文章编号:1674-2869(2025)04-0413-05

无锡市某医院大肠杆菌耐药情况分析

叶正超,孙雪言,赵喜红*
武汉工程大学环境生态与生物工程学院,湖北 武汉 430205

摘 要:为了研究我国无锡地区大肠杆菌的耐药现状,采用最小抑菌浓度法进行药敏实验,对来源于无锡市某医院检验科的75株大肠杆菌进行氨苄西林、环丙沙星、诺氟沙星、四环素等8种抗生素耐药率检测,并研究其耐药进化和耐药稳定性。结果显示三重及以上抗生素耐药的菌株达73.3%,对氨苄西林、环丙沙星、诺氟沙星、四环素、复方新诺明、头孢噻吩的耐药率分别为92%、60%、53.3%、45.3%、49.3%、52%,对卡那霉素和氯霉素耐药率为12%和13.3%。大肠杆菌在抗生素长时间的胁迫下自身的耐药性普遍提高,且这种耐药性的变化可以被遗传。研究结果可为医生提供参考,以避免抗生素滥用,有利于推动抗生素的减少使用和综合管理。

关键词:大肠杆菌;最小抑菌浓度法;耐药性;稳定性
中图分类号:R446.5 **文献标识码**:A **DOI**:10.19843/j.cnki.CN42-1779/TQ.202310019

Analysis of drug resistance in *Escherichia coli* in a Wuxi hospital

YE Zhengchao*, *SUN Xueyan*, *ZHAO Xihong*
School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: To study *Escherichia coli*'s drug resistance in Wuxi area of China, the minimum inhibitory concentration (MIC) method was used for *Escherichia coli*'s drug sensitivity testing. Seventy-five isolates of *Escherichia coli* from the clinical laboratory of a hospital in Wuxi City were tested for resistance to 8 antibiotics such as ampicillin, ciprofloxacin, norfloxacin and tetracycline, and their resistance evolution and stability were studied. The results showed that the proportion of isolates resistant to three or more antibiotics reached 73.3%, with resistance rates to ampicillin, ciprofloxacin, norfloxacin, tetracycline, cotrimoxazole, cefalotin being 92%, 60%, 53.3%, 45.3%, 49.3% and 52%, respectively, and those to kanamycin and chloramphenicol were 12% and 13.3%, respectively. Under long-term stress of antibiotics, the drug resistance of *Escherichia coli* generally increased, and this change in resistance could be inheritable. These findings provide references for doctors to avoid antibiotic abuse, by promoting the reduction of antibiotics use and their comprehensive management.

Keywords: *Escherichia coli*; minimum inhibitory concentration; drug resistance; stability

抗生素是改善人类健康的最重要发现之一,通过预防细菌感染而发挥作用。然而,抗生素耐药性削弱其在了临床领域、寿命和安全食品生产方面的进展动能作用。这一现象进一步恶化是由于抗生素研发渠道的减少,自20世纪90年代,新抗生素的研发和商业化进展已经减缓[1]。即使新的抗生素可以继续保护人们免受细菌的侵害,但抗生素的滥用会让细菌不断进化成长,人们的健康情况又将面临非常严重的威胁[2]。抗生素胁迫下存活的菌株不仅可以把抗性基因传给其他的宿主,甚至可以影响到其他的群落的生长[3]。据估计,若不限制抗生素滥用,到2050年,将会有1 000万人

收稿日期:2023-10-24
基金项目:湖北省自然科学基金(2018CFB514)
作者简介:叶正超,硕士研究生。Email:1099162250@qq.com
***通信作者**:赵喜红,博士,教授。Email:zxh@wit.edu.cn
引文格式:叶正超,孙雪言,赵喜红.无锡市某医院大肠杆菌耐药情况分析[J].武汉工程大学学报,2025,47(2):413-417.

