

• 论 著 •

外排泵在肺炎克雷伯菌对左氧氟沙星耐药中的作用*

江培涛¹, 吴 钧², 方 敏¹, 马 超¹, 李琛泽¹

1. 南京鼓楼医院集团仪征医院/扬州大学医学院附属医院检验科, 江苏扬州 211900;

2. 南京医科大学附属脑科医院检验科, 江苏南京 210029

摘要:目的 探讨肺炎克雷伯菌(KP)中外排泵 OqxAB、AcrAB 和 QepA 介导的左氧氟沙星(LVX)耐药机制。方法 选择分离自南京鼓楼医院集团仪征医院 2018 年 7 月至 2020 年 12 月的门诊和住院患者的 106 株 KP(剔除同一患者相同部位的重复分离株),采用微量肉汤稀释法检测 KP 对常用抗菌药物的敏感性,根据药物敏感试验结果随机选择 24 株对 LVX 耐药的 KP 作为试验组,27 株 LVX 非耐药的 KP 作为对照组。采用羧基氟氯苯脲泵抑制法检测 KP 的外排泵表型,采用实时定量反转录 PCR 检测外排泵 OqxAB、AcrAB 和 QepA 相应表达基因 OqxA、acrB 和 QepA 的表达水平,采用常规 PCR 及测序检测 acrR 基因突变。分析两组 KP 外排泵基因表达水平的差异,LVX 最低抑菌浓度(MIC)与外排泵基因表达水平间的关联性,以及两组 KP 外排泵表型的差异。结果 试验组与对照组 KP 外排泵表型试验结果差异无统计学意义($P>0.05$)。两组 KP 外排泵基因 OqxA、QepA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),而 acrB 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$),且试验组 acrB 表达水平与 LVX 的 $\log_2$ MIC 呈正相关($r=0.544, P<0.05$)。试验组调控因子 acrR 突变率为 58.3%(14 株),携带突变型 acrR 基因的 KP(14 株)与携带野生型 acrR 基因的 KP(10 株)之间 acrB 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 外排泵是介导 KP 对 LVX 耐药的机制之一, AcrAB 在外排泵介导 KP 对 LVX 耐药中具有明显作用; OqxAB 和 QepA 虽广泛分布于 KP 中,但并不是介导 KP 对 LVX 耐药的主要机制。

关键词:肺炎克雷伯菌; 外排泵; 左氧氟沙星; 耐药机制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.15.018

中图法分类号:R446.5;R378.99+6

文章编号:1673-4130(2022)15-1874-07

文献标志码:A

Role of efflux pump in the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to levofloxacin*JIANG Peitao¹, WU Jun², FANG Min¹, MA Chao¹, LI Chenze¹

1. Department of Clinical Laboratory, Yizheng Hospital, Nanjing Drum Tower Hospital Group / the Affiliated Hospital of Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 211900, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Brain Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of levofloxacin (LVX) resistance mediated by efflux pump OqxAB, AcrAB and QepA in *Klebsiella pneumoniae* (KP). **Methods** A total of 106 KP strains isolated from outpatients and inpatients of Yizheng Hospital of Nanjing Drum Tower Hospital Group from July 2018 to December 2020 were selected (repeated isolated strains from the same part of the same patient were excluded), and the susceptibility of KP to commonly used antibiotics was detected by micro-broth dilution method. According to the results of drug susceptibility test, 24 LVX-resistant KP strains were randomly selected as the experimental group, and 27 LVX non-resistant KP strains were selected as the control group. The efflux pump phenotype of KP was detected by carbonyl cyanochlorophenylhydrazone pump inhibition method, and the expression levels of the corresponding expressed genes OqxA, acrB and QepA of efflux pumps OqxAB, AcrAB and QepA were detected by real-time quantitative reverse transcription PCR, and the mutation of acrR gene was detected by conventional PCR and sequencing. The differences in the expression levels of KP efflux pump genes between the two groups, the correlation between the minimum inhibitory concentration (MIC) of LVX and the expression levels of efflux pump genes, and the differences in KP efflux pump phenotypes between the two groups were analyzed. **Results** There was no statistically significant difference in the results of KP efflux

