

肺炎克雷伯菌的异质性耐药

靳洋洋¹, 孔雪莲², 吴晓晗¹, 唐吉元昊¹, 黄颖^{1*}

¹安徽医科大学第一附属医院, 检验科, 安徽 合肥

²安徽省立医院, 中国科学技术大学附属第一医院, 内科, 安徽 合肥

收稿日期: 2024年10月15日; 录用日期: 2024年11月27日; 发布日期: 2024年12月11日

摘要

克雷伯菌属中的肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP), 分类上隶属于肠杆菌科。该菌能够引发包括肺部、泌尿系统、血液系统以及中枢神经系统等多个关键部位的感染。在社区及医院环境中, 该菌种均呈现出较高的流行率, 是引发院内感染的主要病原体之一。近些年来, 由于抗生素的不合理使用以及在基层医院的广泛运用, KP对抗生素的耐药率不断上升且广泛传播。除了展现出对广谱抗生素的耐药特性之外, KP还表现出一种被称为异质性耐药的现象。此现象具体指的是, 在同一细菌群体中, 不同亚群对同一抗生素的敏感性表现出显著差异, 这一现象被视为细菌由敏感状态向全面耐药状态过渡的关键阶段。由于KP异质性耐药在表型与遗传特征上的高度不稳定性, 常规的临床检测手段难以准确捕捉这种耐药特性, 从而对临床用药决策构成了严峻挑战, 增加了患者遭受重复感染及治疗失效的风险。所以, 对KP异质性耐药进行研究, 对于预防和控制细菌耐药以及指导临床用药具有重大意义, 也有助于了解临床常见分离菌的耐药发展进程。本论文旨在概述肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, 简称KP)异质性耐药性的概念界定、鉴别技术手段、潜在的耐药机理及其潜在的治疗干预策略。通过对这些方面的综合分析, 本研究期望为深入理解KP异质性耐药现象提供理论支撑, 并为临床治疗中应对此类耐药菌提供策略参考。

关键词

肺炎克雷伯菌, 异质性耐药, 抗生素

Heterogeneous Resistance of *Klebsiella pneumoniae*

Yangyang Jin¹, Xuelian Kong², Xiaohan Wu¹, Jiyuanhao Tang¹, Ying Huang^{1*}

¹Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

²Department of Internal Medicine, Anhui Provincial Hospital, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei Anhui

Received: Oct. 15th, 2024; accepted: Nov. 27th, 2024; published: Dec. 11th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 靳洋洋, 孔雪莲, 吴晓晗, 唐吉元昊, 黄颖. 肺炎克雷伯菌的异质性耐药[J]. 生物过程, 2024, 14(4): 185-195.
DOI: 10.12677/bp.2024.144023

Abstract

Klebsiella pneumoniae (KP) belongs to the genus *Klebsiella* of the family Enterobacteriaceae and can cause infections in multiple sites, including pneumonia, the urinary tract, the blood, and the brain, etc. It is prevalent in community environments and is one of the most common pathogens that cause hospital-acquired infections. In recent years, with the irrational application of antibiotics and the widespread use of primary hospitals, the resistance rate of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics has increased year by year and become widely prevalent, and in addition to resistance to antibiotics, heterogeneous resistance to a variety of antibiotics has also been found. Heterogeneous resistance refers to homogeneous subgroups of bacteria that exhibit different sensitivities to a particular antibiotic and is considered to be an intermediate stage in the evolution of bacteria from sensitivity to complete resistance. Due to the phenotypic and genotypic instability of heterogeneous resistance in *Klebsiella pneumoniae*, heterogeneous resistance cannot be effectively detected by conventional clinical tests, which poses a great threat to the clinical therapeutic use of medication and is prone to cause recurrent infections and medication failure in patients. Therefore, the study of heterogeneous drug resistance in *Klebsiella pneumoniae* is of great significance for the prevention and control of bacterial drug resistance as well as the guidance of clinical medication, and it also helps to understand the process of drug resistance development of common clinical isolates. In this paper, the definition of *Klebsiella pneumoniae* heterogeneity, detection methods, possible resistance mechanisms, potential therapeutic strategies, and future perspectives are reviewed as follows. By comprehensively analyzing these aspects, this study expects to provide theoretical support for an in-depth understanding of the phenomenon of KP heterogeneous drug resistance and to provide strategic references for coping with such drug-resistant bacteria in clinical treatment.

Keywords

Klebsiella Pneumoniae, Heteroresistance, Antibiotics

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺炎克雷伯菌是临床上频繁遇见的一种革兰氏阴性杆菌，其特征在于拥有较厚的荚膜结构，多数菌株表面附着有菌毛，同时缺乏芽孢与鞭毛结构，分类上隶属于克雷伯菌属，并进一步归属于肠杆菌科范畴。它是寄生于人和动物皮肤、呼吸道、肠道等部位的机会致病菌，致病性较强，常引起呼吸系统、泌尿系统、消化系统等感染[1]，甚至会出现败血症、脑炎等情况，特别是在住院时间较长、入住重症监护病房(ICU)、先前接触过抗菌药物(尤其是碳青霉烯类、喹诺酮类、氨基糖苷类药物以及替加环素)、进行侵入性手术、使用血管内导管、实施气管切开术和过去 90 天内入住 ICU 的情况下更为常见[2]。近年来，由于抗生素被大量且不合理地使用，肺炎克雷伯菌(KP)的耐药性问题愈发严峻。耐药菌株的出现显著增加了患者面临的风险，具体表现为易导致患者发生反复感染以及药物治疗失败的情况。据临床数据显示，耐药菌株感染的患者中，约有 40%至 60%会经历至少一次治疗失败，且这些患者的感染复发率高达 20%至 30%。这种治疗上的挑战不仅使得患者病情迁延不愈，延长了住院时间，还显著增加了患者的经济负担[3]。据统计，耐药菌感染患者的平均医疗费用比非耐药菌感染患者高出约 30%至 50%，这对于患者及其家庭而言，无疑是一个沉重的经济压力。