死亡;除了对人们生命的巨大威胁之外,届时,微生物耐药性还将造成3 000亿~10 000亿美元的经济损失[4-5]。因此,我们需要通过采取各种措施来限制微生物耐药性对人们生命和经济的威胁。

本文选取2023年5月无锡市某三甲医院的病人体内分离出来的大肠杆菌进行药敏实验。本研究对其结果进行了统计以及数据分析,旨在了解当下最新的大肠杆菌的耐药情况与特点,进而为临床提供用药建议,也可以更好地进行耐药菌株防控。

1 实验部分

1.1 材 料

1.1.1 菌 株 EDL933,*ΔLuxS*,C7菌株由本实验室提供。EDL933为质控菌株,*ΔLuxS*为实验室保存的缺失*luxS*基因的大肠杆菌菌株,C7菌株为实验室保存的食源性大肠杆菌。75株已鉴定过的大肠杆菌由无锡市某三甲医院馈赠。详细来源见表1。

1.1.2 药品与试剂 麦康凯琼脂培养基(青岛海博生物技术有限公司);MH培养基(杭州微生物试剂有限公司);氯化钠、氨苄西林、诺氟沙星、环丙沙星、盐酸四环素、氯霉素[生工生物工程(上海)股份有限公司];胰蛋白胨、酵母提取物(北京拜尔迪生物技术有限公司);复方新诺明、卡那霉素、头孢噻吩(北京索莱宝科技有限公司)。

1.1.3 仪器和设备 MQD-S3R振荡培养箱(上海旻泉仪器有限公司);Multiskan FC型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];BSC-1600Ⅱ A2生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 药敏试验 从LB平板上挑取单菌落至LB液体培养基中,在37 ℃,180 r/min条件下过夜培养至对数生长,菌密度达到0.5麦氏单位。将8种抗生素母液按照梯度稀释的方法,分别稀释到1 024、512、256、128、64、32、16、8、4 μg/mL。吸取各浓度抗生素100 μL,加入96孔板中,同时加入制备好的菌液,将96孔板盖上盖子放入恒温摇床中37 ℃,180 r/min培养12~16 h,培养完成后测量600 nm波长下的吸光度值,得到每个孔内菌的生长情况,得到最小抑菌浓度。所有标准参考《抗菌药物敏感性试验性能标准》(M100—2021),如表2所示。试验重复3次,数据以均值±标准差表示。

1.2.2 传代实验 选取EDL933、*ΔLuxS*、C7菌株和19193号菌株作为实验对象进行耐药进化实验,初始传代浓度为各抗生素的1/2耐药率(minimun inhibitory concentration,MIC)。传代30 d后进行3种抗生素的最小抑菌浓度测定。之后再对进化至30 d的耐药菌进行5 d的无抗生素条件的传代培养,测定其8种抗生素的最小抑菌浓度。

表1 实验菌株来源

Table 1 Source of experimental strains

编号	来源	编号	来源	编号	来源
EDL933	本实验室	19057	医院	25105	医院
ΔLuxS	本实验室	19169	医院	25173	医院
C7菌株(O157)	本实验室	20079	医院	25192	医院
11007	医院	20145	医院	25195	医院
12012	医院	20209	医院	26037	医院
12035	医院	20236	医院	26056	医院
12140	医院	21041	医院	26058	医院
12141	医院	21060	医院	26170	医院
13006	医院	21104	医院	26219	医院
13179	医院	21139	医院	26248	医院
14051	医院	21147	医院	27139	医院
14068	医院	21170	医院	27189	医院
14162	医院	21222	医院	27215	医院
14199	医院	22067	医院	29010	医院
14224	医院	22075	医院	29046	医院
15140	医院	22092	医院	29105	医院
16135	医院	22145	医院	29129	医院
16203	医院	22149	医院	30027	医院
16227	医院	24066	医院	30034	医院
17110	医院	24088	医院	30110	医院
17155	医院	25018	医院	30115	医院
18043	医院	25066	医院	30126	医院
18049	医院	25070	医院	30182	医院
18054	医院	25089	医院	30184	医院
18081	医院	25102	医院	30195	医院
18119	医院	25104	医院	30222	医院

