

对话陈声: 关注细菌耐药

我国是抗菌药物最大的生产和使用国. 抗菌药物被称为最伟大的发明之一, 并被广泛应用于医疗卫生、农业养殖等领域, 在治疗感染性疾病、防治动物疫病、提高养殖效益和保障公共卫生安全等方面发挥重要作用. 但是近些年, 细菌耐药事件频频发生, 世界卫生组织多次呼吁合理使用抗生素. 为使大众了解细菌耐药性的一些相关知识, 《科学通报》对话深圳市食品生物性安全防控重点实验室主任、香港理工大学食品安全及技术研究中心副主任、香港食品安全中心专家组成员、香港理工大学陈声教授.

陈声, 2000~2004年在美国马里兰大学攻读博士学位, 从事食源性病原菌耐药机理的研究; 2004~2009年在美国威斯康星医学院开展博士后研究工作, 从事细菌致病性和毒素结构功能研究; 2009年至今在香港理工大学先后任助理教授、副教授和教授, 长期从事微生物病原菌耐药机制、致病机制及新抗生素开发等研究. 已主持国家重点基础研究发展计划(973)1项、深圳市重点实验室项目1项, 香港研究资助局、传染病控制专项基金和香港理工大学研究项目16项, 在 *New Engl J Med*, *Lancet Infect Dis*, *Nat Commun*, *Pro Natl Acad Sci USA*, *Chem Comm* 等学术刊物上发表论文97篇, 研究论文被国际期刊他引超过2560次, 获美国发明专利2项.

《科学通报》: 请您简要介绍一下目前国内外细菌耐药性的研究及发展情况.

陈声: 2000年我从中国农业大学硕士毕业后到美国马里兰大学攻读博士学位, 主要研究方向就是细菌的耐药性. 我的第一个研究课题是从肉类食品中分离并鉴定携带 *bla*_{CMY-2} 型β-内酰胺酶的沙门菌, 该研究结果发表在2001年的 *New Engl J Med*^[1]. 这也说明17年前, 细菌耐药性还普遍较低, 而且广受人们的重视. 随后的一个课题是比较从美国和中国不同来源分离到的大肠杆菌和沙门菌的耐药性差异. 研究发现, 从中国分离到的菌株对氟喹诺酮类抗生素的耐药性比美国分离株要高; 而中国分离到的菌株对头孢菌素类抗生素耐药性为零, 美国分离的部分菌株对头孢菌素类抗生素已经开始产生耐药, 这与两个国家当时的畜牧业抗生素使用情况吻合. 在中国, 氟喹诺酮类抗生素已经广泛应用于食品动物的养殖中, 而头孢菌素类抗生素由于价格偏高, 很少在动物上使用. 与之相反, 美国对氟喹诺酮类药物在动物上的使用控制较为严格, 然而头孢类



香港理工大学教授陈声

抗生素头孢噻唑当时已被批准用于动物疾病治疗. 抗生素使用的不同导致细菌耐药谱在两个国家存在巨大差别, 同时从侧面说明了在动物中使用氟喹诺酮类和头孢菌素类抗生素是推动细菌耐药性产生和流行的主要原因. 西方国家对病原菌的耐药性一直以来都非常重视, 美国于1996年成立了国家耐药性监测系统(NARMS), 对重要食源性病原菌的耐药性进行长期监测. 监测数据表明这些重要食源性病原菌的耐药性总体维持在较低水平, 例如沙门菌对头孢类抗生素的耐药性在4%左右, 对氟喹诺酮的耐药低于1%. 然而, 近10年是中国细菌耐药性快速发展的阶段, 细菌对临床重要抗生素的耐药率呈直线上升的趋势, 令人担忧的是, 目前这种上升趋势并未缓解, 反而促使耐药菌向着高毒力和高传播的方向发展, 给养殖业、环境和人体健康构成巨大的威胁.

《科学通报》: 细菌耐药性相对比较宽泛, 不同的细菌与不同的药物间会有不同的耐药性. 请您介绍一下目前对大众影响较大的抗生素及其耐药菌间的初步研究进展.

陈声: 氟喹诺酮和头孢类抗生素是较早使用的抗菌药物. 在肠杆菌科细菌中, 目前造成头孢类抗生素耐药最为流行的是CTX-M型超广谱β-内酰胺酶(ESBL). CTX-M型超广谱β-内酰胺酶于2002年首次在我国临床大肠杆菌中报道^[2], 并于2006在香港和内地的动物大肠杆菌中分离. 随后几年, CTX-M型超广谱β-内酰胺酶在动物和临床大肠杆菌中快速传播. 我们近两年对动物源大肠杆菌的研究发现, 鸡肉和猪肉中分离的大肠杆菌的 *bla*_{CTX-M} 基因阳性率

接近70%，而养殖场猪和鸡粪便中分离大肠杆菌的 bla_{CTX-M} 阳性率超过95%。对于临床分离菌，2016年的CHINET数据表明其大肠杆菌ESBL检出率高达45%。

