

抗生素耐药性环境中产生和转移的人类健康风险评估(HHRA)

Nicholas J. Ashbolt¹, Alejandro Amézquita², Thomas Backhaus³, Peter Borriello⁴, Kristian K. Brandt⁵, Peter Collignon⁶, Anja Coors⁷, Rita Finley⁸, William H. Gaze⁹, Thomas Heberer¹⁰, John R. Lawrence¹¹, D.G. Joakim Larsson¹², Scott A. McEwen¹³, James J. Ryan¹⁴, Jens Schönfeld¹⁵, Peter Silley^{16, 17}, Jason R. Snape¹⁸, Christel Van den Eede¹⁹, and Edward Topp²⁰

摘要: [背景] 直到最近,人们才明确环境能影响抗生素耐药性风险对临床结果的影响,但迄今为止,很少有文献记录正式评估这些风险的方法。[目标] 我们研究可能的方法,并试图确定人类健康风险评估(HHRA)的研究需求,这项评估注重环境在抗生素耐药性病原体所致的抗生素治疗失败中所起的作用。[方法] 作者参加了2012年3月4—8日在加拿大魁北克省举行的研讨会,定义抗生素耐药性风险与人类健康环境评估的范围和目标。我们专注于环境中耐药性产生“热点区域”的关键要素,(与食品无关的)暴露评估以及剂量反应,以描述风险特征,从而改善抗生素耐药性管理的方案。[讨论] 识别传统风险评估中有助于评估环境中抗生素耐药性的各个新方面。包括:a)解释附加的选择压力对环境耐药基因组的作用,即随着时间的推移,促使抗生素耐药性细菌(ARB)产生;b)在相关的环境组成部分的“热点区域”中识别和描述水平基因转移(HGT)率;c)针对不同健康结局和途径的ARB剂量修改传统的剂量反应方法。[结论] 我们建议将抗生素耐药性产生造成的环境影响纳入所有涉及ARB的HHRA过程之中。由于可用的数据有限,一种多标准决策分析方法将有助于进行环境中抗生素耐药性的HHRA,并使风险管理者了解环境抗生素耐药性。

[作者单位] 1.U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio, USA; 2.Unilever-Safety and Environmental Assurance Centre, Sharnbrook, United Kingdom; 3.Department of Biological and Environmental Sciences, Gothenburg University, Göteborg, Sweden; 4.Veterinary Medicines Directorate, Addlestone, United Kingdom; 5.Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark; 6.The Canberra Hospital and Canberra Clinical School, Australian National University, Canberra, Australia; 7.ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim/Main, Germany; 8.Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario, Canada; 9.European Centre for Environment and Human Health, Exeter University Medical School, Knowledge Spa, Royal Cornwall Hospital, Truro, United Kingdom; 10.Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, Department 3: Veterinary Drugs, Berlin, Germany; 11.Environment Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Canada; 12.Institute for Biomedicine, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden; 13.Department of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada; 14.Environment, Health and Safety, GlaxoSmithKline, Ware, United Kingdom; 15.Umweltbundesamt Federal Environment Agency, Dessau, Germany; 16.MB Consult Limited, Southampton, United Kingdom; 17.University of Bradford, Bradford, United Kingdom; 18.Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca, Brixham, United Kingdom; 19.Pfizer Animal Health VMRD, Zaventem, Belgium; 20.Agriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, Canada

[通信作者] N.J. Ashbolt, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory(MD-593), 26 W. Martin Luther King Dr., Cincinnati, OH 45268 USA. Telephone: (513)569-7318. E-mail: Ashbolt.Nick@epa.gov

1 前言

2012年3月在加拿大魁北克省举行的一个研讨会(环境中的抗菌素耐药性:评估和管理人类活动的影响)集中讨论了环境中的抗菌素耐药性以及评估和管理人类活动对此影响的方法。对人类健康的影响是指从环境中衍生并可能对人类健康产生不利影响的抗生素耐药性细菌(ARB)(例如临床抗生素使用的疗效降低,感染更严重或更持久),它们通过患者直接接触抗生素耐药性病原体、或通过患者接触耐药决定因子并随后发生水平基因转移(HGT)至人类宿主体表或体内的细菌病原体来影响人类健康,如图1所示。ARB危害在环境中产生,是由于它们通过各种机制(例如质粒、整合子、基因盒或转座子这些可动遗传因子)直接摄取抗生素耐药基因(ARG),或在抗生素以及杀虫剂、有毒金属、纳米材料应激源这些共选择剂(Qiu等,2012; Taylor等,2011)或基因突变(Gillings和Stokes,2012)引发的环境选择下增殖。这些过程会产生环境中的抗生素耐药性细菌(eARB)或带抗生素耐药性的病原体(pARB),而这取决于是否存在受体细菌(图1)。

图1这个概念模型描述了致使人类和动物感染抗生素耐药细菌风险增加的环境途径。过程1~6将在文中做进一步描述。过程7和8因不受环境因素驱动,故不详述。

人类健康风险评估(HHRA)可预估现在或将来受污染环境介质中的危害对人类产生的负面健康影响的性质和几率[美国环境保护署(EPA),2012]。在这篇综述里我们着重研究如何把HHRA运用到致病ARB感染的风险上,因为它们是导致发病率和死亡率不断增长的原因,特别是在产生中地区(Gurndmann等,2011)。抗菌剂耐药性微生物相较其同种类易

