

临床肺炎克雷伯菌的异质性耐药研究进展

史梦兰^{1,2}, 李文茹^{*1}, 谢小保^{*1}

- 1 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室 农业农村部农业微生物组学重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070
2 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022

史梦兰, 李文茹, 谢小保. 临床肺炎克雷伯菌的异质性耐药研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2326-2336.

SHI Menglan, LI Wenru, XIE Xiaobao. Research progress in heteroresistance of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2326-2336.

摘要: 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是临床引起感染的常见病原菌之一, 常引发肺炎、尿路感染和细菌血症等。近年来, 肺炎克雷伯菌的异质性耐药相关研究相继被报道。异质性耐药是指同一菌株中同时存在对某种抗生素耐药和敏感亚群的现象, 由于其表型和遗传不稳定, 至今尚无标准、低成本和高效的检测方法。本文对肺炎克雷伯菌异质性耐药进行综述, 阐明了异质性耐药的定义和检测方法, 并结合本团队在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)异质性耐药方面的研究工作, 深入剖析了肺炎克雷伯菌的异质性耐药机制。本文为全面了解肺炎克雷伯菌异质性耐药机制、优化临床抗菌药物的使用和治疗肺炎克雷伯菌感染提供参考。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 异质性耐药; 抗生素

Research progress in heteroresistance of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics

SHI Menglan^{1,2}, LI Wenru^{*1}, XIE Xiaobao^{*1}

- 1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Key Laboratory of Agricultural Microbiome, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China
2 National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* (KP), one of the most common pathogens causing clinical

资助项目: 广东省基础与应用基础研究项目(2021A1515011080)

This work was supported by the Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2021A1515011080).

*Corresponding authors. E-mail: XIE Xiaobao, xiexb@gdim.cn; LI Wenru, liwenru@gdim.cn

Received: 2023-06-16; Accepted: 2023-10-23; Published online: 2024-05-13

infections, often results in pneumonia, urinary tract infection, and bacteremia. In recent years, studies have reported the heteroresistance of *K. pneumoniae*. Heteroresistance refers to the phenomenon that there are both resistant and susceptible subpopulations of a strain to an antibiotic. Due to the phenotypic and genetic instability of heteroresistance, standard, low-cost, and efficient detection methods remain to be established. This article reviews the research progress in heteroresistance of *K. pneumoniae*, clarifies the definition and detection methods of heteroresistance, and probes into the heteroresistance mechanism of *K. pneumoniae* on the basis of our previous studies about the heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa*. This article will provide a reference for comprehensively understanding the heteroresistance mechanism of *K. pneumoniae*, optimizing the clinical use of antibiotics, and treating bacterial infections.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; heteroresistance; antibiotics

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一种定植于口腔、鼻咽和胃肠道黏膜表面的革兰氏阴性杆菌,经常感染免疫缺陷患者的组织和器官,并容易产生抗生素耐药^[1]。肺炎克雷伯菌具有机会致病性,常引发医院临床病原菌感染,如泌尿道和伤口严重感染,以及腹腔感染、肺炎和菌血症^[2-3]。经典肺炎克雷伯菌由于产生青霉素酶而对氨苄青霉素(ampicillin)、卡比西林(carbenicillin)和替卡西林(ticarcillin)天然耐药。随着抗生素在临床上的广泛应用,肺炎克雷伯菌对氟喹诺酮类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类等多种临床上常见抗生素的耐药率逐渐增加,呈现多重耐药(multiple drug resistance, MDR)的趋势^[3-4]。多重耐药的经典肺炎克雷伯菌是导致医院感染的主要因素之一,产生超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum beta-lactamase, ESBL)和碳青霉烯酶的MDR经典肺炎克雷伯菌治疗困难,病死率可达40%–50%^[4]。由于表现出多药耐药和高毒力,肺炎克雷伯菌常造成治疗失败^[5]。

“异质性耐药(heteroresistance)”一词是在1970年由Kayser等^[6]在研究金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)对 β -内酰胺类抗生素的获得性和天然性耐药中首次使用,但最早在1947年Alexander等^[7]在研究链霉素(streptomycin)对B型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的

影响时就描述过异质性抗生素耐药现象,发现流感嗜血杆菌含有使链霉素耐药性增加的罕见亚群。近20年后,在Sutherland等^[8]研究耐甲氧西林葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)的特征时再次被提到。异质性耐药是敏感和耐药的中间阶段^[9],由于在临床上不易被检出,通常导致临床抗生素治疗的失败^[10]。

随着临床上抗生素的大量使用,肺炎克雷伯菌对多种抗生素存在异质性耐药^[11-12]。碳青霉烯被用于治疗产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌引起的感染,1985年首次出现对碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌^[13],随着碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌在全球范围内持续增加^[14-15],产生了一种肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC),它是一种 β -内酰胺酶,可对广谱头孢菌素和碳青霉烯产生耐药性^[11,16]。因此,临床医生不得不使用黏菌素作为治疗多重耐药肺炎克雷伯菌感染的最后手段^[17]。随着黏菌素在临床上的大量使用,耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌逐渐对黏菌素产生异质性耐药。目前国内外关于肺炎克雷伯菌对头孢菌素的异质性耐药研究相对较少,异质性耐药机制尚未明确。本文对肺炎克雷伯菌异质性耐药的定义、检测方法和研究现状等进行综述,以期为临床上使用抗生素治疗KP感染提供新思路。

