

陶梦珂, 李苗苗, 石晴晴, 等. 鸡源大肠杆菌生物被膜形成与耐药性、毒力基因的关联性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 86-93.

TAO M K, LI M M, SHI Q Q, et al. Association analysis between biofilm formation capacity of *Escherichia coli* derived from chickens and drug resistance and virulence genes [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 86-93.

## 鸡源大肠杆菌生物被膜形成与耐药性、毒力基因的关联性分析

陶梦珂, 李苗苗, 石晴晴, 赵恒, 张鲁星, 胡功政, 潘玉善, 刘建华\*

(河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046)

**摘要:** 旨在了解鸡源大肠杆菌临床分离株生物被膜形成能力与耐药性、毒力基因之间的关系。通过刚果红试验、结晶紫染色法测定生物被膜形成能力; 采用微量肉汤稀释法检测分离株对阿莫西林、氟苯尼考、庆大霉素等 8 种抗菌药的耐药性; PCR 检测常见耐药、毒力基因携带情况; 采用实时荧光定量 PCR 检测毒力基因在生物被膜阳性菌中的表达量。结果表明, 在 51 株分离株中, 生物被膜阳性菌株比例为 19.61%, 阳性菌株中,  $OD_{600}$  最大值为  $2.233 \pm 0.702$ , 最小值为  $0.374 \pm 0.099$ , 其他介于 1.455~1.604 之间; 耐药性检测显示, 生物被膜阳性菌株对头孢喹肟、氟苯尼考、庆大霉素、阿米卡星、黏菌素的耐药率均高于阴性菌株, 其中对阿米卡星和黏菌素差异显著 ( $P < 0.05$ ), 但对多西环素耐药率低于阴性菌株, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 二者对阿莫西林+克拉维酸、恩诺沙星耐药率无差异;  $OD_{600}$  值最大的 E13 对 8 种测定药物全部耐药, 6 株  $OD_{600}$  值介于 1.455~1.604 的菌株对 5 种及以上抗菌药产生耐药性,  $OD_{600}$  值为 0.374 的菌株 E39 为敏感菌株。PCR 结果显示耐药基因  $bla_{CTX-M-9}$ 、 $bla_{CTX-M-U}$ 、 $bla_{OXA-1}$ 、 $mcr-1$ 、 $rmtB$ 、 $floR$  在生物被膜阳性菌株中的检出率高于阴性菌株, 菌株 E13 同时携带 9 种耐药基因; 共检出 16 种毒力基因, 其中  $fimH$ 、 $astA$ 、 $aggR$ 、 $irp1$ 、 $iucD$ 、 $fyuA$ 、 $ybtA$ 、 $ompA$  在生物被膜阳性菌株中的检出率高于阴性菌株, 且阳性菌株毒力基因型复杂; 以  $OD_{600}$  值为 0.374 的 E39 菌株为对照,  $OD_{600}$  值较大的生物被膜阳性菌株中,  $fimH$ 、 $ompA$ 、 $ompA$ 、 $iucD$ 、 $hlyF$  毒力基因表达呈现上调趋势。综上, 与生物被膜阴性菌株相比, 大肠杆菌生物被膜阳性菌株耐药更为严重, 携带毒力基因型更加复杂多样, 且毒力基因表达呈现上调趋势。

**关键词:** 大肠杆菌; 生物被膜; 毒力基因; 耐药基因; 耐药性

中图分类号: S855 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)06-0086-08

## Association analysis between biofilm formation capacity of *Escherichia coli* derived from chickens and drug resistance and virulence genes

TAO Mengke, LI Miaomiao, SHI Qingqing, ZHAO Heng, ZHANG Luxing,

HU Gongzheng, PAN Yushan, LIU Jianhua\*

(College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** This study was to identify the correlation between biofilm-forming capacity, and drug resistance and virulence genes of the clinical isolates of *Escherichia coli* from chickens. The biofilm formation ability was assessed by crystal violet staining, while the broth microdilution method was utilized to determine the susceptibility of the bacterial isolates to eight antimicrobial agents, including amoxicillin, florfenicol and gentamicin, etc. PCR tests were performed to detect the presence of common drug resistance and virulence genes of the isolates, while real-time PCR was utilized to quantify the expression of virulence genes in biofilm-positive bacteria. The results revealed that among the 51 isolates, 10 strains were positive for biofilm formation, with a positivity rate of 19.61%. Among the positive strains, the highest  $OD_{600}$  value recorded was  $2.233 \pm 0.702$ , while the lowest value was  $0.374 \pm 0.099$ , and all the other values ranged between 1.455 and 1.604. The results of the resistance test showed that the biofilm-positive strains demonstrated significantly higher levels of resistance to cefquinome, florfenicol, gentamicin, amikacin and colistin ( $P < 0.05$ ), but lower resistance to doxycycline, as compared with the negative strains ( $P < 0.05$ ). The resistance rates of amoxicillin + clavulanic acid and enrofloxacin did not exhibit significant differences. E13 displayed the highest  $OD_{600}$  value and presented resistance to all the eight measured drugs. Additionally, six of the strains exhibiting  $OD_{600}$  values ranging from 1.455 to 1.604 were found to possess resistance to five or more antimicrobial agents. Strain E39, with an  $OD_{600}$  value of 0.374, was determined susceptible. The PCR results showed a higher prevalence of the resistance genes  $bla_{CTX-M-9}$ ,  $bla_{CTX-M-U}$ ,  $bla_{OXA-1}$ ,  $mcr-1$ ,  $rmtB$ , and

