

动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株体内氟喹诺酮 药物蓄积的研究

阳艳林¹, 岳磊¹, 李树娟¹, 薛国聪¹, 李璐璐¹, 陈朝喜², 张文剑¹, 吴欢鹏¹, 刘雅红¹

(¹华南农业大学兽医学院/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642; ²西南民族大学生命科学院, 成都 610041)

摘要: 【目的】研究氟喹诺酮类药物在动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株体内蓄积量的变化规律, 探讨主动外排机制在携 QnrS 菌株中的作用。【方法】采用肉汤微量稀释法测定 QnrS 阳性株对氟喹诺酮类药物的 MIC, 荧光测定法检测盐酸环丙沙星在 QnrS 阳性株体内浓度的变化及能量抑制剂碳酰氰间氯苯胺 (CCCP) 对菌体内药物蓄积的影响。【结果】动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株对氟喹诺酮药物的敏感性存在明显差异, 均对盐酸环丙沙星的蓄积呈能量依赖性降低, 其中以耐药株体内的药物浓度降低最为明显。加入能量抑制剂后, 耐药株体内的药物浓度上升程度明显高于敏感株, 但均达不到标准株体内药物浓度水平。【结论】主动外排泵的激活, 使受试菌体内盐酸环丙沙星减少并低于有效浓度, 从而影响 QnrS 介导的氟喹诺酮类耐药性。

关键词: 大肠埃希氏菌; 盐酸环丙沙星; 主动外排泵

Study on the Accumulation of Fluoroquinolones in QnrS-Positive Animal Clinical Isolates of *Escherichia coli*

YANG Yan-lin¹, YUE Lei¹, LI Shu-juan¹, XUE Guo-cong¹, LI Lu-lu¹, CHEN Chao-xi², ZHANG Wen-jian¹,
WU Huan-peng¹, LIU Ya-hong¹

(¹College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, Guangzhou 510642; ²College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041)

Abstract: 【Objective】 The objective of the experiment was to determine the susceptibility of fluoroquinolones and the effect of active efflux pump in QnrS-positive animal clinical isolates of *E. coli*. 【Method】 The broth dilution method was used to determine MICs of fluoroquinolones against the QnrS-positive isolates. The accumulation of ciprofloxacin and the effect of efflux pump inhibitor, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) for tested isolates of *E. coli* were measured by a fluorescence method. 【Result】 The susceptibility of QnrS-positive animal clinical isolates of *E. coli* to fluoroquinolone antibiotics varied greatly and decreased with energy dependence. The decrease in resistant isolates with QnrS was prominent. CCCP could increase the accumulation of ciprofloxacin in both the susceptible and the resistant strains of QnrS-positive isolates. However, the decrease of the latter was lower than the former. 【Conclusion】 The accumulation of ciprofloxacin in QnrS-positive animal clinical isolates of *E. coli* could be reduced and lower than the effective concentration by activating of active efflux pump, which affected the plasmid-mediated resistance.

Key words: *Escherichia coli*; Ciprofloxacin; active efflux pumps

0 引言

【研究意义】近年来, 随着氟喹诺酮类药物在临床

广泛应用, 细菌对此类药的耐药性也越来越强, 严重影响了其临床疗效及应用。其中以人畜共患菌——大肠埃希氏菌耐药程度最为严重, 受到广大研究人员的

收稿日期: 2009-04-20; 接受日期: 2010-01-28

基金项目: 国家自然科学基金—广东省自然科学基金联合基金重点项目 (U0631006)

作者简介: 阳艳林, 硕士。Tel: 020-38604063; E-mail: angeld98@126.com。通信作者刘雅红, 教授, 博士。Tel: 020-85287189; E-mail: gale@scau.edu.cn