近些年来，关于 KP 异质性耐药的报道逐渐引起大众关注。鉴于其表型和基因型具有不稳定性，当前

难以进行检测和研究[4]，这给实验室准确检测并报告细菌耐药性以及临床抗感染治疗带来了更大的挑战与困难。以下对 KP 异质性耐药的研究进展进行简要综述，以便为指导临床用药和评估治疗方案提供参考依据。

2. 细菌异质性耐药的定义

1928 年, Alexander Fleming 发现青霉素[5]。自此之后, 抗生素在临床治疗的进程中发挥着至关重要的作用, 抗生素的应用为细菌感染患者的治疗带来了极大的希望与福音。然而, 由于抗生素的广泛应用, 耐药性在抗生素使用中日益凸显, 成为了一个愈发严峻的挑战。多重耐药菌、广泛耐药以及完全耐药细菌的出现, 对公共卫生构成重大威胁[6]。细菌异质性耐药描述了一种现象, 即不同看似相同基因的细菌亚群对同一抗生素表现出不同的敏感性[7]。这种现象首次在 1947 年报道的革兰阴性杆菌流感嗜血杆菌中就被描述[8], 随后发现于 1964 年革兰阳性的葡萄球菌[9], 但“细菌异质性耐药”这一词首次报道使用是在 1970 年[10]。此后, 不断有不同菌株在对不同抗生素的反应中表现出异质性耐药的情况。当前, 由于缺乏检测异质性耐药的标准化方法, 并且对异质性耐药机制的认识尚不充分, 因此, 异质性耐药现象的出现给临床感染病人的治疗带来了一定程度的难题与挑战[11]。

细菌异质性耐药被视为细菌从敏感向耐药进化过程中的一个中间阶段[12], 这种现象在自然界中普遍存在。由于对细菌异质性耐药的认知还不够完备, 目前尚未有统一的异质性耐药判别标准[13]。异质性耐药的宽泛定义是指与主要菌群相比, 有一个或几个亚群的菌株对抗生素表现出更高的耐药性水平[4][13]。当前, 普遍采纳 El-Halfawy 等人[7]所确立的基准作为参照框架, 该基准界定为: 在测试菌株中, 能够鉴别出若干亚群, 这些亚群在耐药性上表现出差异性, 且至少存在一个或多个子群体展现出超越其主要群体耐药水平的特定抗生素抵抗能力, 这一现象尤为显著。然而, 在运用此定义时, 需审慎考量以下几个核心要素: (1) 异质性耐药亚群的克隆性或起源: 异质性耐药亚群的形成有单克隆和多克隆之分。当细菌亚群由不同基因型混合而成, 即耐药克隆株与敏感克隆株同时存在且呈现出不同的抗性水平时, 异质性耐药就属于多克隆。多克隆异质性耐药所产生的耐药性通常较为稳定[14]。而因内部异质性导致的单克隆异质性耐药, 也就是原本敏感的克隆株演变成了异质性耐药, 这种耐药在遗传上稳定性较差, 经过几代之后就会失去这种耐药性[15]。由于多克隆异质耐药的维护成本高, 单克隆异质耐药更为常见[4]。(2) 异质耐药亚群所展现的耐药程度: 具体而言, 是指其最小抑菌浓度(MIC)相较于基础水平的最小增幅倍数。当前, 对于界定异质耐药亚群 MIC 增幅的临界标准, 通常采用 2 倍、4 倍、8 倍或其他特定倍数来量化其耐药水平的差异。主流观点通常认为其 MIC 值至少比不影响主要菌群增长的药物最高浓度高 8 倍[7]。(3) 异质性耐药亚群频率: 此指标旨在量化总体细菌群体中异质性耐药亚群所占的比例。值得注意的是, 不同种类的细菌在面对各类抗生素时, 其异质性耐药的比例存在显著差异。为提升不同异质性耐药研究的可对比性, 建议对最小抑菌浓度(MIC)水平超出主要原始敏感亚群至少 8 倍的耐药亚群出现频率进行报告。目前, 对于单克隆异质性耐药的发生频率, 推荐将阈值确定为不小于 10^{-7} [4]。(4) 异质性耐药亚群的稳定性评估: 可在不存在抗菌药物选择压力的条件下, 采用连续传代培养(通常为 50 代)的方式, 以观察耐药亚群耐药性水平的变化状况。这一评估旨在探究耐药亚群在缺乏外部压力时的遗传稳定性。当处于抗生素压力之下时, 若耐药亚群的耐药性保持恒定不变, 就将其称作稳定的异质性耐药; 反之, 若耐药亚群重新恢复其敏感性, 那么这种异质性耐药就是不稳定的, 被称为不稳定的异质性耐药[16]。

3. 细菌异质性耐药的检测方法

3.1. 异质性耐药的初步检测方法: 纸片扩散(Kirby-Bauer, KB)法和 E-Test (Epsilometer Test) 试纸条法

KB 法和 E-test 法均为异质性耐药的初步筛选手段。这两种方法均依据药物浓度梯度扩散原理而进行

[14]。当耐药菌落在药物抑菌圈或 E-test 试纸条周围的抑制区内生长时(见图 1)，就会被判定为异质性耐药菌株。不过，这两种方法存在一定的局限性，一方面它们都无法进行定量检测，另一方面这两种药敏方法在特异性和灵敏度方面表现较差，在检测结果中，时常会观察到非真实阳性(即假阳性)或非真实阴性(即假阴性)的现象，这影响了结果的准确性[17]。KB 法成本较低廉，操作也较为简单，在特定种属细菌异质性耐药的初步筛选中具有一定的应用价值，所以目前常常被当作一种常规方法。在一项基于 KB 法对临床分离的 2500 株革兰阴性杆菌进行筛选的研究中，异质性耐药菌株有 37 株，占比为 1.48%，其中在头孢他啶纸片筛选试验中有 28 株呈现出异质性耐药，在美罗培南纸片筛选试验中共有 9 株出现了异质性耐药[18]。E-test 法同样具有操作简便的特点，并且还具备能够直接读取 MIC 值这一技术优势，但其缺点在于试纸条价格较为高昂，因此不适合用于常规筛查。

