

鲍曼不动杆菌对替加环素的耐药性及其稳定性研究*

曲俊彦, 吕晓菊[△]

四川大学华西医院 感染性疾病中心(成都 610041)

【摘要】 目的 了解长期抗菌药物压力及常用紫外线消毒对鲍曼不动杆菌耐药性的影响及替加环素(TGC)耐药鲍曼不动杆菌耐药性在群体中存续的能力。方法 选取临床分离 TGC 敏感鲍曼不动杆菌 3 株,分别采用多步法及紫外线照射体外诱导耐药,微量肉汤稀释法检测诱导前后鲍曼不动杆菌对 TGC 的最低抑菌浓度(MIC)变化。选取临床分离 TGC 耐药鲍曼不动杆菌 2 株,在空白 MHA 平板中反复传代,测定其 MIC 值。最后选取 TGC 敏感株及 TGC 诱导同源耐药株进行 TGC 耐药株适应度代价研究。结果 应用多步法成功诱导出 TGC 耐药株;紫外线照射虽然对 TGC 耐药性未发生影响,但其 MIC 值有上升趋势。TGC 耐药鲍曼不动杆菌传代 40 代后菌株 MIC 值无明显变化。TGC 敏感株及 TGC 诱导同源耐药株进行相同条件下培养,体外单独培养时耐药株达到对数生长期及平台期的时间均较敏感株长;混合培养时,随着连续传代,耐药株菌落数量较敏感株迅速减少,甚至耐药株被清除。结论 TGC 可诱导鲍曼不动杆菌产生获得性耐药。鲍曼不动杆菌对 TGC 的耐药可能具有遗传稳定性。TGC 耐药株较敏感株适应性下降。

【关键词】 鲍曼不动杆菌 替加环素 诱导耐药 适应度代价

Resistance of *Acinetobacter baumannii* to Tigecycline QU Jun-yan, LÜ Xiao-ju[△]. Center of Infectious Disease, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: lvxj3369@163.com

【Abstract】 Objective To determine the impact of long-term use of antibiotics and ultraviolet radiation on the resistance of *Acinetobacter baumannii* to tigecycline and the viability of tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Methods** Three strains of tigecycline sensitive *Acinetobacter baumannii* were selected. Tigecycline resistance was induced through multi-step method or by ultraviolet radiation. Two strains of tigecycline resistant *Acinetobacter baumannii* were repeatedly passaged on blank MHA plates, for the purpose of determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of tigecycline using broth microdilution method. The tigecycline sensitive (b38) and homologous resistant *Acinetobacter baumannii* (b38') were cultured separately and conjointly to evaluate its fitness costs of tigecycline resistance. **Results** Tigecycline resistant strains were successfully induced using multi-step method. Ultraviolet radiation did not change the sensitivity of the three strains to tigecycline, but elevated the MICs of tigecycline. The MICs of tigecycline did not change over 40 generations. It took much more time for the resistant strains to reach logarithmic growth phase and plateau phase compared with the tigecycline sensitive strains. With repeated passage, the tigecycline resistant strains decreased rapidly, even vanished in conjointly culture. **Conclusion** *Acinetobacter baumannii* can acquire tigecycline resistance. The resistance may have genetic stability. The resistant strains have less adaptability than the sensitive strains.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii* Tigecycline Inducible resistance Fitness cost

鲍曼不动杆菌是院内感染的重要条件致病菌,具有强大的获得耐药性和克隆传播的能力,多重耐药(MDR)、泛耐药(XDR)鲍曼不动杆菌呈世界性流行^[1],在免疫功能低下患者中可引起严重致死性感染。虽然替加环素(TGC)对不动杆菌感染疗效有限^[2],但除多黏菌素外,TGC 仍是目前治疗 MDR/XDR 鲍曼不动杆菌感染的“重要选择”。