收稿日期: 2023-06-25; 修回日期: 2024-03-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072914); 河南省重点研发项目 (221111111300)

第一作者: 陶梦珂, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 刘建华, 教授, 研究方向为细菌耐药分子机制, E-mail: ljhdmy@126.com。

*floR* in the biofilm-positive strains, compared with the negative ones. Additionally, E13 was found to harbor 9 resistance genes. A total of 16 virulence genes were identified, with *fimH*, *astA*, *aggR*, *irp1*, *iucD*, *fyuA*, *ybtA* and *ompA* exhibiting higher prevalence in the biofilm-positive strains than those in the negative ones. Furthermore, the virulence genotype of the positive strains was found to be complex. When compared with the E39 strain with an  $OD_{600}$  of 0.374, the biofilm-positive strains exhibiting  $OD_{600}$  values exhibited increased expression of the virulence genes *fimH*, *ompA*, *iucD*, and *hlyF*. Moreover, these strains of *Escherichia coli* that were positive for biofilm formation possessed significant drug resistance and up-regulated expression of virulence genes.

**Keywords:** *Escherichia coli*; biofilm; virulence genes; drug resistance genes; drug resistance

鸡源大肠杆菌是鸡肠道中的一种正常寄居的革兰阴性菌。作为条件性致病菌，会引起尿道、胃肠道、关节炎、脑膜炎及败血型感染，大肠杆菌病在细菌性疾病中位列世界第一<sup>[1-2]</sup>。临床上预防和治疗鸡源大肠杆菌感染主要依赖抗菌药，然而由于抗菌药的大量且不规范使用，大肠杆菌的耐药问题日趋严重，多重耐药现象普遍<sup>[3]</sup>。大肠杆菌耐药性的产生与生物被膜的形成密切相关。细菌生物被膜 (bacterial biofilm, BF) 是细菌在生长过程中为适应生存环境而吸附于物体表面并通过增殖、分泌胞外基质而形成的一种具有一定空间结构的细菌群体<sup>[4]</sup>。生物被膜的形成使其具有比浮游菌更高的耐药性，导致生物被膜相关感染更难根除和更容易复发<sup>[5]</sup>。

大肠杆菌携带耐药基因和毒力因子种类繁多，前者主要针对不同抗菌药物产生耐药性；后者包括外膜蛋白基因 *ompA*、*ompT*<sup>[6]</sup>、血清抗性蛋白基因 *iss*、转译激活因子基因 *aggR*、耶尔森菌强毒力岛基因 *irp1*、*irp2*、侵袭蛋白调节基因 *invE*、热稳定肠毒素基因 *astA* 等<sup>[7]</sup>。两者与细菌的宿主细胞入侵能力、毒力及致病性有关。关于生物被膜形成能力和不同抗菌药物耐药性，不同耐药基因、毒力基因携带及表达量之间的关系，目前尚不明确。

因此，本研究检测临床分离菌株的生物被膜形成能力，比较生物被膜阳性菌株和阴性菌株在常见抗菌药物耐药性与毒力基因携带上的差异，并分析不同生物被膜形成能力菌株毒力基因表达量之间的关联性，以期揭示大肠杆菌生物被膜菌株的耐药性、致病机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

51株鸡源大肠杆菌，为河南农业大学药理实验室分离保存，并分别以E1~E51编号命名；质控菌为大肠杆菌 ATCC<sup>®</sup>25922；LB肉汤、BHI肉汤、LB琼脂、MHB培养基、TSB培养基，均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司；FastTaq Premix，购自 TOLOBIO 公司；DL2000 DNA Marker (50 ng/ $\mu$ L)、2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 购自诺唯

赞生物科技股份有限公司；抗菌药物由河南牧翔动物药业有限公司馈赠。

### 1.2 生物被膜阳性菌株筛选及形成能力测定

参考范玉堂<sup>[8]</sup>的刚果红琼脂试验方法，挑取菌液划线于刚果红平板上，37℃培养24h后，于室温培养3~5d，每天观察并记录结果。红色菌落逐渐转变为黑色菌落且有光晕，判定为生物被膜阳性菌株，没有明显变化的判定为生物被膜阴性菌株。

挑取生长在LB琼脂板上的各分离菌株单菌落，于TSB肉汤培养基中，37℃过夜震荡培养；取无菌24孔板，每孔加500  $\mu$ L菌液、每组3个平行，阴性对照为TSB培养液。37℃静置培养72h，无菌去离子水洗去浮游菌；甲醇固定、结晶紫染色、冰乙酸脱色。每孔吸取200  $\mu$ L于无菌96孔板，用酶标仪测定波长600 nm的OD值。

### 1.3 药物敏感性试验

采用美国临床实验室标准协会 (CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法，测定51株大肠杆菌菌株对阿莫西林+克拉维酸、头孢唑肟、庆大霉素、阿米卡星、氟苯尼考、多西环素、恩诺沙星、黏菌素8种抗菌药的敏感性，其中耐药折点 (R) 分别为 R>8  $\mu$ g/mL、R>2  $\mu$ g/mL、R>4  $\mu$ g/mL、R>16  $\mu$ g/mL、R>8  $\mu$ g/mL、R>8  $\mu$ g/mL、R>2  $\mu$ g/mL、R>2  $\mu$ g/mL。耐药判断标准为：最小抑菌浓度 (MIC) 是否大于 CLSI 规定的耐药折点，若大于即为耐药。质控菌质控范围分别为：阿莫西林+克拉维酸 2~8  $\mu$ g/mL；头孢唑肟 0.03~0.25  $\mu$ g/mL；恩诺沙星 0.008~0.03  $\mu$ g/mL；阿米卡星 0.5~4.0  $\mu$ g/mL、多西环素 0.5~2.0  $\mu$ g/mL、氟苯尼考 2~8  $\mu$ g/mL；庆大霉素 0.25~1.00  $\mu$ g/mL；黏菌素 0.25~2.00  $\mu$ g/mL。每株菌设3个平行，取平均值。