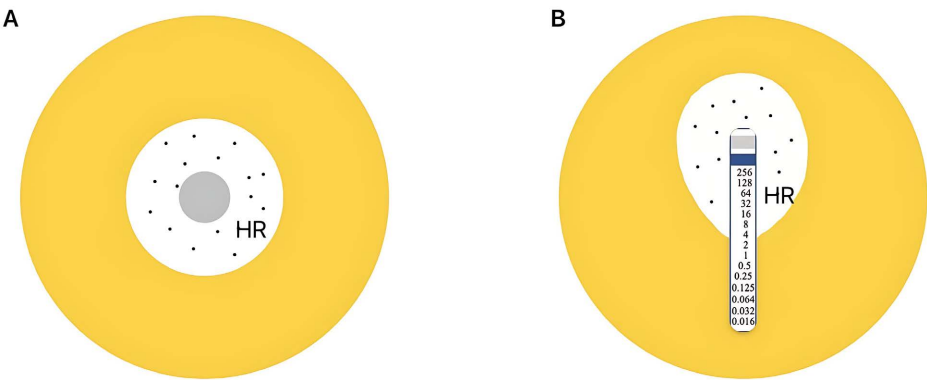


Figure 1. Heterogeneous drug-resistant strains screened by KB method (A) and E-test method (B)
图 1. KB 法(A)和 E-test 法(B)筛选的异质性耐药菌株

3.2. 异质性耐药的确认方法：菌群谱分析(Population Analysis Profile, PAP)方法

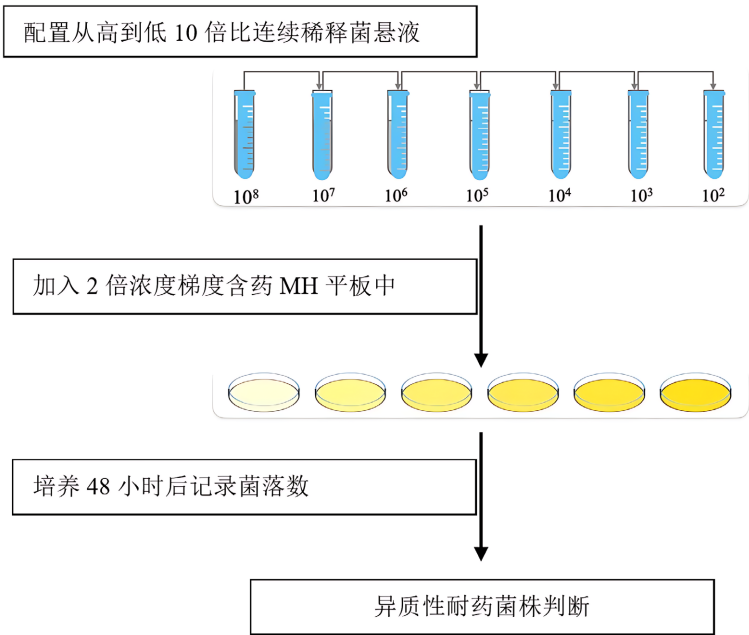


Figure 2. Flow chart of heterogeneous drug-resistant strains identified by PAP method
图 2. PAP 法确定异质性耐药菌株流程图

异质性耐药菌的确定方法是经典的菌群谱分析法, 目前已有多项研究将这种方法确定为检测异质性耐药的金标准[19] [20]。PAP 法的步骤如下: 先配置从高到低呈 10 倍比连续稀释的菌液浓度, 接着将其加入已制备好的 2 倍浓度稀释的含药 MH 平板中, 然后进行涂布并使其干燥, 再放置在 35℃ 的环境下培养 24 小时和 48 小时, 之后对培养基上生长的菌落进行计数, 将此计数视为在多种抗菌剂浓度梯度下耐药亚群出现比例的衡量。当某一异质性细菌亚群能够耐受的最大非抑制性浓度, 与原始细菌群体的最低抑菌浓度相比, 高出至少 8 倍, 并且该亚群的出现频率达到或者超过 1×10^{-7} , 即可判定该细菌群体存在异质性耐药现象[4]。操作流程(见图 2)。

3.3. 其他检测方法

科学家们一直在探寻新的方法来提升异质性耐药的检测效率。其中一种方法便是菌群谱型分析微量滴定(microtitration population analysis profiling, MPAP)方法[17]。它是目前最接近 PAP 法的替代方法。PAP 法是把细菌悬液涂布在抗生素平板上, 而 MPAP 法是将细菌悬液滴定在抗生素平板上。与传统的 PAP 方法相比, MPAP 方法具备更高的成本效益和更便于执行的优点, 不过因为其细菌密度较大, 可能会使假阳性结果增多[4] [17]。

其他用于检测异质性耐药菌株的方法还包括一种先进的技术, 即全基因组测序(Whole-genome sequencing, WGS)技术、第二代测序(Next-generation sequencing, NGS)技术、拉曼光谱技术(Raman spectroscopy, SERS)和微滴式数字 PCR 技术(Droplet Digital PCR, ddPCR)。WGS 是目前在临床分离株耐药亚群检测中越来越常用的一种方法[21]。它属于 NGS 分析的一种类型, 能够对物种的基因组进行测序并对基因组结构进行阐释。WGS 可用于分析重复性高的不同个体之间的多样性[16], 但由于成本高昂且结果复杂, 难以进行常规使用[22] [23]。NGS 是通过对抗性决定区域的扩增片段进行高通量测序来实施的[14]。SERS 技术能够实现直接从样本中分离出的致病菌进行单个细胞的检测, 它能够在不破坏细胞完整性的前提下, 获取单个细胞及其亚细胞水平上的精细化学结构信息。通过结合拉曼成像技术, 该技术能够精确地量化单个细菌在药物作用下的异质性响应, 包括药物在细菌体内的分布格局、动力学变化以及药物与单个细菌间的相互作用细节等。这一能力为深入探究细菌耐药性的演变历程及其潜在机制提供了一个强有力的工具[24]。D.Bauer 等人[25]研发了一种将拉曼光谱技术的抗生素敏感性试验(AST)敏感性与稳定同位素标记相融合的技术, 使该技术超越了耐药或易感的二元选择, 关注到了耐药细菌和敏感细菌之间的灰色区域, 从而实现对异耐药菌的检测。同时依据实验和建模数据, 在 3 小时内就能检测到高表达表型, 且异质性耐药频率可检测到 10^{-6} 。ddPCR 也是一种较为灵敏的检测方法, 它是一种基于泊松分布原理的核酸分子绝对定量技术[26], 能够检测与耐药相关的基因或点突变[27]。为了对幽门螺杆菌对克拉霉素的敏感性进行评估, ddPCR 分析能够同时对克拉霉素敏感和耐药的 23SRNA 等位基因进行定量检测, 还可以对菌株进行表型分析, 通过区分突变型和野生型亚群, 进而捕捉到稀有的异质性耐药单克隆表型[28]。