1 异质性耐药的概述

异质性耐药的定义是指在对细菌进行体外药敏试验中,大多数亚群对抗生素表现敏感,而有一小部分亚群产生耐药,甚至有极少数亚群出现高水平耐药^[18-20]。该定义需要考虑以下几个重要特征:(1) 克隆性。细菌对抗生素的异质性耐药包括多克隆和单克隆。多克隆异质性耐药是由至少 2 个具有不同敏感性的菌株共同感染,或在抗生素治疗期间出现罕见的耐药突变株,而单克隆异质性耐药则是由同一菌株不同亚群的异质性引起的^[10,21-23]。目前关于异质性耐药的研究主要在单克隆方面^[9]。(2) 耐药亚群的耐药水平。大多数研究采用耐药亚群的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)与主要菌群的 MIC 比值进行判断,一般可认为比值 ≥ 8 ^[10]。最新的研究采用最大不抑菌浓度(the highest non inhibitory concentration, HNIC)判断耐药水平,一般认为耐药亚群的耐药水平 ≥ 8 倍 HNIC^[20,22]。(3) 耐药亚群的发生频率。常用抗生素耐药亚群细菌数占未使用抗生素细菌总数的百分比表示。目前对单克隆异质性耐药判定的发生频率建议大于 1×10^{-7} ^[10,21]。(4) 耐药亚群的稳定性。在无抗生素的条件下培养 50 代后,耐药亚群的敏感性发生回复或部分回复,表现为不稳定;若其耐药水平不变,则称为稳定的异质性耐药^[10,20-21]。

2 异质性耐药检测方法的研究进展

由于异质性耐药发生频率低^[18],截至目前尚无检测异质性耐药的标准方法,各实验室检测方法略有不同^[9,24]。常用的检测异质性耐药的方法是抗生素浓度梯度法(E-test)、Kirby-Bauer (K-B)药敏纸片法和菌群谱型分析法(population

analysis profiling, PAP)^[9,20-21,24]。除了常用的这 3 种方法外,近年来开发出了一些新的检测方法,包括 PAP 曲线下面积法^[25]、菌群谱型分析微量滴定法(microtitration population analysis profiling, MPAP)^[9,22]、时间杀伤试验法^[26]、微滴数字 PCR^[27]和全基因组测序^[28]等。

2.1 K-B 药敏纸片法和 E-test 法

K-B 药敏纸片法和 E-test 法用于初步进行异质性耐药检测^[9]。实验中,抑菌圈内明显出现多个菌落生长^[21],分别检测细菌对抗生素的抑菌圈直径大小和 MIC 值^[24],然后对照临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)指南中细菌对抗生素的耐药标准,初步筛选出异质性耐药菌株。但 K-B 药敏纸片法和 E-test 法的特异性和灵敏性较差,通常会出现假阳性或假阴性的结果^[22,26]。因此 K-B 药敏纸片法和 E-test 法只能用于初步筛选细菌的异质性耐药,若需进一步确证,还需进行 PAP 实验和全基因组分析等。

2.2 菌群谱型分析

PAP 实验是异质性耐药检测的金标准^[21]。在该方法中,平板上的细菌数量受抗生素浓度梯度的影响,并对所有浓度梯度的细菌生长进行量化^[21]。将活化好的菌液浓度调至 1.0×10^7 CFU/mL,依次 10 倍稀释到 1.0×10^2 CFU/mL,取 100 μ L 各浓度梯度菌液涂布于各梯度抗生素平板上(抗生素浓度参照 CLSI 中细菌的 MIC,如 KP 对头孢吡肟 MIC 折点值为 2–32 μ g/mL,则选择抗生素的浓度梯度为 0.25–512.00 μ g/mL)^[29],37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后进行菌群计数,若菌株在抗生素浓度大于 8 倍 HNIC 时仍有菌群生长,并且耐药亚群的发生频率大于 1×10^{-7} ,则可将菌株判断为异质性耐药菌株^[20,22]。PAP 是鉴定异质性耐药的常规方法,能定量地确定耐药细菌亚群的发生频率。尽管菌群谱型分析法是检测

异质性耐药最可靠的方法,但与其他方法相比成本高、耗时长、效率低,因此很难在临床上实施^[24,27]。

2.3 菌群谱型分析:曲线下面积法

曲线下面积法作为一种改良的 PAP^[24],是检测金黄色葡萄球菌对万古霉素异质性耐药的首选方法,该方法将质控菌株的曲线下面积与测试菌株的曲线下面积进行定量比较,将菌液调至 1.0×10^7 CFU/mL,涂布于不同浓度万古霉素的培养基上,并在 37 °C 孵育 24–48 h,在对数图上绘制存活菌数与抗生素药物浓度的关系,并使用公式计算曲线下的面积比^[30]。尽管该方法是检测万古霉素对金黄色葡萄球菌异质性耐药的“金标准”,但其可能会错误判断具有不同耐药性的菌株^[30–31]。另外,与 PAP 相比曲线下面积法操作更为复杂、成本更高,在临床上难以实施^[24]。该方法仅在金黄色葡萄球菌中有所应用,还未应用于肺炎克雷伯菌。

2.4 菌群谱型分析微量滴定法

MPAP 实验同样作为一种改良 PAP,采用微量稀释滴定分别将 10 μ L 的 4 种菌液稀释液滴定在给定抗生素浓度的单个平板上,该方法与常规 PAP 相比节约了成本、操作更加简便^[25]。而且有研究表明 MPAP 是目前最接近 PAP 的检测方法,但由于滴定的菌量相对较少,MPAP 仍存在一定的假阴性^[24]。

