

# 人类与病原菌的军备竞赛: NDM-1 耐药基因与超级细菌

孙明伟<sup>1,2</sup>, 郑培文<sup>1,3</sup>, 高福<sup>1,4</sup>, 朱宝利<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

3 中国科学院研究生院, 北京 100049

4 中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101

**摘要:** 在人类历史上, 每一次诸如鼠疫和肺结核病等瘟疫的大流行, 都曾给人类的生存带来巨大的威胁。抗生素的应用使人类掌握了抵抗细菌感染的锐利“武器”, 但同时病原菌也通过突变和水平基因转移等方式产生了诸多耐药基因, 从而获得了对抗生素杀伤的坚固“盾牌”; 于是人类又不断地开发新式抗生素“武器”来破解病原菌的耐药“盾牌”——一场“军备竞赛”愈演愈烈。近来研究发现, 携带编码 NDM-1 基因的耐药质粒不仅可以在细菌间转移, 而且能使所在宿主菌成为可以耐受几乎全部抗生素的超级细菌。但是, 凭借着日益进步的科技和医学, 以及科学的用药策略, 我们一定可以再次战胜超级细菌。

**关键词:** NDM-1, 超级细菌, 军备竞赛, 耐药基因

## Arms racing between human beings and pathogens: NDM-1 and superbugs

Mingwei Sun<sup>1,2</sup>, Beiwen Zheng<sup>1,3</sup>, George F. Gao<sup>1,4</sup>, and Baoli Zhu<sup>1</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 College of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Throughout human history, pandemic bacterial diseases such as the plague and tuberculosis have posed an enormous threat to human beings. The discovery of antibiotics has provided us with powerful arsenal for the defense against bacterial infections. However, bacteria are acquiring more and more resistance genes to shield off antibiotics through mutation and horizontal gene transfer. Therefore, novel antibiotics must be produced and the arms race between bacterial pathogens and antibiotics is becoming increasingly intense. Recently, researchers have found that plasmids carrying a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and many other antibiotics resistance genes can easily spread through bacterial populations and confer recipient stains resistance to nearly all of the current antibiotics. It is a threat to the human health and a great challenge for our medical science, which we are facing. We need to find new ways to fight and win this arms racing.

**Keywords:** NDM-1, superbugs, arms racing, resistance gene

**Received:** September 14, 2010; **Accepted:** September 27, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30770060), Foundation for Innovative Research Groups of the National Natural Science Foundation of China (No. 81021003).

**Corresponding author:** Baoli Zhu. Tel: +86-10-64807362; E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

国家自然科学基金项目 (No. 30770060), 国家自然科学基金创新研究群体科学基金 (No. 81021003) 资助。

从古至今,人类与致病菌一直在进行着无休止的战斗。抗生素的诞生结束了几千年来人类对于病原菌的束手无策,铸就了医学史上的辉煌。于是间,一场细菌与抗生素间的“军备竞赛”拉开了帷幕。抗生素时代的人们一手捍卫着文明,另一只手却于无意间催生出更为危险的敌人。今天,具有多重耐药基因的“超级细菌”兵临城下,向我们发出了又一次挑战的同时,也为人类的抗生素滥用敲响了警钟。

## 1 2010年的又一则新闻

就在世界卫生组织(WHO)宣布甲型H1N1流感大流行结束的第2天,一篇发表在权威医学杂志《柳叶刀—传染病》上的报道又戏剧性地将人们带入另一片恐慌:研究者在印度、巴基斯坦和英国的许多地区均分离到可以产生新型金属 $\beta$ -内酰胺酶NDM-1的超级耐药细菌。这些细菌由于NDM-1及其他耐药基因的作用,对现今几乎所有类型的抗生素都具有耐药性<sup>[1]</sup>。

### 1.1 超级细菌与NDM-1

通常一种细菌如果携带多个耐药基因,我们便称之为多重耐药菌,或称超级细菌(Superbug)。其实,“超级细菌”一词由来已久,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)和抗万古霉素肠球菌(VRE)等都曾被冠以“超级细菌”之名,但此时我们所面对这类超级细菌较以往的耐药菌可谓有过之而无不及。

2008年1月,英国加的夫大学的医学微生物学教授Timothy R. Walsh等人在瑞典一名患尿道感染的印度裔患者身上分离到可表达金属 $\beta$ -内酰胺酶(Metallo- $\beta$ -lactamase, MBL)的肺炎克雷伯杆菌*Klebsiella pneumoniae*,出人意料的是此细菌中编码MBL的基因却和已知的几种MBL基因均不相同。该酶全长269个氨基酸,其分子大小约为27.5 kDa;它与目前发现的其他MBL相比,氨基酸序列的一致性不足33%,且在酶活性位点附近具有独特的氨基酸残基以及插入序列,并能与碳青霉烯类抗生素更紧密地接合。由于该名患者是在印度首都新德里接受治疗时被细菌感染的,于是研究者将这一新型金

属 $\beta$ -内酰胺酶命名为新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶(New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1),即NDM-1,同时以 $bla_{NDM-1}$ 命名编码NDM-1的基因<sup>[2]</sup>。

$\beta$ -内酰胺类抗生素(包括常用的青霉素和头孢霉素等)一直被视为治疗严重感染的中流砥柱,而碳青霉烯类抗生素由于在 $\beta$ -内酰胺类药物中抗菌谱最广、抗菌活性最强,以及对普通 $\beta$ -内酰胺酶高度稳定等特点,已成为对抗超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL)的主要抗菌药物之一,常用于产ESBL肠杆菌科细菌,尤其是大肠杆菌和肺炎克雷伯杆菌感染的治疗<sup>[3]</sup>。然而,近年来出现的一些革兰氏阴性菌能够产生金属 $\beta$ -内酰胺酶,其最大特点是可以水解碳青霉烯类的抗生素,且活性不受克拉维酸(Clavulanic Acid)等 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的影响。因此,产生金属 $\beta$ -内酰胺酶的细菌对所有 $\beta$ -内酰胺类抗生素都有一定的耐药性。由于该酶的活性中心需要金属锌离子的参与,故称为金属 $\beta$ -内酰胺酶。