4. 肺炎克雷伯菌异质性耐药的潜在机制

异质性耐药主要归因于两大作用机理的存在[16]。第一种机制是获得遗传稳定的耐药突变, 这种突变一般发生在多克隆异质性耐药中, 同时伴有较高的适应成本。第二种机制是一个亚群因串联基因扩增致使抗性基因拷贝数增加, 这在单株异源抗病中较为普遍。此外还有其他机制, 如外排泵过度生成和孔蛋白表达减少。随着肺炎克雷伯菌临床检出率的上升, 抗生素耐药的出现严重干扰了治疗进程, 并且已发现肺炎克雷伯菌对美罗培南、多粘菌素、替加环素等几种常用抗生素出现了异质性耐药[14]。

4.1. 对多黏菌素类抗生素的异质性耐药

当前多项研究揭示, 肺炎克雷伯菌(KP)对多黏菌素展现出的异质性耐药现象, 其核心机制与 PhoPQ

双组分调控系统中的 PhoP 蛋白发生突变密切相关[29]。具体而言, PhoP 作为 PhoPQ 系统的重要组件, 负责调控 1-氨基阿拉伯糖的合成路径以及 pmrHFIJKLM 操纵子的转录激活。该操纵子所编码生成的产物, 在 4-氨基-4-脱氧-L-阿拉伯糖胞嘧啶核苷(简称 L-Ara4N)的合成过程中, 扮演着不可或缺的关键角色。L-Ara4N 与磷酸乙醇胺(PEtN)共同作用于脂质 A 部分, 通过添加正电荷来促进细菌对多黏菌素的获得性耐药。值得注意的是, Jayol 等人[30]的研究指出, 肺炎克雷伯菌 PhoP 蛋白上的特定氨基酸变化(即 Asp191 至 Tyr 的替换), 会干扰 PhoP 的正常功能表达, 从而诱导异质性耐药的出现。此外, 在对多黏菌素耐药亚群的深入剖析中, 研究者发现 mgrB 基因发生了突变, 导致翻译过程提前终止, 进而不仅消除了细菌的产黏液表型, 还促成了多黏菌素的耐药现象[31]。mgrB 是一个编码跨膜蛋白的基因, 它作为 PhoPQ 系统的负调节因子, 对 PhoP 的磷酸化起到负向调节作用[32], 它的失活会导致 pmrHFIJKLM 操纵子过表达[33]。此外, mgrB 基因的失活还有可能使细菌生成厚荚膜, 从而保护细菌免受粘菌素的侵害[34]。除了 mgrB 和 phoP 基因常见的变异是引起多黏菌素耐药的关键因素外, 研究还揭示了 yciM 和 lpxM 基因的突变, 以及 PmrAB 双组分调节系统功能的变动, 这些因素均能对肺炎克雷伯菌展现出对多黏菌素的异质性耐药特性起到关键作用。具体而言, 这些基因和调控系统的改变均能在不同程度上影响细菌对多黏菌素的敏感性, 进而促进耐药性的产生和发展。

4.2. 对碳青霉烯类抗生素的异质性耐药

肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素产生耐药的机制与该菌携带的不同耐药基因相关, 主要有四种机制, 分别是: 生成可使碳青霉烯失活的碳青霉烯酶; 外膜孔蛋白基因发生突变或者基因缺失引发外膜通透性改变; 膜外排泵基因上调表达; 抗生素靶向的蛋白质位点发生基因突变。

肺炎克雷伯菌因合成 SHV 型 β -内酰胺酶, 对氨苄西林与阿莫西林展现出固有的耐药性。在采用第三代头孢菌素作为治疗手段后, 细菌会表达出超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)。据相关研究表明, 有约 60% 的细菌在该情况下会出现这一现象, 此现象在医疗环境中颇为普遍。这些产 ESBLs 的细菌往往对多种抗生素产生耐药, 导致治疗困难, 且与较高的致死率紧密相连。例如, 有研究显示, 约 30% 至 50% 的患者因携带表达 ESBLs 的细菌而面临更高的死亡风险。这些患者往往需要更长的住院时间, 接受更多的治疗方案, 但治疗效果往往不佳, 最终导致死亡风险增加。随后, 临床上转用抗菌范围广、活性强且对 ESBLs 具有耐受性的碳青霉烯类抗生素来应对 ESBLs 阳性的肺炎克雷伯菌, 然而这却促使细菌演化出碳青霉烯酶, 进而对碳青霉烯类产生耐药, 并迅速在临床环境中蔓延开来[35]。 β -内酰胺酶作为细菌耐药性的核心因素, 依据其一级结构特征可被划分为 A、B、C、D 四大类别[36], 其中 A、C、D 类均隶属于丝氨酸 β -内酰胺酶家族, 而 B 类则是依赖锌离子的金属 β -内酰胺酶(MBLs)。在临床上具有显著意义的 β -内酰胺酶类别涵盖了 ESBLs、头孢菌素酶(AmpC 酶)及碳青霉烯酶。碳青霉烯酶通过基因的水平转移机制产生, 此酶是耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)耐药性的核心机制。依据 Ambler 分类方法, 碳青霉烯酶能够进一步被划分为 A、B、D 这三个主要类别[37]。在 A 类碳青霉烯酶之中, 以肺炎克雷伯菌所特有的 KPC(肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶)型占据主导地位, 由质粒携带的 blaKPC 基因编码, 并借助 Tn4401 转座子实现传播, 促进了其在不同细菌分离株间的有效转移, 肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药性的主要机制已经得以确立。KPC 酶具备将青霉素类、头孢菌素类、单环 β -内酰胺类以及碳青霉烯类抗生素进行有效分解的能力, 展现出其广泛的降解活性, 且对克拉维酸或他唑巴坦无敏感性, 但可被新型二氮杂二环辛烷(DBO)及硼酸类抑制剂有效抑制。KPC-2 与 KPC-3 亚型在全球范围内广泛分布, 特别是在美国、中国、加拿大、拉丁美洲及部分欧洲国家(例如意大利、希腊)中更为流行; B 类金属 β -内酰胺酶(MBLs)这一酶类族群涵盖了诸如亚胺培南水解酶(IMP)、维罗纳整合子介导的金属 β -内酰胺酶(VIM), 以及新德里金属 β -内酰胺酶(NDM)等多种类型, 这类酶能够水解包括碳青霉烯类在内的大部分 β -内酰胺类抗生素, 但对氨基曲无