2.5 微滴数字 PCR 和全基因组测序

近年来,各种先进的技术已被用于评估细菌的异质性耐药。微滴数字 PCR 目前被应用于细菌耐药性相关基因或突变位点的检测^[10],敏感性和准确性均比荧光定量 PCR 高^[32]。有研究表明,微滴数字 PCR 检测到幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)对克拉霉素(clarithromycin)的异质性耐药相关基因型^[28]。有研究发现微滴数字 PCR 可以在 4 h 内检测到血液样本中的肺

炎克雷伯菌^[33],目前微滴数字 PCR 在肺炎克雷伯菌中的应用仅限于快速检测样本中肺炎克雷伯菌的存在,尚无关于其耐药性检测的研究。另外,全基因组测序是检测临床分离株中异质性耐药亚群的一种越来越常用的方法^[34–35],通过分析耐药亚群基因型的变化检测出异质性耐药亚群^[34]。有研究通过全基因组测序技术筛选肺炎克雷伯菌对抗生素耐药性相关基因,分析发现 *blaOXA-48* 基因导致肺炎克雷伯菌耐药^[36]。但该方法仍有局限性,例如在耐药亚群发生频率小于 1×10^{-2} 时灵敏度不高^[34]。随着显微技术和微流控技术的发展,通过使用设计的微流控芯片直接从菌落计数低的样品中捕获细菌细胞,并用显微镜监测细菌个体生长速率,进而鉴定细菌对抗生素的敏感性^[37]。另外,使用直接单细胞成像显示,可以在 10 min 内确定菌株是否对抗生素敏感^[37]。因此,直接使用单细胞成像结合微流控技术作为快速检测细菌异质性耐药的方法具有广阔的应用前景。

3 临床肺炎克雷伯菌异质性耐药的研究现状

肺炎克雷伯菌对抗生素的异质性耐药主要包括碳青霉烯类和黏菌素类异质性耐药,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌会产生一种碳青霉烯酶,可对广谱头孢菌素和碳青霉烯产生耐药性^[11,16]。因此,临床医生不得不使用黏菌素类抗生素治疗多重耐药肺炎克雷伯菌感染^[17]。但随着黏菌素在临床上的大量使用,耐碳青霉烯的 KP 逐渐对黏菌素类产生异质性耐药,联合用药成为治疗肺炎克雷伯菌对黏菌素类抗生素异质性耐药引发感染的新手段。目前国内关于肺炎克雷伯菌对头孢菌素类抗生素的异质性耐药研究相对较少。

3.1 临床肺炎克雷伯菌对黏菌素类抗生素的异质性耐药

肺炎克雷伯菌的异质性耐药常见于黏菌素类抗生素,可能是医院为治疗严重的 KP 感染而广泛使用黏菌素类抗生素导致。对碳青霉烯耐药的 KP 容易对黏菌素类抗生素产生异质性耐药。Wang 等^[38]从 96 株耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌中筛选出 69 株对黏菌素异质性耐药的菌株,异质性耐药率为 71.9%,比例较高,通过杀伤实验研究发现黏菌素与四环素类或氨基糖苷类药物联合使用可以有效抑制耐药亚群的生长,并在体外表现出协同作用。尉景娟等^[39]研究耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌对多黏菌素的异质性耐药,从 40 株肺炎克雷伯菌株中筛选出 38 株异质性耐药菌株,异质性耐药率高达 95%,时间杀伤实验结果显示,与美罗培南低浓度联合用药可在短时间内达到杀菌效果。田原^[40]在 95 株碳青霉烯耐药的 KP 中筛选出 90 株多黏菌素 B 异质性耐药菌株,异质性耐药率为 94.7%,比例偏高,从中挑选 6 株进行 PAP 实验,发现耐药亚群的 MIC 是原始菌株的 32 倍,发生频率为 4.41×10^{-7} – 3.66×10^{-6} ,在无抗生素条件下传代 7 d 后显示耐药亚群子代的耐药稳定性良好;时间杀菌曲线显示,多黏菌素 B 与替加环素联合用药可达到完全清除细菌的效果。Ma 等^[41]从 16 株肺炎克雷伯菌中筛选出 10 株对多黏菌素 B 异质性耐药的菌株,异质性耐药率为 62.5%,耐药亚群的 MIC 为 32 $\mu\text{g/mL}$,是原始菌株的 16 倍,在无抗生素的条件下耐药亚群的稳定性良好,并推测这种稳定的异质性耐药表型可能与遗传有关;该研究表明多黏菌素 B 和头孢他啶/阿维巴坦联合用药提高了多黏菌素 B 的体外抗菌活性,抑制了耐药亚群的出现。因此,联合用药可用于治疗肺炎克雷伯菌对黏菌素类抗生素异质性耐药引发的感染。