Walsh等在对产生NDM-1的肺炎克雷伯杆菌进行遗传学分析后发现,编码NDM-1的基因 $bla_{NDM-1}$ 位于一个180 kb的质粒上,并且 $bla_{NDM-1}$ 基因片段上游的2个区域中还存在能够抵抗利福平、红霉素、链霉素、氯霉素等抗生素以及消毒剂和磺胺药物的多种耐药基因。此外,进一步的实验证明该质粒很容易转移到其他细菌中,使得具有此类耐药质粒的细菌可以耐受除氟喹诺酮(Fluoroquinolones)和多粘菌素(Colistin)以外的所有抗生素。无独有偶,研究人员之后又在患者粪便的大肠杆菌*Escherichia coli*中找到了含有 $bla_{NDM-1}$ 基因的长度为140 kb的质粒,这可能就是耐药质粒在患者体内发生菌间间接合的结果。从而研究者推测,由于诸多耐药基因都位于质粒上,含有 $bla_{NDM-1}$ 基因的质粒又能在不同的菌株之间穿梭传递,并且还可以在转移中发生重组,因而具有广泛的细菌宿主;如果这类质粒在致病菌中得以快速传播,将会是医学界的噩梦<sup>[2]</sup>。

### 1.2 旧药与新瓶?

很快,科学家们的担忧变成了现实……

2010年8月11日,《柳叶刀—传染病》(*The Lancet Infectious Diseases*)杂志报道了包括Walsh

教授在内的英国、印度、巴基斯坦、瑞典和澳大利亚等国学者联合进行的一项研究: 他们在印度、巴基斯坦和英国共分离得到 180 株含有 *bla*<sub>NDM-1</sub> 质粒基因的细菌。其中有些菌株中还不止有一个质粒上带有 *bla*<sub>NDM-1</sub> 基因。这些细菌中大多数为肺炎克雷伯杆菌 (111 株) 或大肠杆菌 (36 株)。实验发现, 它们除了替加环素 (Tigecycline) 和多粘菌素 (Colistin) 以外, 对其他所有抗生素都具有高度耐药性<sup>[1]</sup>, 这其中还包括对 2009 年尚且有效的氟喹诺酮的耐药。经比较这些菌株中的质粒和转化接合子发现, 其中有 10% 在基因转移中改变了质粒的大小。这表明大多数的 *bla*<sub>NDM-1</sub> 阳性质粒都有快速基因转移的能力, 并可以在转移中增加或减少 DNA 而重新组合, 因而具有在种属间大范围传播和多样化变异的可能。

其实, 在“NDM-1”的发现尚未公布之前, 英国健康保障机构 (Health Protection Agency, HPA) 就已从英国一些医院的肠杆菌科细菌样本中检测到分布于 4 个属的 16 种菌株都含有 NDM-1——*bla*<sub>NDM-1</sub> 基因正如“旧药换新瓶”一般悄悄地向不同的菌株中扩散! 因此这次发现的“超级细菌”并不是一种细菌, 而是指一类细菌。换句话说, 任何一种细菌在获得能表达 NDM-1 的质粒后, 都可以成为超级耐药细菌, 甚至还可能根据不同的细菌宿主而具有不同的致病能力。由于目前几乎没有新的抗生素问世, 而现存的抗生素又不能有效地杀灭具有 NDM-1 的耐药细菌, 因而此类感染的治疗将是医学领域的一大挑战。而且更加堪忧的是, 在印度发现的菌株大多数是来自于社区获得性感染, 这也暗示着 *bla*<sub>NDM-1</sub> 基因已经在环境中广泛地传播开来。

另外, 在 29 位 NDM-1 阳性的英国患者中有至少 17 人在过去的一年内到过印度和巴基斯坦, 其中 14 人在当地接受了医疗服务。今年 7 月, 在美国发现的 3 株 NDM-1 阳性抗药菌也都来自近期在印度接受过医疗护理的患者<sup>[4]</sup>。因此, 英国健康保障机构 HPA 认为: *bla*<sub>NDM-1</sub> 耐药基因可能来源于南亚地区, 并与在印巴接受的医疗护理有着密切的关系; 此类耐药基因已多次从印度次大陆流入英国, 且有在全世界流行的趋势。但是, 印度卫生部和媒体对这一论述纷纷表示不满, 指责研究者将“超级细菌”的

源头指向印度, 并强烈抗议以“新德里”命名该耐药基因的做法。然而, 研究者们并非有意针对印度, 而是担心超级耐药菌的爆发会对印度已经颇高的病原菌耐药状况雪上加霜, 其结果必然影响到印度未来的发展, 更会威胁到全人类的健康。事实上, 人们长期的抗生素滥用才是耐药病菌频现的根源。所以, 作者在文章中也不忘提醒世人: “任何国家, 如果继续滥用抗生素, 像这样具有超级耐药性的质粒一旦广泛传播, 后果将不堪设想<sup>[2]</sup>。”

## 2 抗生素的历史回顾

众所周知, 自然界中的细菌无处不在。人体 37℃ 的体温和湿润的黏膜更是一些细菌理想的生存环境, 这些细菌中只有少数病原菌会对人体有害。病原菌在感染人体后, 经过不断分裂, 产生大量毒素, 威胁人体健康。早在人类诞生之初, 人们就开始与细菌进行着血腥的战争。在抗生素诞生之前的漫长岁月里, 这些看不见的病菌残害过无数人的生命。19 世纪 80 年代, 在 Louis Pasteur 和 Robert Koch 等科学先驱的努力下, 人们终于找到了这些在显微镜下才能看到的敌人。从此人们开始寻找治病方法和抗菌药物, 并最终导致了抗生素的问世。

1921 年, 伦敦圣玛丽医院的苏格兰生物学家 Alexander Fleming 发现人的眼泪、唾液及感冒后的鼻涕里都含有一种能溶解细菌的物质, 可以使培养皿里的菌群发生萎缩。Fleming 将这种物质命名为“溶菌酶”<sup>[5]</sup>。事实上, 溶菌酶是人体免疫系统的第一道防线, 细菌只有突破了这道防线, 淋巴细胞等免疫防御才开始发挥作用。不久, Fleming 就从眼泪和鼻涕中提取了溶菌酶, 但这最早被发现的天然抗生素对于真正的病原菌却没有明显的效力。直到 1928 年 9 月 3 日, 度假归来的 Fleming 偶然间发现培养了金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的培养皿由于未及时清理而长出了青霉菌 *Penicillium notatum*, 但令人惊奇的是在霉菌菌落周围出现了一圈白色的菌斑。他马上意识到可能是青霉菌释放了某种杀菌物质, 有效地阻止了细菌的传播。于是他又有意识地在培养葡萄球菌或其他微生物的培养皿上接种了青霉菌, 证实了其对许多细菌都有裂解作

用。Fleming 继而转向研究青霉菌培养物的无细胞提取物，发现它们的确有显著的抗细菌作用，并且用培养物的滤液注射兔子也未引起任何异常反应。于是，Fleming 认识到这种提取液中被他称作青霉素 (Penicillin) 的抗菌物质<sup>[6]</sup>，正是全世界人苦苦等待的治病神药。

