$)，129 株致病性大肠杆菌对 23 种抗生素共呈现 94 种多重耐药谱，其中 AMX-AMP-TET-DOX-SXT-TMP 构成比最大，为 86.0%，见表 3。

2.4 生物膜菌与浮游菌的 MIC

根据药敏实验和生物膜形成能力检测结果，选

择 CIP、FFC、DOX、RAD 4 种抗生素，生物膜形成 3+ 的 2 株菌(编号为 85、119)进行 MIC 测定。生物膜菌对 CIP 的 MIC 均 >4.096 mg/L，浮游菌均为 1.024 mg/L。生物膜菌对 FFC 的 MIC 分别为 4.096 mg/L 和 >4.096 mg/L，浮游菌分别为 256 mg/L 和 512 mg/L。生物膜菌、浮游菌对 DOX 和 RAD 的 MIC 均 >4.096 mg/L。结果显示，生物膜菌对 CIP 和 FFC 的 MIC 较对应浮游菌分别提高 2–16 倍和 8–16 倍。见表 4。

表 3 生物膜形成能力不同的致病性大肠杆菌分离株对 23 种抗生素的耐药率
Table 3 Biofilm-formation ability of different *E. coli* isolates resistance rates to 23 antibiotics

抗生素 Antibiotics	生物膜形成阳性 Biofilm-formation positive (n=124)		生物膜形成阴性 Biofilm-formation negative (n=5)		卡方值 Chi-square value	P	分离菌株耐药性 Isolated strains resistance (n=129) (rate (%))
	Number	Rate (%)	Number	Rate (%)			
阿莫西林 AMX	115	92.7	5	100	0.390 3	>0.05	120/129 (93.0)
氨苄西林 AMP	114	91.9	5	100	0.364 1	>0.05	119/129 (92.2)
四环素 TET	114	91.9	5	100	0.364 1	>0.05	119/129 (92.2)
强力霉素 DOX	112	90.3	5	100	0.318 1	>0.05	117/129 (90.7)
复方新诺明 SXT	110	88.7	5	100	0.278 8	>0.05	115/129 (89.1)
甲氧苄啶 TMP	108	87.1	5	100	0.244 8	>0.05	113/129 (87.6)
庆大霉素 GM	88	71.0	5	100	0.067 2	>0.05	93/129 (72.1)
环丙沙星 CIP	74	59.7	5	100	0.024 9	<0.05	79/129 (61.2)
氟苯尼考 FFC	70	56.5	5	100	0.018 3	<0.05	75/129 (58.1)
左氧氟沙星 LVX	70	56.5	5	100	0.018 3	<0.05	75/129 (58.1)
诺氟沙星 NOR	69	55.6	5	100	0.016 9	<0.05	74/129 (57.4)
妥布霉素 TM	69	55.6	4	80	0.260 8	>0.05	73/129 (56.6)
加替沙星 GAT	68	54.8	4	80	0.246 6	>0.05	72/129 (55.8)
头孢拉定 RAD	58	46.8	5	100	0.006 6	<0.05	63/129 (48.8)
阿米卡星 AN	42	33.9	2	40	0.774 9	>0.05	44/129 (34.1)
头孢曲松 CRO	41	33.1	3	60	0.228 1	>0.05	44/129 (34.1)
头孢哌酮 CFP	39	31.5	4	80	0.028 5	<0.05	43/129 (33.3)
氨苄西林/舒巴坦 SAM	38	30.6	2	40	0.664 3	>0.05	40/129 (31.0)
氨曲南 ATM	26	21.0	1	20	0.958 2	>0.05	27/129 (20.9)
头孢吡肟 FEP	17	13.7	0	0	0.229 6	>0.05	17/129 (13.2)
呋喃妥因 FT	15	12.1	0	0	0.261 2	>0.05	15/129 (11.6)
哌拉西林/他唑巴坦 TZP	13	10.5	2	40	0.095 4	>0.05	15/129 (11.6)
亚胺培南 IPM	2	1.6	0	0	0.689 7	>0.05	2/129 (1.6)

表 4 生物膜菌和浮游菌 MIC

Table 4 Minimum inhibitory concentration of biofilm bacteria and Planktonic bacteria (mg/L)

菌株编号 Strains No.	环丙沙星 CIP		氟苯尼考 FFC		强力霉素 DOX		头孢拉定 RAD	
	生物膜菌 Biofilm bacteria	浮游菌 Planktonic bacteria	生物膜菌 Biofilm bacteria	浮游菌 Planktonic bacteria	生物膜菌 Biofilm bacteria	浮游菌 Planktonic bacteria	生物膜菌 Biofilm bacteria	浮游菌 Planktonic bacteria
85	>4 096	1 024	4 096	256	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096
119	>4 096	1 024	>4 096	512	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096