3.2 临床肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的异质性耐药

碳青霉烯类抗生素具有抗菌活性强、抗菌谱广、稳定程度高的特点,对于产 AmpC 酶和 ESBL 酶细菌具有良好的杀菌效果,是治疗革兰氏阴性菌感染的常用药物。近年来, KP 对碳青霉烯类抗生素的耐药率和异质性耐药率逐年上升^[42]。有研究对 6 株产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌(KPC-KP)临床分离株进行了美罗培南异质性耐药研究,并与不产碳青霉烯酶且对美罗培南敏感的肺炎克雷伯菌对照组进行了比较;菌群谱型分析结果显示, KPC-KP 分离株在美罗培南浓度为 64–256 $\mu\text{g/mL}$ 时生长,耐药亚群的 MIC 是对照菌株的 16–128 倍;但在无抗生素的条件下传代 7 d 后,耐药亚群回复为敏感,异质性耐药不稳定^[11]。代佳伶^[43]在 108 株肺炎克雷伯菌中检测到 63 株对厄他培南异质性耐药菌株,异质性耐药率为 58.3%。Nodari 等^[16]对 5 株产碳青霉烯酶和 4 株不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌株进行了亚胺培南异质性耐药研究,结果显示 5 株产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌为异质性耐药菌株,且耐药亚群的 MIC 达到原始菌株的 16 倍,耐药发生频率为 5×10^{-7} – 1.5×10^{-5} ,而另外 4 株不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌未表现为异质性耐药,由此推测肺炎克雷伯菌对亚胺培南的异质性耐药机制与碳青霉烯酶有关。

3.3 临床肺炎克雷伯菌对头孢菌素类抗生素的异质性耐药

肺炎克雷伯菌对头孢菌素类抗生素的异质性耐药研究相对较少,有研究在 108 株肺炎克雷伯菌中检测到 51 株对头孢吡肟异质性耐药菌株,异质性耐药率为 47.2%^[43]。头孢吡肟属于第 4 代头孢菌素,主要特点是对各类 β -内酰胺酶高度稳定^[44]。据报道,对碳青霉烯耐药的革兰氏阴性病原菌中普遍存在对头孢地尔的异

质性耐药^[45], 头孢地尔是一种新型的铁载体结合的头孢菌素, 对碳青霉烯耐药的病原菌具有很强的活性。研究表明产 β -内酰胺酶是导致头孢地尔对肺炎克雷伯菌异质性耐药的主要原因^[46]。

4 肺炎克雷伯菌的异质性耐药机制

肺炎克雷伯菌对黏菌素类抗生素的异质性耐药机制主要与位于染色体或质粒的辅助基因高突变性有关^[1]。Jayol 等^[47]的研究表明 KP 对黏菌素的异质性耐药机制可能是由 PhoPQ 双组分调节系统的改变引起的, 该调节系统负责激活与多黏菌素耐药性有关的 *pmrHFIJKLM* 基因表达。Halaby 等^[48]发现产 β -内酰胺酶的 KP 对黏菌素异质性耐药机制与 *lpxM*、*mgrB*、*phoQ* 和 *yciM* 基因突变有关, 导致对黏菌素敏感的菌株 MIC 增加了 2–4 倍。Bardet 等^[49]在研究对黏菌素类异质性耐药的 KP 时, 发现其耐药亚群中 *mgrB* 基因发生单核苷酸插入突变, 导致过早产生终止密码子; 另外, 黏菌素作用于靶向脂多糖的脂质 A 部分, 导致细菌细胞膜破坏并失去高黏滞表型。Cheong 等^[50]和 Seo 等^[26]的研究结果均表明双组分调节系统 PmrAB 和 PhoPQ 中的不同氨基酸取代导致 KP 对黏菌素的异质性耐药, 该结果与 Jayol 等^[47]的研究结果一致。Morales-León 等^[51]发现 *pmrAB* 和 *phoPQ* 的突变以及 *mgrB* 基因被破坏会导致 KP 对黏菌素的异质性耐药, *pmrAB* 和 *phoPQ* 的突变会导致基因 *pmrHFIJKLM* 和 *pmrC* 的过表达, 从而降低细菌对多黏菌素的亲和力; 另外, *mgrB* 基因发生缺失突变时会导致 PmrAB 和 PhoPQ 组分上调, 增加 KP 对黏菌素的耐药性。Sánchez-León 等^[52]研究发现 *mgrB* 基因的插入突变会导致肺炎克雷伯菌对黏菌素的异质性耐药, 这与 Bardet 等^[49]的研究结果一致。另外 Silva 等^[12]研究发现生物

膜的形成与 KP 对黏菌素的异质性耐药有关。生物膜是由细菌和自身分泌的胞外聚合物组成的可附着在生物或非生物表面的细胞群体, 生物膜的复杂结构有助于形成具有不同基因表达模式的异质性耐药亚群^[1,53]。

外膜孔蛋白缺失和 β -内酰胺酶的表达是 KP 对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要原因^[4,54]。Adams-Sapper 等^[55]的研究证明了肺炎克雷伯菌对亚安培南的异质性耐药与携带 *blaKPC* 基因和外膜孔蛋白 OmpK36 表达降低有关, 在亚胺培南暴露后耐药亚群外膜孔蛋白 OmpK36 表达水平降低, 在无抗生素条件下培养, 耐药亚群外膜孔蛋白的表达水平发生回复, 异质性耐药表型稳定。柯建飞^[56]研究发现产 OXA-48 的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯的异质性耐药是由于 *bla_{OXA-48}-like* 表达量升高和外膜孔蛋白 OmpC 的突变, *bla_{OXA}* 基因编码 D 类碳青霉烯酶苯唑西林酶, 会导致细菌对碳青霉烯类抗生素产生耐药; 另外, 外膜孔蛋白表达量减少会导致进入菌体的有效药物减少, 降低抗生素的杀菌效果。Pournaras 等^[11]的研究结果表明, 肺炎克雷伯菌对美罗培南的异质性耐药可能归因于 *blaKPC-2* 基因的暂时过表达, 因此选择美罗培南和庆大霉素联合使用可有效杀灭异质性耐药菌株。López-Camacho 等^[57]的研究发现, 肺炎克雷伯菌对美罗培南的异质性耐药是由外膜孔蛋白 OmpK36 低表达或活性降低引起的, 这与 Adams-Sapper 等^[55]的研究结果一致。外膜孔蛋白缺失会导致细菌减少对 β -内酰胺类抗生素的摄取, 并且结合 ESBLs 对抗生素的水解作用, 导致临床抗生素耐药^[58-59]。Li 等^[60]综述了肺炎克雷伯菌双组分调节系统的组成和调控机制, 强调双组分调节系统在肺炎克雷伯菌毒力、抗生素耐药性和应激反应的调节中发挥着重要作用。有研究表明超广谱 ESBLs 是由质粒介导的丝氨酸蛋白酶衍生物, 可水解头孢