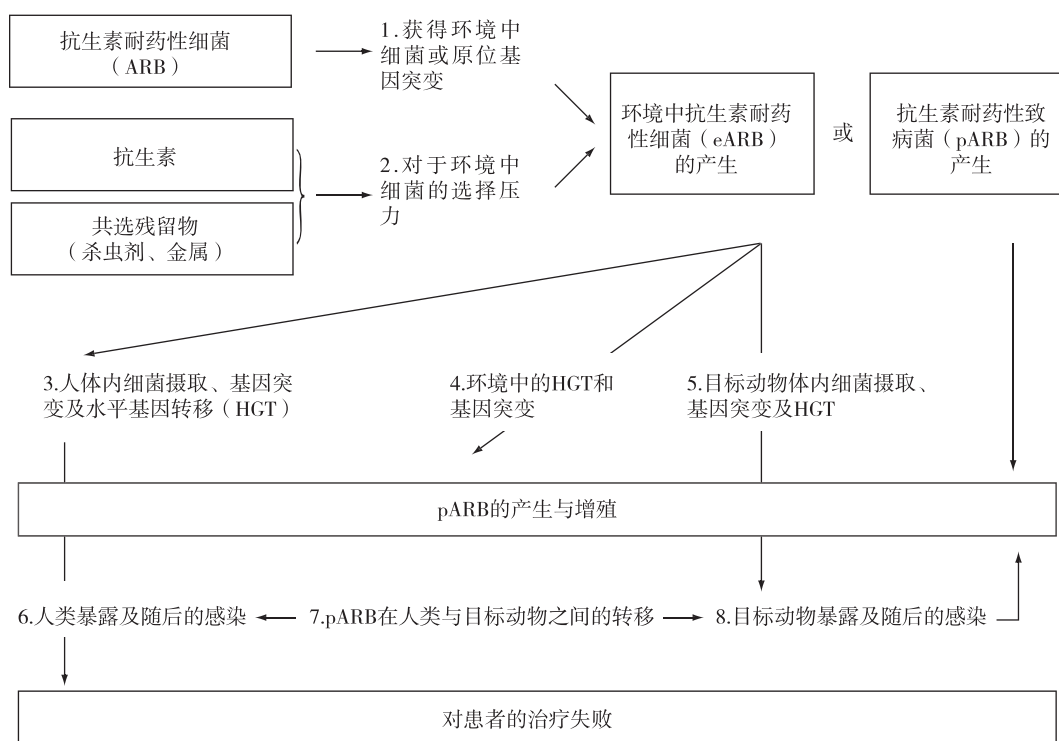


图 1

感微生物可在抗菌剂水平不断增加的情况下繁殖或生存。在这篇综述中,我们限制微生物的耐药组为细菌,即抗生素耐药性,在这一领域中,术语“抗生素”与“抗菌剂”是同义词。理解环境对人类和动物病原体耐药性产生所起到的作用是很重要的,因为治疗耐药性感染可能导致住院时间延长、治疗时间延长、治疗失败、需要使用更具毒性且更昂贵的抗生素来进行治疗以及死亡可能性增加。

我们已经做了大量的工作来了解医院和社区环境对 ARB 感染在人类中传播、维持所做的贡献和所起到的作用。就社区环境中的暴露而言,畜牧生产中使用抗生素及动物源性食品中存在 eARB 和 pARB 是一个备受关注的问题。在 2011 年,国际食品法典委员会 (Codex Alimentarius Commission) [由联合国粮食和农业组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 于 1963 年设立,负责协调国际食品标准、准则和行为守则,以保护消费者的健康并确保食品贸易的公平贸易实践] 发布如何应用风险分析方法来分析兽用及农用抗生素使用中食源性抗生素耐药性的步骤和准则 (国际食品法典委员会, 2011)。

抗生素和其他抗菌剂在环境中的其他来源有生活污水 (Dolejska 等, 2011)、集约化畜牧业以及制药厂的废料 (Larsson 等, 2007)。各种来源的抗生素的使用和排放 (Kümmerer, 2009a, 2009b) 及抗生素耐药基因 (ARG) 在原来的环境菌和病原菌与其耐药决定因子间的 HGT 对环境的影响 (Börjesson 等, 2009; Chagas 等, 2011; Chen 等, 2011; Cummings 等, 2011; Forsberg 等, 2012; Gao 等, 2012; Qiu 等, 2012) 还没有被量化, 但已经引起全球关注 (Finley 等, 2013; WHO, 2012a)。使微生物能够抵抗抗菌剂效用的遗传因子存在于染色体或染色体外, 也可能与例如质粒、整合子、基因盒或者转座子这些可动遗传因子有关联, 从而能使耐药性菌株水平和垂直转移为先前

的易感菌株。从 HHRA 的角度来看, ARB 在水源和饮用水中的出现 (De BOECK 等, 2012; Isozumi 等, 2012; Shi 等, 2013) 进一步凸显了将这些新出现的环境风险纳入长远考量的必要性。然而, 评估环境对抗生素耐药性的影响范围十分复杂, 不仅是由于缺乏定量数据, 也由于需要各环境风险及人畜健康管理部门的协调工作。

环境中 ARB 产生的一个关键问题是耐药基因的出现可能是自然现象 (D'Costa 等, 2011)。另外, 在农作物、动物和人类中使用的抗菌剂使抗生素不断涌入到环境中, 还可能伴随着新的基因和 ARB。在土地施用抗生素饲料的食用动物排出的排泄物或经污水处理流入地表水的废物后, 抗生素及耐药基因的归趋、迁移和长期存在强调了需要更好地理解遗传选择和基因获取的环境机制以及耐药基因 (耐药基因组) 及其细菌宿主的动态 (Chee-Sanford 等, 2009; Crtryn, 2013)。例如, 在世界某些地方的制药厂废水 (Fick 等, 2009)、集约化容纳动物排泄物的池塘 (Barkovskii 等, 2012)、养殖水体 (Shah 等, 2012) 和排污口 (Dolejska 等, 2012) 中出现抗生素残留是导致地表水中出现 ARG 的重要来源。特别是制药厂的流出水中发现抗生素浓度相对较高与地表水中的 ARG 增长有关 (Kristiansson 等, 2011; Li 等, 2009, 2010)。最近在一组不同的临床病原体 and 常见的土壤细菌 (Forsberg 等, 2012) 中发现序列同源性为 100%, 这表明在 eARB 和 pARB 之间存在潜在的环境 HGT。