关注, WHO 还建议对细菌耐药性建立全球耐药监测网。因此,通过对动物源大肠埃希氏菌的氟喹诺酮类耐药机制的研究,为兽医临床应用提供理论依据,具有长远的意义。【前人研究进展】对于大肠埃希氏菌氟喹诺酮类耐药性研究,目前已有大量的文献报道^[1-11]。氟喹诺酮类耐药性主要机制是药物作用靶位改变^[1-3]、质粒介导的耐药^[4-5]、细菌膜通透性降低和主动外排系统作用^[6-9],并且后者常表现出多重耐药性和介导高水平耐药^[9-12]。【本研究切入点】临床分离的携 QnrS 动物源大肠埃希氏菌对氟喹诺酮的敏感性存在着很大的差异,这种差异说明细菌存在着较为复杂的耐药机制。方治平等^[13]研究报道大肠杆菌中存在主动外排泵系统,并对亲水性氟喹诺酮药物的摄入产生重要的影响,从而加剧细菌的耐药性。因此,对 QnrS 阳性株是否也同样存在外膜通透及外排泵系统作用的研究具有非常重要的意义。【拟解决的关键问题】本文通过检测携 QnrS 菌株对氟喹诺酮类药物的敏感性,并以盐酸环丙沙星为代表,研究氟喹诺酮类药物在动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株体内蓄积量的变化规律,对菌体内是否存在主动外排系统及其作用进行研究,为进一步探讨主动外排系统的作用及与 QnrS 介导的耐药性的相互关系。

1 材料与方法

1.1 细菌来源

动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株分离自广东地区各集约化养殖场,由广东省兽药研制与安全评价重点实验室保存。ATCC 25922 为该实验室保存的药敏质控菌株。

1.2 药物与试剂

环丙沙星(含量为 99.7%,批号为 051001)由山东金太阳制药有限公司提供;诺氟沙星(含量 96.3%,批号为 040502),恩诺沙星(含量为 99.5%,批号为 061005),培氟沙星(含量为 99.4%,批号为 080410),由浙江国邦兽药有限公司提供;左氧氟沙星(含量 87.6%,批号 080306),氧氟沙星(含量 98.4%,批号 061111),由浙江普洛康裕制药有限公司提供;盐酸环丙沙星标准品(含量为 99.8%,批号为 H010598)由中国兽药监察所提供;LB 肉汤培养基为广东环凯微生物科技生物有限公司提供,碳酰氰间氯苯(carbonylcyanide m-chlorophenolhydrazone, CCCP)购自 Sigma 公司,甘氨酸(批号 0617)购自 Amereco。磷酸、盐酸均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 最低抑菌浓度(MIC)测定 采用微量肉汤二倍稀释法^[14]测定携带 QnrS 菌株中的最低抑菌浓度(MIC),以 CLSI(2005 年版)公布的药敏试验解释标准分析结果。

1.3.2 标准曲线的绘制 氟喹诺酮类药物在一定波长激发下可发生荧光,且荧光值与氟喹诺酮药物含量呈线性关系。因此按文献^[15]的方法,用 F-4500 型(HITACHI 制造)荧光分光光度仪对盐酸环丙沙星样品溶液进行全波长扫描,分别得出其激发波长(452 nm)和发射波长(279 nm);并用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸甘氨酸(pH 3.0)配成浓度为 0.01—1 mg·L⁻¹ 标准液,求出荧光强度与药物浓度的标准曲线。

1.3.3 盐酸环丙沙星在动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株体内蓄积的测定 按文献^[16]方法并稍做改动。细菌在细菌 LB 肉汤培养基中振荡培养至 OD 值为 0.7—0.8, 4℃, 4 000×g 离心收集菌落,然后用 50 mmol·L⁻¹ PBS (pH7.0) 洗 3 遍,并将细菌混悬于此缓冲液中达到约 40 mg·mL⁻¹ 的菌悬液,取该菌悬液于 37℃ 水中温浴 10 min,加入盐酸环丙沙星至终浓度为 10 mg·mL⁻¹,并于加药后 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 min 分别取 1 mL 菌液至等量冰浴的 PBS 中,4℃, 12 000×g 离心 5 min,沉淀再用 1 mL 冰浴 PBS 洗 1 次,同上条件下离心,弃上清液。沉淀加入 1 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸-甘氨酸缓冲液(pH 3.0) 25℃ 水浴过夜,次日 12 000×g, 4℃ 离心 10 min,取上清液以荧光分光光度仪测定荧光强度,并通过对应的标准曲线得出菌内药物浓度,即细菌对药物的摄入量。