本研究选取鲍曼不动杆菌临床分离株进行体外

诱导耐药,了解临床抗菌药物压力及紫外线消毒对鲍曼不动杆菌耐药性的影响;选取临床分离 TGC 耐药鲍曼不动杆菌在空白 MHA 平板中反复传代,了解去除选择压力后,鲍曼不动杆菌对 TGC 敏感性的变化;并对 TGC 耐药株进行适应度代价研究,了解 TGC 耐药鲍曼不动杆菌在群体中存续的能力,为 TGC 临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

临床分离 3 株鲍曼不动杆菌及质控菌株大肠埃

* 科技部国家科技支撑计划课题(No. 2012EP001000)资助

[△] 通信作者, E-mail: lvxj3369@163.com

希菌(ATCC 25922)均来源于四川大学华西医院感染性疾病中心抗感染药物研究室。

1.2 仪器与试剂

细菌比浊仪(法国梅里埃公司);隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司,GNP-9270 型);紫外灯(佛山电器照明股份有限公司,MW1-Y15 型);紫外分光光度计(英国 GE healthcare, ULTROSPEC 3100 pro);振荡培养箱(北京东联哈尔仪器制造有限公司,HZQ-F160)等。MHA 购自英国 Oxoid 公司;MHB II 购自美国 BD 公司;TGC 临床品购自美国惠氏公司。

1.3 抗菌药物最低抑菌浓度(MIC)测定

采用微量肉汤稀释法测定鲍曼不动杆菌对 TGC 的 MIC,严格按照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)的操作方法进行,每个菌株做 3 个复孔。由于美国 CLSI、美国食品药品监督管理局(FDA)及英国抗微生物化疗学会(BSAC)等均无 TGC 对不动杆菌 MIC 值的判读标准,本研究采用 FDA 中 TGC 对肠杆菌科细菌体外敏感性判读标准执行^[3],根据所测得 MIC 值判读:敏感 ≤ 2 mg/L,中介 = 4 mg/L,耐药 ≥ 8 mg/L。

1.4 多步法诱导耐药试验

将 3 株 TGC 敏感鲍曼不动杆菌接种于 MHA 平板培养基,培养 18~24 h 后,取纯菌落制备成 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液,取 25 μ L 菌悬液接种于 5 mL 含 1/4 MIC TGC 的 MHB II 中,使其最终细菌接种量为 5×10^5 CFU/mL,35 $^{\circ}$ C 培养 24 h 为 1 代,连续培养 5 代。

取 24 h 的细菌培养物用 MHB II 稀释制备为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液,取 25 μ L 菌悬液接种于 5 mL 含 1/2 MIC TGC 的 MHB II 中,35 $^{\circ}$ C 下培养 24 h,连续培养 5 代。

重复如上步骤,通过连续转种培养,每个药物浓度培养 5 代,药物浓度自 1/4 MIC 开始,直至 64 mg/L。当细菌生长不良时可用同一浓度或降低浓度重复传代培养。接种相同菌量的实验菌于不含抗菌药物的 MHB II 中进行同期培养。对诱导出的菌株用微量肉汤稀释法测定 TGC 对其的 MIC 值。

1.5 紫外线照射诱导耐药性试验

将实验菌株接种于 MHA 平板,培养 18~24 h 后,取纯菌落制备 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液。

1.5.1 紫外线照射菌悬液浓度和时间的确定 正式照射前开启紫外灯预照射 10 min。分别取 10^7 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL 菌悬液

各 10 μ L 于 MHA 培养基上,L 形玻棒均匀涂布,置于超净工作台内 15 W 紫外线灭菌灯管下 40 cm 处(每个平板用锡箔纸覆盖一半避免紫外线照射,作为对照),分别照射 5 s、10 s、15 s、30 s、1 min、3 min、5 min、10 min 后,36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养,24 h 后取出。将培养后的平板取出进行菌落计数,与未接受紫外线照射的平板菌落数对比。涂布量细菌分布厚度适宜,且照射后宜于计数的菌悬液浓度确定为本次实验所用菌悬液的浓度;根据平板上菌落数,计算死亡率,死亡率达到 50%~80%的照射时间确定为本次实验紫外灯照射时间。

