



抗生素耐药性的多重风险因子及针对性管控策略

周旻^{1,2}, 张陆², 王子华², 钟江¹, 王华^{1,2,3*}

¹ 复旦大学生命科学院, 上海 200433

² 俄亥俄州立大学食品科技系, 俄亥俄州 哥伦布市 43210

³ 俄亥俄州立大学微生物系, 俄亥俄州 哥伦布市 43210

摘要: 抗生素耐药性已经对人类社会造成了重大影响, 需要采取切实有效的管控措施, 本文将针对耐药性研究领域的新视角, 回顾了亟需重视的抗生素耐药性多重风险因素, 包括非致病菌、食源和肠道菌群、粪便菌群、废水处理、用药途径和生物膜等, 强调了口服抗生素的危害。通过总结针对性的耐药和疾病防控策略, 为有效应对抗生素耐药性危机提供新思路。

关键词: 抗生素耐药性风险因子, 耐药性管控, 共生菌群, 肠道菌群, 给药途径

抗生素耐药性已经对人类社会造成重大的影响。保守估计全球范围内目前每年约 70 万人死于耐药菌感染。据英国经济学家奥尼尔预计, 如果不采取有效措施, 因耐药菌感染致死的人数将在 2050 年达到 1000 万, 届时全球抗生素耐药可累计造成 100 万亿美元的经济损失^[1]。致病菌的耐药性是威胁医用抗生素有效性的关键, 因此多年来对抗生素耐药性的研究主要集中在耐药致病菌的鉴定、溯源、分布以及其他流行病学指标的检测, 及其耐药基因的结构、进化、表达、保持和传播等机制的研究。这些领域已经有大量文献报道及综述^[2-4], 将不再赘述。本文着重归纳亟需重视的抗生素耐药性多重风险因子, 总结相应的针对性防控措施, 为应对抗生素耐药性提供新的视角。

1 新兴研究视角和方法

1.1 非致病菌和基因水平转移在耐药性危机中的关键作用

目前耐药性研究和监测的重点仍然集中于致病菌, 对数量庞大、分布广泛的非致病菌的耐药性缺乏系统性的认识、重视和监测。

细菌主要通过基因突变和基因水平转移机制获得耐药基因。基因突变及积累是个漫长的过程。一般情况下由单个细胞经突变产生新耐药性的概率很小, 由多个突变积累而进化出新耐药基因的几率则更低。可移动基因元件通过基因水平转移机制则可以在菌群中快速扩散, 是耐药性在各类细菌中快速攀升的主要途径^[5-7]。但是, 也有

*通信作者。Tel/Fax: +1-614-292-0218; E-mail: wang.707@osu.edu

收稿日期: 2018-07-31; 修回日期: 2018-09-06; 网络出版日期: 2018-09-14

一些基因的点突变就可造成特定抗生素耐药性的扩散。例如 DNA 旋转酶相关基因的个别点突变就能导致对喹诺酮类药物的耐受性并有助于耐药菌获得竞争优势^[8]。另外, 抗生素筛选压力会引起细菌产生 SOS 反应^[9-10], 增加耐药性基因突变的产生几率^[11]及基因的水平转移概率^[12]。在肠道中, 抗生素对肠道菌群的干扰可能会引起炎症反应, 其同样可能会促进耐药基因在细菌间传播^[13]。

非致病菌作为构成微生物生态系统的绝对主体, 在耐药生态学中的重要作用至少包括以下几点: (1) 其细菌数量为耐药相关的突变产生及积累提供了巨大的个体基数; (2) 其庞大的个体数量及遗传多样性为匹配的细菌间有效发生基因水平转移提供了适宜的环境; (3) 某些细菌含有的内源机制可以极大地促进包括耐药基因在内的各类基因水平转移; (4) 非致病菌可以保存多种类型的耐药基因, 并形成具有扩散能力的复合耐药基因库。在致病菌中发现的新药基因, 其原始载体很可能是非致病菌。当该基因在致病菌中被检出时可能早已广泛存在于非致病菌群中。因此, 只限于研究、监测少数重要致病菌耐药性的现状, 极大地限制了对耐药问题的全面了解, 对于耐药问题的警示作用非常有限。

1.2 细菌耐药性研究方法的发展

研究细菌耐药性的传统方法主要依赖细菌培养。这类方法可以得到菌株及其基因组的完整信息, 但是也拥有明显的局限性: 分离特定致病菌所用的筛选性培养基不适合其他细菌生长, 掩盖了菌群中的耐药问题; 普通培养基及培养条件不适合培养所有菌株, 会遗漏耐药菌株; 而且针对数量庞大非致病菌群进行菌株筛选, 工作量非常