表2 抗生素MIC结果评定标准

Table 2 Evaluation criteria for antibiotic MIC results μg/mL

抗生素	敏感(S)	中度敏感(I)	耐药(R)
环丙沙星	≤1	2-3	≥4
四环素	≤4	2-15	≥16
复方新诺明	≤20	21-319	≥320
诺氟沙星	≤2	3-15	≥16
氨苄西林	≤8	9-31	≥32
卡那霉素	≤16	17-63	≥64
氯霉素	≤8	9-31	≥32
头孢噻吩	≤8	9-31	≥32

2　结果与讨论

2.1　标本分布

一共从医院得到75株捐赠的大肠杆菌，如表3所示这些菌株从尿、血、胆汁、痰、分泌物、穿刺液、脓液等分离而来。其中以尿、腹水、血分离出来的为主，占80%（60/75）。

表3　2023年5月无锡市某医院大肠杆菌来源

Table 3　Sources of *E. coli* in a hospital in Wuxi City in May 2023

标本来源	标本数量	多重耐药菌分数（比例）
尿	43	46.6%（35/75）
血	9	6.67%（5/75）
分泌物	1	0.00%（0/75）
穿刺液	1	1.33%（1/75）
脓液	4	1.33%（1/75）
痰	6	4.00%（3/75）
腹水	8	9.33%（7/75）
胆汁	3	4.00%（3/75）
合计	75	73.33%（55/75）

2.2　药敏试验结果

这些大肠杆菌都是来源于病人，可以通过这75株大肠杆菌药敏结果对无锡市地区耐药情况有个初步的了解，这说明无锡市的耐药情况已经比较严重。由表4可知，这8种抗生素的耐药率由高到低分别是氨苄西林（92%，69/75）、环丙沙星（60%，45/75）、诺氟沙星（53.3%，40/75）、头孢噻吩（52%，39/75）、复方新诺明（49.3%，37/75）、四环素（45.3%，34/75）。而大肠杆菌对卡那霉素和氯霉素则相对敏感，分别仅有12%和13.3%。

表4　8种抗生素的耐药率情况

Table 4　The resistance rate of 8 kinds of antibiotics

药物种类	药物名称	耐药率
β-内酰胺类	氨苄西林	92.0%（69/75）
喹诺酮类	环丙沙星	60.0%（45/75）
喹诺酮类	诺氟沙星	53.3%（40/75）
四环素类	四环素	45.3%（34/75）
氨基糖苷类	卡那霉素	12.0%（9/75）
磺胺类	复方新诺明）	49.3%（37/75）
头孢类	头孢噻吩	52.0%（39/75）
氯霉素类	氯霉素	13.3%（10/75）

2.3　大肠杆菌多重耐药分析

在这75株菌株中，耐药情况已经非常严重。仅有1株大肠杆菌对8种抗生素均不耐药，完全敏感株仅占1.33%，而多重耐药株则高达73.3%。这批菌株中多重耐药数最多的3种分别是4耐，5耐和2耐，其占比分别为26.6%（20/75），18.6%（14/75），16%（12/75）（见图1）。说明本批实验的大肠杆菌耐药性比较严重。

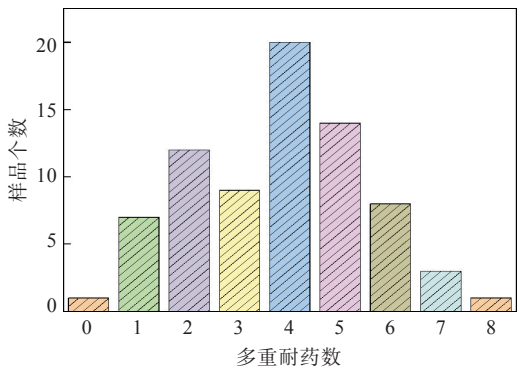

图1　大肠杆菌多重耐药性分析

Fig. 1　Multidrug resistance analysis of *E. coli*

2.4　不同抗生素处理下的EDL933、*ΔLuxS*、C7和19193号菌株的耐药进化性

在本实验中，19193号菌株为75菌株中的唯一全敏感菌株。群体感应是细菌之间的一种交流行为，它涉及细菌间的方方面面如抗生素合成，生物被膜的生长，自由基的形成等诸类可能对细菌的耐药性产生影响的行为。

