

文章编号: 1001-8689(2018)04-0492-05

体外诱导多黏菌素耐药肺炎克雷伯菌的适合度代价相关研究

王冲¹ 侯渊博² 徐春泉¹ 董郭枫³ 李佳慧¹ 张艺之¹ 周铁丽^{1,*}

(1 温州医科大学附属第一医院医学检验中心, 温州 325035; 2 浙江大学附属邵逸夫医院, 杭州 310016;

3 温州医科大学检验医学院, 生命科学学院, 温州 325035)

摘要: 目的 研究体外诱导多黏菌素耐药肺炎克雷伯菌的适合度代价, 并分析耐药株的分子特性。方法 采用体外诱导方法将临床分离的3株多黏菌素敏感肺炎克雷伯菌诱导成多黏菌素耐药株; 微量肉汤稀释法检测体外诱导耐药前后菌株对临床常用抗菌药物的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC); 采用PCR方法检测多黏菌素耐药相关基因 $pmrA$ 、 $pmrB$ 、 $mgrB$ 、 $phoP$ 和 $phoQ$, 并对阳性片段进行测序比对分析; 对诱导耐药菌株及其对应敏感菌株进行生长曲线分析、生物膜形成能力检测及体外竞争和抗血清试验, 分析研究多黏菌素耐药肺炎克雷伯菌的适合度代价。结果 3株诱导耐药株中均检出 $pmrB$ (T157P)突变, 在诱导株FK713R和FK729R携带的 $mgrB$ 基因中分别检出 $IS_{kpn}14$ 和 $IS5$ like插入序列。诱导耐药株与敏感株相比, 24h生长曲线未发现明显差异; 生物膜形成能力检测结果发现诱导耐药株与敏感株生物膜形成能力无明显差异; 3株菌获得多黏菌素耐药后均表现出一定程度的体外竞争缺陷, 竞争指数(CI值)分别为0.01、0.54和 5×10^{-4} ; 3株诱导耐药菌中有2株(FK713R和FK729R)与其敏感菌相比出现抗血清作用增强现象。结论 肺炎克雷伯菌获得多黏菌素耐药后会出现一定的适合度改变, 不同的耐药机制可能会引起不同的适合度表现。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 多黏菌素耐药; 适合度代价; 体外诱导

中图分类号: R978.1 文献标志码: A

The fitness cost of clinical isolates of induced polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in vitro

Wang Chong¹, Hou Yuan-bo², Xu Chun-quan¹, Dong Guo-feng³, Li Jia-hui¹, Zhang Yi-zhi¹ and Zhou Tie-li¹

(1 Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035; 2 Department of Clinical Laboratory, Sir Run Run Shaw Hospital, Hangzhou 310016; 3 School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035)

Abstract Objective To investigate the fitness cost of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* which were acquired from polymyxin B susceptible strains through induction *in vitro*, and analyze the molecular characteristics of resistant strains. **Methods** Three polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* which were acquired from *in vitro* induction were collected. The six strains were tested the minimum inhibitory concentration (MIC) of clinical commonly used antimicrobial agents by the broth dilution method, and the polymyxin-resistant genes $pmrA$, $pmrB$, $mgrB$, $phoP$ and $phoQ$ were screened by polymerase chain reaction (PCR). Growth curves, biofilm formation, serum resistance and competition assays *in vitro* were performed to detect the fitness costs of polymyxin-induced resistant strains compared with their susceptible parental strains. **Results** For the *in vitro* selected mutants, all mutants revealed mutations in $pmrB$ (T157P). The $IS_{kpn}14$ and $IS5$ like insertions were detected in the $mgrB$ gene in FK713R and FK729R, respectively. No differences were observed in growth curves and biofilm formation ability among three polymyxin B mutants and the corresponding susceptible parental strains. Three polymyxin B mutants exhibited

收稿日期: 2017-04-18

作者简介: 王冲, 男, 生于1991年, 在读硕士研究生, 研究方向为临床检验诊断学, E-mail: wangchong2016wy@163.com

*通讯作者, E-mail: wyztli@163.com

significant fitness defects when co-cultured with the parental strains, competitive index (*CI* values) were 0.01, 0.54 and 5×10^{-4} , respectively. FK713R and FK729R exhibited more resistance to serum compared with their susceptible bacteria. **Conclusion** A certain degree of fitness cost would occur when *Klebsiella pneumoniae* acquired polymyxin B resistance, and different resistance mechanisms may cause different fitness costs.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; Polymyxin-resistant; Fitness cost; Induction *in vitro*