巨大。

PCR 和测序技术的发展使得一系列不依赖细菌培养的菌群分析手段得以广泛运用。利用实时定量 PCR 技术, 可以批量检测菌群基因组中特定耐药基因的丰度, 通过设置合理的内参可推测耐药基因在菌群中的相对分布状况。这一方法的局限在于, 需要根据目标耐药基因合成 PCR 扩增所需的引物, 因此只能检测序列已知的耐药基因, 而且难以对载体菌进行直接分析。16S rRNA 扩增子测序和菌群基因组鸟枪法测序技术很大程度上弥补了 PCR 检测技术的不足。配合对菌群的筛选性培养, 16S rRNA 扩增子测序可以构建耐药菌群的结构。菌群全基因组测序不依赖序列特异性引物, 通过将测得的序列与 ARDB^[14]、CARD^[15]、SARG^[16]和DeepARG-DB^[17]等耐药基因数据库对比, 理论上可以对菌群的耐药基因进行全面分析甚至预测, 但技术上尚有需要改进之处。上述基于基因检测的方法具有假阳性高这一共同的缺陷, 检测或分析得到的耐药基因不一定都能正常表达并赋予细菌耐药性。所以对于耐药基因组的功能还需要进一步借助表达组、蛋白组分析。同时仍然有必要结合菌株进行各类功能鉴定和确认。

1.3 生物被膜在耐药中的贡献

几乎所有微生物, 不管是否携带耐药基因, 都会附着在特定物质表面形成生物被膜。生物被膜被公认是造成包括抗生素治疗在内的多种疾病治疗手段失败的重要原因。致病菌感染早期, 细菌细胞处于游离状态, 很容易被抗生素杀灭。一旦形成生物被膜, 细菌对各种不利环境条件的耐受性急剧增加, 尤其是对抗生素治疗的耐受性。但是鲜有研究者将及时使用抗生素与预防生物膜的形成进行联系。

2 重要抗生素耐药风险因素

规范和限制抗生素的使用是各国至今普遍采用的耐药控制措施。但是近年发现抗生素的使用只是耐药性危机形成的因素之一。下文列举的风险因子亟待引起重视。

2.1 食品微生物

发酵食品中大量的发酵菌和益生菌也存在传播抗生素耐药性的风险。发酵是一门古老的技术，发酵菌的选择往往考虑与发酵过程直接相关的特性，耐药性存在与否以往并不是菌株选择的考量条件。这导致发酵菌成为耐药性积累的重灾区之一^[6,18-20]。美国俄亥俄州立大学王华团队在2004-2007年就发现，发酵用乳酸菌可以大幅促进耐药基因的水平转移，并在绝大部分零售奶酪中检出大量耐药菌及耐药基因。该团队发现在实验室条件下，一种常用奶酪发酵菌中存在的分子机制可以在实验室条件下使耐药基因水平传播率提高10000倍^[21]。其中奶酪产品中广泛分布有多种抗四环素和红霉素的耐药基因，*tetS*等耐药基因的丰度可高达 10^7 copies/g^[22]。这些耐药基因由多种常见食源性细菌携带，可以通过天然基因水平转移机制扩散至人类致病菌^[5]。也有报道在酸奶中检测到多种耐药细菌和耐药基因，不乏同时耐受不同抗生素的多重耐药菌株^[20,23-26]。奶酪、酸奶等即食发酵食品往往不需要经过进一步高温高压处理，具有活性的耐药细菌可能与肠道菌群接触并发生基因交流。值得庆幸的是，经过全程跟踪研究，奶酪发酵过程中的风险因子已经得到有效控制。欧美几大发酵菌种供应企业已经替换了耐药菌株，目前从这些正规企业获得耐药性发酵菌株的风险基本被排除。2011年的数据

表明，美国零售发酵乳制品中的系统性耐药问题已经得以解决^[27]。与此同时，土法发酵的传统工艺仍然遍布世界各地，比如家族奶酪作坊、牧民自制酸奶等产品，因此世界范围内依旧存在发酵菌传递耐药性的风险。

除了发酵食品之外，研究显示其他即食食品同样存在携带耐药细菌的隐患^[28-32]。熟食、生菜沙拉、寿司、生蚝等不再经过热加工的食物都有可能将原有或在制作过程中接触污染的耐药菌，在消费者食用时被带入胃肠道。

食品在耐药性传播上具有重要的媒介作用^[5,6,33-35]。序列比对和溯源研究发现，食品细菌和临床分离菌株中的耐药基因具有相关性^[36]。食品细菌的耐药性对肠道菌群和生态圈的耐药水平具有深刻的影响。一项以小鼠为模型的研究发现，如果没有摄入食源性的耐药细菌，短期使用抗生素不会增加肠道内相应的耐药基因丰度。而经口腔接种了耐药细菌之后，抗生素的使用会导致耐药基因丰度大幅飙升^[37]。这表明肠道菌群中已有的耐药细菌是耐药基因扩增的“种子”，而食源性耐药菌正是这些耐药“种子”的重要来源。