作用[38]。在日本、泰国、菲律宾以及澳大利亚等国家,携带有 IMP 基因的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)占据了主导地位[39];而携带 VIM 的肠杆菌科细菌则多见于欧洲,特别是希腊、西班牙、英国及意大利等国。NDM-1 在印度及东南亚地区最为常见。D 类酶,亦称 OXA 酶,其中 OXA-48 亚型在地中海盆地国家,特别是土耳其,占据主导地位[40]。肺炎克雷伯菌细胞外膜的重要组成部分是膜孔蛋白,它们作为水溶性的通道结构,主要由 OmpK35 和 OmpK36 这两种基因负责编码。研究表明,肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制可能与编码外膜孔蛋白 OmpK35 和 OmpK36 的基因发生突变或缺失密切相关[41]。Adams-Sapper 等人[42]的研究揭示,由于 OmpK36 孔蛋白表达减少的 KPC-2 阳性肺炎克雷伯菌菌株,相较于敏感菌株,其对亚胺培南的最小抑菌浓度(MIC)提升了 32 倍。

4.3. 对四环素类抗生素的异质性耐药

四环素类抗生素通过抑制细菌蛋白质合成的生物过程,进而发挥其抗菌效果。替加环素(TGC)是一种创新的甘氨环素衍生物,具体属于含有 9-叔丁基甘氨酸胺基米诺环素的新型类别,主要与细菌核糖体 30S 亚基相结合,阻止氨酰-tRNA 进入核糖体 A 位点,从而通过抑制细菌蛋白质的合成起到抗菌作用[43]。替加环素与四环素是临床常用的四环素类药物。替加环素是治疗耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)感染的“最后防线”[44]。然而,质粒介导的高水平替加环素耐药基因的出现,显著提升了细菌对替加环素的耐药程度,这一现象尤为突出。

药物外排以及核糖体保护是众多革兰氏阴性菌中四环素耐药的主要机制[45]。为解决这一问题,研发出了新的四环素衍生物,其中有半合成的替加环素以及全合成的依拉环素[46]。近些年来,有关替加环素和依拉环素耐药肺炎克雷伯菌分离株数量的报道持续增多[47]。其耐药机制包含外排泵 AcrAB、OqxAB 与 MacAB 的过度表达。acrAB 和 oqxAB 基因的表达受全局转录激活因子(如 RamA、SoxS、MarA)调控,这些激活因子分别由其转录抑制因子 RamR、SoxR、MarR 控制[47] [48]。替加环素和依拉环素的耐药情况也是因核糖体蛋白 S10 (由 rpsJ 基因进行编码)发生突变所导致的,这种突变阻止了抗生素与小的 30S 核糖体亚基相结合[46]。

截至目前,多种机制致使异质耐药亚群中出现替加环素耐药性,具体包括:(1)acrAB 外排泵基因过度表达;(2)ramR 基因突变,使得 RamA 上调并产生 AcrAB-TolC 外排泵;(3)soxR 基因突变,导致 SoxS 过表达以及 AcrAB-TolC 上调;(4)编码核糖体 S10 蛋白的 rpsJ 基因中出现核苷酸插入和移码。这些基因变异有可能会削弱替加环素与核糖体 16SrRNA 之间的相互作用。其他研究结果显示,依拉环素异质耐药或许是由 OqxAB 和 MacAB 外排泵以及转录调节因子 RamA 过表达所引起[48]。异质耐药的依拉环素菌株来自于未经过替加环素或依拉环素预处理的样品。所以,AcrAB 和 OqxAB 的过表达或许意味着分离株曾暴露于这些泵所转运的其他化合物中。

4.4. 对氨基糖苷类类抗生素的异质性耐药

氨基糖苷类修饰酶(aminoglycoside-modifying enzyme, AMEs)以及 16S 核糖体 RNA 甲基转移酶(armA、rmtA、rmtB、rmtC、rmtD、rmtE 和 npmA)是肺炎克雷伯菌对氨基糖苷类抗生素产生耐药的主要原因[49]。AMEs (即氨基糖苷类修饰酶)涵盖了一系列酶类,包括但不限于 N-乙酰基转移酶、O-核苷酰基转移酶以及 O-磷酸化酶,它们通过共价结合的方式,对氨基糖苷类抗生素分子中的特定氨基基团或羟基官能团进行化学修饰。

KP 分离株的氨基糖苷类异质性耐药主要是由于质粒上携带的编码氨基糖苷类乙酰转移酶(aac)的 AMEs 基因发生扩增所致。在庆大霉素、妥布霉素或奈替米星存在的情况下,每个质粒的质粒拷贝数以及 aac 拷贝数都会增加。耐药表型并不稳定,在没有抗生素压力的情况下经过 40 代后,aac 拷贝数和质