1.5.2 紫外线照射实验菌 正式照射前开启紫外灯预照射 10 min。分别取 2 株敏感株及 1 株耐药菌株菌悬液各 10 μ L 于 MHA 培养基上,玻棒均匀涂布,置于 15 W 紫外线灭菌灯管下 40 cm 处照射上一步实验确定的时间后,36 $^{\circ}$ C 培养,24 h 后取出,挑取生长良好的菌落,接种 MHA 平板传代后,再次制备成 0.5 麦氏单位的菌悬液,同样的方法涂布于 MHA 平板,依照上述方法进行第 2 次紫外线照射,培养后仍然传代、照射,依次共进行 20 代。

1.5.3 细菌耐药性监测 分别对经紫外线照射后的第 1、4、8、12、16、20 代细菌应用微量肉汤稀释法进行 TGC 敏感性试验。

1.6 耐药性消除试验

取 2 株 TGC 耐药鲍曼不动杆菌划线接种于空白 MHA 平板中,36 $^{\circ}$ C 培养,24 h 后取出,挑取生长良好的菌落再次划线接种于空白 MHA 平板中,依次传代约 40 代后,应用微量肉汤稀释法测定 TGC 对其的 MIC 值。

1.7 TGC 耐药株适应度代价研究

1.7.1 生长曲线绘制 方法参阅文献^[4],将 TGC 敏感菌株(b38)和 TGC 诱导同源耐药菌株(b38')划线接种于 MHA 平板,36 $^{\circ}$ C 培养 18~20 h 后,取单个菌落分别接种至 MHB II 中过夜培养达对数增长期,菌液取出稀释不同倍数后分别转至盛有 20 mL MHB II 的 50 mL 烧瓶中,菌液基线浓度为 1×10^5 CFU/mL。36 $^{\circ}$ C 振荡孵育 24 h,分别在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24 h 时取样(每个时间点取 3 个标本),紫外分光光度计测定细菌浓度光密度(OD)值(600 nm),绘制两株菌生长曲线。

1.7.2 竞争试验 方法参阅文献^[4],将 b38 和 b38'菌株划线接种于 MHA 平板,36 $^{\circ}$ C 培养 18~20 h 后,取单克隆分别接种至 MHB II 中过夜培养达对数增长期,两种细菌同时转种至含 10 mL 新鲜预

温的 MHB II 烧瓶中,起始浓度为 1×10^5 CFU/mL, 36°C 振荡孵育,每 12 h 为 1 个竞争循环,每个竞争循环后,取 10 mL 混合菌液转种至另一个含 10 mL 新鲜预温的 MHB II 烧瓶中,每 24 h 取一次样本,每次均取 3 个样本。所取菌液接种在无药及含 TGC ($8 \mu\text{g/mL}$) MHA 平板上, 36°C 培养 18~20 h 后取出,稀释至适宜稀释度涂布至 MHA 平板计数。含药平板的克隆数为 TGC 耐药株,敏感株的克隆数可通过无药平板及含药平板克隆数差异得出。