表 5 不同时间形成生物膜菌的 MIC

Table 5 Minimum inhibitory concentration of biofilm bacteria in different time (mg/L)

抗生素 Antibiotic	菌株编号 Strains No.	Time (h)						
		6	12	24	36	48	60	72
环丙沙星 CIP	85	512	1 024	1 024	>4 096	4 096	1 024	4 096
	119	512	1 024	2 048	>4 096	4 096	2 048	4 096
氟苯尼考 FFC	85	512	1 024	1 024	4 096	4 096	1 024	2 048
	119	512	1 024	4 096	>4 096	4 096	2 048	4 096
强力霉素 DOX	85	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096
	119	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096
头孢拉定 RAD	85	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096
	119	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096	>4 096

2.5 不同时间形成生物膜菌的 MIC

致病性大肠杆菌 85、119 的生物膜形成能力最强时间点为 36 h, 此时 2 株菌对 CIP 的 MIC 均>4 096 mg/L, 对 FFC 的 MIC 85 为 4 096 mg/L, 119 为>4 096 mg/L; 而对 DOX 和 RAD 的 MIC, 2 株菌在 6–72 h 之间均>4 096 mg/L。结果显示, 细菌生物膜形成能力越强, 对 CIP 和 FFC 的 MIC 越高, 见表 5。

2.6 LD₅₀ 测定

生物膜形成能力不同的 8 株菌(3+: 85、119; 2+: 73、67; 1+: 95、97; -: 100、124), 在 0–12 h 的体外生长曲线基本相同, 于 6 h 后进入稳定期, 见图 2。选择稳定期的细菌进行动物攻毒实验。生物膜形成 3+菌株与 1+、-菌株之间毒力均差异显著($P<0.05$), 3+菌株 LD₅₀ 值最大, 毒力最弱, 见表 6。

3 讨论

细菌生物膜是细菌为了适应不利环境而形成

的一种与浮游细菌相对应的存在形式^[4]。细菌通过分泌大量的多糖基质、脂蛋白、纤维蛋白等蛋白复合物使细菌聚集, 并相互粘连最后形成生物膜来抵抗外界不良环境的影响, 从而使细菌能够更好的存活。研究表明, 绿脓假单胞菌、流感嗜血杆菌、肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、致病性大肠杆菌等均具有生物膜形成能力^[5]。而生物膜的形成与外界环

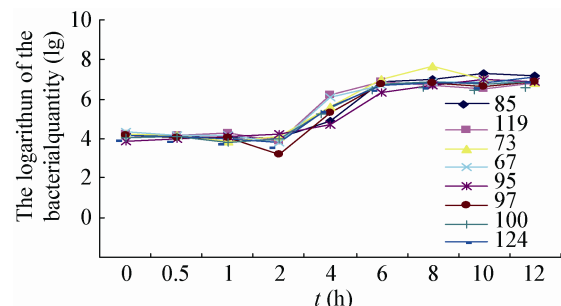


图 2 8 株致病性大肠杆菌体外生长曲线
Figure 2 Growth curve of 8 *E. coli* strains *in vitro*

表 6 生物膜形成能力不同致病性大肠杆菌的 LD_{50}
Table 6 Biofilm-formation ability of different *E. coli* isolates LD_{50} in Kunming mice

受试菌株 Test strain	生物膜形成能力 Biofilm-formation ability	菌株编号 Strains number	LD_{50}	Duncan
致病性大肠杆菌 <i>E. coli</i>	3+	85	9.59×10^8	A
		119	6.87×10^8	
	2+	73	2.30×10^8	AB
		67	4.64×10^8	
		95	3.34×10^7	B
	1+	97	1.32×10^7	
-	100	1.20×10^7	B	
	124	2.75×10^7		

注：表中字母 A、B 表示各组间细菌毒力的差异性，字母相同表明组间毒力差异不显著 ($P>0.05$)，字母不同表明组间毒力差异显著 ($P<0.05$)。

Note: The table letters A, B represents bacterial virulence differences. The same letters between the groups were showed that among the group of virulence difference was not significant ($P>0.05$). Difference letters were showed that the virulence of the differences between the groups were significant ($P<0.05$).