* 基金项目:南京鼓楼医院集团仪征医院科研基金项目(NH19003)。

作者简介:江培涛,男,副主任技师,主要从事临床微生物检验学研究。

pump phenotype test between the test group and the control group ($P > 0.05$). There was no statistically significant difference in the expression levels of KP efflux pump genes OqxA and QepA between the two groups ($P > 0.05$), but there was statistically significant difference in the expression level of *acrB* between the two groups ($P < 0.05$), and the expression level of *acrB* in the experimental group was positively correlated with the $\log_2$ MIC of LVX ($r = 0.544, P < 0.05$). The mutation rate of the regulatory factor *acrR* in the experimental group was 58.33% (14 strains). There was no statistically significant difference in the expression level of *acrB* between the KP (14 strains) carrying the mutant *acrR* gene and the KP (10 strains) carrying the wild-type *acrR* gene ($P > 0.05$). **Conclusion** The efflux pump is one of the mechanisms that mediate the resistance of KP to LVX, and AcrAB plays a significant role in the efflux pump mediating the resistance of KP to LVX. Although OqxAB and QepA are widely distributed in KP, they are not the main mechanism that mediates the resistance of KP to LVX.

Key words: Klebsiella pneumoniae; efflux pump; levofloxacin; drug resistance mechanism

肺炎克雷伯菌(KP)是临床常见的革兰阴性条件致病菌,可以引起呼吸道、尿道、血流等多种感染性疾病。除头孢菌素等 β -内酰胺类抗菌药物之外,左氧氟沙星(LVX)等氟喹诺酮类抗菌药物因为具有口服吸收好、生物利用度高、不良反应少等优点,也常常作为成年人 KP 感染的治疗选择。但是,近年来 KP 引起的医院感染及其耐药率逐年增高,尤其是以耐碳青霉烯类药物为代表的多重耐药 KP 感染的不断增加,常常导致抗菌治疗失败、住院时间延长、治疗费用增加,甚至病死率增高等不良后果,因而如何治疗多重耐药 KP 感染逐渐成为临床医师面临的难题。外排泵系统的高度表达是 KP 获得多重耐药的机制之一,其中属于耐药结节分化(RND)家族的 AcrAB-TolC 外排泵在肠杆菌科中检出率最高^[1]。由外排泵介导的 KP 对碳青霉烯类、替加环素等抗菌药物的耐药机制研究已屡见不鲜,而外排泵介导 KP 对喹诺酮类耐药机制报道相对较少。本研究拟探讨外排泵 OqxAB、AcrAB 和 QepA 在 KP 临床菌株中的基因表达情况及其在 KP 对 LVX 耐药中的作用,以期为临床预防和控制多重耐药 KP 感染提供更多理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 106 株 KP 分离自江苏省仪征市南京鼓楼医院集团仪征医院 2018 年 7 月至 2020 年 12 月的门诊和住院患者,已剔除同一患者相同部位的重复分离株。标本来源:重症监护病房 24 株,呼吸内科 31 株,神经外科 20 株,胸外科 13 株,儿科 6 株,其他科室 12 株;标本类型:痰及肺泡灌洗液 74 株,尿液 18 株,脓液及伤口分泌物 7 株,血液 4 株,导管 3 株。质控菌株为大肠埃希氏菌 ATCC 25922、KP ATCC 700603,均购自生物梅里埃公司。

1.2 主要仪器与试剂 GHP-9270 数显隔水式恒温孵育箱(上海精宏医疗器械厂);MicroScan Walk-Away 96 Plus 细菌鉴定药敏分析仪(美国贝克曼公司);TGL-18R 冷冻高速离心机(珠海 Hema 医学仪器公司);NanoDrop2000 分光光度计(美国 Thermo 公司);ABI7500PCR 仪(美国 ABI 公司);LVX 注射

液(浙江医药股份有限公司);LB 肉汤(杭州百思生物技术公司);水解酪蛋白(MH)琼脂(杭州滨河生物技术公司);细菌基因组实时定量反转录 PCR(qRT-PCR)试剂盒(北京天根生化科技公司);琼脂糖(广州赛国生物科技公司)。