如图2所示，在氯霉素（chloramphenicol，CM）、卡那霉素（kanamycin，Kan）、四环素（tetracycline，TCY）的胁迫下，这4株实验菌株对这些抗生素的耐药性都有不同程度的增加。与EDL933相比，*ΔLuxS*的耐药进化速度明显降低。在CM的胁迫下，*ΔLuxS*最终达到了32 μg/mL的耐药性，EDL933达到了64 μg/mL的耐药性。TCY的情况和CM的情况相同。而在Kan的胁迫下，虽然*ΔLuxS*和EDL933最终并没有达到耐药的程度，但是在30 d之后，这2株菌株的耐药程度也大幅上涨。这说明少了*luxS*后，影响了AI-2的合成，最终导致缺失株相较于正常的大肠杆菌是缺少了群体感应的，而这个很有可能也是影响了其耐药进化性的原因。通过多次诱导，菌株的最小抑菌浓度增加是普遍现象，但并非一定。比如Kan胁迫下的19193号菌株和TCY胁迫下的C7菌株，这2种菌株分别在各自的抗生素胁迫下传代了30 d，但是并没有产生MIC的变化。因此，菌株在抗生素胁迫下的耐药进化是一种大趋势，但并非一定。

2.5　不同抗生素处理下的EDL933、*ΔLuxS*、C7和19193号菌株的耐药稳定性

通过30 d抗生素胁迫进化，不同大肠杆菌菌株的MIC大部分显著上升。但是这种耐药进化并

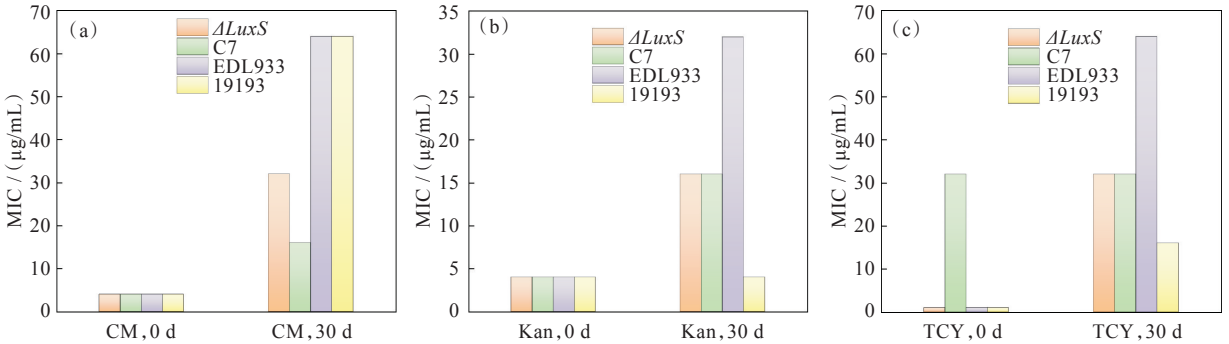

图2 亚致死浓度抗生素胁迫下的*ΔLuxS*、C7、EDL933、19193号菌株的耐药进化:(a)传代前后菌株对CM的MIC,(b)传代前后菌株对Kan的MIC,(c)传代前后菌株对TCY的MIC

Fig. 2 Drug resistance evolution of strain *ΔLuxS*, C7, EDL933 and 19193 under sublethal concentration of antibiotics: (a)MIC of strains to CM before and after passage, (b) MIC of strains to Kan before and after passage, (c) MIC of strains to TCY before and after passage

不能确定在耐药胁迫后是否会回归到初始耐药水平。因此,将之前已经进化到30 d的耐药菌株,进行了5 d无抗生素的传代培养。结果如图3所示,所有菌株在无抗生素胁迫的传代后MIC均未发生显著变化,这表明实验菌株的耐药性在抗生素长期胁迫下发生改变,且可被稳定遗传。