尽管存在这些问题, 但很少有针对环境中的抗生素、ARG 和 ARB 对人类和动物健康的综合影响进行的风险评估 (Keen 和 Montforts, 2012)。最近的流行病学研究对饮用水中的 ARB 和同住成员共生的大肠杆菌的易感性进行评估。例如 Coleman 等 (2012) 报道, 水及其他与当地环境不直接相关的因素导致耐药大肠杆菌在人体内出现。在许多研究中, 饮用水系统中的

原生细菌已经显示出 ARG 蓄积 (Vaz-Moreira 等, 2011)。

除了解决抗生素耐药性产生所带来的环境风险, 我们也应该考虑低概率、高影响的“一次性事件”类型的风险。这种极为罕见的事件会导致一个新的(对临床重要细菌而言)耐药基因从一个无害的环境细菌转移到病原体, 如果人类是新 pARB 的受体, 那么就会一击即中。不同于 SARS(重症急性呼吸综合征)及类似病毒的出现, 这些事件的风险因素在事后已得到充分认识 (Swift 等, 2007), “一次性事件”可能发生在一系列“正常的”栖息地。一旦产生成熟, 耐药细菌/基因就有可能因我们使用抗生素而在世界各地发生人际传播[如 NDM-1(新德里金属- β -内酰胺酶 1)的耐药性传播 (Wilson 和 Chen, 2012)]。虽然似乎很难计算这样一个罕见事件发生的概率(包括评估在何时何地发生的概率), 但尝试找出风险因素具有相当大的价值(例如指出 HGT 发生的关键环境或识别可以引起选择压力并从而增加特定基因丰度的药物暴露水平)。在经历重要的 HGT 事件之后, 我们的 HHRA 可能会成为一个更加定量的方法。

本次研讨会(环境中的抗菌剂耐药性: 评估和管理人类活动的影响)的总体目标是确定环境中 ARB 的重要性, 识别其中一些复杂问题, 以确定研究的空白领域, 并提供各种 ARB 问题的科学报告。许多国际代表, 包括学者、政府监管部门、行业成员和临床医生, 就一系列问题进行了讨论。本文就改善我们对人类健康风险认知的讨论内容以及流行病学研究进行综述, 通过制定 HHRA 来研究潜在风险并为风险管理提供信息。因为评估的最终目标取决于评估背景(例如研究、法规), 我们提供了一个通用的方法来开展环境 ARB 的 HHRA, 这个方法适用于用户感兴趣的评估对象(参见图 1)。鉴于存在许多不确定性, 我们也重点关注当前研究的空白领域。

2 对环境 ARB 风险评估的总体考虑

了解其他正在进行的相关国际活动和使用的抗生素种类, 为制定 ARB 的风险评估框架提供了良好的起点。国际食品法典委员会 (2011) 描述了食源性抗菌素耐药性风险分析的八项原则, 其中几项普遍适用于环境 ARB 的 HHRA。举例而言, FAQ、WHO 和 OIE(世界动物卫生组织)联合举行的临床重要抗菌剂专家会议(联合国粮食及农业组织/世界卫生组织/世界动物卫生组织 2008)以及 WHO 抗菌剂耐药性综合监测咨询小组 (WHO, 2012b), 都为人类风险评估的优先级抗生素设置提供了信息。应当指出, 在抗生素的使用、耐药模式以及人体暴露途径中存在显著的国家/地区差异。

一般情况下, 是通过识别风险和确定管理目标来制定风险评估框架的, 所以该评估应为可行管理方式提供信息, 并对管理是否成功予以评价。此次研讨会与会者的共识是, 在抗生素的生产和使用、农业作业包括水产养殖、以及污水处理厂中, 管理措施可发挥最大作用 (Pruden 等, 2013)。为评估整体风险而忽略对该系统各部分相对重要性的认识, 将会阻碍对管理该系统某个特定部分所产生的相对影响的评估。正如最近 WHO 所述 (2013): “AMR 是一个复杂的问题, 由许多相互关联的因素推动形成, 单一和孤立的干预措施几乎没有作用, 需要各方的协调行动。”因此, 对于旨在促进风险管理的环境抗生素耐

药性风险评估, 可以从一个理论上的风险评估途径入手, 这种风险评估基于 a) 在人类医学、作物生产、畜牧业和宠物方面的抗生素用量和种类的当地监测数据; b) 不同环境组成部分(特别是土壤和包括饮用水在内的水生系统)中有关 ARG 和 ARB 的信息; c) 相关疾病信息。这种风险评估应该在与利益相关者进行讨论后修订, 这需要广泛的风险沟通, 并可以形成一部分多准则决策分析 (MCDA) 方法(下文详述)。作为此次研讨会的成果之一, Pruden 等 (2013) 也建议通过有针对性的监测和监控措施将环境管理和缓解计划双管齐下, 从而判断干预措施的相对影响及成功与否。

实施一个成功有效的人类健康风险评估, 有些详细信息需要定量测量。因此, 关键在于如何利用实验或者建模的方法来得出估计值。此外, 危害的浓度、时间、与环境组成部分相关的方面也应考虑在内。