2.2 肠道细菌

人体和动物体内数量庞大的肠道微生物不仅与宿主生长发育、疾病及健康状况休戚相关，而且也成为抗生素耐药性积累和扩散的温床^[38-40]，肠道菌群为耐药突变的筛选、细菌间基因水平转移提供了巨大的细菌个体基数和适宜的环境^[41-42]。研究发现，人的肠道中含有超过1000种不同的抗生素耐药基因，占肠道菌群总基因组的0.266%，其丰度远高于土壤、海洋和湖泊等环境^[43-44]。肠道菌群的耐药基因与迄今为止发现的致病菌所携

带的耐药基因之间存在着同源性^[44]。

抗生素对肠道菌群的影响不仅仅局限于用药期间。停药后数月甚至数年内, 肠道菌群依旧能够反映抗生素药物的使用史^[45]。一项长达 10 个月的监测研究还表明, 抗生素的使用在用药后 3–4 d 内会急剧改变肠道菌群结构、降低菌群多样性。尽管停药后 1 周肠道菌群就有自修复的能力, 长时间的监测结果表明用药结束数月后肠道菌群达到稳定状态时, 其结构已经无法恢复到用药前的状况。这一菌群结构的差异可能与耐药性改变密切相关^[46]。

近年来的研究表明, 未直接接触抗生素的人群, 甚至处于生长发育初期的婴幼儿粪便内同样携带有大量耐药细菌和耐药基因。一项研究中, 出生后 8 d 所有受跟踪的新生婴儿粪便中已分离出高达 10^6 CFU/g 的四环霉素耐药细菌和 10^9 CFU/g 的红霉素耐药细菌, 以及相应的耐药基因库; 而且粪便菌群中耐药细菌所占比例随时间推移有进一步增加的趋势^[47]。类似现象在另一项对早产儿耐药菌监测的研究中也被证实^[48]。耐药细菌通过接触、食物的摄入量和随粪便的排出量之间存在巨大差异, 表明即使在没有抗生素选择压力的情况下肠道也是耐药细菌繁殖的温床, 而粪便是耐药菌排放和扩散的重要载体。

肠道菌群中的产超广谱 β 内酰胺酶(ESBL, Extended spectrum β -lactamases)细菌是一类不可忽视的耐药细菌, 近年来其大幅攀升已经对临床感染产生了很大影响, 如肠道菌导致的尿路感染等。ESBL 可由质粒基因表达, 并在细菌间快速传播, 导致耐药性的扩散^[49]。令人不安的是, 近年来发现即便不使用抗生素, 动物饲养环境尤其粪便中也分离出了可观的 ESBL 大肠杆菌^[50]。在没有抗生素选择压力下, 这些 ESBL 菌的耐药性

状也难以去除, 因此极可能已获得稳定的遗传机制。通过 β 内酰胺酶抑制剂, 例如克拉维酸、舒巴坦等配合常规的抗生素, 是现有用于对抗 ESBL 细菌的临床方法之一。但要在生态系统水平上控制这类耐药菌和耐药基因的大规模扩散, 还有赖于科学家们更多的创新发现和针对性的防控措施的研发。

2.3 粪便菌群

健康人平均一天排出约 50–800 g 粪便(平均约 128 g)^[51], 年排便量接近 50 kg, 以目前人口估算年排便量超过 10^7 t; 加上大量饲养的食用动物^[52], 由人类活动产生的粪便年产量应超过 10^8 t, 其中大量的耐药细菌会随粪便对土壤、水体环境造成极大影响。现代养殖场会利用动物排泄物进行肥田, 或作为禽类、渔业养殖中的营养补充剂。如果粪便不经过严格处理, 其中的耐药细菌和耐药基因会进一步污染瓜果蔬菜、水源和人、畜禽及水生动物, 并进一步传播^[53–55]。耐药性在“肠道-粪便-环境-肠道”循环中存在传递和放大的效应。随粪便排入环境的耐药细菌和耐药基因组将大大增加管控的难度和成本。

2.4 污水处理

禽畜养殖业的废水中含有大量的耐药细菌和耐药基因, 未经处理后排放会显著增加地表水和河流中的耐药基因的丰度^[56–57]。市政污水收集、处理系统将城市污水集中处理, 对抗生素耐药性的放大作用同样不可小觑。以抗生素使用较为频繁的医院环境为例, 所产生的废水和污水中会携带耐药细菌, 其耐药性往往能反映医院的用药情况。近期一项在美国马里兰州国立卫生研究院临床中心的检测研究发现重症监护室废水和外排污口均能检测到碳青霉烯耐药细菌^[58]。如果不做妥

善处理, 其耐药基因将会直接进入水体环境。在市政污水处理系统中已检测到与医院用药相关的抗生素耐药基因和耐药细菌, 如碳青霉烯耐药细菌^[59-61]。

污水处理过程甚至增加了耐药程度和耐药菌/基因丰度, 而污水处理所用的活性淤泥甚至成为耐药性积累的又一重要场所^[62]。污水处理厂出水口样品中耐药细菌和多重耐药菌的比例, 以及耐药基因和基因水平移动元件的丰度均比入水口样品有显著增加^[63]。活性污泥细菌量约为 10^6 – 10^9 个/mL^[64], 其中含大量耐药细菌、耐药基因以及耐药传播相关的基因移动原件^[65-66], 且耐药质粒可以有效通过结合方式进行转移^[67]。