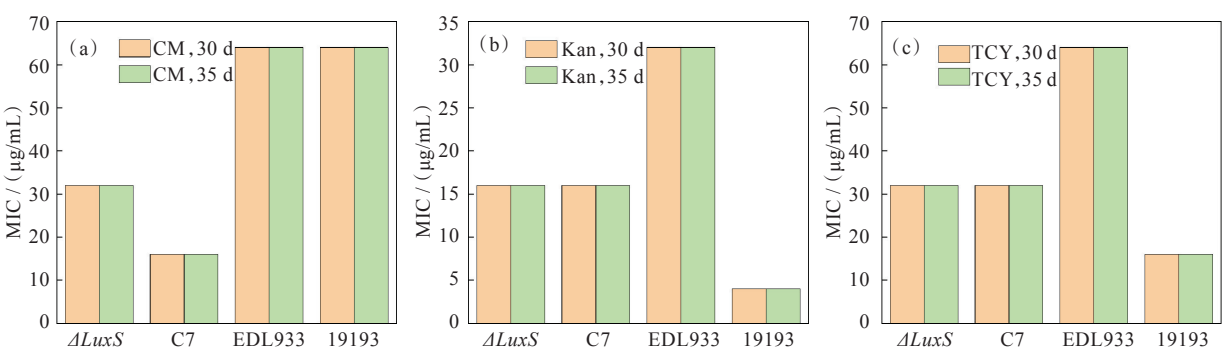

图3 无抗生素胁迫下的*ΔLuxS*、C7、EDL933、19193号菌株的耐药稳定:(a)传代前后菌株对CM的MIC,(b)传代前后菌株对Kan的MIC,(c)传代前后菌株对TCY的MIC

Fig. 3 Drug resistance stability of *ΔLuxS*, C7, EDL933 and 19193 without antibiotic stress: (a)MIC of strains to CM before and after passage, (b) MIC of strains to Kan before and after passage, (c)MIC of strains to TCY before and after passage

3 结 论

目前,多重耐药菌对人们的影响已经到生活的方方面面,越来越多的人被感染,增加人类的死亡率[6],人类公共卫生安全不断受到挑战。本实验获取医院病人的最新菌株,其实验结果可以清晰地呈现当下病人体内细菌的耐药情况。而大肠杆菌作为一种人们最熟知和最常见的细菌,用来选作实验对象具有代表性。本研究共有75株大肠杆菌作为实验对象,其中多重耐药菌占73.3%,结果表明,现今的耐药情况已较严峻。在参与实验的抗生素中,大肠杆菌仅对卡那霉素和氯霉素敏感。其余6种抗生素的耐药率都比较高。这与程然等[7]研究类似,其在研究75株大肠杆菌耐药性情况时,环丙沙星(53.9%),复方新诺明(59.8%),氨苄西林(92%)等抗生素的耐药性也都超过了50%。张胜勇等[8]也发现大肠杆菌对氨苄西林(100%),环丙沙星(69.39%),复方新诺明(75.51%)的耐药性较高,大肠杆菌对氯霉素(9.18%)的耐药性较低。但是其研究得出的大肠杆菌对四环素耐药性较低(4.08%),与本实验结果不一致,这可能是受各地区样本环境不同的影响(本文样本仅来自单一医院,仅反应该医院情况)。

在耐药进化实验中,选取了75株菌株中唯一对8种抗生素全部敏感的19193号菌株进行实验。在被抗生素多次诱导后,其本身的最小抑菌浓度就很有可能显著增加。因此不能完全靠抗生素来解决问题,需要在源头对病原菌进行消灭和遏制,一旦有所残留,通过大量的诱导,很有可能最终成为“超级细菌”。李悦[9]在研究铜绿假单胞菌的耐

药进化时，通过不同抗生素20 d的传代后，铜绿假单胞菌对环丙沙星的MIC提高了16~256倍。在头孢他啶和阿米卡星的胁迫下，细菌的MIC提高了128倍。MIC的显著增加都显示耐药进化的严重性。

