

铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素异质性耐药研究

张亚会^{1,2}, 李文茹², 廖康³, 黄旭斌⁴, 张月星¹, 谢小保^{*2}

1 浙江海洋大学, 浙江 舟山 316022

2 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 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

3 中山大学附属第一医院医学检验科, 广东 广州 510080

4 中山大学附属第一医院呼吸与危重症医学科, 广东 广州 510080

张亚会, 李文茹, 廖康, 黄旭斌, 张月星, 谢小保. 铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素异质性耐药研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1786-1798

Zhang Yahui, Li Wenru, Liao Kang, Huang Xubin, Zhang Yueying, Xie Xiaobao. Heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa* to penicillins[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1786-1798

摘要:【背景】铜绿假单胞菌是临床上常见的条件致病菌, 其异质性耐药的发生常导致临床治疗失败。【目的】研究铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素的异质性耐药情况, 为相关临床感染治疗提供一定的依据。【方法】收集临床分离的 50 株铜绿假单胞菌, 采用纸片扩散法(disk diffusion method)即 Kirby-Bauer (K-B)法、菌落谱型分析(population analysis profile, PAP)法、生长实验以及传代稳定性实验探究铜绿假单胞菌的异质性耐药特征。【结果】K-B 法初筛得到铜绿假单胞菌对哌拉西林(piperacillin, PIP)、哌拉西林/他唑巴坦(piperacillin/tazobactam, TZP)和替卡西林/克拉维酸(ticarcillin/clavulanic acid, TIM)的异质性耐药率分别为 52%、52%和 54%。PAP 实验确认后有 13 株异质性耐药菌, 其检出率占总实验菌株的 26%。随机选取 8 株异质性耐药菌株, 其耐药亚群的发生频率为 7.3×10^{-7} – 1.2×10^{-5} 。通过无抗生素压力的生长实验发现, 异质性耐药菌株 PAS92、PAS57 与其各自的 3 株最高 PIP 浓度平板上的耐药亚群的生长速度均差异无统计学意义($P > 0.05$), 但 PAS92 抑菌圈内的耐药亚群比 PAS92 的生长速度快(8–12 h), 有极显著差异($P = 0.0022 < 0.01$)。抑菌圈内不同耐药水平的耐药亚群及从 PAP 实验中最高 PIP 浓度平板上挑取的高水平耐药亚群在无抗生素压力下传代培养, 发现仅有一株耐药亚群不稳定且恢复到原始菌株的药物敏感水平, 其他菌株耐药稳定性良好。【结论】铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素的异质性耐药率相对偏低, 但异质性耐药亚群的发生频率较高, 而且对哌拉西林的耐药水平较高, 大多耐药亚群传代稳定性良好。

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2021A1515011080, 2020A1515010850)

Supported by: Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2021A1515011080, 2020A1515010850)

*Corresponding author: E-mail: xiaobaoxie@126.com

Received: 2021-08-03; Accepted: 2021-09-17; Published online: 2022-01-18

因此在使用该类抗生素治疗时应更加注意异质性耐药现象的发生, 防止更高水平耐药菌的出现而导致治疗失败。

关键词: 铜绿假单胞菌; 异质性耐药; 青霉素类抗生素

Heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa* to penicillins

ZHANG Yahui^{1,2}, LI Wenru², LIAO Kang³, HUANG Xubin⁴, ZHANG Yuexing¹, XIE Xiaobao^{*2}

1 Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 Department of Clinical Microbiology Laboratory, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

4 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Abstract: **[Background]** *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is a common opportunistic pathogen in clinical practice, and its heteroresistance often leads to failure of clinical treatment. **[Objective]** To study the heteroresistance of PA to penicillins, and to provide a basis for the treatment of related clinical infections. **[Methods]** We collected 50 clinical isolates of PA and investigated their heteroresistance characteristics by using disk diffusion method (Kirby-Bauer (K-B) test), population analysis profile (PAP), growth assay and passage stability test. **[Results]** According to the preliminary screening results obtained with K-B test, 52%, 52%, and 54% of the PA isolates had heteroresistance to piperacillin (PIP), piperacillin/tazobactam (TZP) and ticarcillin/clavulanic acid (TIM), respectively. Thirteen (26%) strains were confirmed to have heteroresistance by PAP. Eight heteroresistant strains were randomly selected, and the frequency of resistant subpopulations ranged from 7.3×10^{-7} to 1.2×10^{-5} . Without antibiotic pressure, the heteroresistant strains PAS92 and PAS57 and their three subpopulations on the plates with the highest PIP concentration showed no statistical difference in growth rate ($P > 0.05$), while the growth of the subpopulations in the inhibition zone of PAS92 was faster than that of PAS92 within 8–12 h ($P = 0.002$ $2 < 0.01$). The subpopulations with different levels of resistance in the inhibition zone and those with high levels of resistance selected from the plates with the highest PIP concentration in PAP were subcultured without antibiotic pressure. Only one of the subpopulations was found to be unstable and returned to the sensitivity level of the original strain, while the others had good stability of resistance. **[Conclusion]** In this study, PA isolates show low heteroresistance ratio while high frequency of resistant subpopulations to penicillins. Besides, they have high heteroresistance to PIP, and most of the resistant subpopulations had good passage stability. Therefore, when using this type of antibiotics, attention should be paid to the occurrence of heteroresistance to prevent the emergence of strains with higher drug-resistance from causing treatment failure.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; heteroresistance; penicillins

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属非发酵革兰氏阴性杆菌,是医院内感染的主要条件致病菌,广泛分布于自然界,主要存在于土壤、空气和水体中,是动植物和人体微生物菌群成员之一。该菌在有机体健康条件下不表现出致病性,但是在人体免疫力低下、严重受创或体外治疗操作、囊性肺纤维化、恶性肿瘤化疗、放疗及长期使用广谱抗菌药物时,极易引发感染^[1]。针对铜绿假单胞菌感染,常用的抗菌药物主要有 β -内酰胺类(如青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类等)、氨基糖苷类和氟喹诺酮类等,其中 β -内酰胺类抗菌药物是治疗铜绿假单胞菌感染的首选抗生素。然而随着抗生素的广泛使用和大量滥用,铜绿假单胞菌对这类抗生素的耐药性也在不断增强^[2-3],其耐药情况也越来越严重,甚至出现了多重耐药和泛耐药情况,给临床治疗带来了很大的困难。