### 1.4 耐药及毒力基因的检测

参考相关文献合成耐药及毒力基因引物<sup>[9-11]</sup>，序列见表1。10种耐药基因分别为： $\beta$ -内酰胺类 (*bla*<sub>CTX-M-U</sub>、*bla*<sub>CTX-M-9</sub>、*bla*<sub>OXA-1</sub>)，酰胺醇类 (*floR*)，四环素类 (*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*)，氨基糖苷类 (*rmtB*)，多肽类 (*mcr-1*)；31种毒力基因分别为：紧密黏附素基因 (*fimH*、*fimC*、*tsh*、*eaeA*、*eae*、

*sfa*), 毒素相关基因 (*astA*, *aggR*, *hlyF*, *elt*, *estA*, *estB*, *stx1*, *stx2*, *vat*, *ler*), 铁摄取系统相关基因 (*irp1*, *irp2*, *iucD*, *fyuA*, *ybtA*, *iroN*), 编码外膜蛋白基因 (*ompT*, *ompA*, *papC*, *ler*, *escV*), 编码血清抗性蛋白基因 (*iutA*, *iss*, *colV*, *invE*)。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 2 $\times$  FastTaq Premix 10  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/mL) 各 0.5  $\mu$ L, 菌液 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体系。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性

30 s, 51.5~65.5  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸, 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.5 毒力基因表达量测定

利用诺唯赞生物科技有限公司反转录和定量试剂盒进行反转录和定量 PCR 检测, 按照说明书操作。*fimH*、*fimC*、*iucD*、*hlyF*、*ompA* 毒力基因引物由擎科生物科技股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列 (5'→3')	引物	序列 (5'→3')
<i>bla</i> <sub>CTX-M-U</sub> -F	ATGTGCAGTACCAGTAAAGT	<i>stx2</i> -F	GTTTGGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG
<i>bla</i> <sub>CTX-M-U</sub> -R	TGGGTRAAGTARGTCACCAGAA	<i>stx2</i> -R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> -F	GAGATGGTGACAAAGAGAGT	<i>vat</i> -F	TCCTGGGACATAATGGCTAG
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> -R	TTACAGCCCTTCGGCGATGATTCT	<i>vat</i> -R	GTGTCAGAACGGAATTGTC
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> -F	TTGAAGGAAGTGAAGGTTGT	<i>ler</i> -F	CGCACACAACAAGCCCATAC
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> -R	CCAAGTTTCTGTAAAGTGCC	<i>ler</i> -R	GATGAGTTCCGGCGAGCAA
<i>floR</i> -F	CACGTTGAGCCTCTATAT	<i>irp1</i> -F	AAAACCTCTTTGAGGCGGGTGC
<i>floR</i> -R	ATGCAGAAGTAGAACGCC	<i>irp1</i> -R	GTTGTCTAACACCGTACCG
<i>tetA</i> -F	GCTACATCCTGCTTGCCCTTC	<i>irp2</i> -F	AAGGACTACAAAGCCGTCA
<i>tetA</i> -R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	<i>irp2</i> -R	GTTTCCCACCTCAAGCAG
<i>tetB</i> -F	TTGGTTAGGGCAAGTTTTG	<i>iucD</i> -F	TCAGAACTTCAAACGGTGTG
<i>tetB</i> -R	GTAATGGGCCAATAACACCCG	<i>iucD</i> -R	TATTGCCATCAGTACTGGA
<i>tetC</i> -F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	<i>fyuA</i> -F	ACACGGCTTTATCCTCTGGC
<i>tetC</i> -R	ATGGTCGTCTACTACCTGCC	<i>fyuA</i> -R	GGCATATTGACGATTAACGAA
<i>tetD</i> -F	AAACCATTACGGCATTTCTGC	<i>ybtA</i> -F	CATGATGGATCCCCTGCAAACGATGGCAATATTCCT/
<i>tetD</i> -R	GACCCGATACACCATCCATC	<i>ybtA</i> -R	CATGATCTCGAGTTACATCCCCTGTTAAAGGTCCA
<i>rmtB</i> -F	ATCAACGATGCCCTCACCTCC	<i>iroN</i> -F	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT
<i>rmtB</i> -R	TTCCACGCCCGCCTAAACT	<i>iroN</i> -R	GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT
<i>mcr-1</i> -F	ATGATGCAGCATACTTCTGTG	<i>ompT</i> -F	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT
<i>mcr-1</i> -R	TCAGCGGATGAATGCGGTG	<i>ompT</i> -R	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC
<i>fimH</i> -F	GGCTCATTAATTGCCGTGCTT	<i>ompA</i> -F	CATACAAAGCTCAGGGCGTTC
<i>fimH</i> -R	ACCACCACATCATTATTGGCGTA	<i>ompA</i> -R	ATACCATGCCACCCAGACGA
<i>fimC</i> -F	ATTCTCTGACGCTGATTAACCC	<i>papC</i> -F	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGT
<i>fimC</i> -R	AGGCAATTTAAACCGTGCTT	<i>papC</i> -R	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATATT
<i>tsh</i> -F	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	<i>ler</i> -F	CGCACACAACAAGCCCATAC
<i>tsh</i> -R	CCTCCGATGTTCTGAACGT	<i>ler</i> -R	GATGAGTTCCGGCGAGCAA
<i>eaeA</i> -F	GCAAACACGACCGATGACA	<i>escV</i> -F	ATTCTGGCTCTTCTTCTTTATGCTG
<i>eaeA</i> -R	AATCTGACCGCCCTGACT	<i>escV</i> -R	CGTCCCCTTTTACAACTTCATCGC
<i>eae</i> -F	TAACGGCTATTTCCGCATGA	<i>iutA</i> -F	GGCTGGACATCATGGAACTGG
<i>eae</i> -R	TCCCAGACGATACGATCCAG	<i>iutA</i> -R	CGTCCGGAACGGGTAGAAATCG
<i>sfa</i> -F	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	<i>iss</i> -F	AAAACAGCAACCCGAACC
<i>sfa</i> -R	CCCGTAACGGCCAGCATCTC	<i>iss</i> -R	CGAAACGAAGAAATGATGAGTG
<i>astA</i> -F	ATATCCTCATCGCCTGTG	<i>colV</i> -F	TGGTAGAATTGTGCCAGAGCAAG
<i>astA</i> -R	ACGGCTTTGTAGTCTTTC	<i>colV</i> -R	GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC

续表1

引物	序列 (5'→3')	引物	序列 (5'→3')
<i>stx1</i> -F	CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	<i>invE</i> -F	CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG
<i>stx1</i> -R	AATGCCACGCTTCCCAGAATTG	<i>invE</i> -R	CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC
<i>aggR</i> -F	GCGGCTCATAACAGAACT	q- <i>fimH</i> -F	GGCTCATTAATTGCCGTGCTT
<i>aggR</i> -R	GGAAATCATAGCGGGTGT	q- <i>fimH</i> -R	ACCACCACATCATTATGGCGTA
<i>hlyF</i> -F	GCATTCCGATACTCAGTAGCTTG	q- <i>fimC</i> -F	ATTCTCTGACCGTGATTAACCC
<i>hlyF</i> -R	CGCCTTATGTTAAAAGCCATTCC	q- <i>fimC</i> -R	AGGCAATTTAACCGTGCTT
<i>elt</i> -F	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	q- <i>iucD</i> -F	TCAGAACTTCAAAAACGGTGGT
<i>elt</i> -R	TGGTCTCGGTCAGATATGT	q- <i>iucD</i> -R	TATTGCCATCAGTTACTGGA
<i>estA</i> -F	CAACTGAATCACTTGACTCTT	q- <i>hlyF</i> -F	GCATTCCGATACTCAGTAGCTTG
<i>estA</i> -R	TTAATAACATCCAGCACAGG	q- <i>hlyF</i> -R	CGCCTTATGTTAAAAGCCATTCC
<i>estB</i> -F	TGCCTATGCATCTACACAAT	q- <i>ompA</i> -F	CATACAAAGCTCAGGGCGTTC
<i>estB</i> -R	CTCCAGCAGTACCATCTCTA	q- <i>ompA</i> -R	ATACCATGCCACCCAGACGA

注: q-*fimH*, q-*fimC*, q-*iucD*, q-*hlyF*, q-*ompA* 为荧光定量引物序列。

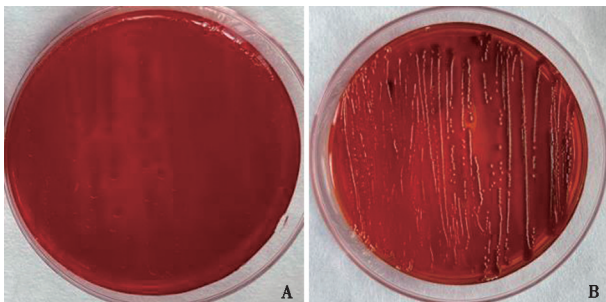
### 1.6 数据统计与分析

应用 Prism. exe 软件进行统计学分析, 结果用 *t* 检验分析, 数据以“平均值±标准差”表示, 当 *P* < 0.05 时, 认为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 生物被膜阳性菌株检出结果

51 株大肠杆菌菌株的刚果红琼脂试验中 (图 1), 共有 10 株菌株红色菌落逐渐转变为黑色菌落且有光晕, 生物被膜阳性率 19.61%, 其余 41 株无变化为阴性菌株。其中 10 株生物被膜阳性菌株编号分别为 E11、E13、E21、E30、E24、E44、E42、E32、E45、E39。



A 为阴性菌株; B 为阳性菌株。

图 1 生物被膜阳性菌株筛选

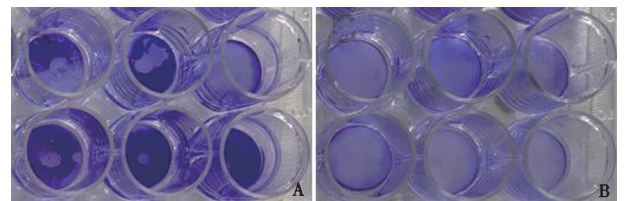
### 2.2 生物被膜形成能力测定结果

对 10 株生物被膜阳性菌株结晶紫染色, 测其 OD 值。结果显示 E13 菌株 OD 值最大为 2.233±0.702; E11、E21、E24、E30、E42、E44 OD 值介于 1.455~1.604 之间 (表 2), E32、E39、E45 菌株结晶紫染色后 OD 值分别为 0.325、0.374、0.418。选取最高