通过EDL933和*ΔLuxS*的耐药进化实验对比，发现缺少了群体感应的菌株，在面对抗生素的环境胁迫时，耐药进化不如普通菌株。这也可能暗示着群体感应的存在影响细菌抵抗外部环境的能力。GARCÍA-CONTRERAS等[10]发现绿脓假单胞菌群体感应系统*lasR*基因缺失后，缺失株在热、渗透压、重金属离子的压力下，其本身的抵抗外部环境的能力都有明显减弱。

细菌可以不断进化，提高自身对抗生素的耐受性。张胜勇等[8]在河南省新郑市在2020年检出的多重耐药大肠杆菌占比占全部病原菌的46.01%。谭萍等[11]在研究深圳市某三级医院2016至2020年的多重耐药大肠杆菌时，发现多重耐药大肠杆菌在全部病原菌的占比一直在50%左右。彭玲等[12]在研究上海市大肠杆菌的耐药情况时，发现大肠杆菌对氨苄西林等7种抗生素的耐药性都超过了50%，且在不断地增加。这都表明了多年来临床上抗菌药物的广泛应用，抗生素虽然可以帮助病人，但是其也是导致多重革兰氏阴性耐药菌大量出现的主要原因[13]，这也对人们的生命健康造成了巨大的威胁[14]。抗生素还通过滥用进入水产中[15]，人工养殖的南美白对虾中也检测出抗生素残留。近年来，多重耐药菌数量的快速增加[7]，加剧了医疗风险，威胁人民群众的健康安全。对于细菌耐药性以及多重耐药菌的研究任重而道远。

参考文献

[1] SINGER A C, KIRCHHELLE C, ROBERTS A P. (Inter) nationalising the antibiotic research and development pipeline [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2020, 20(2): e54-e62.

[2] LEE C R, CHO I H, JEONG B C, et al. Strategies to minimize antibiotic resistance [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2013, 10(9): 4274-4305.

[3] LEVY S B, MARSHALL B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses [J]. Nature Medicine, 2004, 10(12): S122-S129.

[4] DE KRAKER M E A, STEWARDSON A J, HARBARTH S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? [J]. PLoS Medicine, 2016, 13(11): e1002184.

[5] BURKI T K. Superbugs: an arms race against bacteria [J]. The Lancet. Respiratory Medicine, 2018, 6(9): 668.

[6] 周勇，和鹏，侯水平，等. 重症监护病房耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药机制和分子分型的研究[J]. 实用预防医学，2021，28(4)：446-449.

[7] 程然，靖杰，伍勇，等. 2015年湘雅三医院临床分离病原菌分布的特点及耐药性分析[J]. 实用预防医学，2017，24(1)：109-113.

[8] 张胜勇，赵嘉咏，刘颖惠，等. 2020年河南省新郑市某三级医院临床分离病原菌耐药状况分析[J]. 现代疾病预防控制，2023，34(6)：461-466.

[9] 李悦. 群体感应介导的铜绿假单胞菌耐药进化机制研究[D]. 杭州：浙江工商大学，2020.

[10] GARCÍA-CONTRERAS R, NUÑEZ-LÓPEZ L, JASSO-CHÁVEZ R, et al. Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating [J]. The ISME Journal, 2015, 9(1): 115-125.

[11] 谭萍，朱平安，金娴，等. 2016—2020年深圳某三级医院病原菌分布及耐药变化趋势[J]. 实用预防医学，2022，29(10)：1259-1263.

[12] 彭玲. 上海市某医院综合ICU多重耐药革兰阴性杆菌耐药性、危险因素分析及预测模型建立[D]. 南昌：南昌大学，2022.

[13] LOGAN L K, WEINSTEIN R A. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2017, 215(suppl. 1): S28-S36.

[14] PODSCHUN R, ULLMANN U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(4): 589-603.

[15] 李小玥，姚槐应，葛超荣. 人工养殖南美白对虾中副溶血弧菌的分离鉴定及抗生素耐药性分析[J]. 武汉工程大学学报，2022，44(6)：658-663.

本文编辑：张　瑞