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)广泛分布于自然界中，是社区和院内获得性感染的重要致病菌之一。在我国，肺炎克雷伯菌是院内感染的第二大致病菌，占9.03%^[1]。由于抗菌药物的大量及不规范使用，导致多重耐药株迅速出现。有报道称多重耐药肺炎克雷伯菌引起院内感染暴发流行致死率高达40%^[2]。在此情况下，替加环素和多黏菌素成为治疗多重耐药肺炎克雷伯菌可选择的最后抗菌药物。多黏菌素是一种多肽类抗菌制剂，临床常用的有多黏菌素B(polymyxin B, PB)和多黏菌素E(polymyxin E)两种。多黏菌素的使用是革兰阴性菌发展成多黏菌素耐药的独立危险因子，研究发现，使用多黏菌素治疗的病人与未使用的相比出现多黏菌素耐药株的概率从0~6%增加到55%~69%^[3]。而且，当去除抗菌药物后，产生的耐药突变对细菌有毒性且会产生一定的适合度代价^[4]。细菌的适合度代价是指在没有选择压力条件下，如果特定基因型个体的适合度低于种群平均的适合度，即可以认为该基因型个体存在适合度代价。适合度代价可能与耐药基因相关，通常会表现为菌株生长缓慢、毒力下降或转移能力下降等，继而影响细菌自身的生长力和适应性。最近，Melny等^[5]通过Meta分析对不同耐药菌株所产生的适合度代价进行研究，发现适合度代价往往为点突变引起，而且适合度代价也会因菌株种类、药物种类及耐药机制不同而发生改变。然而，有关肺炎克雷伯菌耐药菌株的适合度代价研究较少，因此本文旨在研究体外诱导多黏菌素耐药肺炎克雷伯菌的适合度代价，从而为更有效地指导临床用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

3株多黏菌素敏感肺炎克雷伯菌临床菌株分离自温州医科大学附属第一医院临床菌株。大肠埃希菌ATCC25922和铜绿假单胞菌ATCC27853为药敏质控菌株、肺炎克雷伯菌ATCC13883和肺炎克雷伯菌ATCC700603为生物膜形成对照菌株，均购自卫生部临检中心。

1.2 主要仪器和试剂

聚合酶链反应仪器(美国Bio-Rad公司); DR100比浊仪(法国Mérieux公司); 96-孔细胞培养板(美国Corning公司); 全功能微孔板检测酶标仪(美国Biotek

公司); 微量移液器(德国Eppendorf有限公司); 哥伦比亚血琼脂、胰蛋白胨、酵母浸出物、M-H(Mueller-Hinton)肉汤(英国Oxoid有限公司); 琼脂糖干粉(法国Biowest有限公司); 1%结晶紫染液(北京索莱宝科技有限公司); 无水乙醇(中国医药公司); 氯化钠(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 体外诱导多黏菌素耐药试验^[6]

将待测菌株(FK660、FK713和FK729)接种于新鲜血琼脂平板，置普通细菌培养箱中，37℃培养18~24h；挑取单个菌落接种于10mL LB液体培养基中振荡培养18h，离心去上清，用无菌生理盐水将待测菌液重悬并调至 1.5×10^8 CFU/mL，取150μL上述菌液均匀涂布于含有PB(浓度为0.5~256 mg/L)的系列梯度MH药敏琼脂平板表面，于37℃培养箱培养3d后挑取平板上的菌落调至 1.5×10^8 CFU/mL后，同样取150μL均匀涂布于下一梯度浓度平板进一步诱导，逐梯度进行。在诱导第10代获得3株耐药株，分别为FK660R、FK713R和FK729R，整个过程持续30d。耐药菌株通过药敏及耐药基因测序分析进行验证。

1.4 药敏试验

参照2016年美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐方法，采用微量肉汤稀释法对3株诱导耐药前后的菌株进行临床常用抗菌药物最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的检测。