OD 值以及最低 OD 值菌株对比, 如图 2 可以看出 E13、E39 菌株结晶紫染色后, 生物被膜量有明显区别。

表 2 10 株生物被膜阳性菌 OD 值

菌株名称	OD 值	菌株名称	OD 值
E13	2.233±0.702	E44	1.455±0.044
E11	1.467±0.021	E42	1.604±0.127
E21	1.504±0.088	E32	0.325±0.039
E30	1.503±0.106	E45	0.418±0.051
E24	1.467±0.089	E39	0.374±0.099



A 为 E13 菌株; B 为 E39 菌株。

图 2 E13、E39 形成生物被膜后的结晶紫染色

### 2.3 生物被膜阳性菌株和阴性菌株耐药性的比较

从表 3 中可以看出, 51 株临床分离株对阿莫西林、恩诺沙星耐药率均较高, 达到 90% 以上, 但生物被膜阳性菌株和阴性菌株差异不显著; 总分离菌株对氟苯尼考、头孢喹肟、庆大霉素耐药率分别为 70.59%、64.71%、56.86%, 且生物被膜阳性菌对以上 3 种药物耐药率均高于阴性菌株, 但差异不显著; 生物被膜阳性菌株更容易对阿米卡星、黏菌素耐药, 且与生物被膜阴性菌株相比差异显著; 值得关注的是, 生物被膜阳性菌株对多西环素的耐药率明显低于阴性菌株, 差异显著。

表 3 鸡源大肠杆菌生物被膜阳性菌株和阴性菌株的耐药性比较

%

菌株	阿莫西林+ 克拉维酸	头孢唑肟	恩诺沙星	氟苯尼考	庆大霉素	阿米卡星	黏菌素	多西环素
生物被膜阴性 (n=41)	92.68	63.41	90.24	68.29	53.66	14.63	2.44	58.54
生物被膜阳性 (n=10)	90.00	70.00	90.00	80.00	70.00	50.00*	40.00**	20.00*
总计 (n=51)	92.16	64.71	90.20	70.59	56.86	21.57	9.80	50.98

注：与生物被膜阴性菌株相比，\*代表  $P<0.05$ ，\*\*代表  $P<0.01$ ，下同。

## 2.4 生物被膜阳性菌株耐药情况

10株生物被膜阳性菌株中，OD值最大的E13对8种抗菌药全部耐药，6株OD值介于1.455~1.604的菌株对5种及以上抗菌药产生耐药性；OD值小于0.5的菌株E39为敏感菌株。其中有8株生物被膜阳性菌对3种以上抗菌药耐药，多重耐药率80%，共有8种耐药谱，表4可知，其中E11、E21、E30有相同

的耐药谱（阿莫西林+克拉维酸）+头孢唑肟+恩诺沙星+氟苯尼考+庆大霉素+阿米卡星+黏菌素。表4所示抗菌药物对生物被膜阳性菌株的MIC值较高，其中阿莫西林+克拉维酸、头孢唑肟、庆大霉素、阿米卡星对部分菌株的MIC值大于512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，说明生物被膜形成能力强的菌株耐药更为严重。

表 4 各抗菌药物对生物被膜阳性菌株的 MIC

菌株名称	MIC 值/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )							
	阿莫西林+ 克拉维酸	头孢唑肟	恩诺沙星	氟苯尼考	庆大霉素	阿米卡星	黏菌素	多西环素
E13	>512	512	64	256	>512	>512	4	16
E11	>512	>512	32	256	>512	>512	4	8
E21	>512	>512	32	256	>512	>512	4	8
E30	>512	>512	32	256	>512	>512	4	8
E24	>512	>512	32	256	>512	>512	<1	8
E44	>512	8	32	128	16	<1	<1	8
E42	>512	256	32	256	<1	<1	<1	32
E32	128	<1	8	128	8	<1	<1	8
E45	>512	<1	16	4	<1	<1	<1	<1
E39	4	<1	<1	4	<1	<1	<1	<1

## 2.5 耐药基因携带情况

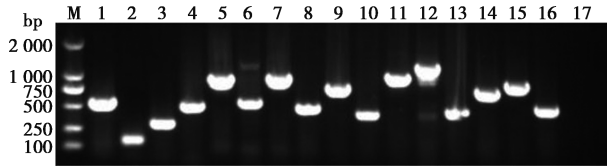
表5可知， $bla_{\text{CTX-M-9}}$ 、 $bla_{\text{CTX-M-U}}$ 、 $bla_{\text{OXA-1}}$ 、 $mcr-1$ 、 $rmtB$ 、 $floR$ 在生物被膜阳性菌株中的检出率高于阴性菌株，与耐药表型对应；四环素类耐药基因 $tetA$ 、 $tetB$ 、 $tetC$ 、 $tetD$ 在生物被膜阳性菌株中的检出率低于阴性菌株检出率，与多西环素耐药性检测结果对应。

## 2.6 毒力基因携带情况

对51株大肠杆菌进行毒力基因检测，其中31种毒力基因共检出16种（图3）。各基因检出率见表6。基因 $fimH$ 、 $astA$ 、 $aggR$ 、 $irp1$ 、 $iucD$ 、 $fyuA$ 、 $ybtA$ 、 $ompA$ 在生物被膜阳性菌株中的检出率高于阴性菌株，且差异显著；生物被膜阳性菌株最少携带4种毒力基因，最多携带13种基因，共有10种毒力基因型，见表7。