首先, 目前我们知道对于由非突变而产生抗生素耐药性的环境细菌(包括在宿主体外可以生长的病原体), 若想产生 eARB/pARB(图 1, 过程 1、2), 则必须在 ARG 存在的前提下长期保持选择压力(例如, 存在抗生素或抗生素耐药决定因子); 对于释放到环境中的 pARB, 能在环境介质中生存是关键因素。然而, 有关选择压力和 ARB 产生之间确切的机制和定量关系目前尚未明确, 并且可能会因抗生素和细菌种类以及所涉及的耐药机制而不同。如果消除选择压力, 那么抗生素耐药性 ARB 的丰度可能减少, 但不会消失 (Andersson 和 Hughes, 2010, 2011; Cottell 等, 2012)。即使只是在社区层面的小部分 ARB, 当选择压力重现的时候, 也可以成为 ARG 水平转移的储存库。由于似乎不能避免 ARB 最终对任何抗生素都产生耐药性 (Levy 和 Marshall, 2004), 所以管理的首要目标应是尽可能延缓和限制这样的产生。第二, 一个健全的定量风险评估需要描述相关环境组成部分中不同 eARB 菌株减少和 pARB 菌株增加的组合的 HGT 率和/或基因突变率(图 1, 过程 3~5)。缺乏 ARG 突变/HGT 的定量评估资料是一大数据缺口。第三, 传统微生物风险评估中的剂量-反应方法(图 1, 过程 6、8)可用于确定感染的可能性[国际食品法典委员会, 2011; 美国 EPA 和美国农业部食品安全检验署 (USDA/FSIS), 2012], 但除了 HGT 和 ARB 选择, 需要解决的新问题是 eARB(在人体内或人体外存在敏感病原体的情况下)的剂量-效应关系(图 1, 过程 3、6)。值得注意的是, 与某些地区进行的传统 HHRA 的关键区别在于, 该评估必须包括环境中的过程, 才能全面评估抗生素耐药性相关的人类风险。

因此, 以人类健康为导向的环境 ARB 风险评估中应记录的信息类型包括[改编自国际食品法典委员会 (2011)]:

- 抗生素、ARB 及其决定因子的临床和环境监测项目重点关注报告在人类医学、作物、畜牧业、宠物以及全球作物和食用动物生产地区的抗生素用量和种类的区域数据;
- ARB 相关的暴发和散发病例的流行病学调查, 包括对于 ARB 感染的发生、频率和严重程度的临床研究;
- 对选择压力(选择/共选择剂的时间和剂量)的识别, 用于选择不同环境中的耐药性及随后 HGT 至与人体相关的细菌, 两者均基于之前确认的热点区域中环境细菌的 HGT 频率和

ARG 摄取, 包括在环境病原体;

- 确定抗生素使用和耐药性之间联系的人体、实验室、和/或现场动物/农作物实验(特别是区域数据);
- 有关 ARB 的特征及其决定因子(异位和原位)的调查;
- 有关 ARB 耐药性、毒性、和/或生态适合度(如, 生存能力或适应性)之间联系的研究;
- 有关水和土壤中抗生素残留的环境归趋及其在任何特定环境组成部分、动物或人类宿主中选择导致 pARB 的 ARB 生物利用度的研究;
- 现有的 ARB 和相关病原体的风险评估。

总之, 针对环境 ARB 的人体健康风险评估需要许多数据, 而这当中很多数据可能极其有限(尤其是定量评估)。因此, 最终的风险评估报告应该强调各个研究结论的证据链和证据权重的重要性。此外, 模型建立后, 先前未使用的数据集应该尽可能用于模型验证。

3 传统风险评估方法的适用性

环境中抗生素的人类健康风险评估建立于传统的化学风险评估基础上(美国国家研究委员会 1983), 该两种风险评估方法均从根据耐药性数据确定的每日允许摄入量(ADI)着手(VICH 筹划委员会 2012)。相应的环境抗生素浓度测量可以根据最小选择浓度(MSC)(Gullberg 等, 2011)的概念制定, 定义为可以产生耐药性的抗生素的最低剂量。不同于传统的化学风险评估方法, 通过 MSC 方法可以确定由 ARB 导致的人类健康效应以及 ARB 的耐药决定因子, 包括由突变产生的耐药性(图 1, 过程 1、2)。在某种数据缺失的情况下, MSC 分析可以为风险评估人员提供选择基质中一种药物或多种混合物的选择浓度, 以此描述 ARB 产生的阈值。

病原体风险可以通过微生物风险评估(MRA)来评价, MRA 是一种结构化、系统化、以科学为基础的方法, 它建立在化学品风险评估模式之上; MRA 包括 a) 问题建立(描述危害、风险等级和途径), b) 危害(ARB、ARG)的暴露评估, c) 量化人类 pARB 感染和危害剂量之间关系的剂量-反应评估(图 1, 过程 6、7), d) 综合利用前述程序, 描述待评估病原体不同暴露途径的风险特征。MRA 用于定性或定量评估微生物危害的暴露水平及其人类健康风险。就微生物抗生素耐药性而言, 环境 MRA 尚处初始阶段, 但它可以用来确定耐药细菌和/或其决定因子。MRA 最初是用于确定食品和水中粪便病原体危害[ILSI(国际生命科学学会)1996], 最近经过修改后包括生物膜相关的环境病原体, 如嗜肺军团菌(Schoen 和 Ashbolt, 2011)。有些人类病原体可以在环境中生长(并可能成为 pARB; 图 1, 过程 1、2), 且很多只会感染缺乏免疫力的个体(通常称为条件致病菌)。

在过去的 20 年中, MRA 在很大程度上受到国际食品安全组织的影响, 目前是一种公认和广为接受的食物安全风险分析方法。1999 年, 国际食品法典委员会采用了微生物风险评估的原则和指南(CAC/GL-30)(国际食品法典委员会, 2009)。最新的国际食品法典委员会食源性抗生素耐药性风险分析指南包括八项原则(国际食品法典委员会, 2011), 而美国的食物