1.5 多黏菌素耐药相关基因PCR及测序

按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取肺炎克雷伯菌基因组DNA作为PCR反应模板。采用PCR扩增技术对肺炎克雷伯菌5种多黏菌素耐药相关基因*pmrA*、*pmrB*、*mgrB*、*phoP*和*phoQ*进行检测，PCR引物序列设计参照先前文献[7]。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳，GelRed染色后于凝胶成像系统观察结果。所有PCR阳性扩增产物均送至上海华大基因进行测序确认，将得到的序列通过NCBI数据库中的Blastn及Blastx进行比对分析。

1.6 生长曲线分析

将诱导前后菌株接种到血琼脂平板37℃下培养18~24h，用LB肉汤将待测菌株调至 10^6 CFU/mL，取100μL菌液加入到200mL LB液体培养基，在振荡培养箱中以180r/min于37℃进行增菌培养，每隔1h检测1次

菌液 A_{600} 值，观察24h内菌液 A 值的变化情况。

1.7 生物膜形成能力试验

参照文献[8]的方法对诱导耐药前后的菌株进行生物膜形成能力检测，将待测菌株转入血琼脂平板37℃下培养18~24h，挑取单个菌落调至菌液浓度至 1.5×10^7 CFU/mL，取150μL菌液加入到96孔板中37℃下培养18~24h，结束后将孔内浮游菌去除，并用无菌生理盐水清洗3次，室温晾干。向孔中加入200μL结晶紫溶液作用20min，用无菌生理盐水清洗3次，室温晾干。向孔中加入200μL无水乙醇进行溶解，用酶标仪测样本孔在590nm处的吸光度(A)值。

1.8 体外竞争实验

依据文献[9]，收集对数生长期的耐药菌和敏感菌，将每株菌浓度调至 1.5×10^3 CFU/mL，按照1:1比例将耐药菌与对应的敏感菌混合后，加入到10mL LB液体培养基中，37℃，180r/min条件下培养16~18h。对细菌总量和耐药菌量进行10倍梯度稀释法计数，取100μL菌液涂布于LB琼脂平板和含有10g/L多黏菌素的LB琼脂平板上，37℃培养16~18h。测定进行体外竞争指数(competitive index, CI)， CI 值=耐药菌数量/敏感菌数量，每对菌株均进行2次平行重复试验计算，计算 CI 均值。判断标准： $CI=1$ ，耐药菌未出现适合度改变； $CI>1$ ，耐药菌适合度增加； $CI<1$ ，耐药菌适合度下降。

表1 菌株药敏结果

Tab. 1 Strain susceptibility results

菌株	MIC/(mg/L) ¹												
	CAZ	CTX	CIP	AMK	FOS	GEN	LEV	ETP	IMP	MEM	TOB	PB	COL
FK660	128	>128	64	>512	64	>128	32	8	32	>64	>512	1	1
FK660R	128	>128	64	>512	64	>128	32	8	32	>64	>512	256	>256
FK713	128	>128	64	>512	32	>128	32	8	32	>64	>512	1	1
FK713R	128	>128	128	>512	32	>128	64	>32	32	>64	>512	256	>256
FK729	128	>128	128	>512	32	>128	32	8	32	64	>512	1	1
FK729R	128	>128	128	>512	64	>128	64	>32	32	>64	>512	256	>256
ATCC25922 ²	0.25	0.06	0.015	8	0.25	2	0.03	0.06	0.25	0.015	2	1	0.5
ATCC27853 ²	2	8	0.25	2	4	1	0.25	8	4	0.5	0.5	1	1

注：CAZ：头孢他啶；CTX：头孢噻肟；CIP：环丙沙星；AMK：阿米卡星；FOS：磷霉素；GEN：庆大霉素；LEV：左氧氟沙星；ETP：厄他培南；IMP：亚胺培南；MEM：美罗培南；TOB：妥布霉素；PB：多黏菌素B；COL：多黏菌素E；¹：药敏检测采用CAMHB方法；²：大肠埃希菌ATCC25922和铜绿假单胞菌ATCC27853为质控菌株