粒拷贝数会减少,甚至会出现质粒丢失的情况,从而使 MIC 值恢复到亲本分离株的 MIC 值。阿米卡星耐药亚群存在 *ubiJ* 和 *cydA* 基因突变,这与小菌落变异表型或氨基糖苷类耐药性有关。在没有阿米卡星的生长过程中,会选择代偿性的点突变或重复(*ubiJ*),使得阿米卡星对恢复子恢复敏感性。在没有选择性压力的情况下,恢复对氨基糖苷类药物的敏感性[17]。研究还发现,阿米卡星异质耐药可能与 *aac* 基因的不稳定过度表达以及参与包括碳水化合物摄取和染色体分离等各种生理过程的蛋白质编码基因中的几种突变(SNVs,单核苷酸变异)有关[50]。

4.5. 对磷霉素类抗生素的异质性耐药

KP 对磷霉素出现异质性耐药的产生机制为,在耐药亚群中,磷霉素靶酶 MurA 的活性位点,尤其是磷霉素结合位点发生突变,包括周边氨基酸发生替换,这造成了磷霉素摄取系统出现缺陷,同时还存在磷霉素耐药基因 MurA 过度表达的情况[51],从而引起异质性耐药。

5. 肺炎克雷伯菌异质性耐药的治疗策略

最近的研究成果显示,多种抗生素联合使用或许是治疗具有异质性耐药的 KP 感染的一种有效手段。Cheong 等人[52]发现,美罗培南与黏菌素联合使用或许可作为黏菌素异质耐药 KP 感染的一种治疗选择。仅使用美罗培南就能根除异质性耐药分离株,而美罗培南与黏菌素联合使用的疗效更为显著。Tian 等人[53]对多黏菌素 B 和替加环素联合作用于具有双重异质性耐药的 KP 分离株进行了研究。正如所料,抗生素单药治疗(多黏菌素 B 或替加环素)会产生短暂的抑制效果,这是因为易感细菌被杀死了,但耐药亚群并未被清除。多黏菌素 B 与替加环素联合使用能够成功地根除易感和耐药亚群。在另外的研究探索中,采用头孢他啶与阿维巴坦(一种 β -内酰胺类抗生素与 β -内酰胺酶抑制剂的组合法)联合使用,显著增强了多黏菌素 B 对携带有异质性耐药碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌(KP)分离株的治疗效果,并且抑制了体外多黏菌素耐药亚群的出现[54]。Band 等人[55]针对黏菌素和磷霉素异质性耐药的 KP 分离株进行了不同抗生素组合的研究。研究结果表明,黏菌素和磷霉素单药治疗无法抑制小鼠感染,然而两种药物联合使用却能显著降低细菌水平。还有一种菌株对黏菌素完全耐药,且对磷霉素和头孢他啶呈现异质耐药性。只有磷霉素和头孢他啶进行双重治疗才能根除感染,而与黏菌素的任何联合治疗(黏菌素 + 磷霉素或黏菌素 + 头孢他啶)都没有效果。这些结果显示,多药治疗应当使用针对不同异耐药亚群的抗生素,而非针对单一耐药群体的抗生素。

6. 结论和未来展望

近年来,众多研究揭示了异质性耐药现象在多种细菌针对多种抗生素的反应中广泛存在。然而,迄今为止,异质性耐药依旧缺乏统一、明确的定义以及行之有效的检测手段,这在很大程度上阻碍了对其进行深入探究的进程。异质性耐药的机制极为复杂,不同种类的细菌对于同一种抗生素的异质性耐药机制有着显著差异,即使是同一种细菌在应对同一种抗生素时,其异质性耐药机制也可能完全不同。当前,在筛查异质性耐药表型方面,常用的实验方法有 K-B 纸片扩散法、E-test 等。不过,这些方法存在耗时较长、重复性欠佳的问题,对异质性耐药菌株的检测精准度往往难以达到预期要求,难以为临床用药提供及时且精确的指导。尽管 PAP 法被看作是评估异质性耐药的黄金标准,然而,因其操作过程耗时又繁杂,所以在临床实践中的应用比较少,通常仅仅在特定的临床病例确认中才会被使用。若无法及时发现并有效控制异质性耐药菌株,其最终可能演变为完全耐药状态,进而对临床用药的选择及治疗效果产生严重影响。因此,异质性耐药已成为临床抗感染治疗领域的一大严峻挑战。所以,建立规范化、快速的异质性耐药实验室检测技术以及规范合理应用抗生素刻不容缓,同时还需深入探究 KP 异质性耐药的机制,