早在 19 世纪 70 年代，微生物之间的拮抗现象就已经被各国学者陆续发现并报道了<sup>[7-11]</sup>。1874 年 William Roberts 在《英国皇家学会会志》上首次报道了真菌的生长常常抑制细菌的生长<sup>[12]</sup>，这一观察还专门谈到一种青霉菌对细菌生长的影响；此外，Tyndall 在 1876 年也报道了青霉菌溶解细菌的现象<sup>[13]</sup>。但甚为遗憾的是，这些发现因为不能即刻应用于医疗而不被人们所重视。就连 Fleming 发现的青霉素也苦于没有提纯技术，而在发现后的 10 年间仅作为选择性培养基被使用。直到 1938 年，牛津大学病理学家 Howard Florey 对已知的微生物产生的抗菌物质进行了系统地研究，并在同事 Ernest Chain 及 Norman Heatley 的帮助下很快实现了青霉素的大量提取和纯化，并在 1940 年制备出纯度可满足人体肌肉注射的制品。不久后的第二次世界大战让青霉素大显身手。在以往的战争中都有数百万人因为坏疽而死去，现在它却被神奇的青霉素征服了——人类终于战胜了病原菌。美国《时代》周刊在 1944 年 5 月的封面中写到：“Fleming 的‘神药’（青霉素）拯救的生命比在战争中消耗的生命要多得多”。Fleming 也因此与 Florey 和 Chain 共同获得了 1945 年的诺贝尔生理学或医学奖。

青霉素的发现被誉为“20 世纪医学界最伟大的收获”。数据显示，青霉素的运用使人类的平均寿命延长了 10 年。随着时间的推移，人们又成功地找到了链霉素 (1944)、氯霉素 (1948)、庆大霉素 (1969) 等多种抗生素。在过去的几十年里，已经有近 200 种抗生素先后诞生。抗生素的峥嵘让人类摆脱了医疗的黑暗时代，并赋予了医生创造奇迹的权利。抗生素类药物推广使用以后，人们不仅用它来治疗严重疾病，也用它们来处理日常生活中各种各样的感染。这些抗生素药物不仅延长了人类的寿命，也大大提高了人们的生活质量，同时也为我们的健康提

供了保障。二战中的那段记忆使得人们把抗生素当成是能治百病的灵丹妙药，甚至还把它们加进各种日用品中。因而，抗生素的开发还带动了其他产业<sup>[14-15]</sup>。例如，人们发现把抗生素加入到动物饲料和水中不仅能够预防疾病，还能促进家畜的生长。此举不但降低了饲养成本，同时也大大提升了禽畜的产量<sup>[16]</sup>。于是，抗生素又成了一种生产工具。但当时，很少有人想过这种物质对人类会造成怎样的影响，否则可能就不会有今日的担忧了。

### 3 细菌耐药基因的来源

抗生素的发明和大量制造使它成为人类抵御细菌感染类疾病的主要武器。一时间许多曾经导致人们死亡的疾病变得不再可怕。可就在人们凭借着抗生素一次又一次战胜各种病原菌的时候，殊不知这些在自然界生存了 30 多亿年的微生物怎会如此轻易地投降？这群微小的敌人正在孕育着一场反击……

#### 3.1 细菌的耐药机制

抗生素 (Antibiotic) 是由微生物或高等动植物在生活过程中所产生的具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物，能够干扰或抑制病原体的生长和存活。但迄今为止所开发的上百种抗生素之间却有着不尽相同的药理途径。如青霉素等  $\beta$ -内酰胺类抗生素就是通过抑制细菌细胞壁的合成而起到杀菌效果的；而其他一些抗生素则通过抑制细菌蛋白质的合成 (如大环内酯类)、核酸的复制 (如喹诺酮类) 和转录 (如利福霉素类) 以及干扰细菌代谢途径 (如磺胺类) 等方式杀灭细菌的。

抗生素类药物的种类之所以如此繁杂，正是因为一种抗生素只能对一类或几类细菌有抑制效果。一些细菌经过长期的繁衍和进化，对某些外界的不良环境具有天然的抗性，而它们中的耐药基因恰恰可以抵御某些抗生素的抑制作用。目前，革兰氏阴性菌的抗生素耐药性就发现了以下几种机制<sup>[17]</sup>：1) 防渗透屏障：某些细菌具有非渗透性的细胞膜，或者缺乏某些抗生素的作用位点，因而对这类抗生素具备固有的抗性。2) 多重耐药性外排泵 (Efflux pump)：这些外排泵可以直接将进入细胞的抗生素、重金属或其他毒性分子排出胞外<sup>[18-20]</sup>；或经主要易

化超家族 (Major facilitator superfamily, MFS) 的转运子先将抗生素释放到周质空间, 再排出细胞外。

3) 耐药性突变: 某些改变抗生素的靶蛋白突变能在细胞内的其他功能蛋白不受影响的同时, 改变抗生素结合位点的构型, 使抗生素不能识别。例如: DNA 拓扑异构酶发生突变, 能够抵御喹诺酮类抗生素; RNA 聚合酶 B 亚基的突变可导致对利福平的耐药; 若突变点位于细菌 30S 核糖体亚基 S12 则会对链霉素不再敏感。4) 使抗生素失活: 导致抗生素失活的方式可以通过钝化酶对抗生素进行共价修饰, 如乙酰转移酶的催化可使氨基糖苷类抗生素失去效用; 或者是分泌某些灭活酶直接将抗生素降解。这次震惊世界的“超级细菌”就是利用  $bla_{NDM-1}$  基因所表达的金属  $\beta$ -内酰胺酶对碳青霉烯类抗生素的降解作用而形成超强耐药的。

### 3.2 自然环境中的耐药基因

在种类繁多的微生物大军中, 不同病原菌生理和功能的差异使得新的抗菌药不断被开发, 同时又不断地失去了效用。同时, 多重耐药菌接二连三的出现又表明顽固的病原菌在适者生存的进化规律下, 不再只有单一的耐药机制, 它们已经在自然环境中获得了更多的耐药基因。如同抗生素来自于自然界的放线菌和真菌一样, 目前绝大多数的耐药菌体内的耐药基因也都有各自的环境来源。依照大自然相生相克的平衡法则, 不难理解许多分泌抗生素的微生物本身也具有抵御自身抗生素的能力; 它们的基因簇中往往就含有相应的耐药基因, 以保护自身在对抗竞争者的同时不受损害。但令人奇怪的是, 一些不产生抗生素的细菌也渐渐具有了某些耐药因子。一种合理的解释是, 细菌的某些基因位点发生突变而获得了耐药性<sup>[21]</sup>, 从而在相应抗生素存在的环境中得以存活下来。可是, 基因突变的频率十分有限, 因而要产生像“超级细菌”这样复杂的耐药菌还得依赖于微生物的又一遗传特性——水平基因转移 (Horizontal gene transfer, HGT)<sup>[22-23]</sup>。许多耐药基因已在转座子、整合子或质粒中被发现, 这些基因可以通过细菌细胞间的转化和接合等方式转移给其他相同或不同的菌株, 或是借助溶源性噬菌体转导而整合到受体菌的基因组内<sup>[24]</sup>。最早发现表达