2.5 用药途径

从 20 世纪 30 年代至今, 人们已研发并使用了类型多样的抗生素药物, 而国外抗生素药物口服剂型从 20 世纪七、八十年代起成为主流。口服抗生素的给药方式固然具有方便快捷、不易引发急性过敏反应等优点, 我国依然在医疗体系中推进抗生素药物口服化进程。然而, 感染的病发部位并不仅限于肠道。由于对肠道菌群缺乏认识, 用药途径作为重要的耐药性风险因素长期以来并没有受到关注。

不同抗生素在宿主体内的代谢途径并不相同, 同一类抗生素在不同物种的宿主体内也可能不相同。以常用的 β 内酰胺类抗生素(如青霉素、头孢类药物等)为例, 哺乳动物主要依靠肾脏代谢这类药物, 仅有小部分经由肠道排出。对于这类药物, 将给药途径从口服改为皮下或肌肉注射, 药物不需经过消化道吸收, 而代谢和排泄主要由泌尿系统完成, 理论上能够极大程度减少肠道内的耐药性筛选压力。大量的研究结果已经证

明了口服抗生素的使用与肠道/粪便中耐药细菌增殖、耐药基因增加密切相关, 但鲜有研究关注用药途径对肠道菌群耐药性的影响。

美国俄亥俄州立大学王华团队通过一系列动物实验, 证明用药途径对肠道/粪便菌群耐药性具有显著影响。将抗生素的摄取方式由口服转变为注射之后耐药基因组丰度最多可降低 5 个数量级^[37]。在实验鼠模型中, 氨苄青霉素用药 5 d 后耐药基因 *bla_{CMY-2}* 在口服给药的小鼠粪便中可达到每克 10^{11} 拷贝, 在注射给药组中的平均值仅为每克 10^7 拷贝, 与摄入生理盐水的对照组基本持平。相比于以肾脏代谢为主的氨苄青霉素, 改变四环霉素摄入途径对改善肠道菌群的效果相对较小, 这与其肝脏为主的代谢途径有关。另一方面, 实验所用的四环霉素对肠道菌群的影响存在着明显的剂量效应^[68]。这一结果说明, 即使是四环素这类肝胆代谢为主的抗生素药物, 换用注射方式也会相应缓解对肠道菌群的筛选压力。

美国食品药品监督管理局的数据显示, 养殖业中使用的抗生素, 至少有 90% 都是通过饲料拌喂或者添加于饮水的方式经口服被摄入的。通过对比养殖动物用药前后肠道菌群耐药基因的丰度, 研究者发现口服抗生素可将耐药基因的比例增加 2 个数量级^[69], 与早年其他研究的类似条件下耐药细菌增加的比例基本吻合^[70]。考虑到全球每年 10^8 t 的粪便产量, 多年来口服抗生素经粪便菌群导致及传播的耐药基因, 对生态圈整体耐药性产生的影响非常巨大。

改变用药途径对肠道菌群的保护作用不仅限于抗生素类药物。近期研究发现, 受监测的 FDA 认证市售非抗生素类药物中, 24% 对肠道细菌都具有不同程度的抑菌特性^[65], 其胃肠道副作用很

可能来源于此。所以调整特定药物的用药途径, 对于减少耐药的产生、保护肠道菌群、减轻胃肠道副作用具有巨大的应用价值。有研究者尝试让接受 β 内酰胺注射治疗的病人同时摄入肠溶性的 β 内酰胺酶, 分解进入肠道的抗生素从而降低肠道内的筛选压力, 避免耐药性积累, 并取得了令人鼓舞的效果^[66]。还有其他研究者使用活性炭非选择性地吸附人体肠道内未被吸收的抗生素, 在不影响血浆抗生素浓度的同时达到了保护肠道菌群结构和丰度的效果^[71]。这些成果都值得进一步关注。

2.6 剂量效应

抗生素滥用对耐药性的促进作用毋庸置疑。与此同时我们也应该认识到, 与谈论物质毒性必须考虑剂量一样, 衡量抗生素对于微生物的筛选压力也需要考虑剂量。“耐药性突变选择窗”假说就指出了细菌耐药性的积累主要发生在特定的抗生素浓度范围内。当抗生素浓度低于该浓度范围的下限(最小抑制浓度, MIC)或者高于上限(突变抑制浓度, MPC), 都难以诱发细菌耐药性产生和积累^[72-76]。抗生素筛选压力的这一剂量效应, 在上文中 Zhang 等^[37]和 Vasseur 等^[68]研究的结果中得到体现。注射用抗生素经循环系统的缓释作用, 降低了进入肠道的抗生素浓度。