1.3.4 CCCP 对 QnrS 阳性株摄入盐酸环丙沙星的影响 细菌收集同上述,在加入盐酸环丙沙星 5 min 后取出一半菌悬液至另一管中,并迅速加入 CCCP 至终浓度为 100 μmol·L⁻¹,然后在加入 CCCP 后的 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 min 分别从加与不加 CCCP 的菌悬液中取 1 mL 至等量冰浴的 PBS 中,其它的操作同 1.3.3,根据荧光值求出其对盐酸环丙沙星摄入量的变化。上述实验均设立重复,每个样品均测定 3 次,取平均值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 统计分析软件,对动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株体内的盐酸环丙沙星蓄积量的变化进行 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 判为差异显著,以 $P < 0.01$ 判为差异极显著。

2 结果

2.1 动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株对氟喹诺酮类药物的敏感性

QnrS 阳性株对于氟喹诺酮类药物的敏感性差异很大,以环丙沙星为例, MIC 从 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 最高值与最低值相差 32 倍。并且, QnrS 阳性受试菌株对其它的第三代氟喹诺酮类的耐药情况与环丙沙星基本相似, 结果见表 1。

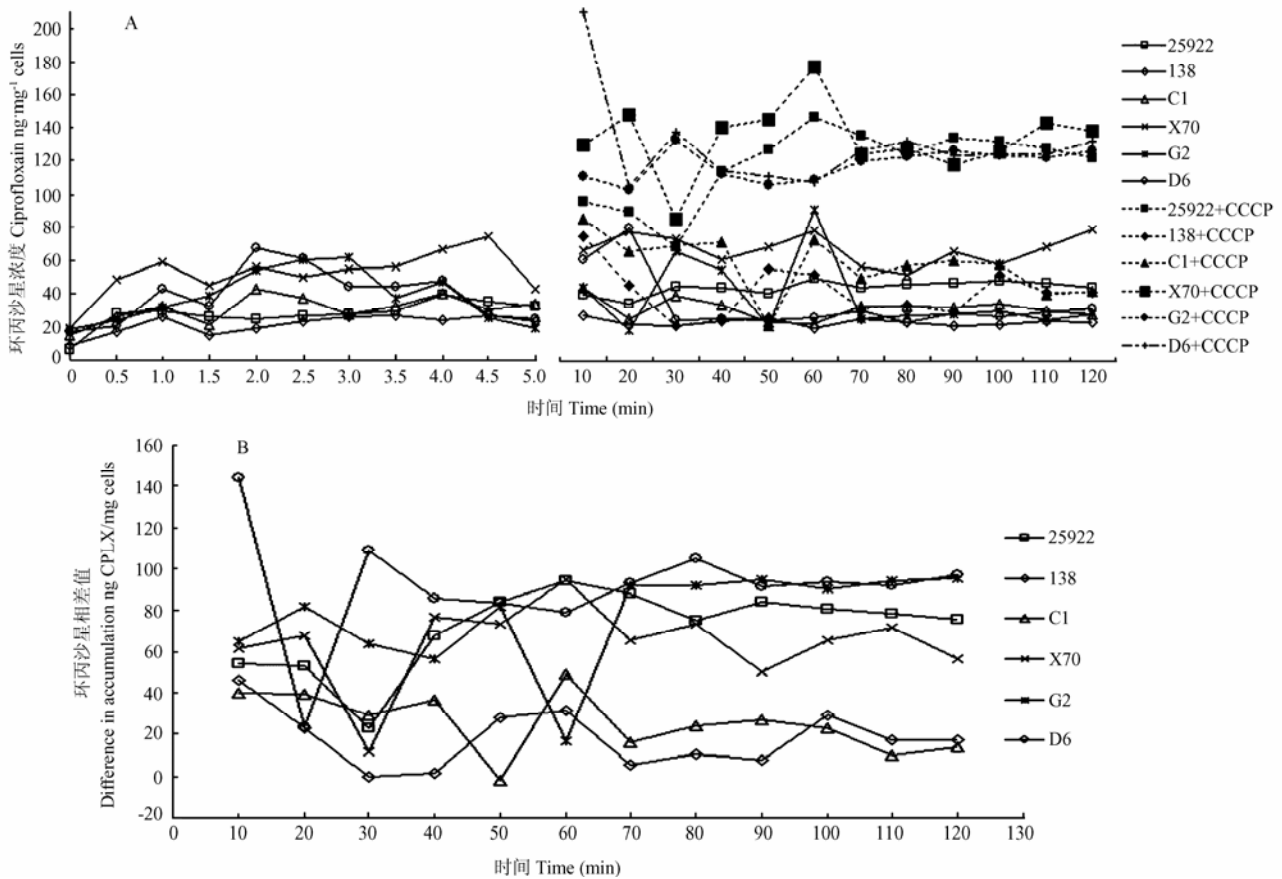
2.2 盐酸环丙沙星在动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株体内的蓄积量及 CCCP 的影响