2 结果

2.1 TGC 诱导前后鲍曼不动杆菌耐药性的变化

3 株敏感鲍曼不动杆菌用不同浓度 TGC 进行多步法诱导培养,均成功诱导为耐药株,各菌株诱导后,TGC 对其 MIC 值均较前有明显升高。见表 1。

2.2 紫外线照射诱导性耐药性试验

2.2.1 紫外线照射菌悬液浓度及时间确定 不同

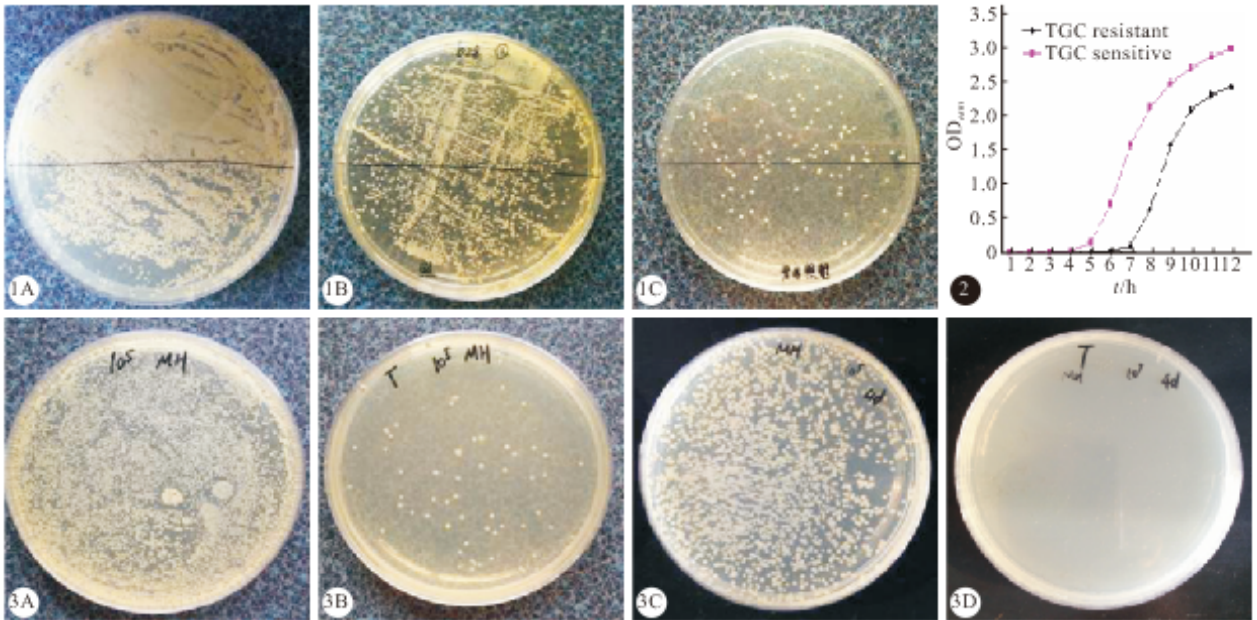


图 1 不同浓度菌悬液紫外线照射后的菌落分布

图 2 TGC 敏感株与耐药株生长曲线

图 3 无药(A和C)及含药(B和D,

$8 \mu\text{g/mL}$ TGC) MHA 平板上 TGC 敏感株与耐药株混合培养的细菌生长情况(A, B, 24 h; C, D, 72 h)

Fig 1 Changes of bacterial counts after ultraviolet exposure (A: 1×10^7 CFU/mL, 15 s; B: 1×10^6 CFU/mL, 15 s; C: 1×10^5 CFU/mL, 15 s. Upper: Non-ultraviolet-exposure; Below: Ultraviolet-exposure)

Fig 2 The growth curves of tigecycline sensitive and resistant *Acinetobacter baumannii*

Fig 3 The bacterium growth of co-cultured b38' and b38 strains on MHA plate without (A and C) and with tigecycline (B and D,

$8 \mu\text{g/mL}$). A, B, 24 h; C, D, 72 h

示,后续试验紫外线照射时间均使用 15 s。

2.2.2 紫外线照射诱导前后鲍曼不动杆菌耐药性的变化 3 株鲍曼不动杆菌紫外线照射 20 代后对 TGC 的敏感性未发生明显变化,2 株敏感株仍表现为对 TGC 敏感,但 TGC 的 MIC 值均较前有所升

表 1 不同质量浓度 TGC 诱导鲍曼不动杆菌后 TGC 的 MIC 值/ $(\mu\text{g/mL})$

Table 1 Changes of MICs with exposure of *Acinetobacter baumannii* to different concentrations of tigecycline (TGC)/ $(\mu\text{g/mL})$