哌拉西林是青霉素类中活性最强的抗铜绿假单胞菌的药物,是一种广谱半合成青霉素,在痰液、肺组织、腹腔渗液及胆汁中的分布良好。在抗假单胞菌青霉素及相应的酶抑制剂复合物中,以哌拉西林/他唑巴坦最常用^[4]。研究显示^[5],在多类抗生素对铜绿假单胞菌的敏感实验中,哌拉西林抗铜绿假单胞菌的敏感性是最高的,达到了89.70%,如果联合 β -内酰胺酶抑制剂他唑巴坦则可提高到94.10%。Gniadkowski等^[6]对多个城市的医院内674株PA对12种抗生素的耐药性分析发现,PA对亚胺培南(imipenem, IPM)、哌拉西林(piperacillin, PIP)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)等抗生素较敏感,而对其他抗生素的耐药性较强。

在细菌与抗菌药物的不断抗衡中,还出现了一种耐药形式——异质性耐药(heteroresistance, HR)。异质性耐药常常干扰临床抗菌药物的敏

感性,导致实验室不能给临床正确的药敏信息,引起感染复发和治疗失败,给临床诊断和抗感染治疗带来诸多困惑。异质性耐药现象最早报道于1947年^[7],但在1970年^[8]“异质性耐药”一词才首次出现。目前一般认可同一株细菌分离株遗传学上同源的不同亚群表现出对某种抗生素药物敏感性各不相同的耐药现象,而且当细菌耐药亚群比原细菌亚群的MIC值高8倍时,称之为“异质性耐药”。同时,细菌亚群的发生频率及细菌耐药亚群的稳定性等都是判断异质性耐药的重要因素^[9]。尽管早在1986年已有铜绿假单胞菌对环丙沙星异质性耐药的报道^[10],但对于铜绿假单胞菌的异质性耐药的研究仍相对较少,其机制尚不明确。目前关于铜绿假单胞菌异质性耐药的报道相对较多的也仅限于碳青霉烯类^[11-13]和多黏菌素B^[14],暂未见到铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素异质性耐药的报道。本研究以临床上分离的多株铜绿假单胞菌为研究对象,探索铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素异质性耐药的情况及其机制,以期为临床上铜绿假单胞菌感染的治疗提供有效的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

实验菌株为中山大学附属第一医院临床分离的50株铜绿假单胞菌。质控菌株为铜绿假单胞菌ATCC 27853,由广东省科学院微生物分析检测中心保存。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

K-B药敏纸片:哌拉西林(PIP: 100 μ g)、哌拉西林/他唑巴坦(piperacillin/tazobactam, TZP: 100/10 μ g)、替卡西林/克拉维酸(ticarcillin/clavulanic acid, TIM: 75/10 μ g),北京天坛药

物生物技术开发公司; 哌拉西林粉剂, 北京瑞达恒辉科技发展有限公司。

紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 多功能酶标仪, Tecan Spark 公司。

水解酪蛋白胨琼脂培养基、LB 肉汤培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; Mueller-Hinton (MH) 肉汤(阳离子调节)培养基, 北京酷来搏科技有限公司; 哥伦比亚血平板, 广州市左克科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及保存

所有实验菌株均经 Vitek2 Compact 全自动微生物鉴定系统鉴定。实验菌株采用甘油管保藏法, 即实验菌株接种于 LB 肉汤培养基中, 于 37 °C、180 r/min 恒温摇床培养过夜, 含菌液的 LB 肉汤与 50% 的甘油按照 1:1 的比例混合, 甘油管置于 -80 °C 冰箱进行保存。

1.2.2 纸片扩散法

纸片扩散法的操作按照《全国临床检验操作规程》第 4 版^[15]进行。细菌浓度用麦氏比浊法测定, 将菌悬液浓度调整为 0.5 麦氏比浊标准, 此时菌悬液浓度约为 $(1-2) \times 10^8$ CFU/mL。以上述菌液浓度接种, 37 °C 孵育 16-18 h。根据临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2019 版^[16]进行结果判读。同时观察抑菌圈内是否有菌落生长的情况, 将抑菌圈内有菌落生长的菌株判读为所贴药敏纸片的异质性耐药菌株, 否则不是异质性耐药菌株。本实验用到的参考质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。另外, 补充纸片扩散法药敏实验探究菌液浓度对异质性耐药检测的影响, 菌液浓度设定为 1×10^8 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL 进行比较。

1.2.3 微量肉汤稀释法

哌拉西林对铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度

按照标准微量肉汤稀释法检测^[16]完成。现配浓度为 1 024 μ g/mL 的 PIP 溶液, 过滤除菌后用新鲜配制的 Mueller-Hinton (MH) 肉汤(阳离子调节)对倍稀释, 配制成 2 倍浓度梯度的抗生素工作液(2-1 024 μ g/mL), 共计 10 个浓度梯度。细菌接种浓度为 5×10^6 CFU/mL, 在 96 孔板中依次加入 100 μ L 上述梯度的抗生素工作液, 再分别加入 10 μ L 菌悬液, 细菌接种终浓度约为 5×10^5 CFU/mL。只加菌液不加抗生素工作液作为阳性对照, 只加空白肉汤不加入菌液作为阴性对照。每个抗生素浓度及阳性、阴性对照均做 3 组重复。37 °C 孵育 16-20 h 后读取结果。参考质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。根据 CLSI 指南推荐折点判读结果, 以完全抑制细菌生长所在孔的最低抗生素浓度作为该菌株的 MIC。阳性对照孔细菌正常生长, 阴性对照孔没有细菌生长, 参考质控菌株的抗生素 MIC 结果在 CLSI 指南要求范围内。实验重复 3 次。

1.2.4 菌落谱型分析(population analysis profile, PAP)

菌落谱型分析法是一种菌落计数的相对定量方法, 也被认为是异质性耐药确证的金标准^[17]。配制 2-256 μ g/mL 共 8 个倍比稀释浓度含 PIP 的 MH 平板。将细菌浓度调整为 1×10^8 CFU/mL, 然后进行 10 倍梯度稀释, 依次得到 10^7-10^2 CFU/mL 的菌悬液。吸取 100 μ L 菌液均匀涂布于 PAP 梯度抗生素平板, 依次完成不同浓度抗生素平板及空白对照平板的细菌接种, 每个平板做 3 组重复。37 °C 孵育 48 h 后菌落计数, 并使用 GraphPad Prism 软件将菌落数量与 PIP 浓度作图, 若最低抑菌浓度与最高不抑菌浓度比值大于 8, 则确认为 HR。对照菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和耐药铜绿假单胞菌 PAS90。