NDM-1 的肺炎克雷伯杆菌 *Klebsiella pneumoniae* 05-506 就是在一段已有多种耐药基因排列的整合子下游插入了  $bla_{NDM-1}$  基因, 从而获得了广泛的抗生素耐药性。可见, 这些可怕的病原菌正在通过水平基因转移积累着越来越多的耐药基因。

在来自环境的耐药基因中, 有一些原本并不是针对抗生素的。例如许多生物的细胞膜上都具有多重耐药性外排泵, 而这些外排泵元件相对于排出抗生素, 更多的是参与细胞中间代谢产物的解毒和信号传导<sup>[25]</sup>。一些抗性基因往往在其原始宿主内充当着调控与代谢网络的一部分, 但当这些基因迁移到其他菌种时, 难以很快地融入新的系统中去, 因而新的宿主中仅因耐药功能而被保留。比如, 斯氏普罗威登斯菌 *Providencia stuartii* 产生的 2'-N-乙酰转移酶, 可以修饰细菌肽聚糖, 而庆大霉素与该酶的底物相似性使它也同样可以被修饰<sup>[26]</sup>。但如果编码该酶的基因通过质粒转移到其他菌种中, 因为离开了原本的生化环境, 就可能只剩下对庆大霉素的抗性了<sup>[27]</sup>。另外, 生存环境的改变也常常导致微生物抗性的进化。自然环境为微生物提供了一个巨大的耐药基因文库, 环境的改变、人类的活动、动物的迁徙等都可能影响到细菌的种群动态进化, 产生未知的耐药基因。而此时, 新出现的耐药基因对生态系统以及人类健康的影响则是难以预知的<sup>[28]</sup>。

### 3.3 滥用抗生素

自抗生素问世以来, 细菌等微生物就与抗生素之间不断博弈, 形成了几近鲜明的敌对关系。如果说, 自然环境中广泛存在的耐药基因是病原菌产生耐药的内在因素, 那么临床上的抗生素滥用以及环境中的抗生素污染无疑是现今耐药菌泛滥的外在动力。几十年前, 青霉素曾经是最有效的抗生素, 但现在同样的感染, 使用过去几十倍剂量的青霉素也很难获得相同的疗效。据国内不完全统计, 一些细菌的青霉素耐药性已经高达 70% 以上, 就连近十年才研制出的头孢类、左氧氟沙星类等新生代抗生素, 细菌的耐药性也高达 30%~50%, 是抗生素的滥用最终导致了耐药菌的增多。因为, 具有抗生素效用的分子在治疗浓度下虽然能暂时地抑制病菌的扩散, 但长期施用就可能对环境起到截然不同的作用,

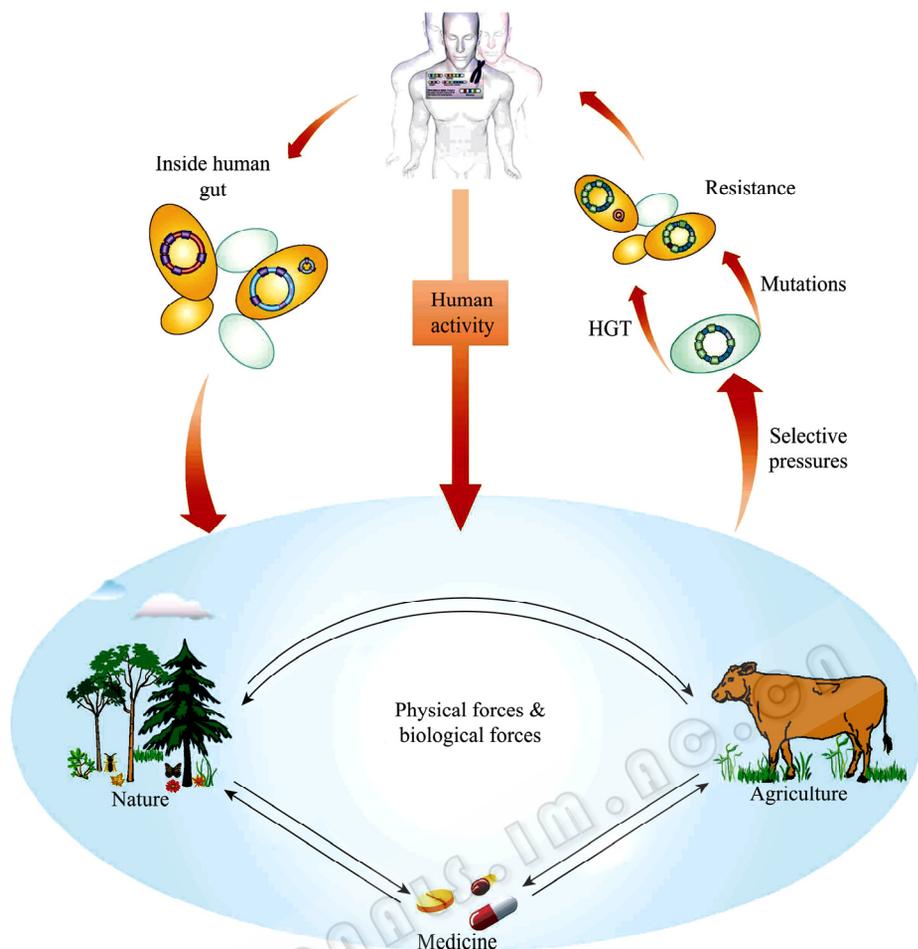


图1 耐药基因的来源

Fig. 1 Sources of resistance genes.