表 5 不同生物被膜形成能力鸡源大肠杆菌耐药基因检出率对比结果

基因	生物被膜菌株数 (检出率)		合计
	阳性 (n=10)	阴性 (n=41)	
$tetA$	5 (50%)	21 (51.22%)	26 (50.98%)
$tetB$	2 (20%)	9 (21.95%)	11 (21.57%)
$tetC$	5 (50%)	31 (75.61%)	36 (70.59%)
$tetD$	0 (0)	5 (12.20%)	5 (9.80%)
$bla_{\text{CTX-M-U}}$	5 (50%)	20 (48.78%)	25 (49.02%)
$bla_{\text{CTX-M-9}}$	5 (50%)	12 (29.27%)	17 (33.33%)
$bla_{\text{OXA-1}}$	1 (10%)	3 (7.32%)	4 (7.84%)
$mcr-1$	6 (60%)	18 (43.90%)	24 (47.06%)
$rmtB$	1 (10%)	2 (4.88%)	3 (5.88%)
$floR$	6 (60%)	23 (56.10%)	29 (56.86%)



M. DL2000 Marker; 1 ~ 16. *iroN*, *astA*, *iutA*, *fimH*, *ybtA*, *irp1*, *ompA*, *fimC*, *aggR*, *iss*, *fyuA*, *colV*, *hlyF*, *iucD*, *tsh*, *ompT*; 17. 阴性对照。

图3 鸡源大肠杆菌不同毒力基因的PCR检测结果

表6 不同生物被膜形成能力鸡源大肠杆菌毒力基因检出率对比结果

基因	生物被膜菌株数 (检出率)		合计
	阳性 (n=10)	阴性 (n=41)	
<i>fimH</i>	10 (100%)*	38 (92.68%)	48 (94.12%)
<i>fimC</i>	7 (70%)	38 (92.68%)	45 (88.24%)
<i>tsh</i>	2 (20%)	12 (29.27%)	14 (27.45%)
<i>astA</i>	6 (60%)*	13 (31.71%)	19 (37.25%)
<i>aggR</i>	3 (30%)*	2 (4.88%)	5 (9.80%)
<i>hlyF</i>	7 (70%)	30 (73.17%)	37 (72.55%)
<i>irp1</i>	3 (30%)*	3 (7.32%)	6 (11.76%)
<i>iucD</i>	8 (80%)*	30 (73.17%)	38 (74.51%)
<i>fyuA</i>	2 (20%)*	2 (4.88%)	4 (7.84%)
<i>ybtA</i>	3 (30%)*	3 (7.32%)	6 (11.76%)
<i>iroN</i>	2 (20%)	18 (43.90%)	20 (39.22%)
<i>ompT</i>	5 (50%)	25 (60.98%)	30 (58.82%)
<i>ompA</i>	10 (100%)*	39 (95.12%)	49 (96.08%)
<i>iutA</i>	4 (40%)	22 (53.66%)	26 (50.98%)
<i>iss</i>	3 (30%)	18 (43.90%)	21 (41.18%)
<i>colV</i>	0 (0)	41 (100%)	11 (21.57%)

表7 生物被膜阳性菌株毒力基因型

菌株	毒力基因型
E13	<i>iss+aggR+astA+fimC+ompA+ompT+iucD+iroN+tsh+fimH+ybtA+irp1</i>
E11	<i>astA+fimC+ompA+hlyF+fimH</i>
E21	<i>ompA+iucD+iutA+fimH</i>
E30	<i>astA+ompA+ompT+hlyF+iucD+iutA+fimH</i>
E24	<i>iss+aggR+astA+fimC+ompA+ompT+hlyF+iucD+fyuA+tsh+fimH+ybtA+irp1</i>
E44	<i>astA+ompA+ompT+hlyF+iucD+fimH</i>
E42	<i>iss+aggR+fimC+ompA+ompT+hlyF+iucD+iroN+fimH+eaeA</i>
E32	<i>astA+fimC+ompA+iucD+fyuA+fimH+ybtA+irp1</i>
E45	<i>fimC+ompA+iucD+iutA+fimH+hlyF</i>
E39	<i>fimC+ompA+hlyF+iucD+iutA+fimH</i>

### 2.7 毒力基因表达量情况

通过荧光定量PCR检测生物被膜阳性菌株中检出率高的 *fimH* (100%)、*ompA* (100%)、*fimC* (70%)、*hlyF* (70%)、*iucD* (80%) 毒力基因表达量情况,如图4所示。以OD值较小的菌株E39为对照,测定E13、E11、E21、E30、E24、E44、E42菌株中基因表达量,结果发现7株生物被膜形成能力较强的菌株中,除E44中*fimH*表达量下调外,其余菌株中基因表达量均上调。