选用 ATCC25922 作为质控标准敏感株, 对比携 QnrS 菌株体内环丙沙星药物蓄积浓度的变化。结果表明, 受试耐药菌株体内盐酸环丙沙星浓度均比受试敏

感株和质控标准株低, 在加入 CCCP 后, 所有受试菌均有升高, 但均未高于质控标准株体内药物蓄积水平; 本文研究还发现, 质控标准株菌内盐酸环丙沙星在加入 CCCP 后也出现了明显变化, 如加入 60 min 时, 与不加 CCCP 比较, 增加了近 $100 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$; 另外, 加入 CCCP 前后受试耐药菌株 D6、G2 体内的药物浓度差值均高于受试敏感株和质控标准株; 而临床分离 QnrS 阳性敏感株 138、低耐药水平 X70 对氟喹诺酮类药物的蓄积量在加入 CCCP 前后变化最小, 均低于质控标准株。结果见图 1。

2.3 动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株对盐酸环丙沙星蓄积的比较

大部分受试株在 10 min 内对盐酸环丙沙星的摄入量就已达到或接近稳态浓度, 且与 MIC 值呈负相关。



A: 动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株体内环丙沙星在不同时间内的蓄积量及 CCCP 的影响; B: 动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株在加入 CCCP 与未加 CCCP 体内的环丙沙星相差值
A: Time-dependent accumulation of ciprofloxacin by QnrS-positive animal clinical isolates of *E. coli* without CCCP and following CCCP addition at different minutes; B: Time-dependent differential accumulation of ciprofloxacin by QnrS-positive animal clinical isolates of *E. coli*. Difference in ciprofloxacin accumulation = (accumulation in presence of CCCP)–(accumulation without CCCP)

图 1 QnrS 阳性株体内环丙沙星蓄积量变化情况及 CCCP 的影响

Fig. 1 The accumulation of ciprofloxacin in QnrS-positive animal clinical isolates of *E. coli* and the influence of CCCP