即低浓度的抗生素可以引发不依赖于细菌应激系统的特异性转录变化<sup>[29]</sup>,使它们调整与微生物群落间的相互作用,从而更加适应药物环境<sup>[30]</sup>。其实,就连 Fleming 本人也早在 1945 年的《纽约时报》中警告过人们不要滥用青霉素,他指出:“如果使用剂量与所对抗的细菌数量相比太少,细菌会反克青霉素从而产生抗药性<sup>[31]</sup>”。遗憾的是,人们只看到了抗生素所带来的一时便利,而忽视了 Fleming 的忠告。在面临抗生素的巨大压力时,细菌通常比较稳定的 DNA 聚合酶往往容易产生更多的错误。这些错误会在自身复制时造成功能变异。其中一些有益于生存的变异,如耐药基因,就可能在后代中形成稳定遗传,从而将这些新特性保留下来<sup>[32]</sup>。事实上,水平基因转移所导致的耐药性,也都是由于不合理的抗生素施用所带来的选择压力间接促成的。所以,抗生素对细菌来说具有杀菌武器和刺激耐药性产生的

双重功效<sup>[33]</sup>。

在抗生素时代的前 50 年中,人类不仅在医疗和生活中无度地使用抗生素,而且在渔业、畜牧业中广泛用作疾病预防和营养添加剂的抗生素数量更是大得惊人。由此产生的耐药菌会经排泄物等掺入土壤和尘埃,再通过风、水等自然动力反馈给人类<sup>[17]</sup>。虽然医学和工业的发展让我们有能力不断地研制出新的抗生素,但这些病原菌极高的突变率和极快的繁殖速度,再加上可以轻松实现耐药基因的互通有无(即水平基因转移),使得它们总能绝处逢生。如此往复,终于衍生出了具有多重耐药性的超级细菌。

## 4 全球病原菌的耐药概况

### 4.1 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)

青霉素发明后,由金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 引起的多种感染性疾病得到有效控制。但随

着青霉素的广泛使用, 有些金黄色葡萄球菌产生青霉素酶, 能水解青霉素的  $\beta$ -内酰胺环, 呈现出青霉素耐药性。于是, 人们在 1959 年研制出了抗青霉素酶的半合成青霉素, 即甲氧西林 (Methicillin), 从而有效地控制了产酶金黄色葡萄球菌的感染。然而好景不长, 时隔 2 年后英国学者 Jevons 首次发现了耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。研究表明, 它们不但能够抵抗甲氧西林, 而且对其他所有与甲氧西林有相似结构的  $\beta$ -内酰胺类和头孢类抗生素均有一定的耐药性; 一些 MRSA 还通过修饰酶催化、改变抗生素作用位点等机制对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类以及利福平等多种抗生素也产生了不同程度的耐药<sup>[34]</sup>。此外, 还有研究发现 MRSA 能分泌一种酚可溶性调控蛋白 (Phenol-soluble modulins, PSM) 破坏人类的嗜中性粒细胞<sup>[35]</sup>, 形成严重感染——第一任“超级细菌”就此诞生。MRSA 感染从发现至今几乎遍及全球, 已成为医院内感染的重要病原菌之一。今天, 医院内分离到的金黄色葡萄球菌中 60%~70% 都是具有多重抗药性的 MRSA。目前, 经美国 FDA 认证可用于 MRSA 临床治疗的抗生素有万古霉素 (Vancomycin)、利奈唑胺 (Linezolid)、达托霉素 (Daptomycin) 和替加环素 (Tigecycline)。但也发现有一些医院获得性 (Hospital-acquire, HA) MRSA 对万古霉素和利奈唑胺产生了耐药。数据显示, MRSA 耐药性还在不断增强, 其耐药菌的范围也在不断扩大<sup>[36-37]</sup>。

## 4.2 多重抗药性结核杆菌 (MDR-TB)

全世界对于具有多种抗菌剂耐药性的微生物尚无统一的定义<sup>[38-39]</sup>。但通常将具有两种或两种以上的抗菌剂抗性称为多重耐药性 (Multidrug-resistant, MDR)<sup>[40]</sup>; 若细菌对所有已获批使用的抗菌药都具有抗药性, 则又被称为泛耐药性 (Pandrug-resistant, PDR)<sup>[41]</sup>。在肺结核中, 多重抗药性肺结核 (MDR-TB) 专指对利福平 (Rifampicin) 和异烟肼 (Isoniazid) 等一线抗结核药物具有抗药性的结核病。根据 2006 年 10 月世界卫生组织的定义, 在 MDR-TB 基础上, 对全部喹诺酮 (Quinolone) 类抗

生素以及二线抗结核药物卡那霉素 (Kanamycin)、卷曲霉素 (Capreomycin) 和阿米卡霉素 (Amikacin) 中的至少一种具有抗药性的结核病称为广泛耐药性肺结核 (Extensively drug-resistant, XDR-TB)<sup>[42-44]</sup>。对于普通的结核病, 服用一线药物半年左右即可治愈, 而感染了 MDR-TB 的患者的治疗时间则要延长 2 倍, 同时治疗费用要增长 10 倍。世界卫生组织在今年的全球检测报告中指出: 仅 2008 年, 世界范围内就有 44 万人感染 MDR-TB, 其中约 1/3 死亡, 约有 50% 的 MDR-TB 患者分布在中国和印度。目前, 我国已被 WHO 列为“耐药结核病需引起警示”的国家之一, 肺结核病控制面临巨大挑战。

## 4.3 耐多药肺炎链球菌 (MDRSP)

肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* 是一种球状革兰氏阳性菌, 能普遍导致成人感染细菌性肺炎, 儿童患脑膜炎、中耳炎、菌血症等疾病<sup>[45-47]</sup>。近年来, 由于许多国家和地区在治疗时广泛使用  $\beta$ -内酰胺类和大环内酯类抗生素, 使得多种类型的耐药肺炎链球菌日益流行。自 1967 年发现第一例耐青霉素肺炎链球菌 (Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, PRSP) 以来, 肺炎链球菌对抗生素的抵抗力一直不断上升。由于大环内酯类抗生素相对  $\beta$ -内酰胺类不易引起过敏反应, 因而在临床上的使用日趋增加, 从而也导致了耐大环内酯类肺炎链球菌 (Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*, MRSP) 检出率逐年升高, 并且其流行具有明显的地区差异<sup>[48-51]</sup>。亚洲国家的 MRSP 耐药最为严重: 经不完全统计, 耐红霉素肺炎链球菌在我国的临床检出率已达到 90% 以上。MRSP 主要通过由甲基化酶 (*ermB* 基因编码) 催化的核糖体甲基化、rRNA 和核糖体蛋白突变以及红霉素外排泵 (*mefA* 基因编码) 等机制实现对红霉素等大环内酯类抗生素的耐药<sup>[52]</sup>。现在甚至有些耐多药肺炎链球菌 (Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*, MDRSP) 对盐酸克林霉素 (Clindamycin hydrochloride) 及喹诺酮 (Quinolone) 等抗生素也产生了不同程度的耐药性<sup>[53]</sup>。但是肺炎链球菌对泰利霉素 (Telithromycin)、利奈唑胺 (Linezolid) 以及左氧氟沙星 (Levofloxacin) 的