以防止 KP 异质性耐药菌的感染和传播。

致谢

作者感谢匿名审稿人的建设性意见，感谢安徽医科大学第一附属医院的合作。

参考文献

- [1] Lee, C., Lee, J.H., Park, K.S., Jeon, J.H., Kim, Y.B., Cha, C., *et al.* (2017) Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, Article 483. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>
- [2] Lou, T., Du, X., Zhang, P., Shi, Q., Han, X., Lan, P., *et al.* (2022) Risk Factors for Infection and Mortality Caused by Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Large Multicentre Case-Control and Cohort Study. *Journal of Infection*, **84**, 637-647. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.03.010>
- [3] Zhen, X., Stålsby Lundborg, C., Sun, X., Gu, S. and Dong, H. (2020) Clinical and Economic Burden of Carbapenem-Resistant Infection or Colonization Caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*: A Multicenter Study in China. *Antibiotics*, **9**, Article 514. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080514>
- [4] Andersson, D.I., Nicoloff, H. and Hjort, K. (2019) Mechanisms and Clinical Relevance of Bacterial Heteroresistance. *Nature Reviews Microbiology*, **17**, 479-496. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0218-1>
- [5] Fleming, A. (2001) On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzae. *Bulletin of the World Health Organization*, **79**, 780-790.
- [6] Liu, L., Zhao, M., Tang, Y., Shen, A., Yang, X., Yao, L., *et al.* (2024) Dissemination of Clinical *Escherichia coli* Strains Harboring *mcr-1*, *bla*_{NDM-7} and Siderophore-Producing Plasmids in a Chinese Hospital. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, **13**, Article No. 66. <https://doi.org/10.1186/s13756-024-01423-3>
- [7] El-Halfawy, O.M. and Valvano, M.A. (2015) Antimicrobial Heteroresistance: An Emerging Field in Need of Clarity. *Clinical Microbiology Reviews*, **28**, 191-207. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-14>
- [8] Alexander, H.E. and Leidy, G. (1947) Mode of Action of Streptomycin on Type b Hemophilus Influenzae: II. Nature of Resistant Variants. *Journal of Experimental Medicine*, **85**, 607-621. <https://doi.org/10.1084/jem.85.6.607>
- [9] Sutherland, R. and Rolinson, G.N. (1964) Characteristics of Methicillin-Resistant Staphylococci. *Journal of Bacteriology*, **87**, 887-899. <https://doi.org/10.1128/jb.87.4.887-899.1964>
- [10] Kayser, F.H., Benner, E.J. and Hoeprich, P.D. (1970) Acquired and Native Resistance of *Staphylococcus aureus* to Cephalixin and Other β -Lactam Antibiotics. *Applied Microbiology*, **20**, 1-5. <https://doi.org/10.1128/am.20.1.1-5.1970>
- [11] Qin, J., Wu, N., Bao, J., Shi, X., Ou, H., Ye, S., *et al.* (2021) Heterogeneous *Klebsiella pneumoniae* Co-Infections Complicate Personalized Bacteriophage Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, Article 608402. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608402>
- [12] 傅豪, 罗琦霞, 肖永红. 多黏菌素异质性耐药的研究进展及临床意义[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(11): 1103-1108.
- [13] Falagas, M.E., Makris, G.C., Dimopoulos, G. and Matthaiou, D.K. (2008) Heteroresistance: A Concern of Increasing Clinical Significance? *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, 101-104. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01912.x>
- [14] Lin, J.Y., Zhu, Z.C., Zhu, J., Chen, L. and Du, H. (2024) Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*: Definition, Detection Methods, Mechanisms, and Combination Therapy. *Microbiological Research*, **283**, Article ID: 127701. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127701>
- [15] Dewachter, L., Fauvart, M. and Michiels, J. (2019) Bacterial Heterogeneity and Antibiotic Survival: Understanding and Combatting Persistence and Heteroresistance. *Molecular Cell*, **76**, 255-267. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.028>
- [16] Pereira, C., Larsson, J., Hjort, K., Elf, J. and Andersson, D.I. (2021) The Highly Dynamic Nature of Bacterial Heteroresistance Impairs Its Clinical Detection. *Communications Biology*, **4**, Article No. 521. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02052-x>
- [17] Nicoloff, H., Hjort, K., Levin, B.R. and Andersson, D.I. (2019) The High Prevalence of Antibiotic Heteroresistance in Pathogenic Bacteria Is Mainly Caused by Gene Amplification. *Nature Microbiology*, **4**, 504-514. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0342-0>
- [18] 岑珂, 裘春宁, 徐丽慧, 等. 基于 K-B 法筛选异质性耐药菌株及其对抗菌药物敏感试验结果的影响[J]. 中国微生物学杂志, 2019, 31(4): 466-470.

- [19] Zhang, Q., Lin, L., Pan, Y. and Chen, J. (2021) Characterization of Tigecycline-Heteroresistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from a Chinese Tertiary Care Teaching Hospital. *Frontiers in Microbiology*, **12**, Article 671153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671153>
- [20] Wootton, M. (2001) A Modified Population Analysis Profile (PAP) Method to Detect Hetero-Resistance to Vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK Hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47**, 399-403. <https://doi.org/10.1093/jac/47.4.399>
- [21] Operario, D.J., Koepfel, A.F., Turner, S.D., Bao, Y., Pholwat, S., Banu, S., et al. (2017) Prevalence and Extent of Heteroresistance by Next Generation Sequencing of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *PLOS ONE*, **12**, e0176522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176522>
- [22] Wang, Z., Ke, J., Guo, Z., Wang, Y., Lei, K., Wang, S., et al. (2024) Transposase-Assisted Tagmentation: An Economical and Scalable Strategy for Single-Worm Whole-Genome Sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **14**, jkae094. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkae094>
- [23] Scheutz, F., Nielsen, C.H. and von Mentzer, A. (2024) Construction of the ETECFinder Database for the Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Revision of the VirulenceFinder Web Tool at the CGE Website. *Journal of Clinical Microbiology*, **62**, e00570-23. <https://doi.org/10.1128/jcm.00570-23>
- [24] Schuster, K.C., Reese, I., Urlaub, E., Gapes, J.R. and Lendl, B. (2000) Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. *Analytical Chemistry*, **72**, 5529-5534. <https://doi.org/10.1021/ac000718x>
- [25] Bauer, D., Wieland, K., Qiu, L., Neumann-Cip, A., Magistro, G., Stief, C., et al. (2020) Heteroresistant Bacteria Detected by an Extended Raman-Based Antibiotic Susceptibility Test. *Analytical Chemistry*, **92**, 8722-8731. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05387>
- [26] 姜羽, 胡佳莹, 杨立桃. 利用微滴数字 PCR 分析转基因生物外源基因拷贝数[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(10): 1298-1305.
- [27] Dai, Y., Li, C., Yi, J., Qin, Q., Liu, B. and Qiao, L. (2020) Plasmonic Colloidosome-Coupled MALDI-TOF MS for Bacterial Heteroresistance Study at Single-Cell Level. *Analytical Chemistry*, **92**, 8051-8057. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00494>
- [28] Sun, L., Talarico, S., Yao, L., He, L., Self, S., You, Y., et al. (2018) Droplet Digital PCR-Based Detection of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates Reveals Frequent Heteroresistance. *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e00019-18. <https://doi.org/10.1128/jcm.00019-18>
- [29] Falagas, M.E., Rafailidis, P.I. and Matthaïou, D.K. (2010) Resistance to Polymyxins: Mechanisms, Frequency and Treatment Options. *Drug Resistance Updates*, **13**, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.05.002>
- [30] Jayol, A., Nordmann, P., Brink, A. and Poirel, L. (2015) Heteroresistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Alterations in the PhoPQ Regulatory System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**, 2780-2784. <https://doi.org/10.1128/aac.05055-14>
- [31] Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M., Ozdamar, M., Turkoglu, S., et al. (2014) The *mgrB* Gene as a Key Target for Acquired Resistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**, 75-80. <https://doi.org/10.1093/jac/dku323>
- [32] Yap, P.S., Cheng, W., Chang, S., Lim, S.E. and Lai, K. (2022) *MgrB* Mutations and Altered Cell Permeability in Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Cells*, **11**, Article 2995. <https://doi.org/10.3390/cells11192995>
- [33] Morales-León, F., Lima, C.A., González-Rocha, G., Opazo-Capurro, A. and Bello-Toledo, H. (2020) Colistin Heteroresistance among Extended Spectrum β -Lactamases-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, **8**, Article 1279. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091279>
- [34] Formosa, C., Herold, M., Vidaillac, C., Duval, R.E. and Dague, E. (2015) Unravelling of a Mechanism of Resistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae* Using Atomic Force Microscopy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**, 2261-2270. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv118>
- [35] Arato, V., Raso, M.M., Gasperini, G., Berlanda Scorza, F. and Micoli, F. (2021) Prophylaxis and Treatment against *Klebsiella pneumoniae*: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 4042. <https://doi.org/10.3390/ijms22084042>
- [36] Karaïskos, I., Galani, I., Papoutsaki, V., Galani, L. and Giamarellou, H. (2021) Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae*: Implication on Future Therapeutic Strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **20**, 53-69. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1935237>
- [37] Queenan, A.M. and Bush, K. (2007) Carbapenemases: The Versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, **20**, 440-458. <https://doi.org/10.1128/cmr.00001-07>
- [38] Bush, K. and Bradford, P.A. (2019) Interplay between β -Lactamases and New β -Lactamase Inhibitors. *Nature Reviews*