1.3 菌株鉴定和药物敏感试验(简称药敏试验) 所有菌株的分离培养均严格按照《全国临床检验操作规程》第 4 版操作,菌种鉴定和 LVX 等常规药敏试验(微量肉汤稀释法)均由 MicroScan WalkAway 96 Plus 系统完成。所有菌株的鉴定均通过 PCR 检测 *rpoB* 基因进行确认。药敏试验判断标准参照 2018 版临床实验室标准化协会(CLSI)M100^[2]执行,以 LVX 的最低抑菌浓度(MIC) $\leq 2.00 \mu\text{g/mL}$ 为敏感, MIC = $4.00 \mu\text{g/mL}$ 为中介, MIC $\geq 8.00 \mu\text{g/mL}$ 为耐药。随机选取 24 株对 LVX 耐药的 KP 作为试验组,另随机选取 27 株对 LVX 非耐药的 KP(25 株敏感,2 株中介)作为对照组进行后续试验。

1.4 KP 的外排泵表型测定 参照文献[3-4]以 KP ATCC700603 标准株生长良好的碳基氯苯胍(CCCP)溶液水平 $25 \mu\text{g/mL}$ 为外排泵抑制剂工作水平;采用微量肉汤稀释法分别测定加入 CCCP 前后 LVX 对两组 KP 的 MIC,同时以不含药物的肉汤作为生长对照。本试验以加入外排泵抑制剂后 LVX 的 MIC 值降低至原值的 1/4 或更低作为外排泵表型阳性的判定标准。

1.5 外排泵基因检测 采用 qRT-PCR 检测外排泵 OqxAB、AcrAB 和 QepA 相应表达基因 OqxA、*acrB* 和 QepA 的表达水平。用阳离子调节的 MH 肉汤稀释的隔夜细菌培养物在 35°C 下生长至对数阶段,摇动混匀(200 r/min)。在无 RNase 的环境中,用 Trizol 法从分离物中提取总 RNA。测定 RNA 的产量和质量,然后将 RNA 水平调整到 150 ng/mL 。使用反转录试剂盒将所有分离物的总 RNA 反转录成 cDNA;然后用 qRT-PCR(60°C 30 s; 50°C 5 min; 95°C 10 min; 40 次循环 95°C 15 s 和 60°C 1 min; 60°C 30 s)对靶基因的相对表达量进行测定。以 KP

ATCC700603 作为参考菌株(表达水平=1),用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法根据管家基因 *rrsE*(KP)的表达计算被测基因的相对表达量,所有标本 3 复孔测定,取平均值。用于上述基因检测的引物(表 1)合成及上述试验由南京祖和生物技术公司完成。

1.6 *acrR* 基因突变检测 对 LVX 耐药 KP 临床分离株,用表 1 所述引物进行 PCR 并测序,以证实 *acrR* 中相对于参考 KP 株 MGH78578(CP000647)^[5] 的突变存在。

1.7 统计学处理 用 Whonet5.6 软件进行抗菌药物敏感性统计;用 SPSS20.0 软件通过 *t* 检验分析两组之间基因表达水平的差异;用线性回归分析 MIC 与基因表达水平之间的关系;采用 χ^2 或 Fisher 确切概率法分析两组之间外排泵表型的差异。以 $P < 0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结 果

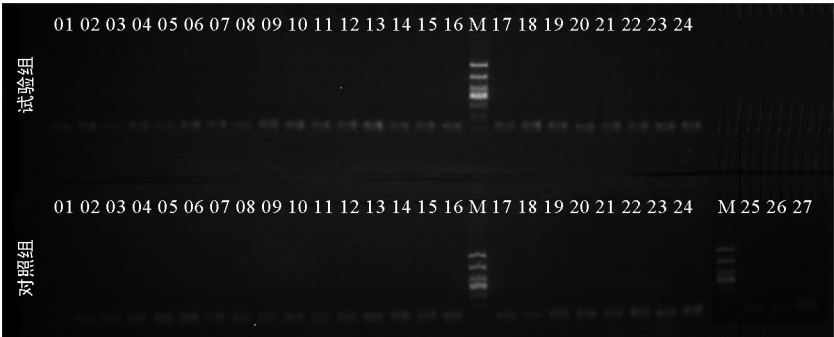
2.1 药敏试验及菌株确认试验结果 106 株 KP 对 LVX 的敏感率为 69.8%(74/106),中介率为 3.8%(4/106),耐药率为 26.4%(28/106),见表 2。*rpoB* 基