和水 MRA 指南(美国 EPA 和 USDA/FSIS, 2012)继续使用四步框架(最初用于化学品风险评估)。近年来已发布和综述了若干 ARB 风险评估(Geenen 等, 2010; McEwen, 2012; Snary 等, 2004)。但是几乎所有此类研究均集中在食源性传播; 对通过各种环境途径或者 ARG 直接接触导致的 ARB 传播缺少人类健康风险评估。

例如, Geenen 等(2010)研究了超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)产生的细菌, 并确定了以下风险因素: 曾住院、使用抗菌药物、前往高流行国家以及有 ESBL 阳性的家庭成员。虽然作者总结认为环境风险评估有益于解决 ESBL 产生的细菌的问题, 但并未进行风险评估。

3.1 危害识别和危害特征描述

遗憾的是, 我们没有 ARG 摄取及其人类健康影响之间定量关系的数据(图 1, 过程 3、6)。但是我们有不同环境组成部分中的 ARGs 的数据, 并且数据质量也在不断提高(Allen 等, 2009; Cummings 等, 2011; Ham 等, 2012), 尤其是土壤中临床相关的耐药基因(Forsberg 等, 2012)(图 1, 过程 1)。导致 ARB 危害产生的前驱因素包括 ARG 以及伴随着基因突变(Gillings 和 Stokes, 2012)出现的调动这些基因、抗生素和共选择剂的机制(Qiu 等, 2012; Taylor 等, 2011)。由于受体细菌不同, 这些过程产生 eARB 或者 pARB(图 1, 过程 1、2)。

对于各环境组成部分的众多参数, 我们缺乏综合数据, 如 a) 由抗生素或者其他共选择剂产生的抗生素耐药性; b) 在自然环境组成部分的细菌中 ARG(耐药基因组)及获取要素(如整合子)的流动; c) 某环境组成部分中水平或垂直基因转移率的可能范围。然而, 其中重要的因素是涉及抗生素、ARG 和 ARB 排放到环境组成部分并在其中扩增的潜在途径的范围, 如植物根际、非根际土壤、混合肥料、生物被膜、污水处理池、河流、沉积物、水产养殖、植物、鸟类和野生动物。

对于抗生素, 一般情况下, 需要以下信息来描述危险特征: a) 当地重点关注的抗生素类名单, b) 已知的环境归趋, 和 c) 可能的积聚之地, 特别是某些环境组成部分(例如, 植物根际、一般土壤、混合肥料、生物被膜、污水处理池、河流、沉积物、水产养殖、植物、鸟类、野生动物、农畜或宠物)。ARB 的选择(图 1, 过程 2)将取决于选择/共选择剂的类型和原位生物可利用度、细菌宿主的丰度和 AR 决定因子的丰度。

ARB 的选择由相关细菌群落中细菌的营养状况进一步调节, 因为高代谢活性和高细胞密度可以促进细菌群落的演替和 HGT(Brandt 等, 2009; Sørensen 等, 2005)。与此相比, 虽然抗生素和 ARB 可被共同转运(Chen 等, 2013), 但 HGT 相对独立于抗生素, 应激细菌的 HGT 率将增高。例如, 在某些抗生素存在的情况下, 通过细菌 SOS 反应(DNA 修复过程)整合酶表达将上调(增加)(Guerin 等, 2009)。

虽然缺乏描述环境中 pARB 产生的定量数据, 但有充分的证据说明, 在某种抗生素、ARG(如在耐金属质粒中)、和/或碳利用基因(Knapp 等, 2011; Laverde Gomez 等, 2011)存在情况下, 或如消毒剂/纳米材料的体外试验所示(Qiu 等, 2012; Soumet 等, 2012), 抗生素敏感性病原体引起共摄取。

生物的空间分布(接近的机会)也可能影响基因转移, 这

可由固有斑块、土壤结构、存在基质等导致。考虑到不同基因转移率,有可能存在基因转移的热点区域;例如,有证据表明在受粪便污染土壤的细菌中(Forsberg 等, 2012)和富含有机质的植物根际中临床相关的耐药基因会发生 HGT(Pontioli 等, 2009)。另外, eARB 随后增殖的选择压力可能在这些环境热点区域中更高(Brandt 等, 2009; Li 等, 2013)。因此,在风险评估的问题建立和危害特征描述阶段及通过采样来确定原位交换率时,识别高活性的可能区域十分重要。作为人类活动影响的标志物,1 类整合子具有预测可动耐药基因组的能力,因为它具有整合传递多种抗生素和杀菌剂耐药性的基因盒的能力(Gaze 等, 2011)。在半原始土壤的发生率比在受影响土壤和沉积物中可能低两个或三个数量级(分别为 0.001% 与 1%)(Gaze 等, 2011; Zhu 等, 2013)。

除了 eARB 危害的巨大差异,有几种病原体可以用微生物风险评估来评价:a)以空肠弯曲菌、肠道沙门氏菌或各种致病性大肠杆菌为代表的食源性和水源性粪便病原体;b)环境病原体,如以嗜肺军团菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌为代表的存在于呼吸道、皮肤或者伤口的病原体。众所周知这些粪便和环境中的病原体能够获得 ARG;因此,如果有进一步的环境中 HGT 率数据,它们就可以作为微生物风险评估中的参照病原体。但是,风险评估中更大的问题——目前也正局限于此——是不同环境组成部分或人类/动物宿主体内,原有细菌将耐药性转移至这些病原体的比率(图 1, 过程 3~5)。通过建模和实验得出的这些环境问题的相关信息将在下文的“环境暴露评估”部分讨论。Hunter 等总结了人体胃肠道内的 HGT 数据(2008)。