耐药还较为罕见，因此这些抗生素仍表现出很好的临床疗效和细菌学疗效<sup>[54]</sup>。

#### 4.4 抗万古霉素肠球菌 (VRE)

万古霉素 (Vancomycin) 是一种糖肽类抗生素，通过抑制细菌细胞壁肽聚糖的合成来达到抑制细菌生长的目的，主要用于预防和治疗革兰氏阳性菌的感染。1958 年，万古霉素凭借对耐青霉素金黄色葡萄球菌的良效而问世，到 20 世纪 80 年代已被临床广泛使用。由于对万古霉素的耐药性产生几率较低，因而一直被医学界视为对抗革兰氏阳性细菌的“最后防线”。自从 1985 年人们首次发现了抗万古霉素肠球菌 (Vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)<sup>[55]</sup> 之后，仅仅几年时间 VRE 就传遍了全世界。到 20 世纪 90 年代中期，几乎所有医院都遇到了抗万古霉素的细菌感染，导致在癌症化疗和器官移植手术中因感染 VRE 而死亡的人数不断升高。肠球菌对万古霉素的耐药性是由 *Van A*、*Van B*、*Van C*、*Van D* 四

种耐药基因决定的，它们可以使肠球菌对糖肽类药物的亲和力降低，使细菌细胞壁的合成不再被此类抗生素所抑制<sup>[34]</sup>。VRE 对一般用于肠球菌的抗生素如氨基青霉素、氟喹诺酮以及碳青霉烯类抗生素也都有耐药性，并且在 2001 年又发现了耐利奈唑胺的 VRE。对于 VRE 抗药性的出现，一般认为是在家畜饲料中产生的<sup>[56]</sup>。在动物饲料中不断地添加抗生素，这也是抗药细菌难以斩尽杀绝的重要原因<sup>[57]</sup>。研究者发现，由于家畜摄入了大量的抗生素，很快引起了肠球菌的抗药性，这些细菌的抗药基因与动物体内的抗药基因相同<sup>[58]</sup>。于是，与万古霉素相似而用在禽畜饲料上的阿伏霉素在 1996 年被欧盟禁止其成员国使用。但万古霉素因为在金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、肺炎链球菌、难辨梭状芽胞杆菌、白喉杆菌等感染中的良好抑菌效果而沿用至今。但面对 VRE，这“最后防线”的崩溃使得研制抗万古霉素菌株的窄谱抗菌药剂迫在眉睫。

表 1 世界范围内病原菌的耐药情况

Table 1 Antibiotic resistance of superbugs around the world

Resistant bacteria	Resistance gene	Resistance to	Sensitivity to	Main hit areas
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	<i>mecA</i> <i>femA</i> , <i>femB</i>	Methicillin β-lactam	Daptomycin Tigecycline	Occident, North Africa, Middle East, East Asia <sup>[34,59]</sup>
Multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MDR-TB)	<i>rpoB</i> <i>rpsL</i> <i>katG</i>	Rifampicin Streptomycin Isoniazid	Pyrazinamide Cyloserine Terizidone	Eastern Europe, Southeast Asia, China, West Pacific <sup>[60]</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>pbp1a</i> <i>ermB</i> , <i>mefE</i> <i>tetM</i> <i>Catpc194</i> <i>gyrA</i> <i>parC</i> , <i>parE</i>	Penicillin Macrolide Tetracycline Chloramycetin Ciprofloxacin Fluoroquinolones	Oxazolidinone Telithromycin Linezolid Levofloxacin	Asia <sup>[52,61]</sup>
Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> (VRE)	<i>VanA</i> , <i>VanB</i> , <i>VanC</i> , <i>VanD</i>	Vancomycin	Quinupristin Dalfopristin	Worldwide <sup>[34,55]</sup>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	<i>rpsL</i> <i>gyrA</i> <i>rpoB</i> <i>fusA</i> <i>fmt</i> , <i>folD</i>	Streptomycin Nalidixic acid Rifampicin Fusidic acid Actinonin	Quinolones	Worldwide <sup>[24,62-63]</sup>
<i>Escherichia coli</i>	<i>gyrA</i> , <i>marR</i> , <i>parC</i> <i>rpsL</i> <i>rpoB</i>	Fluoroquinolones Streptomycin Rifampicin	Imipenem Ceftazidime Amikacin	Worldwide <sup>[64-66]</sup>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>sul2</i>	Sulfonamide	Penicillin	Africa, UK, Northern America <sup>[67]</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	Quinolones	Gentamicin	Worldwide <sup>[68]</sup>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Omp31</i>	Clarithromycin	Amoxicillin	Worldwide <sup>[69-70]</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>nalB</i> , <i>nfxB</i> <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>OXA</sub></i>	Fluoroquinolone β-lactam	Colistin Neomycin	Worldwide <sup>[71-72]</sup>

## 5 耐药菌应对策略

如何抵御病菌的侵袭是人类亘古不变的生存问题。随着病原菌中耐药基因的不断积累, 我们陷入了“抗生素-耐药菌-新型抗生素”的恶性循环。如今, 越来越长的超级细菌清单令人触目惊心。人类站在“后抗生素时代”的边缘, 再谈耐药菌的对策, 不可同日而语。