因 PCR 电泳结果显示,随机选取的 51 株菌株均为 KP,见图 1。

表 1 相关基因引物序列和产物长度			
引物	引物序列(5'-3')	引物长度 (bp)	参考文献
<i>rpoB</i>	F:CGTATCGTAAAGTGACCGACG	114	[6]
	R:GGCCGTTTTTCATCCAGGTTG		
<i>OqxA</i>	F:CGCGTCTCGGGATACATTGA	190	[7]
	R:AATAGGGGCGGTCACTTTGG		
<i>acrB</i>	F:AAACTTCGCCACTACGTCATA	158	[8]
	R:AGCTTAACGCCTCGATCAT		
<i>QepA</i>	F:ATCACCATGGGCACGCTGGGCGAC	401	[9]
	R:TGCCCCGCGTCCGGATCACGATAC		
<i>acrR</i>	F:GCTAAGCTGCCTGAGAGCAT	969	[5]
	R:ATGCAAATGCCGAGAATAC		
<i>rrsE</i>	F:GTCATCATGGCCCTTACGAG	94	[8]
	R:ACTTTATGAGGTCCGCTTGCT		

表 2 106 株 KP 对常用抗菌药物的药敏试验结果[%(*n*)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药	抗菌药物	敏感	中介	耐药
替加环素	94.3(100)	3.8(4)	1.9(2)	氨曲南	59.5(63)	2.8(3)	37.7(40)
氨苄西林	0.0(0)	0.0(0)	100.0(106)	厄他培南	83.0(88)	0.0(0)	17.0(18)
氨苄西林/舒巴坦	50.0(53)	7.5(8)	42.5(45)	亚胺培南	73.6(78)	2.8(3)	23.6(25)
哌拉西林/他唑巴坦	78.3(83)	0.0(0)	21.7(23)	美罗培南	72.6(77)	1.9(2)	25.5(27)
头孢唑林	64.1(68)	3.8(4)	32.1(34)	环丙沙星	69.8(74)	2.8(3)	27.4(29)
头孢呋辛	50.9(54)	3.8(4)	45.3(48)	LVX	69.8(74)	3.8(4)	26.4(28)
头孢曲松	60.4(64)	2.8(3)	36.8(39)	阿米卡星	84.0(89)	2.8(3)	13.2(14)
头孢他啶	67.9(72)	2.8(3)	29.2(31)	妥布霉素	76.4(81)	4.7(5)	18.9(20)
头孢噻肟	67.9(72)	0.0(0)	32.1(34)	庆大霉素	77.4(82)	0.0(0)	22.6(24)
头孢吡肟	74.5(79)	0.0(0)	25.5(27)	甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	71.7(76)	0.0(0)	28.3(30)
头孢西丁	72.6(77)	3.8(4)	23.6(25)				



注:试验组 01~24 分别对应菌株号为 LVX-R2、LVX-R7、LVX-R11、LVX-R15、LVX-R26、LVX-R32、LVX-R39、LVX-R42、LVX-R53、LVX-R67、LVX-R69、LVX-R71、LVX-R72、LVX-R74、LVX-R77、LVX-R79、LVX-R89、LVX-R94、LVX-R96、LVX-R97、LVX-R100、LVX-R106、LVX-R108、LVX-R111 的 KP;对照组 01~27 分别对应菌株号为 LVX-S66、LVX-S68、LVX-S70、LVX-S75、LVX-S76、LVX-S78、LVX-S80、LVX-S81、LVX-S82、LVX-S83、LVX-S84、LVX-S85、LVX-S86、LVX-S87、LVX-S88、LVX-S90、LVX-S91、LVX-S92、LVX-S93、LVX-S95、LVX-S98、LVX-S99、LVX-S101、LVX-S102、LVX-S113、LVX-S62、LVX-S103 的 KP。M 为 DNA Marker,条带大小从上至下依次为 1 000、700、500、400、300、200、100 bp。