境因素变化密切相关，离子环境、pH、温度、时间、营养条件等各种环境因素均影响细菌生物膜的形成^[6-8]。熊杰等^[1]检测了临床分离的 92 株大肠杆菌，其生物膜形成阳性率为 96.74%，且以中量(2+)为主。喻华英等^[9]筛选源自犊牛粪便中的 60 株大肠杆菌生物膜形成菌，阳性率为 15%，其中 1 株生物膜形成呈强阳性(3+)。Feng 等^[10]对陕西省猕猴桃园分离的 68 株大肠杆菌生物膜形成能力进行分析，结果显示所有菌株均不能形成生物膜。在本研究中，129 株大肠杆菌生物膜形成阳性率为 96.1%，具有普遍的生物膜形成能力，且以少量(1+)为主。表明不同来源的大肠杆菌，其生物膜形成能力存在差异，细菌生物膜的形成与其生存环境密切相关。

细菌形成生物膜后与浮游菌相比，对抗菌药物的耐受能力可提高 10–1 000 倍，严重影响抗生素的治疗效果，并可使疾病转为慢性感染，导致久治不愈^[11]。李立艳^[12]检测了自临床标本分离的 60 株具有生物膜形成能力铜绿假单胞菌的耐药性，结果显示，对 IPM、MEM、FEP、CRO、RAD 的耐药率均大于 80%。马艳平^[13]分析了副猪嗜血杆菌生物膜

形成能力不同的菌株与耐药性的关系，生物膜形成能力越强的菌株对 CIP 和 Kan 的 MIC 越大。袁晨燕等^[14]比较了铜绿假单胞菌的生物膜菌和浮游菌对 RAD、CTX、LVX 的 MIC，生物膜菌是浮游菌的 100–1 000 倍。李钊^[3]测定了生物膜状态下铜绿假单胞菌的生物膜菌和浮游菌对 CIP、IPM、RAD 的 MIC，生物膜菌分别是浮游菌的 64 倍、16–128 倍、4–32 倍。在本研究中，129 株致病性大肠杆菌对 TET、DOX、AMX 和 AMP 的耐药率高达 90%以上，对 23 种抗生素共呈现 94 种多重耐药谱，其中 AMX-AMP-TET-DOX-SXT-TMP 构成比最大，为 86.0%；具有生物膜形成能力的 124 株致病性大肠杆菌与 CIP、FFC、LVX、NOR、RAD 和 CFP 的耐药性有相关性 ($P<0.05$)，而与其它抗生素的耐药性无相关性 ($P>0.05$)；生物膜菌对 CIP 和 FFC 的 MIC 较浮游菌提高 2–16 倍，生物膜形成能力最强时的生物膜菌 MIC 最大。从而进一步表明，细菌形成生物膜后会增强其耐药性，这在临床上增加了治疗的难度。生物膜形成导致细菌可能的耐药机制包括渗透限制学说、营养限制学说、生物膜内外环境不均一学说、基因型在生物膜耐药方面的作用、热休克蛋白对于某些微生物生物膜耐药的影响等^[15]。

许多病原菌利用形成生物膜而存在于不利环境中，引起疾病。研究表明，细菌生物膜可作为细菌的毒力因子在致病性上发挥作用^[16-17]。生物膜菌在感染宿主时，可释放包裹在生物膜内的浮游菌对宿主致病，而生物膜本身又可抵抗宿主的免疫反应，造成持续性感染。Jin 等^[18]研究副猪嗜血杆菌生物膜形成与毒力变化，发现无毒力的菌株比有毒力的菌株具备更高水平的生物膜形成能力。Li 等^[19]分析铜绿假单胞菌生物膜菌与浮游菌毒力差异，结果显示生物膜菌的毒力基因表达低于浮游菌近 30 倍。在本研究中，比较了 8 株生物膜形成能力不同的致病性大肠杆菌 LD_{50} ，结果为生物膜形成能力最强的菌株则毒力最弱，无生物膜形成能力的菌株反而毒力最强。有研究报道，细菌形成生物膜后影响了浮游菌毒力因子的释放，从而导致毒力减弱，

而且生物膜本身具有抵抗宿主的免疫反应, 这可能是细菌毒力减弱的原因之一^[19]。众多研究结果表明生物膜形成菌的耐药性增强, 而对其毒力的影响作用则有增强、减弱或未产生的报道, 这可能与细菌种类、耐药机制等不同有关^[20-22]。生物膜作为细菌一种较强的抗原, 可以刺激机体产生抗体, 但是这些抗体并不能渗透细菌生物膜而作用于细菌, 它们只能与生物膜表面的抗原结合形成免疫复合物, 最后大量沉积于组织表面而形成慢性炎症反应, 最终导致机体的免疫损伤, 久治不愈^[23]。因此, 细菌生物膜的存在仍是疾病治疗过程中所面临的一大难题。