菌素类抗生素, 导致肺炎克雷伯菌对头孢菌素类抗生素耐药^[61]。此外, AmpC 酶的过表达也会导致除第 4 代头孢菌素和碳青霉烯类以外的 β -内酰胺类抗生素耐药, AmpC 酶又称为头孢菌素酶, 属于 Ambler 分子结构分类中的 C 类^[62]。由于肺炎克雷伯菌对第 4 代头孢菌素类抗生素的异质性耐药现象的发生, 迫切需要进一步研究其发生机制。

关于 KP 对头孢菌素类抗生素异质性耐药机制的研究还有待深入, 尤其是抗菌谱广、抗菌性能更强、对 β -内酰胺酶稳定性更高的第 4 代头孢菌素类抗生素。

5 总结与展望

目前关于异质性耐药的定义也在不断更新发展, 有研究认为以 MIC 作为判断异质性耐药水平的唯一标准会导致异质性耐药的高发病率和治疗失败, 所以用最大不抑菌浓度判断耐药水平^[22]。另外, 关于异质性耐药的检测方法, 由于异质性耐药发生的不稳定性和低频性, 目前尚无准确高效的标准方法。K-B 药敏纸片法和 E-test 法只能用于初步进行异质性耐药检测, 容易出现假阴性或假阳性的结果。PAP 实验成本高、耗时长、效率低, 很难在临床上实施, 临床细菌感染不能第一时间检出异质性耐药菌株, 这会严重影响临床抗感染的治疗效果。因此, 必须建立一个标准的检测方法来正确地监测和分析异质性耐药菌株, 以在临床治疗中保持抗生素的有效性。张传珍^[63]对 PAP 的实验方法进行了优化, 将接菌量由 10^8 CFU/mL 提升到 10^{10} CFU/mL, 将抗生素的浓度按比例扩大, 优化后 PAP 实验的培养时间从原来的 48 h 缩短至 24 h, 不仅提高了筛选效率, 而且节约了实验成本。这是 PAP 实验优化的一个新趋势, 但临床治疗需要更加快速高效的检测方法, 还需进

一步研究。另外, 显微技术和微流控技术这些快速检测细菌异质性耐药的方法也具有广阔的应用前景。

由于碳青霉烯酶的产生导致肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率大幅增高, 临床对黏菌素类抗生素的使用增加, 肺炎克雷伯菌对黏菌素的异质性耐药率也越来越高。多项研究表明联合用药可用于治疗 KP 对黏菌素类抗生素异质性耐药引发的感染。多黏菌素联合氨基糖苷类和四环素类都具有较好的协同作用^[38-39], 此外联合用药还能抑制耐药的发生, 这为临床治疗 KP 感染提供了更多合理方案。

肺炎克雷伯菌的异质性耐药机制包括基因突变、外排泵系统的过表达以及产 β -内酰胺酶等^[64]。最近出现了 KP 对第 4 代头孢菌素异质性耐药的现象, 但关于第 4 代头孢菌素类抗生素的异质性耐药机制知之甚少, 头孢吡肟作为第 4 代头孢菌素, 主要特点是对各类 β -内酰胺酶高度稳定, 因此肺炎克雷伯菌对第 4 代头孢菌素类抗生素异质性耐药的研究迫在眉睫。

最近有研究证明^[65], 在新型冠状病毒感染大流行期间, 广泛使用消毒剂和增加使用抗生素以防止细菌合并感染会导致细菌进化和耐药性增强。例如, 消毒液中含有破坏微生物 DNA 的基因毒性化学物质, 容易激活 DNA 修复酶, 可能导致细菌耐药性的突变^[66-67]。有研究表明, 在新型冠状病毒感染患者中, 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌合并感染的患病率可能达到 50% 以上, 迫切需要关注新型冠状病毒感染患者中碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的感染^[68]。此外, 有研究报道了肺炎克雷伯菌对医院中广泛使用的消毒剂“洗必泰”的异质性耐药^[69]。

需要注意的是, 大多数异质性耐药的实验都在体外进行, 这些结果不能完全反映人体中发生的耐药机制, 需要考虑病原体与人体免疫

反应之间的相互作用, 以及多个异质性耐药亚群共存的问题等。鉴于缺乏检测异质性耐药的标准程序和方法, 迫切需要进一步研究检测异质性耐药的标准方法, 以了解肺炎克雷伯菌异质性耐药的机制, 并防止多药耐药感染的传播, 为抗生素的临床使用提供更多参考。