1.2.5 生长实验

生长实验主要检测细菌生长曲线特征^[18]。本实验主要是为了观察原始菌株和异质性耐药亚克隆(PAP实验、K-B药敏纸片实验中分别挑选)在相同的培养条件下生长速度有无显著差异,来鉴别异质性耐药亚群是否存在延迟生长现象。

将细菌接种到新鲜配制的LB肉汤中,37 °C、180 r/min 恒温培养箱孵育过夜。制备浓度为 1×10^7 CFU/mL的菌悬液,吸取10 μ L菌悬液加入每孔含有100 μ L LB肉汤的96孔板中,每组3个重复孔,然后放在全波长吸收光酶标仪上37 °C振荡培养48 h,每小时测定一次 OD_{600} 值。以孵育时间为横坐标,对应时间点的菌液 OD_{600} 值为纵坐标,用GraphPad Prism软件绘制时间生长曲线图,并将耐药亚群与其原始菌株生长对数期的数据进行生物统计学分析,判断生长速度是否有显著差异。本实验质控菌株为铜绿假单胞菌ATCC 27853。实验重复3次。

1.2.6 传代稳定性实验

传代稳定性实验是为了证实哌拉西林异质性耐药亚群在无抗生素作用下能否稳定遗传。用接种环挑取K-B药敏纸片抑菌圈内侧的单个菌落,按照三区划线标准操作接种到血平板

上,重复此过程2周。每次传代菌株分别按照K-B药敏纸片扩散法和标准微量肉汤稀释法完成异质性耐药表型和体外药敏检测,并且在超低温冰箱(-80 °C)保存菌株。另外,挑取PAP实验中最高PIP浓度平板上的耐药亚群,在无抗生素的MH平板上进行传代(50代),并进行传代菌株MIC值的测定。

2 结果与分析

2.1 异质性耐药菌株的初筛

本研究收集了临床上分离出的50株铜绿假单胞菌,通过测量K-B药敏纸片抑菌圈直径大小,检测到50株铜绿假单胞菌分别对PIP、TZP和TIM这3种抗生素药敏纸片的敏感情况(图1)。通过观察抑菌圈内是否有大小不等的菌落生长,初步判定其异质性耐药情况(图2)。PIP的K-B药敏实验结果显示,41株敏感、2株中介、7株耐药,占比分别为82%、4%、14%,初步筛选到26株异质性耐药菌株,占总实验菌株的52%。TZP的K-B药敏实验结果显示,42株敏感、1株中介、7株耐药,占比分别为84%、2%、14%,也初步筛选到26株异质性耐药菌株,占总实验菌株的52%。TIM的K-B药敏实验结果显示,33株敏感、8株中介、9株

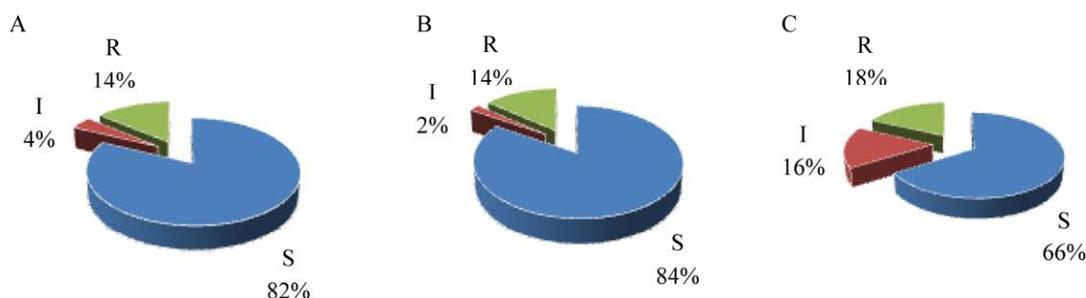


图1 铜绿假单胞菌对PIP(A)、TZP(B)和TIM(C)的药敏情况

Figure 1 Drug susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to PIP (A), TZP (B) and TIM (C).

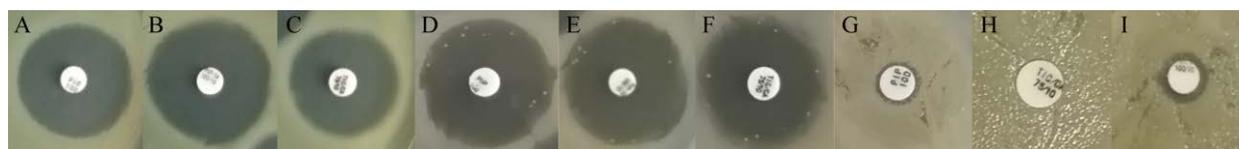


图 2 铜绿假单胞菌对 PIP、TZP 和 TIM 的药敏表型 A、B、C: 敏感型(S); D、E、F: 异质性耐药(HR)表型; G、H、I: 完全耐药(FR)表型

Figure 2 *Pseudomonas aeruginosa* drug susceptibility phenotype to PIP, TZP and TIM. A, B, C: Susceptibility (S); D, E, F: Heteroresistance (HR); G, H, I: Fully resistant (FR).

耐药, 占比分别为 66%、16%、18%, 初步筛选到 27 株异质性耐药菌株, 占总实验菌株的 54%。以上结果可以看出, 实验菌株对 PIP 和 TZP 的敏感性比 TIM 好, 但本次的实验菌株对哌拉西林加酶抑制剂与不加酶抑制剂的敏感性无显著差异。

通过将 1×10^7 CFU/mL 和 1×10^8 CFU/mL 这 2 个不同浓度的菌悬液分别均匀涂布于水解酪蛋白胨琼脂平板上进行 K-B 药敏实验, 观察到涂布浓度为 1×10^8 CFU/mL 菌悬液的 PIP 和 TZP 药敏纸片的抑菌圈内的亚克隆菌落数比涂布浓度为 1×10^7 CFU/mL 菌悬液的多, 在菌悬液浓

度为 1×10^7 CFU/mL 时 TIM 药敏纸片的抑菌圈内无亚克隆菌落, 而在 1×10^8 CFU/mL 时出现了一些亚克隆(图 3)。由此可见, 接种细菌浓度的大小对 K-B 药敏纸片法检测异质性耐药菌株有很大影响, 实验要严格按照纸片扩散法中明确规定的菌液浓度标准(1×10^8 CFU/mL)进行。