图 1 试验组与对照组 *rpoB* 基因 PCR 电泳结果

2.2 外排泵表型试验结果 随机选择的 51 株 KP 中,9 株外排泵表型试验结果为阳性(17.6%)。参照 CLSI M100(S28)标准,试验组中有 3 株 KP 表现为外排泵表型试验阳性,其中 2 株对 LVX 耐药逆转为敏感;对照组中有 6 株 KP 表现为外排泵表型试验阳性,其中 2 株对 LVX 中介的菌株均表现为外排泵表型试验阳性,且均逆转为敏感,25 株对 LVX 敏感的菌株中有 4 株表现为外排泵表型试验阳性。试验组、对照组

外排泵表型试验结果差异无统计学意义($\chi^2=0.293$, $P>0.05$)。见表 3。

2.3 qRT-PCR 结果 两组 KP 外排泵基因 OqxA、QepA 表达水平差异无统计学意义($t=0.651$ 、 -0.669 , $P=0.518$ 、 0.506 ,图 2A、2B),而 *acrB* 表达水平差异有统计学意义($t=12.76$, $P<0.001$,图 2C),且试验组 *acrB* 表达水平与 LVX 的 $\log_2$ MIC 呈正相关($r=0.544$, $P=0.006$,图 2D)。

表 3 两组 KP 临床分离株外排泵表型试验结果

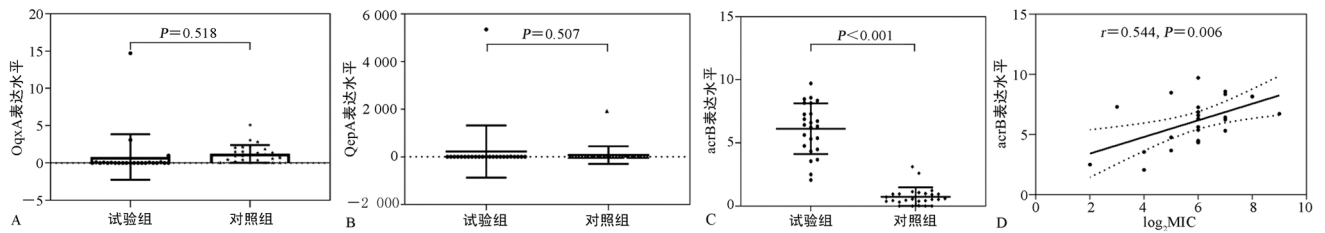
组别	菌株号	MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)		外排泵 表型试验	组别	菌株号	MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)		外排泵 表型试验
		LVX	LVX+CCCP				LVX	LVX+CCCP	
对照组	LVX-S66	0.25	0.25	—	试验组	LVX-R2	64.00	32.00	—
	LVX-S68	0.25	0.25	—		LVX-R7	64.00	32.00	—
	LVX-S70	1.00	0.25	+		LVX-R11	8.00	0.50	+
	LVX-S75	0.25	0.25	—		LVX-R15	128.00	128.00	—
	LVX-S76	0.25	0.25	—		LVX-R26	8.00	2.00	+
	LVX-S78	0.50	0.25	—		LVX-R32	512.00	256.00	—
	LVX-S80	1.00	0.25	+		LVX-R39	16.00	8.00	—
	LVX-S81	0.25	0.25	—		LVX-R42	128.00	128.00	—
	LVX-S82	0.25	0.25	—		LVX-R53	128.00	64.00	—
	LVX-S83	0.25	0.25	—		LVX-R67	64.00	64.00	—
	LVX-S84	0.25	0.25	—		LVX-R69	32.00	32.00	—
	LVX-S85	0.25	0.25	—		LVX-R71	256.00	128.00	—
	LVX-S86	0.25	0.25	—		LVX-R72	64.00	32.00	—
	LVX-S87	0.50	0.25	—		LVX-R74	64.00	64.00	—
	LVX-S88	0.50	0.25	—		LVX-R77	64.00	64.00	—
	LVX-S90	0.25	0.25	—		LVX-R79	64.00	64.00	—
	LVX-S91	0.25	0.25	—		LVX-R89	128.00	64.00	—
	LVX-S92	1.00	0.25	+		LVX-R94	64.00	16.00	+
	LVX-S93	0.50	0.25	—		LVX-R96	64.00	64.00	—
	LVX-S95	0.25	0.25	—		LVX-R97	128.00	128.00	—
LVX-S98	0.25	0.25	—	LVX-R100	256.00	256.00	—		
LVX-S99	0.25	0.25	—	LVX-R106	32.00	32.00	—		
LVX-S101	1.00	0.25	+	LVX-R108	16.00	8.00	—		
LVX-S102	0.25	0.25	—	LVX-R111	32.00	16.00	—		
LVX-S113	0.25	0.25	—						
LVX-S62	4.00	1.00	+						
LVX-S103	4.00	0.25	+						