3.2 剂量-反应关系

要正确表征人类的风险,典型的方法是选择有剂量-反应健康数据(无论是确定或推测)的危害因素,供参照的肠道致病菌(如空肠弯曲菌、沙门氏菌、大肠杆菌)(Schoen 和 Ashbolt, 2010)同样也应具有这些数据,但这些剂量-反应健康数据还需要被量化才能分析皮肤/伤口的参考病原体(Mena 和 Gerba, 2009; Rose 和 Haas, 1999)。然而,如上文流程 1~5(图 1)所述,对于 ARB 而言,一个重要区别是需要说明与 ARB 产生的选择性环境压力相关联的现象,及其最终形成的人类 eARB 或 pARB 感染剂量。确切机制和剂量-反应关系仍有待阐明,并且可能随细菌种类以及所涉及的耐药机制而变化。然而,免疫力正常的 pARB 暴露人群符合已公布的无抗生素耐药性的同种病原体菌株的剂量-反应/感染关系,这是合理的(例如,来自健康成人的“喂养”试验或来自暴发期间调查收集的信息)。而对于描述条件感染致病的可能性及已经出现免疫力低下的人群(如正接受抗生素治疗),剂量-反应模型却表现出局限性。尽管有确切的数据表明, pARB 相比其抗菌易感等效物具有更强致病能力或可引发更严重的疾病(Barza, 2002; Helms 等, 2004, 2005; Travers 和 Barza, 2002),但事实并非一直如此(Evans 等, 2009; Wassenaar 等, 2007)。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐第三代头孢菌素大肠杆菌(G3CREC)相关的血流感染引发超额死亡就是一个很好的例子。2007 年,在参与调查的欧洲国家中,27 711 例 MRSA 与 5503 例超额死亡和

255 683 天额外住院天数有关,而 15 183 例 G3CREC 血流感染与 2 712 例超额死亡和 120 065 天额外住院天数有关(de Kraker 等, 2011)。作者预测,到 2015 年 MRSA 和 G3CREC 耐药性产生的综合负担可能导致 3.3/10 万的相关死亡率。然而,对于世界上许多地区而言,这一预测是难以接受的。

MRA 的最后一个步骤是风险特征描述,即综合危害识别、危害特征描述、剂量反应和暴露评估的结果,从而最终形成对风险的总体估计。此估计可在多种风险测量中使用,如个体或群体风险,也可以是基于特定危险因素暴露的年度风险评估。根据风险评估的目的,风险特征描述也包括在风险评估中使用的关键科学假设、多变性和不确定性的来源以及对风险管理方案的科学评价。

4 环境暴露评估

根据我们对 ARB 的 HHRA 这一重要过程的理解,图 1 中大部分与 ARB 生长有关的要素(过程 1, 2 和 4)已在上文的“危害识别和危害特征”中进行阐释。这里我们将重点描述 ARB 的重要环境组成部分和人类暴露情况(过程 3 和 6)。环境因子(如抗生素)和 ARB 的浓度,及其至人体摄取点的归趋和迁移,对于暴露评估非常关键。就一项特定的 ARB 人体健康风险评估而言,根据在问题形成和危害特征描述阶段确定的抗生素/耐药药决定因子,选择/扩展各传播路径(即识别与人接触的关键环境组成部分)非常重要。

可能受影响的环境组成部分包括容纳动物粪便或生物固体的土壤、堆肥、氧化池、河流以及容纳废水的沉积物(Chen 等, 2013)。Pruden 等(2013)指出,对于包括 eARB 和 pARB 等污染物而言,更传统的人类暴露途径是饮用水、被污水和/或抗生素生产废水污染的娱乐和灌溉用水、食物以及受农场建筑和动物粪便影响的空气。生物膜中原位繁殖的 ARB(Boehm 等, 2009),以及保护、运送 ARB(Abraham, 2010)进入和存在于饮用水中(Schwartz 等 2003; Silva 等 2008)的非寄生原生动物这两方面的研究,存在重要的空白。其中,后一条路径对于医院饮用水系统尤其构成威胁,因为暴露人群相对易感。此外,随着国家雨水收集利用和暴露的增多,大气中的 ARB 沉降物也可能在家庭体系中“生根”(Kaushik 等, 2012)。

在确定环境中抗生素和病原菌的浓度以及每个环境组成部分中 ARB 水平和 ARB 产生速率后,就可用一系列归趋和迁移模型来估计与人接触时抗生素、病原体、ARB 和 ARG 的数量(图 1, 过程 3 和 6)。这种模型主要建立在流体动力学基础上,用病原体特异性参数来计算土壤及水环境中可能的灭活/摄取,例如阳光灭活(Bradford 等, 2013; Cho 等, 2012; Ferguson 等, 2010)。归趋和迁移模型的一个关键方面是考虑到任何体系组成部分的内在多样性。此外,该模型也应考虑我们对于评估模型参数值的不确定性,例如在运用贝叶斯合成法时就要考虑这一点(Albert 等, 2008; Williams 等, 2011)。为了更好地解释参数的不确定性,越来越多的新模型纳入贝叶斯学习算法,运用气象、水文和微生物的解释变量整合信息(Dotto 等, 2012; Motamarri 和 Boccelli, 2012)。总体而言,这些模型也有助于确定缓解 ARB 和抗生素暴露的干预介入点,且在任何风

险评估中都是描述人类暴露危害路径的重要工具。

5 MCDA 和风险排序法

考虑到环境中 ARB 风险暴露路径的复杂性和不同暴露路径中一些节点输入数据的巨大不确定性,其结果必然不易于决策者进行解读,甚或适得其反。因此,在考虑决策分析方法时,有必要区分风险优先次序、指导资源配置和数据收集、并促进决策制定。尽管在微生物风险评估的大范围中,有很多排序方法、权重用途、选择标准(Cooper 等, 2008; Pires 和 Hald, 2010)以及失效模型和效果分析(Pillay 和 Wang, 2003),但是包括贝叶斯算法在内的众多 MCDA 方法可以综合运用(Lienert 等, 2011; Ludwig 等, 2013; Ruzante 等 2010)。