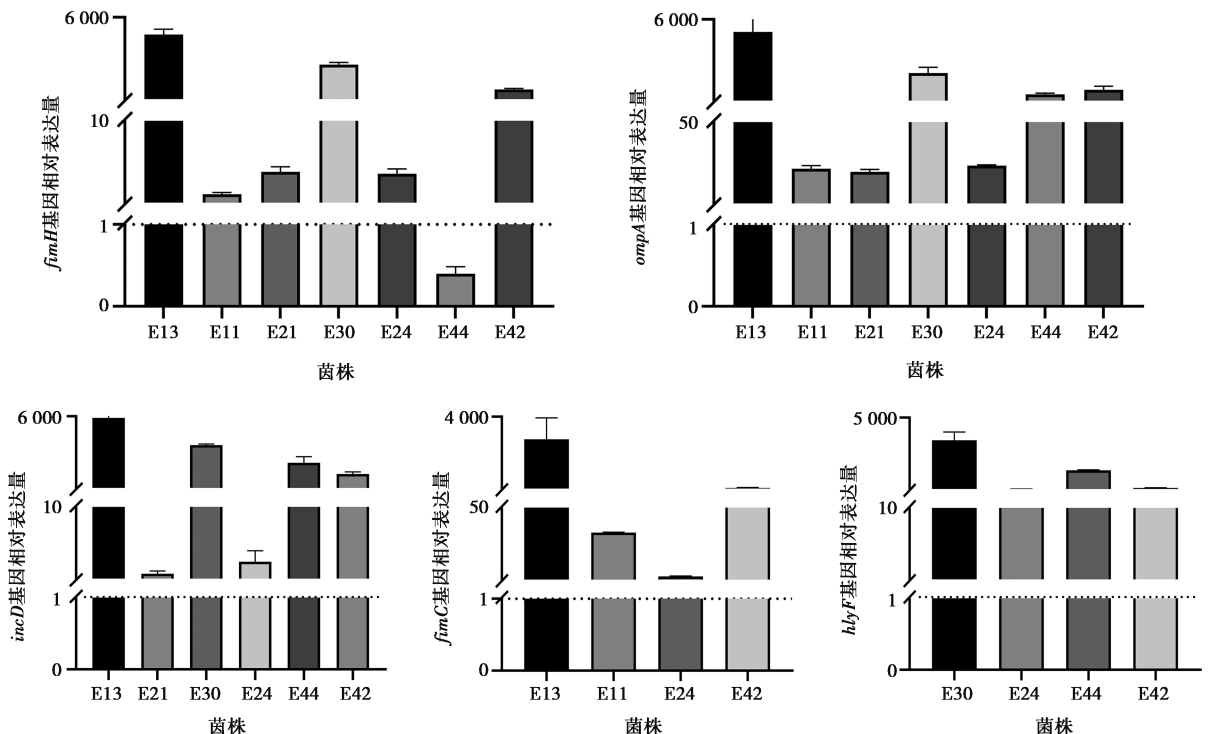


图4 生物被膜阳性菌株毒力基因相对表达量

### 3 讨论

大肠杆菌是鸡最常见的病原体之一，而大肠杆菌生物被膜的形成会导致各种感染的发生且根除困难。生物被膜是细菌群体被自身胞外多聚物包裹，不可逆地附着于接触表面而形成的有组织的膜状物质，这是细菌为适应自然环境有利于生存的一种生命现象。生物被膜菌比浮游菌对抗菌药的耐受性提高 10~1 000 倍<sup>[12]</sup>。本试验通过刚果红琼脂试验测得生物被膜阳性菌株检出率 19.61%，与蔺飞等<sup>[13]</sup>研究结果 (27.66%) 相似。近年来，细菌生物被膜阳性菌株逐渐增多，耐药现象严重。本研究发现，生物被膜阳性菌株对头孢唑肟、氟苯尼考、黏菌素、庆大霉素、阿米卡星的耐药率分别为 70%、80%、40%、70%、50%，高于阴性菌株耐药率。10 株生物被膜阳性菌株中，共有 8 株对 3 种以上抗菌药耐药，多重耐药率 80%，共有 8 种耐药谱，与刘璨颖等<sup>[14]</sup>、周陆红等<sup>[15]</sup>研究结果基本一致。*OD* 值最大的 E13 菌株对 8 种抗菌药均耐药，携带 9 种本研究检测耐药基因；E11、E21、E30 菌株耐药谱为 (阿莫西林+克拉维酸)+头孢唑肟+恩诺沙星+氟苯尼考+庆大霉素+阿米卡星+黏菌素。说明生物被膜形成能力越强，耐药性越强，耐药谱越广，耐药基因检出率高，基因型也越复杂。

细菌生物被膜的形成与多种毒力因子如铁摄取系统、黏附素、肠毒素基因等有关；毒力基因属于 DNA 片段，能够编码细菌致病基因组，与细菌致病性、生殖进化有一定关系。有研究表明大肠杆菌致病性与自身携带的毒力基因有相关性，因此可以从大肠杆菌的毒力基因携带及表达水平研究菌株的致病机理<sup>[16]</sup>。本试验对 51 株鸡源大肠杆菌进行毒力基因检测，PCR 结果显示共有 *iss*、*aggR*、*fimC*、*fimH*、*ompA* 等 16 种毒力基因检出，基因 *aggR*、*astA*、*ompA*、*iucD*、*fyuA*、*fimH*、*ybtA*、*irp1* 在生物被膜阳性菌株中的检出率高于阴性菌株，且差异显著。*ler*、*eaeA*、*sfa*、*escV*、*eae*、*estA*、*estB*、*elt* 均未检出，与陈亚强<sup>[7]</sup>、李巧玲<sup>[9]</sup>试验结果一致。*ompA* 基因属于大肠杆菌细胞壁中脂质双层结构的外膜蛋白，能够增强细菌对物质的运输能力及抵抗机体免疫<sup>[6]</sup>，与抗菌药耐药性、侵袭性和生物被膜形成有关<sup>[17]</sup>；*fimH* 基因在生物被膜形成过程中起到黏附素的作用，参与生物被膜不可逆黏附阶段<sup>[18]</sup>。试验结果显示 *ompA*、*fimH* 基因在生物被膜阳性菌株中的检出率均为 100%，在阴性菌中的检出率分别为 95.12%、92.68%，差异具有统计学意义；*ompA*、*fimH* 检出率与蔺飞<sup>[13]</sup>、曲凤仪<sup>[10]</sup>的试验结果相一致，本试验结