注:—表示外排泵表型试验结果阴性;+表示外排泵表型试验结果阳性。

2.4 *acrR* 基因突变检测 试验组 *acrR* 基因 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳及测序结果显示菌株 02(LVX-R7)、03(LVX-R11)、05(LVX-R26)、07(LVX-R39)、11(LVX-R69)、12(LVX-R71)、18(LVX-R94)、21(LVX-R100)、23(LVX-R108)、24(LVX-R111)扩增出 969 bp 大小(野生型)的目的片段,而其余 14 株

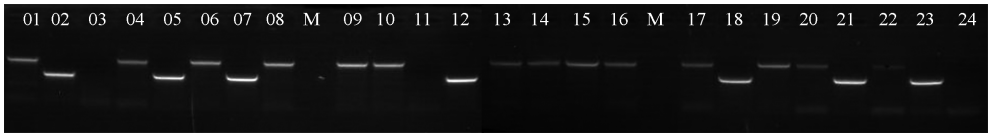
(58.3%)均扩增出 2 000 bp 大小(突变型)的条带(图 3)。经测序比对,两种产物与美国生物信息中心基因库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中 KP 株 MGH78578 序列一致性达到 98%以上。突变型菌株序列改变主要为碱基置换(图 4、5)。10 株携带野生型 *acrR* 基因的菌株与 14 株携带突变型 *acrR*

基因的菌株 *acrB* 基因表达水平差异无统计学意义 ($t'=0.993, P=0.347$)。



注：A、B、C 分别为两组 KP 外排泵基因 *OqxA*、*QepA*、*acrB* 表达水平比较；D 为外排泵基因 *acrB* 表达水平与 $\log_2$ MIC 间关系散点图。。

图 2 两组 KP 外排泵基因 *OqxA*、*acrB*、*QepA* 表达水平比较及 *acrB* 表达水平与 $\log_2$ MIC 的关系图



注：01~24 分别对应试验组菌株号为 LVX-R2、LVX-R7、LVX-R11、LVX-R15、LVX-R26、LVX-R32、LVX-R39、LVX-R42、LVX-R53、LVX-R67、LVX-R69、LVX-R71、LVX-R72、LVX-R74、LVX-R77、LVX-R79、LVX-R89、LVX-R94、LVX-R96、LVX-R97、LVX-R100、LVX-R106、LVX-R108、LVX-R111 的 KP；M 为 DNA Marker。

图 3 试验组 *acrR* 基因 PCR 电泳结果

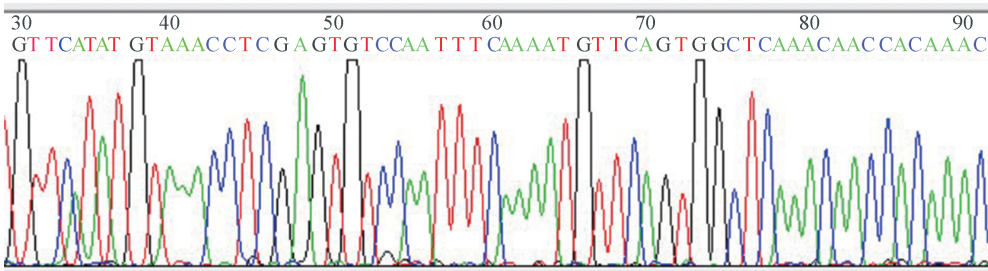


图 4 试验组部分突变型菌株 *acrR* 基因正向测序峰图

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* MGH 78578, complete genome