据报道, 目前带有 NDM-1 的超级细菌正在全球蔓延, 在英国、美国、加拿大、澳大利亚、法国和荷兰等地区也都出现了疑似感染病例。虽然, 仍有两种抗生素——替加环素和多粘菌素对其有效, 但由于一些种类的细菌对替加环素的敏感性十分有限, 而多粘菌素对人体肾脏和神经系统又具有毒副作用, 因而都不适合大规模使用。况且, 抗生素早已成了“双刃剑”, 对于任何类型的细菌感染性疾病, 再去一味地依赖抗生素, 终究会重蹈覆辙。有一些学者提出对抗生素进行修饰, 如在万古霉素分子上增加疏水性支链, 以增强靶位亲合力。但这也只不过是权宜之计, 细菌惊人的突变率很快便能形成新的耐药机制。因此, 许多医学家和研究者们已纷纷着手寻找新型抗菌药物和新的抗感染方法。例如, 有人发现通过降低微生物复制时的错误频率, 可以防治病菌迅速进化出耐药基因: 2007 年, 美国加州斯克利普斯研究所的 Floyd Romesberg 等人发现了一种名为 *LexA* 的基因, 它是细菌具有错误倾向的 DNA 聚合酶的一个关键开关。研究者们通过筛选找到了能够抑制 *LexA* 的小分子化合物, 从而能够防止在环丙沙星等 DNA 抑制型抗生素存在下的细菌变异。这种 *LexA* 抑制分子使抗生素变得更加有效, 同时减缓细菌对于抗菌药物的自然响应<sup>[73]</sup>。另外, 采用高通量筛选技术开发的新型治疗药物可以有效针对病菌的特异性靶位<sup>[74]</sup>。虽然比传统的抗生素具有较窄的作用谱, 但这些药物可以有效减少耐药基因选择和扩散的机会, 这当然还要有相应的快速诊断系统与之相匹配。因此, 发展快速准确的耐药性检测手段至关重要。病原菌及其耐药性的快速检出, 会大大减少抗生素处方的误用率; 令人们及时选取针对性更强的抗生素, 减轻细菌耐药基因产生的选

择压力, 从而控制耐药菌的出现。与此同时, 近年来提出的“源于自然, 回归自然”的微生物生态疗法主张扶持生理性微生物, 通过生物拮抗抑制某些致病菌、调整和改善人体微环境、提高机体防御功能, 也不失为一种防治感染性疾病的新途径<sup>[75-77]</sup>。

目前发现的具 NDM-1 的耐药菌多在医院内流行, 这可能表明此类细菌虽然耐药性极强, 但致病能力相对较弱, 或者更适于在医院内传播。医院感染的耐药菌株已经和耐多药结核菌、艾滋病病毒一起被列为 21 世纪人类面临威胁的三大病原微生物。当前, WHO 也建议各国落实医院感染控制措施, 谨慎使用抗生素, 从而减少细菌对抗生素产生抗药性的机会。因此, 也应该尽快强化医源性感染和交叉感染的预防和控制, 建立细菌耐药性的全球监控。具体来说, 首先必须合理选择抗生素并适当控制使用剂量: 抗生素种类繁多, 合理选用是有效对抗病原菌的前提, 也是提高抗生素使用效果, 降低副作用的重要因素; 而低于抑菌浓度的抗生素不但达不到杀菌效果, 并且长期使用还会对细菌有利, 促其获得耐药性。此外, 在饲养业中也一定要有科学的用药策略和严格的停药期: 同一环境中连续使用同种抗生素容易使病菌产生耐药性; 停用一种抗生素一段时间可使动物体内残留的抗生素排出体外, 并逐渐衰减掉, 从而减少环境中的抗生素污染。这是因为一些细菌在获得新的耐药因子时往往伴随着相应生理途径中的某些缺陷, 耐药细菌虽然更适于有抗生素存在的压力环境, 但在没有抗生素的天然环境下反而不如其他非耐药的细菌更具优势。因此, 科学地轮换用药和穿梭用药, 就是以包括多种抗菌药物在内的抗生素“核武库”为依托, 利用抗生素给药期的时间间隔淘汰掉相应的耐药细菌, 并在反复用中达到将其彻底消灭的目的。这其中, 抗生素施用的战略性思想显得尤为重要。

总而言之, 在缺乏新结构、新靶点抗菌药物的现状下, 有计划、有目的地合理使用抗菌药物, 延长现有药物的使用寿命, 才是当前最行之有效的策略。因此, 抗击超级细菌, 需要国际社会的共同参与。

## 6 结语

在人类数千年的文明史中，各种病原菌一直是我们最具威胁的敌人。抗生素的出现从疾病和感染的灾难中挽救了无数人的生命。然而几十年来，“道高一尺，魔高一丈”的军备竞赛最终给人们留下的却是数以百计的抗生素以及源源不断的耐药菌。

当我们头上的天空因气候变暖而崩裂时，脚下的大地也在塌陷——人类不合理的抗生素使用招致了超级细菌的反噬，那将同样是一场巨大的灾难。今天，“超级细菌”带给我们的不该仅仅是恐慌，更多的应当是警钟长鸣。

一个人的安全是脆弱的，共同的防御才是坚固的。当公共卫生安全受到威胁的时候，没有人可以独善其身。超级细菌并不可怕，可怕的是不断产生新的超级细菌。所以，在全球范围内停止抗生素的滥用是控制与防治超级耐药菌的当务之急。而这，需要全人类的共同努力。我们仍然相信，随着医学和生命科学的不断发展，人们终将有能力在这场军备竞赛中赢得人类健康的最后胜利。

## REFERENCES

- [1] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2010, **10**(9): 597–602.
- [2] Yong D, Toleman MA, Giske CG, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, **53**(12): 5046–5054.
- [3] Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*, 2006, **34**(5 Suppl 1): S20–28; discussion S64–73.
- [4] Agency HP. Multi-resistant hospital bacteria linked to India and Pakistan. *Health Protection Report*, 2009, **3**(26): 3–4.
- [5] Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1922, **93**: 306–317.
- [6] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*, 1929, **10**: 226–236.
- [7] Pasteur L, Joubert JF. Charbon et septicémie. *C R Soc Biol (Paris)*, 1877, **85**: 101–115.
- [8] Babes V, Cornil J. *Med Prat (Paris)*, 1885, **7**: 321.
- [9] Garre C. Ueber Antagonisten unter den bacterien. *Correspondenz-Blatt für Schweizer Aerzte*, 1887, **17**: 385–392.
- [10] Emmerich R, Low O. Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. *Z Hyg InfektKr*, 1899, **31**: 1.
- [11] Foster W, Raoult A. Early descriptions of antibiosis. *J R Coll Gen Pract*, 1974, **24**(149): 889–894.
- [12] Doetsch RN. Studies on biogenesis by Sir William Roberts. *Med Hist*, 1963, **7**: 232–240.
- [13] Majno G, Joris I. Billroth and *Penicillium*. *Rev Infect Dis*, 1979, **1**(5): 880–884.
- [14] Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *J Plant Nutrition Soil Science-Zeitschrift Für Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 2003, **166**(2): 145–167.
- [15] Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*, 2006, **8**(7): 1137–1144.
- [16] Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 2006, **65**(5): 725–759.
- [17] Allen HK, Donato J, Wang HH, *et al.* Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*, 2010, **8**(4): 251–259.
- [18] Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, **27**(2/3): 313–339.
- [19] Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2005, **56**(1): 20–51.
- [20] Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, **36**(4): 695–703.
- [21] Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44**(7): 1771–1777.
- [22] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 1994, **264**(5157): 375–382.
- [23] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Rev Microbiol*, 2005, **3**(9): 711–721.
- [24] Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*, 2010, **8**(4): 260–271.