2.2 异质性耐药菌株的确认

菌落谱型分析结果验证了抑菌圈内亚克隆生长现象为异质性耐药, 确认 13 株为异质性耐药菌株。从中随机挑选 8 株异质性耐药菌株的菌落谱型分析曲线均在参考菌株 ATCC 27853 和哌拉西林耐药菌株曲线之间(图 4)。随着抗生

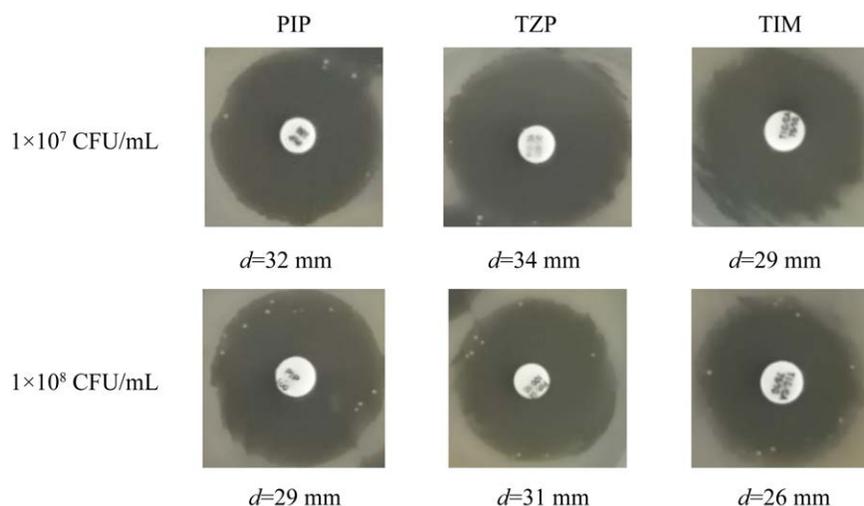


图 3 纸片扩散法检测菌液接种浓度对 PIP、TZP 和 TIM 作用效果的影响

Figure 3 Effect of inoculum size on the activity of PIP, TZP and TIM, determined by disk diffusion.

素浓度的增加, 原始菌株中耐药亚克隆可以在平板上生长的数量逐渐减少, 异质性耐药亚群比原细菌群的最低抑菌浓度均不低于 8 倍。从这 8 株异质性耐药菌株的 MIC 值看, 均对 PIP 表现敏感, 而 PAP 结果显示耐药亚群对 PIP 敏感度各不相同, 少量亚群在 8–16 倍 MIC 值的抗生素平板上仍可以生长。测定在最高浓度 PIP 平板上生长的菌落的 MIC 值与其所在平板的 PIP 浓度进行对比(表 1), 发现 PAS56、PAS57、PAS58、PAS86 和 PAS98 这 5 株有菌落生长的最高 PIP 浓度与其上面生长菌落的 MIC 值一致, 而 PAS84、PAS92 和 PAS97

最高 PIP 浓度平板上菌落的 MIC 值(512、256 和 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均大于所在平板的 PIP 浓度(128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 表明有些异质性耐药原始菌株的耐药亚克隆可以在 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甚至更高的哌拉西林平板上生长, 即产生更高水平的耐药。将抗生素浓度最高的平板上生长的菌落数除以对照(无抗生素)平板上的菌落数, 计算得到本次这 8 株菌株的异质性耐药亚克隆的发生频率为 7.3×10^{-7} – 1.2×10^{-5} 。

生长实验结果显示, 异质性耐药菌株(原始菌) PAS92 与其 3 株 PAP 实验中最高 PIP 浓度平板上的耐药亚群的生长速率(4–12 h)均无

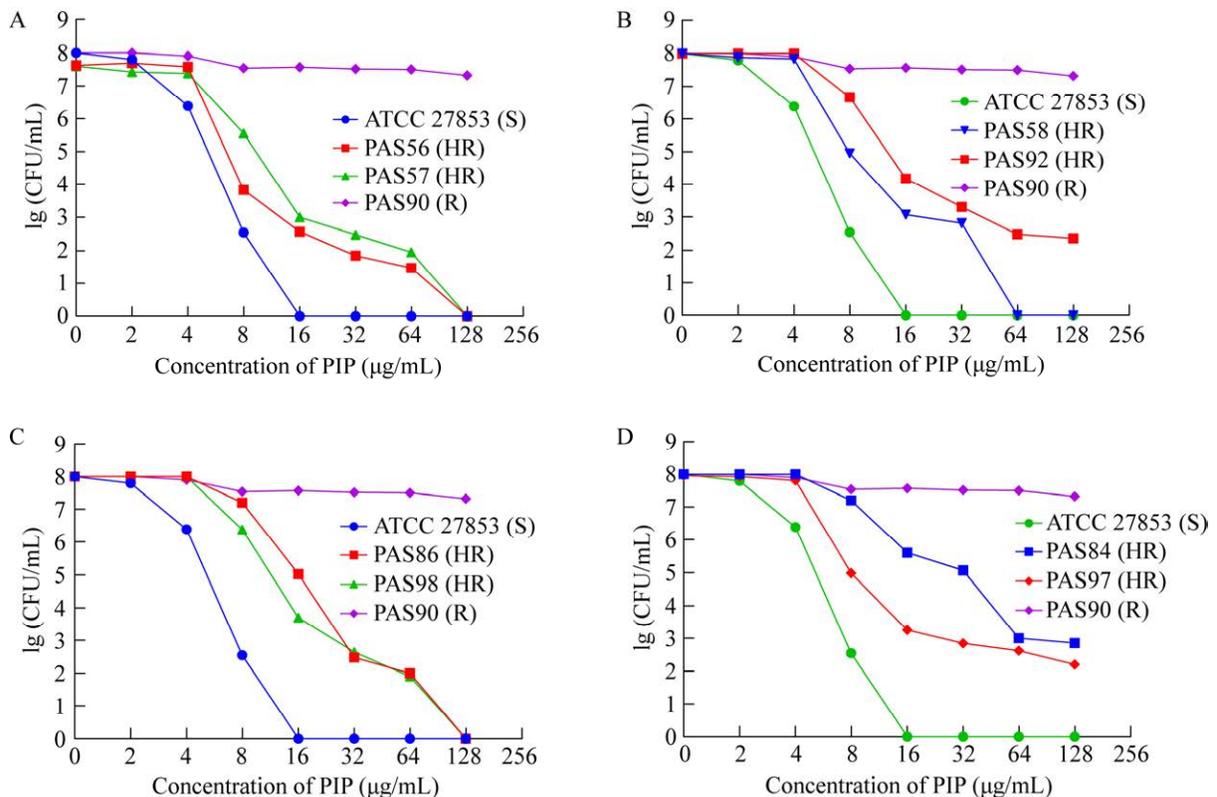


图 4 异质性耐药菌株的菌落谱型分析结果 A: PAS56、PAS57; B: PAS58、PAS92; C: PAS86、PAS98; D: PAS84、PAS97。菌株 ATCC 27853 作为敏感的标准菌株, PAS90 为本研究筛选到的完全耐药菌株