相当一部分研究者认为, 医疗及畜牧业中抗生素的使用是抗生素耐药及共生菌群失调造成的许多现代疾病的根源。这个结论除了不了解用药途径所造成的后果外, 在很大程度上也夸大了抗生素食物残留以及必要的抗生素治疗的副作用。以食物残留的四环素为例, 按照我国《动物性食品中兽药最高残留限量》规定, 动物制品中四环素的残留上限为 100–600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (浓度随取材部位变化)。敏感细菌对于四环素的 MIC 约为 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以成人血液体积约为 4 L 计算, 要达到“耐药性选

择窗”的最低浓度意味着需要短期内进食 60 kg 肉、奶类食品, 或者 10 kg 肾脏制品, 显然不符合现实。有研究者发现 MIC 浓度 1/30 的抗生素也会诱发耐药性突变^[77], 该浓度仍然远高于正常进食时残留抗生素的血液浓度。尽管特定抗生素对某些敏感细菌的 MIC 较低, β 内酰胺类的 MIC 甚至可以低至 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 但相应的药物残留标准也更严格, 比如氨苄霉素在肉类中的最高允许检出量仅为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。而随代谢进入肠道的抗生素浓度会更低。所以从母乳、正常饮食中摄取的抗生素残余的浓度非常低, 无法与治疗用抗生素, 尤其是口服抗生素浓度相提并论。脱离药物剂量来谈抗生素筛选压力以及副作用, 尤其是将耐药及肠道菌群失调归咎于食源, 混淆了引发耐药的主要因素。畜牧业中大量使用抗生素的危害, 主要来源于肠道及粪便中的大量耐药菌以及粪便中药物残留对环境的影响。当然, 合理使用抗生素, 杜绝滥用, 降低环境、食物链中抗生素残留对于有效减灭抗生素耐药性仍然至关重要。

3 结语: 抗生素耐药性的针对性防控策略

近年来的研究揭示了新的耐药性风险因素, 这也要求有相应的防控措施来有效对抗生素耐药性危机。针对上述几个风险因素, 以下措施有望完善耐药管控策略。

在食品卫生、环境、卫生监测系统中建立耐药性监测和预警机制, 利用日趋完善和普及的基因检测和测序技术, 结合菌株研究, 对非致病细菌耐药性也进行定期采样和监控, 并与医疗机构进行信息联网。通过对环境菌群耐药性的监测, 推测可能发生的基因水平转移状况和潜在耐药致病菌, 为院内感染防控和药物选择提供指导。

在人畜排泄物的无害化处理过程中降低耐药细菌数量。一方面应当禁止将未经处理的排泄物直接排入环境；另一方面，可利用堆肥技术降低粪便中抗生素耐药基因的丰度和表达水平^[78-79]，研究对减少耐药细菌最为有效的堆肥条件并进行推广。

对污水处理设施中的耐药细菌和耐药基因富集和排放进行监测和控制。跟踪活性淤泥中的耐药基因组动态变化和相应耐药菌、耐药基因的流入/流出比例，研发有效减灭措施。

综合考虑病情、药物种类、代谢方式和药物剂量，优化用药方式。改变用药途径对减少肠道耐药，保护肠道菌群健康及改善与肠道菌群失调相关的糖尿病、自身免疫失调、神经系统疾病等都会有重要影响。另一方面，在正常抗生素用药范围内，应当在感染发生初期足量使用抗生素，避免细菌以生物被膜的方式形成耐药性。新药研发方面，除了寻找新型抗菌药物，通过技术手段改进现有药物，缩小抗生素药物的“耐药性突变选择窗”等，达到减少甚至规避耐药性选择压力的目的，也是潜在的耐药性管控手段。

通过摄入益生菌、外源菌群移植等方式调节、改变肠道菌群结构也是值得尝试的耐药性调控方式。但是在实际运用之前必须考虑到移植菌株、尤其是粪便菌群的耐药性特点，避免引入新的耐药性及其他尚未了解到的风险因子。近年美国医学界的研究也表明，通过加强医院系统的消毒灭菌、减少交叉感染可以大大减少院感事故，包括严重的抗生素耐药菌感染。

综上所述，近年科学技术的发展为有效减灭抗生素耐药拓展了视野，拓宽了道路。由此也要求政府部门、科研和监管机构调整投入人力财力的方向，对多重风险因子进行对症管控，以便带来有效的成果。