REFERENCES

- [1] STOJOWSKA-SWĘDRZYŃSKA K, ŁUPKOWSKA A, KUCZYŃSKA-WIŚNIK D, LASKOWSKA E. Antibiotic heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 23(1): 449.
- [2] 周馨, 马筱玲, 戴媛媛, 黄家祥, 王影. 2014–2017 年某院肺炎克雷伯菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(21): 3210-3215.
- ZHOU X, MA XL, DAI YY, HUANG JX, WANG Y. Distribution and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in 2014–2017[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(21): 3210-3215 (in Chinese).
- [3] PACZOSA MK, MECSAS J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(3): 629-661.
- [4] MARTIN RM, BACHMAN MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 4.
- [5] MULANI MS, KAMBLE EE, KUMKAR SN, TAWRE MS, PARDESI KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 539.
- [6] KAYSER FH, BENNER EJ, HOEPRICH PD. Acquired and native resistance of *Staphylococcus aureus* to cephalixin and other beta-lactam antibiotics[J]. Applied Microbiology, 1970, 20(1): 1-5.
- [7] ALEXANDER HE, LEIDY G. Mode of action of streptomycin on type b *hemophilus influenzae*: ii. nature of resistant variants[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1947, 85(6): 607-621.
- [8] SUTHERLAND R, ROLINSON GN. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococci*[J]. Journal of Bacteriology, 1964, 87(4): 887-899.
- [9] 张亚会, 李文茹, 谢小保. 铜绿假单胞菌异质性耐药的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1167-1176.
- ZHANG YH, LI WR, XIE XB. Research progress on heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1167-1176 (in Chinese).
- [10] ANDERSSON DI, NICOLOFF H, HJORT K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(8): 479-496.
- [11] POURNARAS S, KRISTO I, VRIONI G, IKONOMIDIS A, POULOU A, PETROPOULOU D, TSAKRIS A. Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(7): 2601-2604.
- [12] SILVA A, SOUSA AM, ALVES D, LOURENÇO A, PEREIRA MO. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* is triggered by small colony variants sub-populations within biofilms[J]. Pathogens and Disease, 2016, 74(5): ftw036.
- [13] KNOTHE H, ANTAL M, KRÉMÉRY V. Imipenem and ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1987, 19(1): 136-138.
- [14] GERACI DM, BONURA C, GIUFFRÈ M, SAPORITO L, GRAZIANO G, ALEO A, FASCIANA T, Di BERNARDO F, STAMPONE T, PALMA DM, MAMMINA C. Is the monoclonal spread of the ST258, KPC-3-producing clone being replaced in southern Italy by the dissemination of multiple clones of carbapenem-nonsusceptible, KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae*?[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2015, 21(3): e15-e17.
- [15] BONURA C, GIUFFRÈ M, ALEO A, FASCIANA T, Di BERNARDO F, STAMPONE T, GIAMMANCO A, MDR-GN WORKING GROUP, PALMA DM, MAMMINA C. An update of the evolving epidemic of blaKPC carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: emergence of multiple non-ST258 clones[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132936.
- [16] NODARI CS, RIBEIRO VB, BARTH AL. Imipenem heteroresistance: high prevalence among *Enterobacteriaceae Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers[J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64(1): 124-126.
- [17] MAMMINA C, BONURA C, Di BERNARDO F, ALEO A, FASCIANA T, SODANO C, SAPORITO MA, VERDE MS, TETAMO R, PALMA DM. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011[J]. Eurosurveillance, 2012, 17(33): 9-14.