Figure 4 The results of population analysis profile (PAP) for heteroresistant strains. A: PAS56, PAS57; B: PAS58, PAS92; C: PAS86, PAS98; D: PAS84, PAS97. Strain ATCC 27853 was used as the susceptible standard strain, PAS90 was a fully resistant strain screened in this study.

表 1 8 株对 PIP 异质性耐药的铜绿假单胞菌临床分离株的菌落谱型分析结果

Table 1 Population analysis profiles results of 8 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates with piperacillin (PIP) heteroresistance

Isolate strains	PIP MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Highest PIP concentration of growth in population analyses ($\mu\text{g/mL}$)	PIP MIC of resistant subpopulations ($\mu\text{g/mL}$)	Classification	PAP frequency
PAS56	8	64	64	HR	1.4E-6
PAS57	8	64	64/128/256	HR	2.3E-6
PAS58	8	64	64	HR	6.0E-6
PAS84	8	128	512	HR	5.7E-6
PAS86	8	64	64	HR	9.0E-7
PAS92	8	128	256	HR	1.2E-5
PAS97	8	128	256	HR	1.8E-6
PAS98	8	64	64	HR	7.3E-7

统计学意义[PAS92(1) ($P=0.668\ 5$)、PAS92(2) ($P=0.709\ 7$)和 PAS92(3) ($P=0.860\ 8$)], 但均比参考菌株的生长速率慢很多($0.01 < P < 0.05$), 并且生长特性与参考菌株也有所不同, 细菌总量明显低于参考菌株(图 5A)。PAS92 抑菌圈内的耐药亚群(记作 PAS92k)比 PAS92 的生长速率快, 8 h 前差异无统计学意义, 8-12 h 有极显著差异($P=0.002\ 2$), 但是没有参考菌株生长速率快(图 5B); PAS57 与 3 株 PAP 实验中最高 PIP 浓度平板上的耐药亚群及参考菌株的生长速率(4-9 h)差异均无统计学意义[PAS57(1) ($P=0.445\ 8$)、PAS57(2) ($P=0.860\ 8$)和 PAS57(3) ($P=0.902\ 9$)], 但耐药亚群 PAS57(1)在生长特性上与其他菌株不同, 其细菌总量相对较少(图 5C)。PAS57 抑菌圈内的耐药亚群(记作 PAS57k)与 PAS57 的生长速率差异无统计学意义($P=0.953\ 2$) (图 5D)。此结果表明, 本研究出现的异质性耐药亚群现象并非缓慢生长的滞留菌现象, 不同耐药亚群较其原始菌株均未表现出明显的生长滞后现象。

将 K-B 药敏纸片抑菌圈内靠近纸片内侧边缘的耐药亚群在无抗生素的血平板上连续传代 15 d 后, 选取 F1、F5、F10 和 F15 进行 K-B 药

敏纸片实验, 发现不同代数耐药亚群的抑菌圈均变小, 而且各代之间抑菌圈大小几乎相同, 说明其耐药表型较为稳定。通过测定原始菌株与选取的不同代数的耐药亚克隆的哌拉西林 MIC 值发现, F1、F5、F10 和 F15 的 MIC 值也保持稳定, 并且这种耐药表型可以稳定遗传(图 6)。不同菌株的圈内耐药亚群与其原始菌株两者 MIC 值相比均有不同程度的差异。PAS58 圈内亚群的 MIC 值($16\ \mu\text{g/mL}$)是原始菌株($8\ \mu\text{g/mL}$)的 2 倍; PAS92 圈内耐药亚群的 MIC 值($256\ \mu\text{g/mL}$)是原始菌株($8\ \mu\text{g/mL}$)的 32 倍; PAS57 圈内耐药亚群的 MIC 值($64\ \mu\text{g/mL}$)是原始菌株($8\ \mu\text{g/mL}$)的 8 倍; PAS56 圈内耐药亚群的 MIC 值($64\ \mu\text{g/mL}$)是原始菌株($8\ \mu\text{g/mL}$)的 8 倍。同时也提示异质性耐药菌株极易向完全耐药转化。此外, 挑选了异质性耐药菌株 PAS92 和 PAS57 的各 3 株 PAP 实验中最高 PIP 浓度平板上的耐药亚群[分别记作 PAS92(1)、PAS92(2)、PAS92(3)和 PAS57(1)、PAS57(2)、PAS57(3)], 在无抗生素的平板上传代(50 代), 再测定其 MIC 值, 发现仅一株耐药亚群 PAS92(1)在传代过程中不稳定, 在 10-15 代左右耐药水平开始逐渐下降, 第 25 代时已恢复