2.3 生长曲线对比分析

如图1所示，通过监测24h内待测菌株的生长曲线发现，诱导耐药菌与其对应的敏感菌株相比并没有出现明显生长缓慢或加快现象。

2.4 生物膜形成能力对比分析

菌株诱导耐药前后生物膜形成能力如表3所示，所有待测菌株均具有生物膜形成能力，但是诱导耐药前后菌株的生物膜形成能力并没有发生明显变化

1.9 抗血清试验

对Siu等^[10]方法略做调整，将对数生长期的待测菌株浓度调至 1.5×10^6 CFU/mL，按照1:3(V/V)比例与健康正常人血清进行混合，37℃下培养2h，采用倍比稀释法对处理前后菌液进行计数分析，每株菌重复3次试验。判断标准：培养2h后，菌量下降到原始菌量的1%甚至更低判断为抗血清阴性；若≥90%的菌量存活，判断为抗血清阳性。

1.10 数据處理及分析

采用SPSS 17.0对数据资料进行统计分析， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义，用Origin Pro 8.0软件对数据进行作图。

2 结果

2.1 药敏试验结果

诱导耐药后的菌株全部对PB和多黏菌素E耐药，并没有出现对其他药物耐药性改变的现象，具体结果见表1。

2.2 基因测序分析结果

诱导耐药菌株中均出现了 $pmrB$ (T157P)突变，且在FK713R和FK729R中分别检出 $ISkpn14$ 和 $IS5like$ 插入序列，本次研究发现的 $IS5like$ 插入位点与之前报道一致，在编码区+74位和+75位之间，而 $ISkpn14$ 的插入位点在 $mgrB$ 基因启动子上游-52位和-51位之间（表2）。

表2 多黏菌素耐药菌株基因突变情况

Tab. 2 The mutations of polymyxin-resistant strains

菌株	基因	突变位点	评价
FK660R	$pmrB$	T157P	有义突变
FK713R	$pmrB$	T157P	有义突变
	$mgrB$	$ISkpn14$ ¹	插入位点在基因启动子上游-52和-51位之间
FK729R	$pmrB$	T157P	有义突变
	$mgrB$	$IS5like$ ²	插入位点在基因编码区+74和+75之间

注：¹和²：插入序列(insertion sequence, IS)

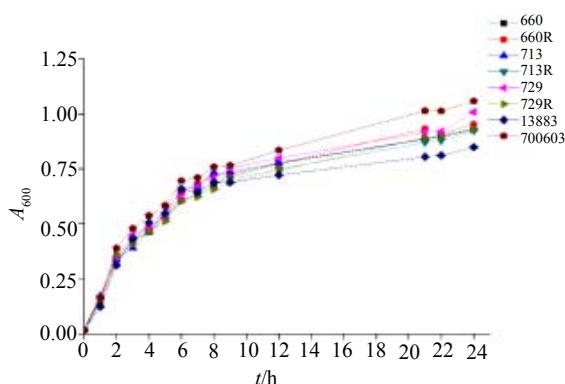


图1 生长曲线对比
Fig. 1 Growth curve comparison

($P>0.05$)。

2.5 体外竞争试验分析

3株敏感菌经多黏菌素诱导耐药后均表现不同程度的适合度下降现象, CI 值分别为0.01、0.54和 5×10^{-4} 具体见表4。

2.6 抗血清试验分析

所有待测菌株均表现为抗血清阴性, FK713R和FK729R菌株分别与FK713和FK729相比, 存活率稍有增加, 而FK660R菌株与FK660相比, 其存活率有所下降, 具体情况见表5。

3 讨论

肺炎克雷伯菌为常见的条件致病菌, 可引起伤口感染, 支气管炎、肺炎, 泌尿系统等疾病, 甚至可引起严重威胁生命的重症感染如脑膜炎、败血症等^[11]。随着 β -内酰胺类及碳青霉烯类等抗菌药物的研发以及在临幊上大量不合理的使用, 造成多重耐药肺炎克雷伯菌的检出率急速上升, 对临幊治疗带来更大的挑战。针对多重耐药菌, 临幊上通常选择多

表3 菌株诱导耐药前后生物膜形成能力对比

Tab. 3 Comparison of biofilm formation ability before and after induction resistance