Strain	Prior to TGC induction	TGC concentration/ $(\mu\text{g/mL})$					
		1	2	4	8	16	32
b38	0.25	2	2	16	32	32	32
C49	0.5	8	8	16	32	32	32
V021	0.5	16	16	32	32	32	32

稀释度的菌悬液照射后菌量均有明显减少,但菌悬液浓度为 1×10^5 CFU/mL 的涂布量细菌分布厚度适宜,且照射后宜于计数,见图 1,故后续试验均采用 1×10^5 CFU/mL 浓度菌悬液涂布 MHA 平板。

照射不同时间后,各 MHA 培养基内细菌均有所减少,照射时间较长的培养基中甚至无菌生长。其中在照射 15 s 后 MHA 平板中细菌死亡率为 50%~80%,为适宜的紫外线照射时间,如图 1 所

高,分别由照射前的 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 升至照射后的 $1 \mu\text{g/mL}$,1 株耐药株的 TGC 的 MIC 值未发生变化,见表 2。

2.3 耐药性消除试验结果

2 株 TGC 耐药鲍曼不动杆菌连续划线接种于

表 2 紫外线照射诱导后 TGC 对鲍曼不动杆菌的 MIC 值/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Table 2 Changes of MICs with exposure of *Acinetobacter baumannii* to ultraviolet radiation/($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Strain	Prior to ultraviolet radiation	Generations after exposure to ultraviolet radiation					
		1	2	4	8	16	20
b38	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	1
C49	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
N05	16	16	16	16	16	16	16

空白 MHA 平板中, 传代 40 代后, 微量肉汤稀释法检测 TGC 对鲍曼不动杆菌的 MIC 值未发生变化, 仍表现为 TGC 耐药。

2.4 TGC 耐药株适应度代价研究结果

2.4.1 生长曲线 b38 和 b38' 在相同的培养条件下的生长曲线见图 2, 敏感株 b38 培养至 12 h 时, 其 OD_{600} 值大于 3, 细菌生长已饱和。TGC 耐药株 b38' 达到对数生长期及平台期的时间均晚于敏感株。

2.4.2 竞争试验结果 b38 和 b38' 在同一培养基中进行混合培养, 经过 2 个竞争循环后 (即共培养 24 h) 第一次取样 TGC 耐药株较敏感株就明显减少 (图 3A、3B); 混合培养至 72 h, 无药 MHA 平板上的菌落继续生长 (图 3C), TGC 含药平板上即使涂布 10^7 CFU/mL 浓度的菌悬液, 仍无细菌生长 (图 3D)。

3 讨论

抗菌药物耐药性的产生是一种自然生物现象。针对环境中的压力, 细菌进化过程中会采取不同的反应维持自身稳定。抗菌药物的不合理使用, 会导致细菌出现耐药。当抗菌药物刺激消失, 突变型又可回到原来的表型, 耐药性也逐渐消失, 对抗菌药物恢复敏感。紫外线可杀灭各种微生物, 是临床上最常用的消毒方法, 然而不规范的使用紫外线照射, 不仅不能达到预期的消毒效果, 还可能诱导细菌发生突变, 形成新的耐药菌株, 成为引发医院感染的隐患。

本研究采用多步法对鲍曼不动杆菌进行体外耐药诱导。多步法是将诱导菌株在含药物浓度逐渐递增的同体培养基中连续传代至诱导出耐药菌株的方法, 可诱导出高耐药菌株。本研究诱导初始药物浓度为 $1/4$ MIC, 这和临床用药剂量不足 (低于药物的 MIC) 有一定相似性, 通过连续转种培养并逐步增加 TGC 浓度, TGC 对 3 株临床分离鲍曼不动杆菌的 MIC 值均显著增高。国内也有使用阿米卡星、奈替米星、亚胺培南、TGC 等诱导鲍曼不动杆菌对此类