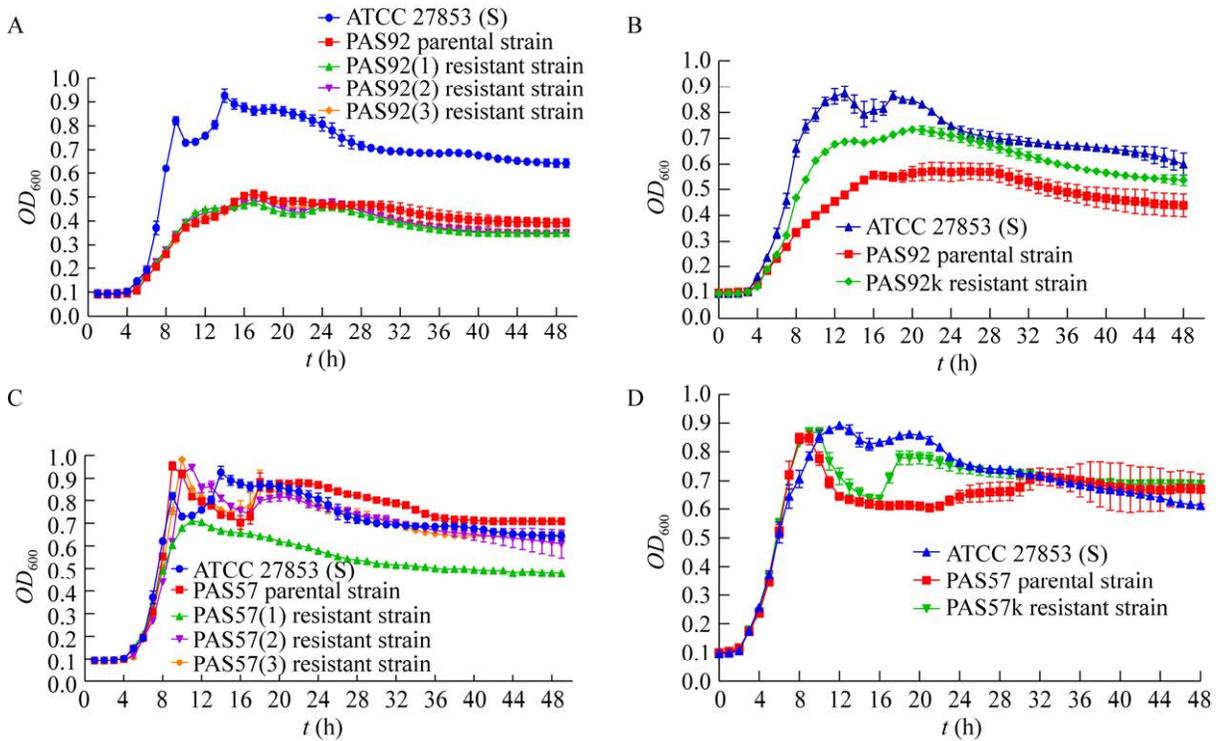


图 5 PIP 异质性耐药菌株生长曲线

Figure 5 Growth curve of piperacillin heteroresistant strains.

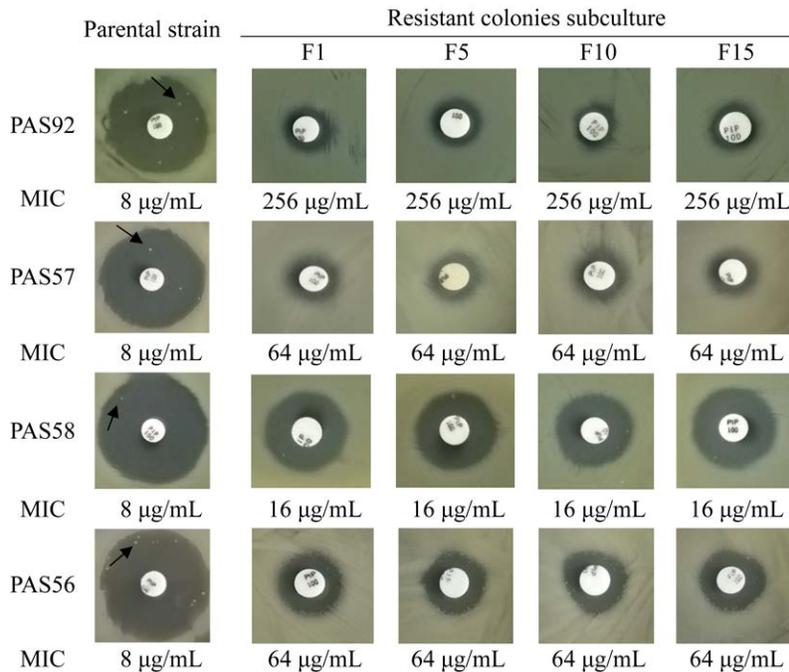


图 6 PIP 异质性耐药菌株(抑菌圈内的亚群)传代稳定性实验 箭头指的是进行传代培养的耐药亚群

Figure 6 Passage stability test of piperacillin heteroresistant isolates (subpopulations within the inhibition zone). The arrows indicate the resistant subpopulations to be subcultured.

至原始菌株耐药水平, 其余耐药亚群耐药稳定性良好或在 10-15 代时有轻微降低(表 2)。

3 讨论与结论

本研究基于纸片扩散法并结合微量肉汤稀释法进行异质性耐药菌株的初筛, 铜绿假单胞菌对 PIP、TZP 和 TIM 的异质性耐药率分别为 52% (26/50)、52% (26/50)和 54% (27/50), 耐药率分别为 14% (7/50)、14% (7/50)和 18% (9/50)。对初筛结果中的异质性耐药菌株进行菌落谱型分析确认, 提示异质性耐药率为 26% (13/50)。吴婷婷^[19]报道铜绿假单胞菌对 PIP、TZP 和 TIM 这 3 种药敏纸片的耐药率分别为 28.1%、18.7%和 25.5%, 铜绿假单胞菌对 IPM 的异质性耐药率为 11.6% (36/310)。与许磊^[14]研究铜绿假单胞菌对多粘菌素的异质性耐药菌株 35% (7/20)相比较低, 比何建春^[13]分析的 2011 年到 2015 年碳青霉烯类异质性耐药铜绿假单胞菌(carbapenem-heteroresistant *Pseudomonas aeruginosa*, CHPA)的流行病学数据中, IPM-HR 和 MEM-HR 的异质性耐药率(分别为 54.3%、72.5%)低得多。铜绿假单胞菌对头孢吡肟的异