当决策中需要考虑多种因素时,诸如 MCDA 等方法能为决策选择提供结构框架。MCDA 是一个好工具,虽然它很依赖于专家的观点,但可用它评估和记录风险排序中不同因素的重要性(Lienert 等, 2011)。MRA 评估中,MCDA 被用于食源性微生物风险的排序,这种排序考虑到公共卫生、市场影响、消费者的认知和接受度及社会敏感度等多方面因素(Fazil 等, 2008)。MCDA 也可用于干预方式排序和选择,以减少病原体暴露(Fail 等, 2008)。也有关于 MCDA 应用于治理生态毒理风险的案例报道(Linkov 等, 2006; Semenzin, 2008),并提供了有效的 MCDA 方法。例如,对于被抗生素、ARG 和 ARG 决定因子高度污染的栖息地(上文所述 HGT 和 ARB 产生的潜在热点区域),可以使用 MCDA 评估和排序其相对风险。MCDA 可用于评估不同来源的共选择剂(如清洁剂、杀虫剂、金属、纳米材料)对环境中总的 ARB 风险所产生的相对影响。而且,根据相关影响因素制定的标准,MCDA 可对一系列影响环境的抗生素进行风险排序(例如,遗传因子中耐药决定因子的移动,不同环境组成部分中的抗生素耐药性转移率,环境组成部分中抗生素的累积水平,环境归趋及至暴露点的迁移)。在 MCDA 过程中,识别低概率、高影响的“一次性事件”类型的风险也很重要。

MCDA 依赖专家观点(这一直被认为是这种方法不足之处),因此,为避免主观打分造成的偏倚和错误,需要进行结构完善、公众认可的启发式实践。与之相比,MCDA 技术的一大优点是能在一个专家组中对于相关标准及其在决策中的权重达成一致的意见。

6 影响抗生素耐药性 HHRA 进程的重大研究空白

此处存在若干研究空白有待填补。尤其要注意的是受污染的栖息地(热点区域),在这些地方抗生素、共选择剂、可动遗传因子上携带耐药决定因子的细菌和对细菌生长及活动有利的条件——所有有利于 HGT 的条件——会同时大量出现。然而,由于目前数据有限,研讨会参与者评估了其他路径和可能的实验方法来填补与图 1 流程相关的 HHRA 数据空白。

6.1 确定 MSC 的试验(过程 1、2 和 4)

对于不同的抗生素和环境条件,可以通过试验来确定 MSC(Gullberg 等, 2011)。例如,在沙土、粘土、不同沉淀物和不同水体中,可以建立实验并进行验证,具体是将模式生物的一对相同基因植入选择基质并经选择剂充分稀释。亚抑菌浓度时的

选择和环境基质的试验建立是需要关注的主要研究内容。然而,在解读异位研究并外推至原位环境条件时,以及在处理环境中定义不明的混合危害时,需要对整体予以关注。

6.2 识别环境热点区域的试验(过程 1、2 和 4)

热点区域是指 HGT 和抗生素耐药性的水平较高地区,可能包括受制药厂流出水、水产养殖业或污水排放影响的水体环境以及受生物固体或动物粪便沉积物影响的陆地环境。在风险评估中也应考虑到抗生素耐药性的持久程度(如,在没有环境选择压力下耐药性消失的比率),它依赖于耐药性的适合度代价。然而,在复杂和多样的环境中是难以评估适合度代价的。而且,还没有研制出标准方法评估复杂微生物群落中的环境选择压力,但有一些实验方法可能可行,这在其他文献也有论述(Berg 等, 2010; Brandt 等, 2009)。

Berg 等(2010)和 Brandt 等(2009)确定的方法可以在实验室应用(评估已知化合物/混合物的效能),或在现场评估可疑环境(例如存在未知的化学混合物)是否是热点区域。因而,界定“关键暴露水平”是 HHRA 的关键,有助于管理工作。它取决于地点,在环境组成部分之间和同一环境组成部分之内都可能不同。

6.3 筛选新的耐药决定因子(减少过程 2)

筛选程序可在新抗生素产生周期的早期启用,以确保现有的耐药决定因子不会在环境组成部分中流行。将标记的受体菌株植入环境基质[如,泥土、生物固体或粪污(清洁基质为阴性对照)],经过培养,再与一种选择性抗生素一起植入含有所研究化合物的介质,使标记的受体菌株恢复耐药性。由此,质粒,即受体的完整基因组,就能在小的插入表达载体中克隆,转化到大肠杆菌或其他宿主,并植回含有所研究化合物的介质。用这种方法可以识别新的耐药决定因子。

另外,功能宏基因组学也可以识别宏基因组 DNA 中的新耐药决定因子(Allen 等, 2009)。简而言之,从环境样本中提取 DNA,克隆入表达载体,并转化入细菌宿主,如大肠杆菌。然后,就可以在所研究的化合物中筛选出转化株,耐药基因也能通过转座子突变技术和序列测定及生物信息学分析得以识别。这样,就可以检测出那些由非质粒产生、但可以转移至其他病原体的新耐药决定因子。

6.4 剂量-反应数据的需求(过程 3、5 和 6)

我们过去没有意识到剂量-反应数据反映了 ARG 组合和受体之间的关系,之前一直以为是易感病原体剂量与人类或动物疾病之间的关系(图 1,过程 3 和 5)。与之相比,当人们暴露于 eARB 时,很多例子都表现出患病率和死亡率增加,如上文“剂量-反应关系”部分所述。因此,目前已经发表的非耐药性病原体的剂量-反应模型(Haas 等, 1999)可能不适用于感染终点之后的情况,需要针对不同人类生命阶段的其他剂量-反应模型来协助 pARB 的风险评估。由 pARB 感染而导致的次生疾病终点(后遗症)的剂量-反应信息也需要完善。