抗菌药物耐药^[5-6], 提示鲍曼不动杆菌经过体外不断地接受抗菌药物的压力, 容易对抗菌药物产生继发耐药。

经紫外线照射后, 3 株鲍曼不动杆菌对 TGC 的敏感性未发生变化, 但 TGC 对其的 MIC 值似乎有上升趋势。国内有研究应用紫外线对铅黄肠球菌、铜绿假单胞菌、褪色沙雷菌照射后, 发现细菌对抗菌药物的耐药性增加^[7], 但国内外尚无应用紫外线照射诱导鲍曼不动杆菌对 TGC 耐药性研究的报道。本研究未用紫外线诱导出 TGC 耐药株, 可能与照射代数不够有关, 随着紫外线照射代数的增加, 有可能出现突变的 TGC 耐药株。紫外线对细菌具有诱变作用, 经紫外线照射后, 细菌 DNA 链断裂或碱基破坏等, 干扰 DNA 的正常碱基配对, 导致细菌死亡或变异。突变后的细菌表达新的基因或原有的基因失活, 微生物采用其他替补途径产生新的酶或结构蛋白, 引起药物 MIC 值的变化。

本实验通过将 2 株 TGC 耐药鲍曼不动杆菌在空白 MHA 培养基中反复传代所得结果表明, 去除选择压力以后, 鲍曼不动杆菌对 TGC 的敏感性仍未恢复, 说明其耐药表型可能具有遗传稳定性。国内外尚无应用耐 TGC 鲍曼不动杆菌进行相关研究的报道, 国内应用耐药大肠杆菌在空白培养基进行反复传代培养进行耐药消除, 发现其对新霉素的敏感性可恢复, 考虑其耐药性不具有遗传稳定性^[8]。

细菌的耐药性与适应度代价密切相关, 曾有研究表明细菌适应度代价是细菌耐药性形成的主要因素, 影响耐药性的稳定性以及抗菌药物停用后耐药性的变化^[9]。细菌在面对抗菌药物的选择压力时, 可以通过各种变异机制获得耐药性, 其适应性、毒力及质粒转移率均较敏感株明显下降。而当抗菌药物压力解除时, 耐药菌株中的某些耐药机制会成为菌株的额外负担, 其适应度可能小于野生株, 这一现象称为适应度代价^[10]。若某一耐药机制的适应度代价很大, 那么抗菌药物压力不存在时, 敏感株处于主导优势, 能抑制耐药菌生长, 甚至在一定时间内使耐药菌清除出细菌群体^[11]。因此, 评估某种菌株耐药机制的适应度代价, 将有助于了解其在群体中存续及扩散的能力。

本研究将 TGC 敏感鲍曼不动杆菌与 TGC 诱导后的同源耐药株单独培养及混合培养, 结果发现体外单独培养时耐药株达到对数生长期及平台期的时间均较敏感株晚; 混合培养时, 随着连续传代, 耐药株菌落数量较敏感株迅速减少, 甚至耐药株被清

除,提示耐药株在发生耐药性突变的同时适应性有所降低,即细菌耐药性的获得需要付出适应度代价,可能是由于耐药菌株外排泵耐药机制不仅泵出了抗菌药物,也泵出了大量代谢产物,增加了耐药株的代谢负担。国内外有学者进行了许多有关细菌耐药性与适应性关系的研究,大多研究^[12-15]结果提示耐药株发生耐药突变后存在适应度代价,如 KUGELBERG 等^[12]研究测定耐药铜绿假单胞菌的体外生长速率,结果显示耐药株的生长速率较其同源敏感株低,KANAI 等^[13]研究发现分离自同一患者耐药和敏感的幽门螺杆菌株,在单独培养时未表现出生长速率的显著性差异,当混合培养时,耐药株在适应性上有所降低。但也有研究^[16]发现某些耐药突变并未引起适应性的显著改变。国外也有研究^[17]发现,发生耐药性突变的大肠埃希菌与耐药性质粒结合,有利于该细菌的生长,增加了细菌的适应度代价,使细菌在无抗菌药物的平板上处于劣势,从而有利于耐药性的恢复。但国内外均无 TGC 耐药鲍曼不动杆菌适应度代价的研究。本研究结果提示 TGC 耐药株较敏感株适应性下降,TGC 耐药株的播散能力较敏感株弱,可能抗菌药物的间歇使用有助于减少或消除鲍曼不动杆菌对 TGC 的耐药性。但临床上的耐药株是否会通过补偿突变(即第 2 位点突变),在不丧失耐药性的同时通过基因进化修复适应性,还需进一步观察及研究。