表 1 动物源大肠埃希氏菌 QnrS 阳性株对氟喹诺酮类药物的 MIC ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 值Table 1 MIC results of fluoroquinolone antibiotics against QnrS-positive animal clinical isolates of *E.coli*

| 菌种 Strain | 环丙沙星 Ciprofloxacin | 恩氟沙星 Enrofloxacin | 诺氟沙星 Norfloxacin | 甲氟哌酸 Perfloxacin | 氧氟沙星 Ofloxacin | 左氧氟沙星 Levofloxacin |
|--------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| 138 | 1 | 0.25 | 0.5 | 16 | 4 | 0.5 |
| X70 | 4 | 2 | 16 | 16 | 8 | 2 |
| C1 | 8 | 16 | 16 | 32 | 8 | 8 |
| D6 | 32 | 16 | 32 | 64 | 16 | 32 |
| G2 | 16 | 16 | 32 | 64 | 8 | 32 |
| 范围 Range | 1—32 | 0.25—16 | 0.5—32 | 16—64 | 4—16 | 0.5—32 |

受试耐药菌株在加入 CCCP 后摄入量增加百分比为 100%—300%，与质控标准株相比差异显著 ($P < 0.05$)；受试敏感株 138 在加入 CCCP 前菌体内的药物浓度低于质控标准株，加入 CCCP 后虽然有增加，但还是远远低于质控标准株体内的药物浓度，与质控标准株相

比差异不是很明显 ($P > 0.05$)。低耐药水平株 X70 也同样出现这种变化趋势，但与质控标准株相比差异极显著 ($P < 0.001$)，这可能与考察的菌株数有限有关。结果见表 2。

表 2 受试菌对盐酸环丙沙星摄入参数比较

Table 2 Parameters comparison of ciprofloxacin uptake by QnrS-positive animal clinical isolates of *E.coli*

| 菌种 Strain | 加入 CCCP 前平均值 The average of accumulation before CCCP was added ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) | 加入 CCCP 后摄入增加百分比 Percent increase of accumulation after CCCP was added (%) | 加入前后相差平均值 Difference between before and after | P 值 P value |
|--------------|---|--|---|----------------|
| ATCC25922 | 65.19 | 98.39 | 64.14 | |
| X70 | 30.50 | 83.68 | 25.52 | <0.001 |
| 138 | 22.36 | 81.36 | 18.19 | >0.05 |
| D6 | 37.01 | 208.35 | 77.10 | <0.001 |
| G2 | 42.89 | 166.78 | 71.50 | <0.05 |
| C1 | 33.21 | 275.78 | 91.57 | >0.05 |

与对照组 ATCC 25922 相比较 P was compared with standard strain ATCC 25922

3 讨论

3.1 本研究发现，不同临床分离的携带 QnrS 基因的动物源大肠埃希氏菌，对第三代氟喹诺酮类的敏感性差异很大，MIC 为 0.25—64 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时，同一菌株对实验所用的第三代氟喹诺酮类的耐药情况基本相致，减少兽医临床用药选择。对盐酸环丙沙星蓄积量的变化规律的研究发现，受试 QnrS 阳性菌均对盐酸环丙沙星的蓄积呈能量依赖性降低，其中以受试耐药株体内的药物浓度降低最为明显。同时，当加入能量抑制剂 CCCP 后，菌株体内药物浓度显著增加。因此，验证了受试 QnrS 阳性株内同样存在外排泵系统作用，这与其它研究者的结论相同^[17-23]。

3.2 研究还发现主动外排泵抑制剂 (CCCP) 对 QnrS

阳性菌株体内环丙沙星蓄积量均有影响，但其作用的大小却各异，影响最小的是敏感株，最大的是耐药株。这说明高耐药水平株的氟喹诺酮类药物耐药性不仅与质粒介导有关，而且还可能主要是由主动外排机制引起，与 Nikaido H^[24]的研究结果相符。虽然主动外排泵系统抑制剂能提高大肠埃希氏菌耐药菌株对亲水性氟喹诺酮药物的敏感性^[13]，但却无法回到从前的水平，这说明细菌体内不仅存在着外排泵系统的作用和质粒介导机制，可能还存在着其它的主导机制或相互作用，甚至未发现的机制也有可能^[25]。因此使得阻止主动外排泵系统作用之后，其菌体内的药物浓度也要低于临床敏感株。