- [18] MANJUNATH A, THUMU SCR, KUMAR S, HALAMI PM. Bacterial heteroresistance: an evolving novel way to combat antibiotics[J]. *Biologia*, 2021, 76(10): 3029-3041.
- [19] 李金玲, 李文茹, 谢小保, 张建设. 铜绿假单胞菌的耐药与异质性耐药研究进展[J]. *工业微生物*, 2021, 51(5): 58-66.
LI JL, LI WR, XIE XB, ZHANG JS. Research advance in drug resistance and heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Industrial Microbiology*, 2021, 51(5): 58-66 (in Chinese).
- [20] LI WR, ZHANG ZQ, LIAO K, WANG BB, LIU HZ, SHI QS, HUANG XB, XIE XB. *Pseudomonas aeruginosa* heteroresistance to levofloxacin caused by upregulated expression of essential genes for DNA replication and repair[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1105921.
- [21] EL-HALFAWY OM, VALVANO MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(1): 191-207.
- [22] NICOLOFF H, HJORT K, LEVIN BR, ANDERSSON DI. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(3): 504-514.
- [23] DEWACHTER L, FAUVART M, MICHIELS J. Bacterial heterogeneity and antibiotic survival: understanding and combatting persistence and heteroresistance[J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(2): 255-267.
- [24] 刘宇阳, 陈茶, 黄彬. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素异质性耐药的研究进展[J]. *中国感染控制杂志*, 2021, 20(8): 763-768.
LIU YY, CHEN C, HUANG B. Research progress of heteroresistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2021, 20(8): 763-768 (in Chinese).
- [25] IYER RN, HITTINAHALLI V. Modified pap method to detect heteroresistance to vancomycin among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital[J]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2008, 26(2): 176-179.
- [26] SEO J, WI YM, KIM JM, KIM YJ, KO KS. Detection of colistin-resistant populations prior to antibiotic exposure in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(6): 590-597.
- [27] SHERMAN EX, WOZNIAC JE, WEISS DS. Methods to evaluate colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1946: 39-50.
- [28] SUN L, TALARICO S, YAO LN, HE LH, SELF S, YOU YH, ZHANG HF, ZHANG YY, GUO YJ, LIU GD, SALAMA NR, ZHANG JZ. Droplet digital PCR-based detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates reveals frequent heteroresistance[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(9): e00019.
- [29] 代佳伶, 贾晓炯, 何建春, 夏云. 肺炎克雷伯菌对头孢吡肟和厄他培南异质性耐药的临床特征与危险因素分析[J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(3): 236-242.
DAI JL, JIA XJ, HE JC, XIA Y. Clinical features and risk factors of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* with heteroresistance to cefepime and ertapenem[J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2019, 41(3): 236-242 (in Chinese).
- [30] BATHAVATCHALAM YD, SOLAIMALAI D, AMLADI A, DWARAKANATHAN HT, ANANDAN S, VEERARAGHAVAN B. Vancomycin heteroresistance in *Staphylococcus haemolyticus*: elusive phenotype[J]. *Future Science OA*, 2021, 7(7): FSO710.
- [31] SILVEIRA ACO, CAIERÃO J, SILVA CI, ANZAI EK, McCULLOCH JA, D'AZEVEDO PA, SINCERO TCM. Impact of mutations in hVISA isolates on decreased susceptibility to vancomycin, through population analyses profile-area under curve (PAP-AUC)[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2019, 95(3): 114854.
- [32] 梅力, 王英超, 程汝佳, 于国际, 范学政, 高晓龙, 高敏, 秦玉明, 李筱英, 李巧玲, 朱良全, 冯小宇. 1 种布鲁氏菌微滴式数字 PCR 检测方法的建立[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(6): 1753-1759.
MEI L, WANG YC, CHENG RJ, YU GJ, FAN XZ, GAO XL, GAO M, QIN YM, LI XY, LI QL, ZHU LQ, FENG XY. A droplet digital PCR method for detection of *Brucella*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(6): 1753-1759 (in Chinese).
- [33] ZHENG Y, JIN J, SHAO ZQ, LIU JQ, ZHANG R, SUN RH, HU BC. Development and clinical validation of a droplet digital PCR assay for detecting *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with suspected bloodstream infections[J]. *MicrobiologyOpen*, 2021, 10(6): e1247.
- [34] BRADLEY P, WALKER TM, DUNN L, HEYS S, HUANG B, EARLE S, PANKHURST LJ, ANSON L, de CESARE M, PIAZZA P, VOTINTSEVA AA, GOLUBCHIK T, WILSON DJ, WYLLIE DH, DIEL R, NIEMANN S, FEUERRIEGEL S, KOHL TA, ISMAIL N, OMAR SV, et al. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Nature*

- Communications, 2015, 6: 10063.
- [35] OPERARIO DJ, KOEPEL AF, TURNER SD, BAO YD, PHOLWAT S, BANU S, FOONGLADDA S, MPAGAMA S, GRATZ J, OGARKOV O, ZHADOVA S, HEYSELL SK, HOUPTE ER. Prevalence and extent of heteroresistance by next generation sequencing of multidrug-resistant tuberculosis[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181284.
- [36] SANCAK B, ARİ O, DURMAZ R. Whole-genome sequence analysis of carbapenem-heteroresistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates[J]. Current Microbiology, 2022, 79(12): 384.
- [37] BALTEKIN Ö, BOUCHARIN A, TANO E, ANDERSSON DI, ELF J. Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(34): 9170-9175.
- [38] WANG YF, MA XQ, ZHAO LL, HE YK, YU WY, FU SN, NI WT, GAO ZC. Heteroresistance is associated with *in vitro* regrowth during colistin treatment in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 868991.
- [39] 尉景娟, 陈硕, 孙伟, 许颖, 张婧雯, 马立艳. 多黏菌素与美罗培南联合应用对碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌多黏菌素异质性耐药的体外抗菌活性分析[J]. 临床检验杂志, 2023, 41(2): 100-103, 110.
- WEI JJ, CHEN S, SUN W, XU Y, ZHANG JW, MA LY. *In vitro* antibacterial activity of polymyxin combined with meropenem to polymyxin-heteroresistant and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2023, 41(2): 100-103, 110 (in Chinese).
- [40] 田原. 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌对多黏菌素 B 和替加环素异质性耐药机制及联合用药研究[D]. 福州: 福建医科大学硕士学位论文, 2021.
- TIAN Y. The efficacy and heteroresistance mechanism of polymyxin B and tigecycline in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Medical University, 2021 (in Chinese).
- [41] MA XY, HE YT, YU XG, CAI YM, ZENG JM, CAI RX, LU Y, CHEN L, CHEN C, HUANG B. Ceftazidime/avibactam improves the antibacterial efficacy of polymyxin B against polymyxin B heteroresistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and hinders emergence of resistant subpopulation *in vitro*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2029.
- [42] 张宇, 卢笑晖. 耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的耐药机制和应对策略研究进展[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2022, 43(2): 138-148.
- ZHANG Y, LU XH. Research progress on drug resistance mechanism and coping strategies of carbapenem-resistant gram-negative bacilli[J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2022, 43(2): 138-148 (in Chinese).
- [43] 代佳伶. 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2019.
- DAI JL. Study on the mechanism of carbapenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Medical University, 2019 (in Chinese).
- [44] 薛雨, 陈宇瑛. 头孢菌素类抗生素的最新研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(2): 86-92.
- XUE Y, CHEN YY. New development of cephalosporin antibiotics[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(2): 86-92 (in Chinese).
- [45] CHOBY JE, OZTURK T, SATOLA SW, JACOB JT, WEISS DS. Widespread cefiderocol heteroresistance in carbapenem-resistant gram-negative pathogens[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2021, 21(5): 597-598.
- [46] MOON SH, UDAONDO Z, JUN S, HUANG E. Cefiderocol heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* is linked to mutations in the siderophore receptor *cirA* and β -lactamase activities[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2022, 60(3): 106635.
- [47] JAYOL A, NORDMANN P, BRINK A, POIREL L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(5): 2780-2784.
- [48] HALABY T, KUCUKKOSE E, JANSSEN AB, ROGERS MRC, DOORDUIN DJ, van der ZANDEN AGM, AL NAIEMI N, VANDENBROUCKE-GRAULS CMJE, van SCHAIK W. Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(11): 6837-6843.
- [49] BARDET L, BARON S, LEANGAPICHART T, OKDAH L, DIENE SM, ROLAIN JM. Deciphering heteroresistance to colistin in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Marseille, France[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(6): e00356-17.
- [50] CHEONG HS, KIM SY, WI YM, PECK KR, KO KS. Colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates and diverse mutations of PmrAB and PhoPQ in resistant subpopulations[J]. Journal of Clinical Medicine, 2019, 8(9): 1444.
- [51] MORALES-LEÓN F, LIMA CA, GONZÁLEZ-