沙门菌是人和动物重要的病原菌，而氟喹诺酮是用于治疗临床沙门菌感染的重要药物。氟喹诺酮耐药的沙门菌分别于2008和2010年首次在我国临床和动物的沙门氏菌中报道；头孢噻唑耐药的沙门菌在2009和2010年分别在临床和动物的沙门氏菌中报道。以往的研究显示沙门氏菌的氟喹诺酮耐药主要是由于 $gryA$ 基因的双重突变导致。然而沙门氏菌 $gryA$ 基因的双重突变很少发生，因此沙门氏菌氟喹诺酮耐药很低。而我们最近的研究发现临床分离鼠伤寒沙门菌对氟喹诺酮耐药率从2006年的20%上升到2013年的45%。究其原因，主要为质粒介导的喹诺酮耐药基因的产生。沙门氏菌可通过携带多种质粒介导的喹诺酮耐药基因来替代 $gryA$ 基因的双重突变而产生氟喹诺酮耐药。这一新的耐药机制的出现，使得沙门菌的治疗少了一种重要的抗生素选择^[3,4]。

霍乱弧菌、副溶血弧菌等是引起腹泻重要的病原菌。过去几年其对常用抗生素尤其是对氟喹诺酮和头孢类抗生素的耐药性一直保持较低水平。但近年来耐药性也逐渐上升，我们实验室从2011年开始持续跟踪弧菌的耐药性变化，到2016年，弧菌氟喹诺酮的耐药率已达到30%左右，其中靶基因突变和携带不同类型的 $qnrVC$ 基因是介导氟喹诺酮耐药的主要机制。弧菌对头孢类的耐药率在2016年达到20%左右。有意思的是，介导头孢类抗生素耐药的机制在不断的变化，从最早发现的PER-1头孢菌素酶到CMY-2到VEB-2又到了在肠杆菌科细菌中最流行的CTX-M类ESBL^[5-7]。在此过程中前面的头孢菌素酶渐渐消失，新出现的不断增加。介导这种耐药进化的机制还是一个谜，有待进一步研究。

碳青霉烯类抗生素是治疗ESBL等耐药菌极为有效的药物，然而其耐药率也快速上升。根据2016 CHINET耐药监测网数据，我国临床肺炎克雷伯菌的碳青霉烯耐药率从2005年的3%上升到2016年的18.6%。而碳青霉烯酶NDM-1和KPC-2的传播是导致碳青霉烯耐药率上升的主要因素。对耐药机制的进一步研究表明，携带KPC-2的质粒具有多样性，而携带NDM-1基因的质粒主要是由IncX3型质粒介导的。而不管相对多样性的KPC-2介导质粒或相对单一性的NDM-1介导质粒，其携带KPC-2或NDM-1基因的移动元件是非常保守的，说明了这些保守移动元件的转移是介导碳青霉烯耐药性传播的主要因素^[8]。由于碳青霉烯类抗生素耐药率的不断上升，临床上也出现了高毒力、高耐药和高传播力的肺炎克雷伯菌。这些病原菌入血后可造成高死亡率，而这类菌的治疗成为临床最为棘手的问题。

另外一个非常重要的药物为多黏菌素，多黏菌素被认为是治疗碳青霉烯耐药菌的最后一道防线。事实上多黏菌素是一剂“老药”，在我国耳肾毒性多黏菌素仅仅在动物上使用，在临床上尚未开始使用。近期我国会逐渐停止在农业上使用多黏菌素，而开始应用于临床抗多重耐药菌的治疗。但是由于长期在动物上使用，多黏菌素的耐药率不断增加。我国科学家2015年底发现了耐多黏菌素的 $mcr-1$ 基因。自此，它已在世界各地30多个国家被报道。 $mcr-1$ 基因多数情况下由可接合的质粒介导，并在大肠杆菌和其他细菌中广泛传播。目前研究表明， $mcr-1$ 主要由3种不同类型的质粒介导。然而携带 $mcr-1$ 基因的移动元件也非常保守，而且可以形成环状中间体，并介导 $mcr-1$ 基因在不同质粒甚至染色体上转移^[9,10]。虽然 $mcr-1$ 基因对多黏菌素的疗效的影响尚未明确，但其传播严重威胁了多黏菌素作为细菌感染最后一道防线的地位。

除了革兰阴性菌，革兰阳性菌的耐药性问题也非常值得关注。金黄色葡萄球菌是医院感染重要的病原菌，当金黄色葡萄球菌以神奇的速度变成耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)，随后耐万古霉素的MRSA陆续被报道，让全世界预感超级细菌年代的来临。值得庆幸的是，耐万古霉素金黄色葡萄球菌仍然很低，可能金黄色葡萄球菌很难产生万古霉素耐药。最近科学家们又发现了几种可治疗革兰阳性菌的新抗生素，似乎金黄色葡萄球菌的治疗不是难题。但是，肠球菌的耐药悄然出现，其对万古霉素的耐药逐年上升，对新药达托霉素的耐药也快速上升。另外一个潜在的问题是：造成肠球菌万古霉素耐药的机制是否将来有一天会在金黄色葡萄球菌适应并传播，这将会是另一个世界性抗感染治疗难题。