质性耐药率为 57.3% (110/223)^[20]。筛选到的异质性耐药菌株的比例差异与多种因素有关, 比如实验菌株的来源、抗生素的种类及检测方法的不同等。本研究进行了纸片扩散法检测菌液接种浓度对 PIP、TZP 和 TIM 作用效果的影响, 设置 2 个接种浓度: 1×10^7 CFU/mL 和 1×10^8 CFU/mL, 发现两个浓度的 K-B 药敏结果存在差异。还有一种操作方法是使用无菌棉签将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌液涂匀, 这种方法可能也会存在接种量不一的情况而导致检测结果有所差异。Cuenca 等^[21]通过微量肉汤稀释法和纸片扩散实验检测了多个菌株(包括敏感菌株、耐药菌株、异质性耐药菌株等)接种浓度为 1×10^8 CFU/mL 和 1×10^6 CFU/mL 的菌液结果, 发现也存在差异并对异质性耐药菌株的判定产生影响。Hjort 等^[22]研究显示, 当将菌悬液浓度为 10^6 CFU/mL 的鼠伤寒链球菌接种于用 Etest 试纸条检测药敏情况的平板时, 没有观察到耐药亚群, 但当接种量增加到 10^8 CFU/mL 时, 所有的鼠伤寒链球菌都表现出了异质性耐药。另外, 本研究还探究了 1×10^6 CFU/mL 和 1×10^8 CFU/mL 两个浓度的菌悬液在致死浓度

表 2 PIP 异质性耐药菌株(PAP 实验中最高 PIP 浓度平板上的耐药亚群)传代稳定性实验

Table 2 Passage stability test of piperacillin heteroresistant isolates (resistant subpopulations on plates with the highest PIP concentration in the PAP test)

Generations of propagation	MIC of resistant colonies subculture ($\mu\text{g/mL}$)					
	PAS92(1)	PAS92(2)	PAS92(3)	PAS57(1)	PAS57(2)	PAS57(3)
F1	256	256	256	128	256	256
F5	256	256	256	128	256	256
F10	256	256	256	128	128	128-256
F15	128	128-256	256	128	128	128
F20	16	128	128	128	128	128
F25	8	128	128	128	128	128
F30	8	128	128-256	128	128	128
F35	8	128	128-256	128	128	128
F40	8	128	128-256	128	128	128
F45	8	128	256	128	128	128
F50	8	128	256	128	128	128

(32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 PIP 下的生长实验(37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 每小时测定一次 OD_{600} 值), 发现接种浓度为 1×10^6 CFU/mL (图 7A)的敏感菌株被完全杀死, 无再生长的现象, 而异质性耐药菌则出现再生现象, 接种浓度为 1×10^8 CFU/mL 时, 敏感菌株和异质性耐药菌均出现先生长再下降然后再生长再下降现象(图 7B)。表明低浓度的敏感菌株能被致死剂量药物杀死, 但是若敏感菌株浓度较大时, 不仅不能被有效地杀死, 甚至可能会产生更高水平的耐药。然而对于异质性耐药菌来说, 菌浓度越高出现更高耐药亚群的速度越快。以上实验表明, 接种方式和接种量的不同将很大程度地影响异质性耐药检测结果。另外, 准确的药敏检测能够在致病菌浓度较低时尽快给予有效治疗提供指导, 从而避免因发现较晚使得细菌量增多, 耐药性增强, 治疗难度更大, 最终导致治疗失败。

随机挑选的 8 株异质性耐药菌株进行 PAP 实验发现, 其耐药亚群少数能在大于异质性耐药菌株 MIC 值 8 倍的抗生素平板上生长, 极少数甚至可以达到更高水平的耐药。本次这 8 株菌株的异质性耐药亚克隆的发生频率为 7.3×10^{-7} – 1.2×10^{-5} 。Pournaras 等^[23]报道中指出

碳青霉烯类(亚胺培南、美罗培南)异质性耐药的铜绿假单胞菌的耐药亚群发生频率为 1.2×10^{-7} – 6.9×10^{-5} 。吴婷婷等^[12]在其研究中指出, 36 株亚胺培南异质性耐药铜绿假单胞菌的变异发生频率在 4.5×10^{-9} – 8.9×10^{-7} 之间。许磊^[14]研究发现铜绿假单胞菌对多粘菌素的异质性耐药亚群的出现频率为 3.5×10^{-7} – 2×10^{-6} 。由此可见, 铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素异质性耐药的发生频率更高。研究报道, 异质性耐药菌中耐药能力较强的亚群经无抗生素培养传代 5–10 次后, 少数保持高耐药性, 大多数恢复到原始菌的耐药水平且保持异质性耐药特性^[24]。然而在本研究中发现抑菌圈内不同耐药水平的耐药亚群在无抗生素传代 15 d 后, 大多都比较稳定, 保持其最初耐药性, 高水平耐药亚群保持高水平耐药, 低水平耐药亚群保持低水平耐药。对从 PAP 实验中最高 PIP 浓度平板上挑取的高水平耐药亚群进行 50 代的无抗生素传代培养发现, 有一株耐药亚群不稳定且恢复到原始菌株的耐药水平, 但其生长实验表明并未产生适应性代价, 而其余均稳定保持高水平耐药。耐药亚群的稳定性将对临床抗菌药物的使用效果产生影响, 其机制仍待继续研究。

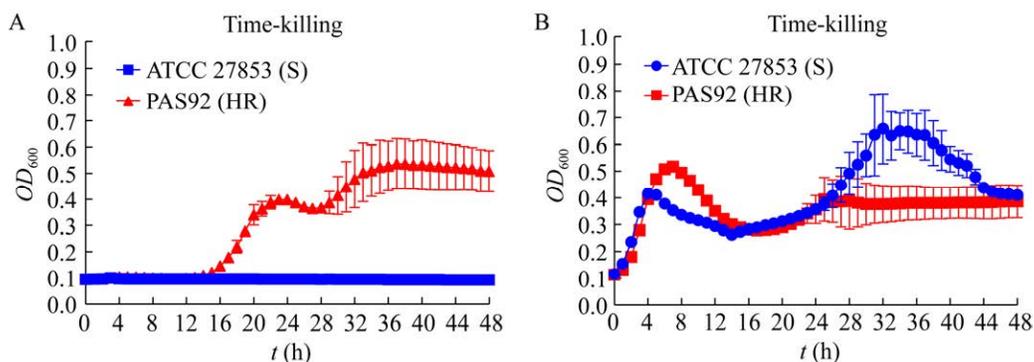


图 7 不同浓度菌悬液在药物致死浓度下的生长情况 A: 接种浓度为 1×10^6 CFU/mL; B: 接种浓度为 1×10^8 CFU/mL

Figure 7 The growth of different concentrations of bacteria at lethal concentrations of drugs. A: Inoculum size 1×10^6 CFU/mL; B: Inoculum size 1×10^8 CFU/mL.