3.3 盐酸环丙沙星在 QnrS 阳性受试菌体内的药物浓度，在未加入 CCCP 组中变化不是很大，随着时间的

推移, 质控标准株和耐药株 D6 体内的浓度有上升, 而耐药株 X70 却呈时间型的降低, 时间越长, 体内的浓度越低。药物能过外膜通透性进入细菌体内, 再经外排泵系统主动把药物泵出体外, 这个过程是一个动态的过程。在高水平的耐药株 D6 体内, 随着时间的推移药物进入体内的要大于药物的外排, 因此体内的浓度会呈时间依赖性的上升。而 X70 则刚好相反。这说明质粒介导的耐药菌体内浓度的变化不仅与外排泵系统有关, 与外膜的通透性也有很大的相关性^[26]。

3.4 大肠埃希氏菌的细胞膜上存在多种主动外排泵, 主动将多种抗菌药物和有机溶剂泵出体外, 导致细菌产生对多种抗菌药物的耐药性, 并与细菌细胞膜通透性下降产生协同作用, 引起高度耐药^[27]。主动外排泵在不同的氟喹诺酮类药物蓄积的方面作用也不尽相同, 一般来说对疏水性氟喹诺酮类药物(托氟沙星, 妥舒沙星, 司帕沙星等)摄入量要明显高于亲水性的氟喹诺酮类药物(环丙沙星, 诺氟沙星, 氧氟沙星等), 但加入能量抑制剂(CCCP, reserpine^[28], PABN^[19])后, 前者摄入量的差异要低于后者^[17-23]。这是由于 CCCP 作为能量解耦剂及质子载体抑制剂, 能使亲水性氟喹诺酮类药物 pH 梯度消失, 阻止药物的主动外排, 使菌内药物积聚增加。然而, 是否这种差异也存在于 QnrS 阳性菌株中, 还需进一步的研究。

4 结论

不同的携带 QnrS 的菌株对第三代氟喹诺酮类药物的敏感性表现出显著的差异, 这可能与携带 QnrS 的菌株是否同时存在其它机制有关。盐酸环丙沙星在不同的携带 QnrS 菌体内的浓度是呈能量依赖性降低, 而且随着耐药水平的提高以及时间的延长而加大减少量。不同细菌存在的耐药机制不同, 相同耐药机制在不同细菌内作用也不一, 或者甚至存在着不同机制的协同作用, 这些都给临床治疗带来很大的挑战。

References

[1] Bagel S, Hullén V, Wiedemann B, Heisig P. Impact of gyrA and parC mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(4): 868-875.

[2] Matrat S, Petrella S, Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Expression and purification of an active form of the Mycobacterium leprae DNA gyrase and its inhibition by quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51 (5): 1643-1648.

[3] Sorlozano A, Gutierrez J, Jimenez A, Luna J D, Martinez J L. Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum-β-Lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45 (8): 2740-2742.

[4] Tran J H, Jacoby G A, Hooper D C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(1): 118-125.

[5] Yue L, Jiang H X, Liao X P, Liu J H, Li S J, Chen X Y, Chen C X, Lu D H, Liu Y H. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2008, 132: 414-420.

[6] Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the Antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar)mutants. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(1): 306-308.

[7] Ghosh A S, Ahamed J, Chauhan K K, Kundu M. Involvement of an efflux system in high-level fluoroquinolone resistance of *Shigella dysenteriae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 242: 54-56.

[8] Nikaido H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(20): 5853-5859.

[9] Blanca M G, Teresa V, Jordi H B, Miguel V. The contribution of efflux pumps to quinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, 297: 187-195.

[10] Hirai K, Aoyama H, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S. Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1986, 30(2): 248-253.

[11] Hawkey P M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51(Suppl. 1): 29-35.