菌株	生物膜形成能力(A_{590})		P 值
	敏感($\bar{x}\pm s$)	耐药($\bar{x}\pm s$)	
FK660	0.65±0.18	0.34±0.12	0.069
FK713	0.22±0.07	0.13±0.02	0.085
FK729	0.13±0.005	0.22±0.06	0.075

注: $P<0.05$: 差异具有统计学意义; $P>0.05$: 差异不具有统计学意义

表4 耐药菌株适合度变化情况

Tab. 4 The fitness cost of resistant strains

菌株	细菌数量/CFU		CI 值
	总量($\bar{x}\pm s$)	耐药菌量($\bar{x}\pm s$)	
FK660R	$1.68\times10^{12}\pm0.05$	$1.7\times10^{10}\pm0.06$	0.01
FK713R	$1.7\times10^9\pm0.07$	$9.18\times10^8\pm0.32$	0.54
FK729R	$9.6\times10^{11}\pm0.26$	$4.64\times10^8\pm0.14$	5×10^{-4}

注: $CI<1$, 说明耐药菌株出现适合度下降; $CI>1$, 说明耐药菌株出现适合度上升

表5 诱导前后菌株的抗血清作用情况对比

Tab. 5 Comparison of antiserum effects of strains before and after induction

菌株	菌量/CFU		存活率/%=处理后/处理前	P 值
	处理前($\bar{x}\pm s$)	处理后($\bar{x}\pm s$)		
FK660	$1.42\times10^5\pm0.04$	60 ± 2.51	0.042	<0.05
FK660R	$1.76\times10^5\pm0.02$	60 ± 1.91	0.034	
FK713	$1.44\times10^5\pm0.03$	160 ± 5.29	0.111	
FK713R	$2.36\times10^5\pm0.04$	780 ± 15.27	0.333	<0.05
FK729	$1.1\times10^8\pm0.02$	160 ± 6.27	0.145	
FK729R	$1.32\times10^5\pm0.06$	$5\times10^3\pm1.21$	3.788	<0.05

注: 若菌量下降到原始菌量的1%甚至更低判断为抗血清阴性; 如果 $\geq90\%$ 的菌量存活, 判断为抗血清阳性

黏菌素、替甲环素或采取联合用药的方式进行治疗。但目前临幊上不断有多黏菌素耐药的报道, 多黏菌素的耐药机制主要与LPS的多样化修饰相关, 如外膜孔蛋白的特定修饰以及LPS总负电荷减少, 涉及 $pmrA$ / $pmrB$ 、 $phoP/phoQ$ 、 $mgrB$ 等基因的突变。然而, 目前有关使用多黏菌素治疗后, 细菌会出现哪些适应性改变的研究资料较少, 为了更加有效地指导临幊用药, 本文对3株体外诱导多黏菌素耐药菌株进行研究。

本次研究发现, 使用多黏菌素诱导细菌耐药后, 对其他药物的敏感性未发生变化。有报道显示, 在鲍曼不动杆菌的研究中发现细菌出现多黏菌素耐药的同时, 对其他药物表现出敏感性升高现象^[12]。这种表型差异可能和菌种外膜渗透性有关。细菌产生生物膜可增加细菌的感染性和持续性, 提示生物膜与反复长期慢性感染有关系。本研究结果显示, 耐药菌与敏感菌相比并没有出现生长曲线特异性改变及生物膜形成能力的变化。但是, 体外竞争试验提示耐药菌出现一定的竞争性下降现象, 与Choi等^[13]的研究结果一致, 这说明在无抗菌药物压力环境下, 敏感菌株比耐药株更具优势。此外, 本研究发现除FK660R出现轻微抗血清下降外, FK713R和FK729R均表现出抗血清增强现象, 这与之前报道结果不一致^[14], 提示这类细菌在获得多黏菌素耐药后, 在体外压力环境下的生存能力增强, 预示其带来的危害性进一步增强, 这一现象值得临幊工作者关注。但是, 有关这一差异, 先前研究指出, 由 $pmrB$ 基因突变所致的多黏菌素耐药的肺炎克雷伯菌并不会出现明显的适合性改变^[15], 我们也发现FK660R菌株中仅存在 $PmrB(T157P)$ 突变, 而对于FK713R和FK729R, 除含有 $PmrB(T157P)$ 突变外, 其 $mgrB$ 基因还分别含有 $ISkpn14$ 和 $IS5like$ 插入序列, 这可能引起两株菌抗血清现象增强的原因。