- ROCHA G, OPAZO-CAPURRO A, BELLO-TOLEDO H. Colistin heteroresistance among extended spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1279.
- [52] SÁNCHEZ-LEÓN I, GARCÍA-MARTÍNEZ T, DIENE SM, PÉREZ-NADALES E, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, ROLAIN JM. Heteroresistance to colistin in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48[J]. Antibiotics, 2023, 12(7): 1111.
- [53] HALL CW, MAH TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(3): 276-301.
- [54] SPAGNOLO AM, ORLANDO P, PANATTO D, PERDELLI F, CRISTINA ML. An overview of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Reviews in Medical Microbiology, 2014, 25(1): 7-14.
- [55] ADAMS-SAPPER S, NOLEN S, DONZELLI GF, LAL M, CHEN K, JUSTO Da SILVA LH, MOREIRA BM, RILEY LW. Rapid induction of high-level carbapenem resistance in heteroresistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(6): 3281-3289.
- [56] 柯建飞. 产 OXA-48 肺炎克雷伯菌的碳青霉烯类耐药机制研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学硕士学位论文, 2023.
- KE JF. The mechanism study of heteroresistance to carbapenem in OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Chinese Medical University, 2023 (in Chinese).
- [57] LÓPEZ-CAMACHO E, PAÑO-PARDO JR, SOTILLO A, ELÍAS-LÓPEZ C, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, GÓMEZ-GIL R, MINGORANCE J. Meropenem heteroresistance in clinical isolates of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2019, 93(2): 162-166.
- [58] MMATLI M, MBELLE NM, MANINGI NE, OSEI SEKYERE J. Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review of current reports[J]. mSystems, 2020, 5(6): e00783-720.
- [59] WYRES KL, LAM MMC, HOLT KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(6): 344-359.
- [60] LI LF, MA JY, CHENG P, LI MC, YU ZY, SONG XR, YU ZD, SUN HQ, ZHANG WC, WANG ZB. Roles of two-component regulatory systems in *Klebsiella pneumoniae*: regulation of virulence, antibiotic resistance, and stress responses[J]. Microbiological Research, 2023, 272: 127374.
- [61] THOMSON JM, BONOMO RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(5): 518-524.
- [62] FRAIMOW HS, TSIGRELIS C. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: mechanisms, epidemiology, and management of specific resistant pathogens[J]. Critical Care Clinics, 2011, 27(1): 163-205.
- [63] 张传珍. 环丙沙星异质性耐药沙门菌的鉴定、毒力评价及机制研究[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2020.
- ZHANG CZ. Study on identification, virulence evaluation and mechanism of ciprofloxacin heteroresistance *Salmonella*[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [64] ZHENG JX, LIN ZW, SUN X, LIN WH, CHEN Z, WU Y, QI GB, DENG QW, QU D, YU ZJ. Overexpression of OqxAB and MacAB efflux pumps contributes to eravacycline resistance and heteroresistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7(1): 139.
- [65] GASPARI R, SPINAZZOLA G, TEOFILI L, AVOLIO AW, FIORI B, MARESCA GM, SPANU T, NICOLOTTI N, de PASCALE G, ANTONELLI M. Protective effect of SARS-CoV-2 preventive measures against ESKAPE and *Escherichia coli* infections[J]. European Journal of Clinical Investigation, 2021, 51(12): e13687.
- [66] LOBIE AT, ROBA AA, BOOTH JA, KRISTIANSEN KI, ASEFFA A, SKARSTAD K, BJORÅS M. Antimicrobial resistance: a challenge awaiting the post-COVID-19 era[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2021, 111: 322-325.
- [67] WAND ME, BOCK LJ, BONNEY LC, SUTTON JM. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 61(1): e01162-16.
- [68] MĘDRZYCKA-DĄBROWSKA W, LANGE S, ZORENA K, DĄBROWSKI S, OZGA D, TOMASZEK L. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in ICU COVID-19 patients-a scoping review[J]. Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(10): 2067.
- [69] NAPARSTEK L, CARMELI Y, CHMELNITSKY I, BANIN E, NAVON-VENEZIA S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Hospital Infection, 2012, 81(1): 15-19.