参考文献

- [1] The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. 2018-7-15.
- [2] Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, 292(2): 115-125.
- [3] Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, 2008, 320(5872): 100-103.
- [4] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1): 42-51.
- [5] Wang HH, Manuzon M, Lehman M, Wan K, Luo HL, Wittum TE, Yousef A, Bakaletz LO. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 254(2): 226-231.
- [6] Wang HH. Commensal bacteria, microbial ecosystems and horizontal gene transmission: adjusting our focus for strategic breakthroughs against antibiotic resistance//Jaykus L, Wang HH, Schlesinger L. Foodborne Microbes: Shaping the Host Ecosystem. Washington, USA: ASM Press, 2009: 267-281.
- [7] Wang HH, Schaffner DW. Antibiotic resistance: how much do we know and where do we go from here? *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7093-7095.
- [8] Zhang QJ, Sahin O, McDermott PF, Payot S. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes and Infection*, 2006, 8(7): 1972-1978.
- [9] Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 2004, 305(5690): 1629-1631.
- [10] Baharoglu Z, Mazel D. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(5): 2438-2441.
- [11] Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crécy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biology*, 2005, 3(6): e176.
- [12] Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 2004, 427(6969): 72-74.
- [13] Stecher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders MJ, Pickard

- DJ, Barthel M, Westendorf AM, Krogfelt KA, Walker AW, Ackermann M, Dobrindt U, Thomson NR, Hardt WD. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(4): 1269–1274.
- [14] Liu B, Pop M. ARDB—antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl_1): D443–D447.
- [15] Jia BF, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo PY, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FSL, Wright GD, McArthur AG. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D566–D573.
- [16] Yin XL, Jiang XT, Chai BL, Li LG, Yang Y, Cole JR, Tiedje JM, Zhang T. ARGs-OAP v2.0 with an expanded sarg database and hidden markov models for enhancement characterization and quantification of antibiotic resistance genes in environmental metagenomes. *Bioinformatics*, 2018, 34(13): 2263–2270.
- [17] Arango-Argoty G, Garner E, Pruden A, Heath LS, Vikesland P, Zhang LQ. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome*, 2018, 6(1): 23.
- [18] Aarts H, Margolles A. Antibiotic resistance genes in food and gut (non-pathogenic) bacteria. Bad genes in good bugs. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5: 754.
- [19] Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(3): 281–295.
- [20] 董春阳. 广州市售酸奶中乳酸菌的药物敏感性分析. 华南理工大学硕士学位论文, 2013.
- [21] Luo HL, Wan K, Wang HH. High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAM β 1 transmission by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 2970–2978.
- [22] Manuzon MY, Hanna SE, Luo HL, Yu ZT, Harper WJ, Wang HH. Quantitative assessment of the tetracycline resistance gene pool in cheese samples by real-time TaqMan PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(5): 1676–1677.
- [23] Nawaz M, Wang J, Zhou AP, Ma CF, Wu XK, Moore JE, Millar BC, Xu JR. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 1081–1089.
- [24] Guo HL, Pan L, Li LN, Lu J, Kwok L, Menghe B, Zhang HP, Zhan WY. Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. *Journal of Food Science*, 2017, 82(3): 724–730.
- [25] Li SY, Li Z, Wei W, Ma CY, Song XM, Li SF, He WY, Tian JJ, Huo XY. Association of mutation patterns in *GyrA* and *ParC* genes with quinolone resistance levels in lactic acid bacteria. *The Journal of Antibiotics*, 2015, 68(2): 81–87.
- [26] Yu T, Jiang XB, Li L, Wang H, Lu SZ, Zhang MM, Qi ZP, Yu MY. Antimicrobial resistance and resistance genes in lactic acid bacteria isolated from commercial yogurt. *Food Science*, 2016, 37(11): 131–136. (in Chinese)
于涛, 姜晓冰, 李磊, 王辉, 逯胜哲, 张萌萌, 祁真平, 于明月. 市售酸奶中乳酸菌耐药性及耐药基因的检测. *食品科学*, 2016, 37(11): 131–136.
- [27] Li XH, Li YL, Alvarez V, Harper WJ, Wang HH. Effective antibiotic resistance mitigation during cheese fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7171–7175.
- [28] Li XJ, Wang HH. Tetracycline resistance associated with commensal bacteria from representative ready-to-consume deli and restaurant foods. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(10): 1841–1848.
- [29] Ye L, Zhang L, Li XH, Shi L, Huang Y, Wang HH. Antibiotic-resistant bacteria associated with retail aquaculture products from Guangzhou, China. *Journal of Food Protection*, 2013, 76(2): 295–301.
- [30] Wu BB, Yu Y, Jin PJ, Fang WH. Analysis of major virulence and antibiotics resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from environment and seafood in Ningbo of Zhejiang Province. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27(5): 381–385. (in Chinese)
吴蓓蓓, 俞盈, 金培婕, 方维焕. 宁波地区海产品及环境中副溶血弧菌主要毒力及耐药性分析. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(5): 381–385.
- [31] Obaidat MM, Salman AEB, Roess AA. Virulence and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from seafood from three developing countries and of worldwide environmental, seafood, and clinical isolates from 2000 to 2017. *Journal of Food Protection*, 2017, 80(12): 2060–2067.
- [32] Sivaraman GK, Jha AK, Remya S, Renuka V, Lalitha KV, Ravishankar CN. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from seafood of Veraval, Gujarat to third generation cephalosporins. *Fishery Technology*, 2017, 54: 141–144.
- [33] Wellington EMH, Boxall ABA, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, Johnson-Rollings AS, Jones DL, Lee NM, Otten W, Thomas CM, Williams AP. The role of the natural

- environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 2013, 13(2): 155–165.
- [34] Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 173.
- [35] Fu YY, Zhang MJ. Discussion on the spread and resistance of foodborne diseases. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(7): 2664–2669. (in Chinese)
付燕燕, 张茂俊. 浅谈食源性疾病的传播和耐药性. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(7): 2664–2669.
- [36] Jahan M, Zhanel GG, Sparling R, Holley RA. Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 199: 78–85.
- [37] Zhang L, Huang Y, Zhou Y, Buckley T, Wang HH. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(8): 3659–3666.
- [38] Salyers AA, Gupta A, Wang YP. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(9): 412–416.
- [39] Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2012, 1(1): 39.
- [40] Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PHM, Wolfs PFG. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 87.
- [41] Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*, 2014, 7: 167–176.
- [42] 龙永艳. 餐饮从业人员肠道菌群喹诺酮及头孢类耐药基因的携带与转移研究. 中国疾病预防控制中心硕士学位论文, 2016.
- [43] Hu YF, Yang X, Qin JJ, Lu N, Cheng G, Wu N, Pan YL, Li J, Zhu LY, Wang X, Meng ZQ, Zhao FQ, Liu D, Ma JC, Qin N, Xiang CS, Xiao YH, Li LJ, Yang HM, Wang J, Yang RF, Gao GF, Wang J, Zhu BL. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Communications*, 2013, 4: 2151.
- [44] Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, 2009, 325(5944): 1128–1131.
- [45] Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 2010, 156(11): 3216–3223.
- [46] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(S1): 4554–4561.
- [47] Zhang L, Kinkelaar D, Huang Y, Li YL, Li XJ, Wang HH. Acquired antibiotic resistance: are we born with it? *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7134–7141.
- [48] Gosalbes MJ, Valles Y, Jimenez-Hernandez N, Balle C, Riva P, Miravet-Verde S, de Vries LE, Llop S, Agerso Y, Sorensen SJ, Ballester F, Francino MP. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2016, 7(1): 35–44.
- [49] Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 1983, 11(6): 315–317.
- [50] Zhou Y. Antibiotic resistance in poultry gastrointestinal microbiota and targeted mitigation. Doctor Dissertation of the Ohio State University, 2016.
- [51] Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015, 45(17): 1827–1879.
- [52] United States Department of Agriculture. Animal manure management. [2018-06-15]. https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/null/?cid=nrcs143_014211.
- [53] Yang XH, Wang N, Ye BP. Review on antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistant genes in livestock and poultry production. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2014, 21(6): 583–588. (in Chinese)
杨晓洪, 王娜, 叶波平. 畜禽养殖中的抗生素残留以及耐药菌和抗性基因研究进展. *药物生物技术*, 2014, 21(6): 583–588.
- [54] Jia SY. Decay of tetracycline resistance genes and shift of bacterial community structure in receiving river contaminated by livestockwastewater. Master Dissertation of Nanjing University, 2014
贾舒宇. 养殖废水接纳河流中四环素耐药基因衰减与菌群结构更替. 南京大学硕士学位论文, 2014.
- [55] Su JQ, Wei B, Ou-Yang WY, Huang FY, Zhao Y, Xu HJ, Zhu YG. Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(12): 7356–7363.