[12] 邓敏, 黄永茂. 大肠埃希菌对氟喹诺酮类药物耐药机制的研究进展. *西南军医*, 2008, 10(5): 98-100.

Deng M, Huang Y M. The research progress of *Escherichia coli* resistant mechanism to Fluoroquinolones. *Journal of Military Surgeon in Southwest China*, 2008, 10(5): 98-100. (in Chinese)

[13] 方治平, 徐炜, 刘小康, 宋晓红. 大肠杆菌体内氟喹诺酮类药物耐药机制的研究. *四川大学学报: 医学版*, 2005, 36(1): 86-89.

Fang Z P, Xu W, Liu X K, Song X H. Study on the Accumulation of Fluoroquinolones in clinical isolates of susceptible and multi-drug-resistant *Escherichia coli* strains. *Journal of Sichuan University*:

- Medical Science Edition*, 2005, 36(1): 86-89. (in Chinese)
- [14] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程. 第 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 890-920.
- The Medical Administration Department of Ministry of Public Health, People Republic of China. *National Guide to Clinical Laboratory Procedures*. The Third edition. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 890-920. (in Chinese)
- [15] Chapman J S, Georgopapadakou N H. Fluorometric assay for fleroxacin uptake by bacterial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1989, 33(1): 27-29.
- [16] Mortimer P G S, Piddock L J V. A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1991, 28: 639-653.
- [17] 何汉江, 谭立志, 李丽华, 周 芸, 陆春雪, 曾焱华. 表皮葡萄球菌对氟喹诺酮类药物摄入的研究. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(2): 92-95.
- He H J, Tan L Z, Li L H, Zhou Y, Lu C X, Zeng Y H. Study on uptake of fluoroquinolones by *Staphylococcus epidermidis*. *Chinese Journal of Infection Chemotherapy*, 2005, 5(2): 92-95. (in Chinese)
- [18] 钟 利, 冯 萍, 夏培元, 雷秉钧, 范昕建, 吕晓菊. 金葡萄球菌对亲水或疏水性氟喹诺酮摄入的研究. 中国抗生素杂志, 2000, 25(1): 56-58.
- Zhong L, Feng P, Xia P Y, Lei B J, Fan X J, Lü X J. Study on uptake of hydrophilicity and hydrophobicity fluoroquinolones for *Staphylococcus aureus*. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2000, 25(1): 56-58. (in Chinese)
- [19] Ricci V, Piddock L J V. Accumulation of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(9): 2361-2366.
- [20] Ricci V, Piddock L. Accumulation of garenoxacin by *Bacteroides fragilis* compared with that of five fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52: 605-609.
- [21] Michot J M, Seral C, Bambeke F V, Mingeot-Lechercq M P, Tulkens P M. Influence of efflux transporters on the accumulation and efflux of four quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, garenoxacin, and moxifloxacin) in J774 macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(6): 2429-2437.
- [22] 夏培元, 雷秉钧. 细菌体内药物蓄积浓度减少与氟喹诺酮耐药性的研究进展. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(1): 24-27.
- Xia P Y, Lei B J, The reduction of drug accumulation by bacteria and the progress of fluoroquinolone resistance. *World Notes on Antibiotics*, 2001, 22(1): 24-27. (in Chinese)
- [23] Xia P Y, Feng P, Zhong L, Lu X J, Lei B J. Accumulation of ciprofloxacin and lomefloxacin in fluoroquinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Chinese Medical Journal*, 2002, 115(1): 31-35.
- [24] Nikaido H, Thanassi D G. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993, 37(7): 1393-1399.
- [25] Sonia K M L, Lauren B B, David S, Lynn Z. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(1): 235-242.
- [26] Chenia H Y, Pillay B, Pillay D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(5): 1274-1278.
- [27] Yang S, Clayton S R, Zechiedrich E L. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51: 545-556.
- [28] Markham P N. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(4): 988-989.

(责任编辑 林鉴非)