- Microbiology*, **17**, 295-306. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>
- [39] Matsumura, Y., Peirano, G., Devinney, R., Bradford, P.A., Motyl, M.R., Adams, M.D., *et al.* (2017) Genomic Epidemiology of Global VIM-Producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **72**, 2249-2258. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx148>
- [40] Bouza, E. (2021) The Role of New Carbapenem Combinations in the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **76**, iv38-iv45. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab353>
- [41] Sugawara, E., Kojima, S. and Nikaido, H. (2016) *Klebsiella pneumoniae* Major Porins OmpK35 and OmpK36 Allow More Efficient Diffusion of β -Lactams than Their *Escherichia coli* Homologs OmpF and OmpC. *Journal of Bacteriology*, **198**, 3200-3208. <https://doi.org/10.1128/jb.00590-16>
- [42] Adams-Sapper, S., Nolen, S., Donzelli, G.F., Lal, M., Chen, K., Justo da Silva, L.H., *et al.* (2015) Rapid Induction of High-Level Carbapenem Resistance in Heteroresistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**, 3281-3289. <https://doi.org/10.1128/aac.05100-14>
- [43] Tasina, E., Haidich, A., Kokkali, S. and Arvanitidou, M. (2011) Efficacy and Safety of Tigecycline for the Treatment of Infectious Diseases: A Meta-Analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, **11**, 834-844. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70177-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70177-3)
- [44] Xu, L., Zhou, Y., Niu, S., Liu, Z., Zou, Y., Yang, Y., *et al.* (2022) A Novel Inhibitor of Monooxygenase Reversed the Activity of Tetracyclines against Tet(X3)/Tet(X4)-Positive Bacteria. *eBioMedicine*, **78**, Article ID: 103943. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103943>
- [45] Stojowska-Swędryńska, K., Łupkowska, A., Kuczyńska-Wiśnik, D. and Laskowska, E. (2021) Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 449. <https://doi.org/10.3390/ijms23010449>
- [46] Grossman, T.H. (2016) Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6**, a025387. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- [47] Bialek-Davenet, S., Lavigne, J., Guyot, K., Mayer, N., Tournebise, R., Brisse, S., *et al.* (2014) Differential Contribution of AcrAB and OqxAB Efflux Pumps to Multidrug Resistance and Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**, 81-88. <https://doi.org/10.1093/jac/dku340>
- [48] Zheng, J., Lin, Z., Sun, X., Lin, W., Chen, Z., Wu, Y., *et al.* (2018) Overexpression of OqxAB and MacAB Efflux Pumps Contributes to Eravacycline Resistance and Heteroresistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, **7**, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0141-y>
- [49] Liang, C., Xing, B., Yang, X., *et al.* (2015) Molecular Epidemiology of Aminoglycosides Resistance on *Klebsiella pneumoniae* in a Hospital in China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 1381-1385.
- [50] Zhang, F., Li, Q., Bai, J., Ding, M., Yan, X., Wang, G., *et al.* (2021) Heteroresistance to Amikacin in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Frontiers in Microbiology*, **12**, Article 682239. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682239>
- [51] 张菲阳, 周英顺. 临床常见革兰阴性菌异质性耐药研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(5): 520-524.
- [52] Cheong, H.S., Kim, S.Y., Wi, Y.M., Peck, K.R. and Ko, K.S. (2019) Colistin Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Diverse Mutations of PmrAB and PhoPQ in Resistant Subpopulations. *Journal of Clinical Medicine*, **8**, Article 1444. <https://doi.org/10.3390/jcm8091444>
- [53] Tian, Y., Zhang, Q., Wen, L. and Chen, J. (2021) Combined Effect of Polymyxin B and Tigecycline to Overcome Heteroresistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, **9**, 00152-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00152-21>
- [54] Ma, X., He, Y., Yu, X., Cai, Y., Zeng, J., Cai, R., *et al.* (2019) 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*. *Frontiers in Microbiology*, **10**, Article 2029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02029>
- [55] Band, V.I., Hufnagel, D.A., Jaggavarapu, S., Sherman, E.X., Wozniak, J.E., Satola, S.W., *et al.* (2019) Antibiotic Combinations That Exploit Heteroresistance to Multiple Drugs Effectively Control Infection. *Nature Microbiology*, **4**, 1627-1635. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0480-z>