先前研究表明氟喹诺酮耐药的肺炎克雷伯菌的适合度变化与其克隆型相关, 其主要克隆型(ST11、

ST15和ST147)与其他克隆型相比具有较低的适应度代价,这种差异可能是由于质粒携带不同类型的ESBL基因造成的^[16]。此外,Luo等^[17]的一项关于环丙沙星耐药的空肠弯曲杆菌的研究表明,*gyrA*突变可使某一株菌具有较高适应度代价,但却能提高另一菌株的适应度,这进一步说明许多适应度的改变具有菌株依赖性。因此,我们推断由多黏菌素引起的细菌适应性改变可能因菌株特性及耐药机制不同而存在差异。值得注意的是,本研究发现两株菌(FK713和FK729)经体外诱导获得多黏菌素耐药后抗血清能力增强,提示其毒力有所增加,有相关研究论证*mgrB*的失活不仅可以导致黏菌素耐药,而且可通过降低对抗菌肽的敏感性以及使宿主免疫防御反应失活来增加肺炎克雷伯菌的毒力,这可能是导致感染死亡率增加的一个原因^[18]。综上所述,细菌获得多黏菌素耐药后,会出现一定程度的适应性改变,如细菌毒力增加。当无抗菌药物的选择压力时,敏感株处于主导优势,能抑制耐药菌的生长,甚至在一定时间内使耐药菌清除出机体。因此,了解抗菌药物耐药的适应度代价改变及其原因对于合理使用抗菌药物至关重要。严格控制抗菌药物的滥用无疑也是一条使细菌耐药性消除的有效途径。

参 考 文 献

- [1] 文细毛,任南,吴安华,等.全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J].中华医院感染学杂志,2011,21(2): 350-355.
- [2] Lithgow A E, Kilalang C. Outbreak of nosocomial sepsis in the special care nursery at port moreshy general due to multiresistant *Klebsiella pneumoniae*: High impact on mortality[J]. *PNG Med.*, 2009, 52(1-2): 28-34.
- [3] Halaby T, Al Naiemi N, Kluytmans J, et al. Emergence of colistin resistance in Enterobacteriaceae after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(7): 3224-3229.
- [4] Silva R F, Mendonca C M, Carvalho L M, et al. Pervasive sign epistasis between conjugative plasmids and drug-resistance chromo-somal mutations[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(7): 1-10.
- [5] Melnyk A H, Wong A, Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations[J]. *Evol Appl*, 2015, 8(3): 273-283.
- [6] Adams M D, Nickel G C, Bajaksouzian S, et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the *PmrAB* two-component system[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(9): 3628-3634.
- [7] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 161-168.
- [8] Wu M C, Lin T L, Hsieh P F, et al. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): 1-28.
- [9] Fernandez A, Perez A, Ayala J A, et al. Expression of OXA-type and SFO-1 beta-lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(4): 1877-1884.
- [10] Siu L K, Fung C P, Chang F Y, et al. Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(11): 3761-3765.
- [11] 谢朝云,熊芸,白瑶,等. ICU与非ICU肺炎克雷伯菌感染的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(23): 5815-5817.
- [12] Vila-Farres X, Ferrer-Navarro M, Callarisa A E, et al. Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected in vitro[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(11): 2981-2986.
- [13] Choi M J, Ko K S. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(11): 6763-6773.
- [14] Fernandez A, Perez A, Ayala J A, et al. Expression of OXA-type and SFO-1 beta-lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(4): 1877-1884.
- [15] Cannatelli A, Di Pilato V, Giani T, et al. In vivo evolution to colistin resistance by *PmrB* sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4399-4403.
- [16] Toth A, Kocsis B, Damjanova I, et al. Fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones is diverse across clones of *Klebsiella pneumoniae* and may select for CTX-M-15 type extended-spectrum β-lactamase[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(5): 837-843.
- [17] Luo N, Pereira S, Sahin O, et al. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(3): 541-546.
- [18] Kidd T J, Mills G, Sa-Pessoa J, et al. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(4): 430-447.