此外, 本研究发现耐药亚群 PAS57(3)在无抗生素的 MH 平板上传代到 F50 后, 将其在超低温冰箱(-80 °C)保存两周的 F35 进行平板传代至 F50, 再次测定 MIC 值发现, F35 之后的各代菌株 MIC (均为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与之前 (MIC=128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)发生了变化, 而其他保存的菌株再次测定时基本保持一致, 推测菌株保存环境可能会导致耐药水平下降。Hindler 等^[25]报道, 14 株鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌中有 5 株最初对粘菌素耐药, 而在 -70 °C 条件下, 添加甘油的布鲁氏菌肉汤中储存 ≤ 12 个月后, 粘菌素抗性丧失菌株变得敏感。Barin 等^[26]的研究也表明, 4 株鲍曼不动杆菌在 -80 °C 下储存 60 d 后对多黏菌素 B 的 MIC 值从 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 减少到 0.125-0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外, 可能耐药亚群中也有耐药水平不同的亚群, 传代时具有一定的随机性。

铜绿假单胞菌长期以来作为感染最常见的机会性致病菌, 对多种抗菌药物具有较强耐药性, 再加上铜绿假单胞菌异质性耐药现象的增加, 给临床用药治疗带来了更大的挑战。异质性耐药现象并不是一个新发现, 其广泛存在于各种细菌对各种抗菌药物的耐药过程之中, 真菌及有些肿瘤细胞中也存在这种现象。如果对异质性耐药现象未能及时发现并给予有效治疗, 异质性耐药将最终向完全耐药转化。本研究在铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素异质性耐药表型等方面做了一定的探究, 在后续工作中将加强对其异质性耐药机制的研究, 为相关临床感染治疗提供一些有效的依据。

REFERENCES

- [1] Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, Potoski BA, Clancy CJ, Nguyen MH. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(1): 01243-16
- [2] 喻容, 石燕, 齐志强, 陈拥军, 聂英, 石国民, 向延根. 1445 株铜绿假单胞菌临床感染的耐药性分析[J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(8): 940-941
Yu R, Shi Y, Qi ZQ, Chen YJ, Nie Y, Shi GM, Xiang YG. Analysis of antibiotic resistance of 1445 strains of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infection[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2012, 9(8): 940-941 (in Chinese)
- [3] 李飞. 450 株铜绿假单胞菌的临床分布及药敏分析[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(2): 14-15
Li F. 450 strains *Pseudomonas aeruginosa* clinical distribution and drug susceptibility[J]. *Guide of China Medicine*, 2012, 10(2): 14-15 (in Chinese)
- [4] 张鑫. 铜绿假单胞菌: 院感常见且高致死[N]. *医师报*, 2021-03-18 (B04)
Zhang X. *Pseudomonas aeruginosa*: hospital infection is common and highly lethal[N]. *Physicians reported*, 2021-03-18 (B04) (in Chinese)
- [5] 张芳, 尹德明. 呼吸道感染铜绿假单胞菌耐药特点分析[J]. *医学检验与临床*, 2006(3): 12-13
Zhang F, Yin DM. Analysis of the bacterial resistance of respiratory tract infection with *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Medical Laboratory Science and Clinics*, 2006(3): 12-13 (in Chinese)
- [6] Gniadkowski M, Skoczyńska A, Fiett J, Trzciński K, Hryniewicz W. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital infections to antibiotics[J]. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 1998, 5(30): 346-350
- [7] Alexander HE, Leidy G. Influence of streptomycin on type b *Haemophilus influenzae*[J]. *Science*, 1946, 104(2692): 101-102
- [8] Kayser FH, Benner EJ, Hoepflich PD. Acquired and native resistance of *Staphylococcus aureus* to cephalexin and other β -lactam antibiotics[J]. *Applied Microbiology*, 1970, 20(1): 1-5
- [9] Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(8): 479-496
- [10] SØgaard P, Gahrn-Hansen B. Population analysis of susceptibility to ciprofloxacin and nalidixic acid in *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacteriaceae*[J]. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*, 1986, 94B(1/6): 351-356

- [11] 马幸延, 李虹霖, 鲁洋, 蔡依玫, 张伟铮, 曾建明, 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临床特征与危险因素分析[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(4): 398-403
Ma XY, Li HL, Lu Y, Cai YM, Zhang WZ, Zeng JM, Chen C, Huang B. Clinical features and risk factors analysis of carbapenems heteroresistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Tropical Medicine, 2019, 19(4): 398-403 (in Chinese)
- [12] 吴婷婷, 芮志莲, 徐敏, 邵启祥. 铜绿假单胞菌亚胺培南异质性耐药的机制[J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(4): 297-301
Wu TT, Rui ZL, Xu M, Shao QX. Mechanisms of heterogeneous drug resistance against imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Jiangsu University: Medicine Edition, 2018, 28(4): 297-301 (in Chinese)
- [13] 何建春. 铜绿假单胞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, 2018
He JC. Study on the molecular mechanism of carbapenem heteroresistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Medical University, 2018 (in Chinese)
- [14] 许磊. 铜绿假单胞菌多粘菌素异质性耐药及联合药敏研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016
Xu L. Colistin heteroresistance and drug combination study of *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
- [15] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2015
Medical Administration Department of Ministry of Public Health, P. R. C. National Guide to Clinical Laboratory Procedures[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 29th informational supplement. CLSI document M100-S29[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019
- [17] El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(1): 191-207
- [18] Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(12): 2809-2819
- [19] 吴婷婷. 异质性耐药铜绿假单胞菌的检测和耐药机制的分析[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2018
Wu TT. Mechanism and detection of heteroresistant *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2018 (in Chinese)
- [20] Jia XJ, Ma WJ, He JC, Tian XL, Liu H, Zou H, Cheng S. Heteroresistance to cefepime in *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2020, 55(3): 105832
- [21] Cuenca FF, Sanchez MDG, Caballero-Moyano FJ, Vila J, Martinez-Martinez L, Bou G, Rodriguez-Bano J, Pascual A. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 39(6): 472-477
- [22] Hjort K, Nicoloff H, Andersson DI. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enteric*[J]. Molecular Microbiology, 2016, 102(2): 274-289
- [23] Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Spanakis N, Maniatis AN, Tsakris A. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(1): 66-70
- [24] 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
- [25] Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug resistant Gram-negative bacilli[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51: 1678-1684
- [26] Barin J, Martins AF, Heineck BL, Barth AL, Zavascki AP. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2013, 12: 15