Sequence ID:CP000647.1 Length:5 3151 20 Number of Matches:4

Range 1:308 856 to 309 405 GenBank Graphics

▼Next Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
953 bits(516)	0.0	540/551(98%)	4/551(0%)	Plus/Minus
Query 455	TAGGGAAGGTGCGAACAAGTTCCTGATATGAGATCATCATATTCATCCGAGCGCATCCC	514		
Sbjct 309 405	TAGGGAAGGTGCGAACAAGTTCCTGATATGAGATCATCATATTCATCCGAGCGCATCCC	309 346		
Query 515	AGAGGGACATCATGAGCCATCAACTCACCTTCGCCGATAGTGAATTCAGCACTAAGCGCC	574		
Sbjct 309 345	AGAGGGACATCATGAGCCATCAACTCACCTTCGCCGATAGTGAATTCAGCACTAAGCGCC	309 286		
Query 575	GTCAGACCCGAAAAGAGATTTTCTCTCCCGCATGGAGCAGATTCTGCCATGGCAGAATA	634		
Sbjct 309 285	GTCAGACCCGAAAAGAGATTTTCTCTCCCGCATGGAGCAGATTCTGCCATGGCAGAAACA	309 226		
Query 635	TGACCGCTGTCATCGAGCCGTTTTATCCCAAGCGGGCAATGGCCGACGGCCCTATCCGC	694		
Sbjct 309 225	TGGTGAAGTCATCGAGCCGTTTTATCCCAAGCGGGCAATGGCCGACGGCCCTATCCGC	309 166		

图 5 试验组部分突变型菌株 *acrR* 基因碱基序列比对图

3 讨 论

KP 是临床常见的条件致病菌,2019 年 CHINET 三级医院数据表明,其在临床标本中的检出率为 15.17%,仅次于大肠埃希氏菌,且该菌对碳青霉烯类的耐药率呈持续上升趋势,对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别从 2005 年的 3.0%、2.9%上升至 2019 年的

25.3%、26.8%,对环丙沙星耐药率从 2005 年的 41.0%逐年下降至 2014 年的 22.4%后又回升至 2019 年的 38.1%,对 LVX 的耐药率从 2017 年的 26.6%上升至 2019 年的 33.4%^[10]。本研究中 106 株 KP 对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 23.6%和 25.5%,对环丙沙星和 LVX 的耐药率为分

别为 27.4% 和 26.4%，均低于全国水平。分析差异产生的原因，可能与南京鼓楼医院集团仪征医院收治病种及抗菌药物可选种类与三级医院不同有关，后者收治患者病情相对复杂，医院获得性感染及多重耐药菌感染常见，抗菌药物选择压力大，导致多种抗菌药物的耐药率较高。

LVX 属于第 3 代喹诺酮类抗菌药物，一般用于治疗成人呼吸道、泌尿生殖道和皮肤软组织等感染，该药具有广谱抗菌作用，对多数肠杆菌目细菌、革兰阳性菌、肺炎支原体和衣原体有抗菌作用。本研究表明 LVX 体外抗菌活性强于第 2 代喹诺酮类抗菌药物环丙沙星，这与全国数据一致^[10]。LVX 主要作用机制是通过抑制细菌 DNA 解旋酶的活性，阻止细菌 DNA 的合成而导致菌体死亡。