综上,TGC 可诱导鲍曼不动杆菌产生获得性耐药,紫外线照射有可能诱导鲍曼不动杆菌对 TGC 耐药性的变化。鲍曼不动杆菌对 TGC 的耐药可能具有遗传稳定性。TGC 耐药株较敏感株适应性下降,抗菌药物的间歇使用可能有助于减少或消除鲍曼不动杆菌对 TGC 的耐药性。

参 考 文 献

- [1] PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.
- [2] KARAGEORGOPOULOS DE, KELESIDIS T, KELESIDIS I, et al. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(1): 45-55.
- [3] CASAL M, RODRIGUEZ F, JOHNSON B, et al. Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile

- against presumably tigecycline non susceptible *Acinetobacter spp.* J Antimicrob Chemother, 2009, 64(1): 69-72.
- [4] GUO B, ABDELRAOUF K, LEDESMA KR, et al. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(4): 928-932.
- [5] 陈 琼. 鲍曼不动杆菌替加环素耐药机制研究. 杭州: 浙江大学, 2015 [2016-03-06]. <http://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10335-1015608883.htm>.
- [6] 王 慧. 体外诱导鲍曼不动杆菌突变耐药与主动外排机制的相关性研究. 沈阳: 中国医科大学, 2012 [2016-03-06]. <http://www.docin.com/p-1014300938.html>.
- [7] 王 燕, 周 焱, 张映华, 等. 紫外线照射对细菌耐药性的影响. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(21): 3355-3363.
- [8] 孟 甄, 金建玲, 刘玉庆, 等. 细菌耐药性的诱导与消除. 中国药理学通报, 2003, 19(9): 1047-1051.
- [9] KOMP LINDGREN P, MARCUSON LL, SANDVANG D, et al. Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(6): 2343-2351.
- [10] ANDERSSON DI, HUGHES D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol, 2010, 8(4): 260-271.
- [11] 蒋 蓉, 刘 冲, 张文婷, 等. 耐药弯曲杆菌适应性代价研究进展. 畜牧与兽医, 2010, 42(5): 99-101.
- [12] KUGELBERG E, LÖFMARK S, WRETLIND B, et al. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(1): 22-30.
- [13] 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.
- [14] BALSALOBRE L, DE LA CAMPA AG. Fitness of *Streptococcus pneumoniae* fluoroquinolone-resistant strains with topoisomerase IV recombinant genes. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(3): 822-830.
- [15] ROZEN DE, MCGEE L, LEVIN BR, et al. Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 412-416.
- [16] HURDLE JG, O'NEILL AJ, CHOPRA I. The isoleucyl-tRNA synthetase mutation V588F conferring mupirocin resistance in glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus* is not associated with a significant fitness burden. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(1): 102-104.
- [17] SILVA RF, MENDONÇA SC, CARVALHO LM, et al. Pervasive sign epistasis between conjugative plasmids and drug-resistance chromosomal mutations. PLoS Genet, 2011, 7(7): e1002181 [2015-12-19]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002181>.

(2016-08-21 收稿, 2016-11-29 修回)

编辑 沈 进