考虑到抗生素浓度和暴露时间导致人体内 pARB 的选择(同时摄取 eARB 和敏感病原体),安全性也可以建立于研究中某种特定抗生素的有效浓度之上。换言之,对采用特定抗生素治疗中病原体的抗生素-反应发生的变化进行进一步研究

之前,通过合理使用不确定系数,可以从急性或平均每日抗生素摄入推断筛选值来确定是否需要采取进一步措施。另外,现存的抗生素耐药性菌株(如 NDM-1)克隆菌株的流行病学数据可以为剂量-反应和暴露评估提供有用的数据。

6.5 风险排序方案(总体 HHRA)

在没有充分的定量数据来进行 HHRA 时,可以运用和建立基于暴露评估模型的风险排序方法,为数据生成(这也是 ARB 的 HHRA 的一部分)的资源配置奠定基础。Evers 等(2008)在食品安全的评估中就展示了这样的一种方法,他们主要评估了荷兰空肠弯曲菌的来源和传播途径对每人日暴露的影响。该研究共包括 31 种直接接触动物和消化食物与水的传播途径,最后得出了其中最重要的暴露来源的排序。尽管他们的研究专注于食源性的传播途径,且没有研究抗生素耐药性弯曲杆菌的菌株,但是可以通过 Evers 等(2008)描述的环境暴露途径,运用相似的方法来估计人类的 ARB 暴露。这需要 ARG 和 ARB 流行状况的数据,在风险评估中也要考虑所有暴露路径中的抗生素水平。尽管这种方法目前还不可行,但是将来可以完善一些选定的病原体-基因组的环境数据。

如同 Albert 等(2008)研究食物中弯曲杆菌时所述,有一种汲取专家和其他利益相关者知识的替代方法是在专业知识的基础上产生贝叶斯网络,并把它们转化为可用数据。

7 结论

因为我们面对的是一个国际性的问题,并且许多行政辖区都会采取预防措施,因此在抗生素耐药性问题恶化之前,有许多风险管理方法现在就可以实施,这与研讨会得出的相关风险

管理报告中所述一致(Pruden 等, 2013)。此外,许多现有的风险管理计划从管理的角度着手,并根据需要形成定量评估,从而改善风险管理措施,比如 WHO 水安全计划(WHO, 2009)。我们建议抗生素耐药性产生的环境因素被纳入所有有关 ARB 的 HHRA 的过程中。一般来说, MRA 适合于由抗生素、ARG 和 ARG 的环境排放构成的环境对人类健康的风险;但是目前要实现这一目标还缺少太多数据。这种类型的方法若要进一步产生,需要从以往的流行病学研究中挖掘数据,以帮助模型的建立、参数化和验证以及新信息的收集,尤其是有关各种热点环境中的 ARB 产生的条件和比率以及本文所述的各种未知的人类健康剂量-反应关系。在短期内,可以提供初步风险评估的方案很可能是基于 MCDA 方法,而贝叶斯网络模型有助于方案的形成。一旦这些 MRA 模型得到更多的认可,它们会有利于情景测试,从而确定哪些控制点可以最有效地降低风险,以及哪些由风险驱动的属性应在新抗生素的开发过程中重点考虑并使剂量降到最低。

翻译: 王晓宇、张伊人、操仪; 审校: 金泰虞

参考文献(略)

本文原文刊登于 EHP 杂志,需要者务请引用英文原文,详见: ASHBOLT NJ, AMÉZQUITA A, BACKHAUS T, et al. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. Environ Health Perspect, 2013, 121(9): 993-1001.

本文原文及参考文献请浏览 <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1206316>

(编辑: 汪源; 校对: 徐新春)

【精彩预告】

上海不同功能区细颗粒物对大鼠肺部炎症指标影响的比较实验

马琼锦, 东春阳, 杨凌, 李莉珊, 田振永, 蒋蓉芳, 赵金镬, 宋伟民, 许慧慧

为利用动物实验比较上海不同功能区各个季节细颗粒物($PM_{2.5}$)对大鼠肺部炎症的影响。研究人员分别采集上海宝山区、徐汇区四个季节 $PM_{2.5}$ 。每个地区每个季节 $PM_{2.5}$ 设低、中、高剂量组(分别为 1.6、8.0、40.0 mg/kg 体重),另设生理盐水对照组,每组 6 只。采用气管滴注的方式进行染毒,连续染毒 3 天。最后一次气管滴注 24h 后,收集肺泡灌洗液(BALF)进行细胞计数,测定 BALF 中总蛋白(TP)、乳酸脱氢酶(LDH)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的变化。BALF 中各指标呈现剂量效应增加的趋势。地区比较显示,宝山 $PM_{2.5}$ 对上述这些指标的影响在高剂量组均显著强于徐汇 $PM_{2.5}$ ($P < 0.05$)。季节比较显示,宝山高剂量组 LDH、IL-6 的含量春季明显大于夏、秋两季 ($P < 0.05$),冬季明显大于秋季 ($P < 0.05$),而在徐汇高剂量组秋季明显低于其他季节 ($P < 0.05$)。TNF- α 含量在宝山中、高剂量组春季明显高于秋季 ($P < 0.05$),而在徐汇高剂量组春、冬两季明显高于夏、秋两季 ($P < 0.05$)。在高剂量组宝山和徐汇春季 $PM_{2.5}$ 致细胞总数(cell number)增加,显著高于秋季 ($P < 0.05$)。宝山钢铁工业区 $PM_{2.5}$ 对大鼠肺部炎症损伤强于徐汇交通繁忙区 $PM_{2.5}$,并存在一定的季节差异性。

此文将于近期刊出。敬请关注!