《科学通报》：据了解，细菌耐药性仍在高速发展，基因技术也逐步运用到细菌耐药性研究，能否为我们简单介绍相关的研究进展？

陈声：研究细菌耐药性近20年以来，我深切感受到细菌耐药的严重性。而近10年我国细菌耐药性到了一个高速发展的时期，从临床最常用的氟喹诺酮和头孢类抗生素到抗感染最后防线的碳青霉烯类抗生素和多黏菌素，细菌都可以从自然界中找到最好的应对方法，就是各种各样的耐药基因。这些耐药基因都是源于不同的细菌，是细菌用于竞争和自身生存的遗传因素，并属于这些特定的细菌。当细菌在长期抗生素的选择压力下，这些耐药基因的两端被装上不同的转座酶基因，形成可移动的元件。同时细菌染色体外遗传物质如噬菌体和质粒也在长期抗生素的选择压力下进行进化和重组，形成不同种类的可接合质粒。携带耐药基因的移动元件可被整合到不同的质粒上，并在不

同种属的细菌中进行转移,极大地加速细菌耐药性的产生和发展。随着过去几十年的积累,这种携带耐药基因的移动元件的种类越来越多,同时耐药质粒的种类也越来越多。当自然界中这种类似“积木”的材料种类越来越多时,细菌就可以组装出超级质粒以介导多种抗生素的耐药性。借助于现代二代和三代测序技术的进步,我们得以获得各种各样的质粒序列来研究多重耐药质粒的组成和进化。结果几乎令我们绝望。细菌可在一种质粒上装上各种各样的携带不同耐药基因的移动元件,产生一个介导多重耐药的超级质粒。一个敏感细菌在获得这个质粒后可马上变成一个超级细菌。更为严重的是,不同转座酶还可介导质粒重组,将两种或多种不同质粒整合成一个质粒,使它变成一个可适应多种宿主的广谱耐药质粒。随着质粒和耐药移动元件的种类增加,细菌可在各种各样的生态环境和小生境中,如水和土壤环境、动物和人的肠道环境、医院环境和食物环境等进行质粒组合和进化,快速组装出适应不同种属细菌的多重耐药的可接合质粒。今后细菌耐药性的发展

会变得越来越快和越来越难以控制。

《科学通报》:最后,请结合您的研究数据预测一下未来细菌耐药性的发展状况。

陈声:我个人认为细菌耐药性的问题才刚刚开始,在不久的将来会变得更为严重。人类回到前抗生素时代或进入后抗生素时代的预言将很快实现或已经到来。随着因细菌感染而死亡的患者的增加,临床上不得不使用更好的抗生素,在没有更有效的后备药物的情况下,人类医学将退回原始年代,一个简单的手术将可使人致命。人和病原菌的战争是长期的,寻找解决细菌耐药性的方法不仅仅是全世界科学家的最紧要任务,也是全世界人们要共同面对的问题。目前全世界各个国家、世界卫生组织等机构已经开始尝试不同的计划,如减少动物使用抗生素、停止在动物上使用人用重要抗生素如多黏菌素、临床上合理使用抗生素等措施。期望通过这些措施来缓解细菌耐药性的问题,并不断探索和研究,希望有一天能够找到行之有效的解决方法。

(张冬梅 王元火)

推荐阅读文献

- 1 White D G, Zhao S, Sudler R, et al. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *New Engl J Med*, 2001, 345: 1147-1154
- 2 Chanawong A, M'Zali F H, Heritage J, et al. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 630-637
- 3 Lin D, Chen K, Wai-Chi Chan E, et al. Increasing prevalence of ciprofloxacin-resistant food-borne Salmonella strains harboring multiple PMQR elements but not target gene mutations. *Sci Rep*, 2015, 5: 14754
- 4 Wong M H, Chan E W, Liu L Z, et al. PMQR genes oqxAB and aac (6') Ib-cr accelerate the development of fluoroquinolone resistance in Salmonella typhimurium. *Front Microbiol*, 2014, 5: 521
- 5 Li R, Ye L, Zheng Z, et al. Genetic characterization of a bla_{VEB-2}-carrying plasmid in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 6965-6968
- 6 Li R, Lin D, Chen K, et al. First detection of AmpC beta-lactamase bla (CMY-2) on a conjugative IncA/C plasmid in a *Vibrio parahaemolyticus* isolate of food origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 4106-4111
- 7 Li R, Wong M H, Zhou Y, et al. Complete nucleotide sequence of a conjugative plasmid carrying bla (PER-1). *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 3582-3584
- 8 Zhang R, Liu L, Zhou H, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) strains in China. *EBioMedicine*, 2017, 19: 98-106
- 9 Li R, Xie M, Zhang J, et al. Genetic characterization of mcr-1-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72: 393-401
- 10 Li R, Xie M, Lv J, et al. Complete genetic analysis of plasmids carrying mcr-1 and other resistance genes in an *Escherichia coli* isolate of animal origin. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72: 696-699