果与赵李祥<sup>[11]</sup>、钟杏好<sup>[19]</sup>的结果相近，均在 90% 左右。其中毒力基因 *ompA*、*fimH*、*fimC*、*iucD*、*hlyF* 检出率较高，故以 *OD* 值较小的 E39 菌株为对照，测定 5 种基因在 *OD* 值介于 1.455~1.607 的菌株中表达量变化。qPCR 结果显示生物被膜阳性菌株中除 E44 中 *fimH* 表达量下调外，其余菌株中基因表达量均上调，总体来说毒力基因表达量呈现上调趋势，可能毒力基因的存在促进了生物被膜的形成，导致耐药现象严重。杨进等<sup>[20]</sup>研究表明强生物被膜形成能力菌株中 *fimH* 基因的检出率高于弱成膜形成能力菌株，提示这些毒力基因在生物被膜形成过程中发挥着重要作用。

细菌生物被膜的形成导致耐药现象越来越严重，形成生物被膜的细菌感染后治疗更加困难，且有复发的机会<sup>[21]</sup>。目前临床上多种抗菌药治疗效果差，不仅要考虑耐药性因素，更要深入研究生物被膜形成后产生的耐药机制<sup>[22]</sup>。本试验中生物被膜阳性菌株耐药现象严重，且有多种耐药谱、基因型，说明耐药性、毒力基因表达量上调与生物被膜的形成显著相关。

### 参考文献：

- [1] 宋超慧, 胡燕, 吴慧敏, 等. 乌鲁木齐市宠物猫源大肠杆菌耐药性及耐药基因检测 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54 (1): 43-48.
- [2] 周炜, 周芷锦, 沈红霞, 等. 我国猪源和鸡源大肠杆菌抗生素耐药性相关基因研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2021, 55 (7): 59-68.
- [3] KOZAK G K, BOERLIN P, JANECKO N, et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75 (3): 559-566.
- [4] 邓小玲, 孙影, 尤向峰, 等. 禽致病性大肠杆菌生物被膜形成能力及相关特性分析 [J]. 南京农业大学学报, 2021, 44 (5): 918-926.
- [5] ALMARRI T, ALMARRI A, ALZANBAQI R, et al. Multidrug resistance, biofilm formation, and virulence genes of *Escherichia coli* from backyard poultry farms [J]. Vet World, 2021, 14 (11): 2869-2877.
- [6] 彭严严, 汪石鹏, 鲁向文, 等. 鹅源大肠杆菌的分离鉴定、药敏试验及耐药基因、毒力基因的检测 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021 (10): 85-89.
- [7] 陈亚强, 彭津津, 廖明, 等. 土鸡屠宰过程中大肠杆菌毒力基因检测及耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47 (8): 2615-2624.
- [8] 范玉堂. 大肠埃希菌生物被膜对抗生素和消毒剂药敏的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [9] 李巧玲, 张召兴, 张文举, 等. 致狐狸肺炎大肠杆菌血清鉴定

- 与毒力基因检测 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (3): 432-437.
- [10] 曲凤仪, 孙婷庭, 刘书玉, 等. 貉源大肠杆菌毒力基因的检测与分析 [J]. 野生动动物学报, 2021, 42 (1): 81-85.
- [11] 赵李祥. 禽病原性大肠杆菌与尿道致病性大肠杆菌毒力基因相关性与其 ftsk 突变株的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2008.
- [12] 陈传荣, 韩敏敏, 张乃嘉, 等. 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 [J]. 微生物学通报, 2016, 43 (10): 2234-2241.
- [13] 蔺飞, 袁明勇, 凌保东. 鲍曼不动杆菌生物膜相关基因研究 [J]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2021, 15 (2): 129-132.
- [14] 刘璨颖, 李建宏, 梅启定, 等. 禽源致病性大肠杆菌的耐药性和毒力基因研究 [J]. 中国家禽, 2018, 40 (13): 21-25.
- [15] 周陆红, 张鹏飞, 张杰, 等. 屠宰猪中大肠杆菌毒力基因检测及耐药性分析 [J]. 食品科学, 2019, 40 (2): 264-268.
- [16] LIU Y, GONG Q, QIAN X, et al. Prophage phiv205-1 facilitates biofilm formation and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* strain DE205B [J]. Vet Microbiol, 2020, 247 (8): 108752.
- [17] LI Z, DING Z, LIU Y, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. Infect Drug Resist, 2021, 14 (7): 2613-2624.
- [18] 王泽平, 李倩文, 尹磊, 等. 大肠杆菌三型分泌系统 2 转录调节子 EtrA 对禽致病性大肠杆菌致病性的影响 [J]. 微生物学通报, 2020, 47 (5): 1515-1523.
- [19] 钟杏好, 李进福, 段沙沙, 等. 不同 CTX-M 亚群鸡大肠杆菌毒力基因的流行特征 [J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32 (2): 152-155.
- [20] 杨进, 高清清, 顾晓, 等. 尿道致病性大肠杆菌临床分离株种系分型、毒力基因型及生物被膜表型分析 [J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26 (5): 24-29.
- [21] GUPTA P, SARKAR S, DAS B, et al. Biofilm, pathogenesis and prevention: a journey to break the wall: a review [J]. Arch Microbiol, 2016, 198 (1): 1-15.
- [22] PARK N H, LEE S J, LEE E B, et al. Colistin induces resistance through biofilm formation, via increased phoQ expression, in Avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Pathogens, 2021, 10 (11): 1525.