- [25] Lubelski J, Konings WN, Driessen AJ. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, **71**(3): 463–476.
- [26] Macinga DR, Rather PN. The chromosomal 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*: physiological functions and genetic regulation. *Front Biosci*, 1999, **4**: D132–140.
- [27] Franklin K, Clarke AJ. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, **45**(8): 2238–2244.
- [28] Martinez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 2008, **321**(5887): 365–367.
- [29] Goh EB, Yim G, Tsui W, *et al.* Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(26): 17025–17030.
- [30] Fajardo A, Martinez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol*, 2008, **11**(2): 161–167.
- [31] Penicillin's Finder Assay's Its Future: Sir Alexander Flemming Says Improved Dosing. Method Is needed to Extend Use. *N.Y. Times*, 1945: 13.
- [32] Cirz RT, Chin JK, Andes DR, *et al.* Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol*, 2005, **3**(6): e176.
- [33] Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, *et al.* Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(51): 19484–19489.
- [34] Taubes G. The bacteria fight back. *Science*, 2008, **321**(5887): 356–361.
- [35] Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*, 2007, **13**(12): 1510–1514.
- [36] Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, *et al.* Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*, 2006, **368**(9538): 874–885.
- [37] Lee BY, Bailey RR, Smith KJ, *et al.* Universal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) surveillance for adults at hospital admission: an economic model and analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2010, **31**(6): 598–606.
- [38] Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 2006, **55**(Pt 12): 1619–1629.
- [39] Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis*, 2008, **46**(7): 1121–1122; author reply 1122.
- [40] McGowan JE, Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control*, 2006, **34**(5 Suppl 1): S29–37; discussion S64–73.
- [41] Kuo LC, Teng LJ, Yu CJ, *et al.* Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(4): 1759–1763.
- [42] Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000–2004. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2006, **55**(11): 301–305.
- [43] Centers for Disease Control and Prevention. Notice to readers: revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2006, **55**(43): 1176.
- [44] Su WJ. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) raises challenges in TB control in Taiwan. *J Formos Med Assoc*, 2008, **107**(11): 827–829.
- [45] Malbruny B, Nagai K, Coquemont M, *et al.* Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J Antimicrob Chemother*, 2002, **49**(6): 935–939.
- [46] Pihlajamaki M, Kataja J, Seppala H, *et al.* Ribosomal mutations in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(3): 654–658.
- [47] CDC. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR*, 1997, **46**: 1–24.
- [48] Hogberg L, Henriques Normark B, Ringberg H, *et al.* The impact of active intervention on the spread of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Swedish day-care centres. *Scand J Infect Dis*, 2004, **36**(9): 629–635.
- [49] Kim NJ, Park SJ, Choi SH, *et al.* Characterization of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Korea, and *in vitro* activity of telithromycin against erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, 2005, **11**(3): 260–265.
- [50] Tamayo J, Perez-Trallero E, Gomez-Garces JL, *et al.* Resistance to macrolides, clindamycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolated in Spain during 2004. *J Antimicrob Chemother*, 2005, **56**(4): 780–782.
- [51] Sener B, Koseoglu O, Gur D, *et al.* Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in a

- university hospital, Ankara, Turkey. *J Chemother*, 2005, **17**(1): 31–35.
- [52] Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(9): 2727–2734.
- [53] Tleyjeh IM, Tlaygeh HM, Hejal R, *et al.* The impact of penicillin resistance on short-term mortality in hospitalized adults with pneumococcal pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 2006, **42**(6): 788–797.
- [54] Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, *et al.* *In vitro* activities of telithromycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against *Streptococcus pneumoniae* with macrolide resistance due to ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(8): 3169–3171.
- [55] Dixon S, Brumfitt W, Hamilton-Miller JM. *In vitro* activity of six antibiotics against multiresistant staphylococci and other gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol*, 1985, **4**(1): 19–23.
- [56] Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(10): 4930–4933.
- [57] Cox LA Jr, Popken DA. Quantifying human health risks from virginiamycin used in chickens. *Risk Anal*, 2004, **24**(1): 271–288.
- [58] Agero Y, Lester CH, Porsbo LJ, *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. *J Antimicrob Chemother*, 2008, **62**(4): 844–845.
- [59] Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol*, 2008, **16**(8): 361–369.
- [60] Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, *et al.* Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect*, 2007, **13**(6): 620–626.
- [61] Rozen DE, McGee L, Levin BR, *et al.* Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, **51**(2): 412–416.
- [62] Bjorkman J, Hughes D, Andersson DI. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(7): 3949–3953.
- [63] Nilsson AI, Zorzet A, Kanth A, *et al.* Reducing the fitness cost of antibiotic resistance by amplification of initiator tRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(18): 6976–6981.
- [64] Schrag SJ, Perrot V. Reducing antibiotic resistance. *Nature*, 1996, **381**(6578): 120–121.
- [65] Reynolds MG. Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics*, 2000, **156**(4): 1471–1481.
- [66] Marcusson LL, Frimodt-Moller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog*, 2009, **5**(8): e1000541.
- [67] Fermer C, Swedberg G. Adaptation to sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: kinetic analysis of dihydropteroate synthases from *N. meningitidis* expressed in a knockout mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1997, **179**(3): 831–837.
- [68] Luo N, Pereira S, Sahin O, *et al.* Enhanced *in vivo* fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(3): 541–546.
- [69] Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, *et al.* Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(25): 14607–14612.
- [70] Kanai K, Shibayama K, Suzuki S, *et al.* Growth competition of macrolide-resistant and -susceptible *Helicobacter pylori* strains. *Microbiol Immunol*, 2004, **48**(12): 977–980.
- [71] Kugelberg E, Lofmark S, Wretling B, *et al.* Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 2005, **55**(1): 22–30.
- [72] Poirel L, Lebossé E, Castro M, *et al.* Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(6): 2277–2279.
- [73] Bacher JM, Schimmel P. An editing-defective aminoacyl-tRNA synthetase is mutagenic in aging bacteria via the SOS response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(6): 1907–1912.
- [74] Gupta A, Bhakta S, Kundu S, *et al.* Fast-growing, non-infectious and intracellularly surviving drug-resistant *Mycobacterium aurum*: a model for high-throughput antituberculosis drug screening. *J Antimicrob Chemother*, 2009, **64**(4): 774–781.
- [75] Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 1989, **66**(5): 365–378.
- [76] Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*, 1991, **32**(4): 439–442.
- [77] Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr*, 2001, **73**(2 Suppl): 465S–470S.