- [56] Jia SY, Zhang XX, Miao Y, Zhao YT, Ye L, Li B, Zhang T. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water. *Water Research*, 2017, 124: 259–268.
- [57] Chen B, Hao LJ, Guo XY, Wang N, Ye BP. Prevalence of antibiotic resistance genes of wastewater and surface water in livestock farms of Jiangsu Province, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(18): 13950–13959.
- [58] Weingarten RA, Johnson RC, Conlan S, Ramsburg AM, Dekker JP, Lau AF, Khil P, Odom RT, Deming C, Park M, Thomas PJ, NISC Comparative Sequencing Program, Henderson DK, Palmore TN, Segre JA, Frank KM. Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance. *mBio*, 2018, 9(1): e02011–e02017.
- [59] Volkman H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(2): 277–286.
- [60] Hrenovic J, Goic-Barisic I, Kazacic S, Kovacic A, Ganjto M, Tonkic M. Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Eurosurveillance*, 2016, 21(15): 30195.
- [61] Ng C, Tay M, Tan B, Le TH, Haller L, Chen HJ, Koh TH, Barkham TMS, Thompson JR, Gin KYH. Characterization of metagenomes in urban aquatic compartments reveals high prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in wastewaters. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2200.
- [62] Czekalski N, Díez EG, Bürgmann H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *The ISME Journal*, 2014, 8(7): 1381–1390.
- [63] Zhang YL, Marrs CF, Simon C, Xi CW. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp.. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(12): 3702–3706.
- [64] Ma LL, Mao GN, Liu J, Yu H, Wang YY. Variation of total bacterial cell counts and bacteriar communities in different water treatment processes from a wastewater treatment plant. Sciencepaper Online, 2013. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201309-438>. Accessed on July 20th, 2018-7-20. (in Chinese)
马丽丽, 毛冠男, 刘杰, 余辉, 王莹莹. 生活污水处理厂各工艺中细菌含量及群落结构变化. 中国科技论文在线, 2013. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201309-438>. 2018-7-20.
- [65] Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, Brochado AR, Fernandez KC, Dose H, Mori H, Patil KR, Bork P, Typas A. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature*, 2018, 555(7698): 623–628.
- [66] Jeong SH, Song YK, Cho JH. Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin, olaquinox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 53(3): 209–216.
- [67] Li LG, Dechesne A, He ZM, Madsen JS, Nesme J, Sørensen SJ, Smets BF. Estimating the transfer range of plasmids encoding antimicrobial resistance in a wastewater treatment plant microbial community. *Environmental Science & Technology Letters*, 2018, 5(5): 260–265.
- [68] Vasseur MV, Laurentie M, Rolland JG, Perrin-Guyomard A, Henri J, Ferran AA, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure *Klebsiella pneumoniae* lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(3): 1744–1748.
- [69] Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai BL, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1691–1696.
- [70] Levy SB. Emergence of antibiotic-resistant bacteria in the intestinal flora of farm inhabitants. *The Journal of Infectious Diseases*, 1978, 137(5): 688–690.
- [71] de Gunzburg J, Ghoulane A, Ducher A, Le Chatelier E, Duval X, Ruppé E, Armand-Lefevre L, Sablier-Gallis F, Burdet C, Alavoine L, Chachaty E, Augustin V, Varastet M, Levenez F, Kennedy S, Pons N, Mentré F, Andremont A. Protection of the human gut microbiome from antibiotics. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018, 217(4): 628–836.
- [72] Zhao XL, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185(4): 561–565.
- [73] Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52(1): 11–17.
- [74] Drlica K, Zhao XL. Mutant selection window hypothesis updated. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44(5): 681–688.
- [75] Cui JC, Liu YN, Wang R, Tong WH, Drlica K, Zhao XL. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006, 194(11): 1601–1608.

- [76] Firsov AA, Vostrov SN, Lubenko IY, Drlica K, Portnoy YA, Zinner SH. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(5): 1604–1613.
- [77] Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(7): e1002158.
- [78] Wang LL, Oda Y, Grewal S, Morrison M, Michel FC Jr, Yu ZT. Persistence of resistance to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon treatments. *Microbial Ecology*, 2012, 63(1): 32–40.
- [79] Wang C, Dong D, Strong PJ, Zhu WJ, Ma Z, Qin Y, Wu WX. Microbial phylogeny determines transcriptional response of resistome to dynamic composting processes. *Microbiome*, 2017, 5(1): 103.

Key risk factors of antibiotic resistance ecology and targeted control strategies

Yang Zhou^{1,2}, Lu Zhang², Zihua Wang², Jiang Zhong¹, Hua Wang^{1,2,3*}

¹ School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

² Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, Columbus 43210, Ohio, USA

³ Department of Microbiology, the Ohio State University, Columbus 43210, Ohio, USA

Abstract: Antibiotic resistance has caused major damages to public health and social economy, and effective control has become a stressing need. This review summarizes recent changes in the scope and methods of antibiotic resistance investigation, and discusses the contributions of foodborne bacteria, gut, fecal and waste water microbiota, drug administration routes, and biofilm to the mega antibiotic resistance problem seen today. We also present new directions for mitigation of antibiotic resistance and diseases.

Keywords: antibiotic resistance risk factors, antibiotic resistance mitigation, commensal microbiota, gut microbiota, drug administration method

(本文责编: 李磊)

*Corresponding author. Tel/Fax: +1-614-292-0218; E-mail: wang.707@osu.edu

Received: 31 July 2018; Revised: 6 September 2018; Published online: 14 September 2018



王华, 美国俄亥俄州立大学食品科学系教授。历任美国宇航局火星生存计划特邀专家委员会食品与微生物专家委员, 美国食品科技协会生物技术分会主席, 美国微生物学会食品分会主席, *Microbial Spectrum* 副主编, 2017年美国微生物学会抗生素耐药生态学、耐药、感染及继发疾病创新减灭专业会议组委会主席。乳酸菌, 生物被膜, 李斯特菌等食品安全领域专家, 抗生素耐药菌群创新研究领域奠基人, 美英全球创新动议耐药减灭项目组织人, 首席科学家。2008–2010年美国微生物学会杰出专家讲员。曾获2009年Battelle基金科技与人类事务项目奖, 2015年俄亥俄州农业研究与发展中心年度发明奖。其创新、颠覆性成就为人类战胜耐药问题、细菌感染及和肠道菌群混乱相关的一系列现代疾病奠定了坚实基础。