参 考 文 献

- Xiong J, Yang JY, Zou ZY, et al. Antibiotics susceptibility and ability of biofilm formation of *Escherichia coli* strains isolated from blood specimens[J]. Chongqing Medicine, 2012, 41(35): 3699-3701 (in Chinese)
熊杰, 杨继勇, 邹自英, 等. 临床血液分离大肠埃希菌株耐药性及生物被膜形成分析[J]. 重庆医学, 2012, 41(35): 3699-3701
- Lu Y, Dong H, Chen S, et al. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar pullorum strains[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(17): 2428-2437
- Li Z. The effect of the formation of biofilm on the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University, 2008 (in Chinese)
李钊. 生物膜形成对铜绿假单胞菌耐药性的影响[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文, 2008
- Scaletsky IC, Souza TB, Aranda KR, et al. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil[J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 25
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving conRADTs in biofilm infections[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11(7): 1034-1043
- Mao XX, Qin YX, Zou WZ, et al. Characteristics of biofilm formation of pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 371-378 (in Chinese)
毛秀秀, 覃映雪, 邹文政, 等. 致病性嗜水气单胞菌生物膜的形成特性[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 371-378
- Villaseñor JC, van Loosdrecht MCM, Picioreanu C, et al. Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor[J]. Water Science and Technology, 2000, 41(4/5): 323-330
- Li XY, Duan DY, Xu Y. Bacterial genes and proteins expressed differentially in biofilm and planktonic conditions[J]. International Journal of Stomatology, 2013, 40(5): 661-666 (in Chinese)
李欣忆, 段丁瑜, 徐屹. 生物膜和浮游状态下细菌的基因和蛋白质表达差异[J]. 国际口腔医学杂志, 2013, 40(5): 661-666
- Yu HY, Li QF. Screening biofilm and determination growth biofilm of curve in *Escherichia coli*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(5): 23-27 (in Chinese)
- 喻华英, 李启峰. 大肠杆菌生物膜的筛选及生长曲线测定[J]. 中国农学通报, 2014, 30(5): 23-27
- Feng YQ, Yang QN, Wang LF, et al. Survey of microbial contamination and characterization of *Escherichia coli* in kiwifruit orchards in Shaanxi, China, 2013[J]. Foodborne Pathogens Disease, 2015, 12(10): 857-863
- Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its involvement for antibiotic resistance[J]. BioMed Research International, 2015, ID 914791. DOI: 10.1155/2015/914791
- Li LY. Study on resistance characters and genes associated with biofilm formation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Medical University, 2009 (in Chinese)
李立艳. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特性及生物膜形成相关基因的研究[D]. 天津: 天津医科大学硕士学位论文, 2009
- Ma YP. Cloning and functional identification of the genes luxS and pilA related to biofilm formation of haemophilus parasuis[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Science, 2010 (in Chinese)
马艳平. 副猪嗜血杆菌生物被膜形成相关基因 luxS 和 pilA 的克隆和功能鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2010
- Yuan CY, Han Q, Chen JM, et al. Formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and antibiotic resistance[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2011, 21(11): 2161-2163 (in Chinese)
袁晨燕, 韩勃, 陈建明, 等. 铜绿假单胞菌细菌生物膜形成及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(11): 2161-2163
- Luo RJ, Lu C, Li JB. AdvanRAD in drug resistance mechanism of bio-membrane[J]. Journal of Microbiology, 2014, 34(1): 92-95 (in Chinese)
罗锐军, 陆春, 李纪兵. 生物膜耐药机制研究进展[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(1): 92-95
- Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(1): 88-92
- Holmberg A, Lood R, Mörgelin M, et al. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2009, 15(8): 787-795
- Jin H, Zhou R, Kang MS, et al. Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 118(1/2): 117-123
- Li Y, Petrova OE, Su SC, et al. BldA, DipA and induRAD dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(6): e1004168
- Hammer BK, Swanson MS. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp[J]. Molecular Microbiology, 1999, 33(4): 721-731
- Diniz CG, Arantes RM, Cara DC, et al. Enhanced pathogenicity of susRADtiple strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole[J]. Microbes and Infection, 2003, 5(1): 19-26
- Wang LP, Lu CP. The virulence change of streptococcus suis resistant to antimicrobials[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2009, 40(1): 103-108 (in Chinese)
王丽平, 陆承平. 猪链球菌耐药性产生对其毒力的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1): 103-108
- Yanagihara K, Tomono K, Sawai T, et al. Combination therapy for chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection associated with biofilm formation[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 46(1): 69-72