研究表明，KP 对氟喹诺酮类抗菌药物的耐药机制除了 DNA 解旋酶和拓扑异构酶突变之外，质粒介导耐药、外膜通透性下降以及外排泵因素都有作用^[1,11-12]。AcrAB-TolC 外排泵系统广泛分布于革兰阴性菌中，属于 RND 超家族，以质子驱动力为能量，通过外排泵将进入菌体内的药物或对自身有害的物质排出体外^[1]。同时文献^[4,13]报道，KP AcrAB-TolC 外排泵可能与其毒力有关，该外排泵主要由膜融合蛋白(AcrA)、外排转运蛋白(AcrB)和外膜通道蛋白(TolC)3 部分组成。有关外排泵介导 KP 耐药多见于 KP 对碳青霉烯类、替加环素等限制使用级抗菌药物耐药的报道中^[8,13-14]，但有关外排泵介导 KP 对 LVX 耐药性与外排转运蛋白相关基因表达水平和调节因子变异之间关系的研究尚不多见。本研究显示，对 LVX 耐药的 24 株 KP(试验组)中，有 3 株表现为外排泵表型试验阳性，其中 2 株对 LVX 耐药逆转为敏感；对 LVX 非耐药的 27 株 KP(对照组)中，6 株表现为外排泵表型试验阳性，其中 2 株对 LVX 耐药逆转为敏感，但两组的外排泵表型试验结果差异无统计学意义($P > 0.05$)，这说明外排泵可能广泛流行于 KP 中，但本研究样本量小，其真实差异有待进一步研究。值得一提的是，本研究是一项回顾性分析，2019 年 CLSI 将肠杆菌目 LVX 的敏感性折点修订至 $MIC \leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ，若以此为标准则外排泵表型阳性菌株均集中在对 LVX 耐药和中介的菌株中，且中介菌株全部表现为外排泵表型阳性并可逆转为对 LVX 敏感。该结果说明外排泵在 KP 对 LVX 的耐药机制中起到一定作用。本研究进一步分析了 KP 3 种外排泵转运蛋白相关基因 OqxA、QepA 和 acrB 表达水平与 LVX MIC 的关系，结果显示 OqxA、QepA 表达水平与 MIC 的升高并无相关性，这与文献^[8]报道相近。但试验组与对照组的 acrB 表达水平差异有统计学意义($t = 12.76, P < 0.001$)，且 acrB 表达水平与

LVX 的 $\log_2 MIC$ 呈正相关($r = 0.544, P = 0.006$)，说明 AcrAB 外排系统可能是介导 KP 耐药的一个重要机制。需要指出的是，本研究中 OqxA 在对 LVX 敏感的 KP 中的表达水平高于对 LVX 耐药的 KP，这与翟俊斌^[15]等关于对碳青霉烯类耐药的 KP 的研究一致。类似的研究结果表明 OqxAB 外排系统虽广泛分布于 KP 中，但并不是介导 KP 对 LVX、碳青霉烯类等抗菌药物耐药的机制，这与以往的报道不同^[16-17]，其机制和原因有待深入研究。

研究表明，AcrAB-TolC 外排泵的调控体系中，整体调控因子 MarA 和 RamA 增加该泵的外排作用，局部调控因子 acrR 阻遏 AcrAB 的外排作用^[18]。据此推断 acrR 的低表达或突变导致的外排阻遏功能缺失将会导致细菌耐药性增高，本研究分析了对 LVX 耐药的 KP 的局部调控因子 acrR 的突变现象，在 24 株耐药的 KP 中，有 14 株(58.3%)发生了 acrR 基因突变，突变的主要类型为碱基置换。但携带突变型 acrR 基因的 KP(14 株)的 acrB 基因表达水平并不显著高于携带野生型 acrR 基因的 KP(10 株)。因而推测 acrR 因子的阻遏调节在 AcrAB-TolC 外排泵介导的 KP 对 LVX 耐药中不占主导作用，在 10 株含野生型 acrR 基因的对 LVX 耐药的 KP 中，其他机制可能共同介导了该菌对 LVX 的耐药。本研究尚存在一定局限性，如样本量较小，还需积累样本量，对 OqxA 在对 LVX 敏感 KP 中的表达水平高于对 LVX 耐药 KP 的机制进一步研究。

综上所述，外排泵 OqxAB、AcrAB 和 QepA 虽然广泛流行于革兰阴性菌中，尤其是 OqxAB 在 KP 中广泛表达，但介导 KP 对 LVX 耐药的主要外排系统是 AcrAB。

参考文献

- [1] LI X Z, PLÉSIAT P, NIKAIIDO H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria[J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(2): 337-418.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-sixth informational supplement. M100-S28[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.
- [3] 孙静娜, 董威, 赵帅, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌外排泵表型和基因型的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(10): 763-766.
- [4] PAKZAD I, KARIN M Z, TAHERIKALANI M, et al. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from burn patients[J]. GMS Hyg Infect Control, 2013, 8(2): Doc15.
- [5] BIALEK-DAVENET S, MARCON E, LEFLON-GUIBOUT V, et al. In vitro selection of RamR and SoxR mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolone

- nes as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(6): 2795-2802.
- [6] HE Y, GUO X, XIANG S, et al. Comparative analyses of phenotypic methods and 16S rRNA, *khe*, *rpoB* genes sequencing for identification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, 109(7): 1029-1040.
- [7] MAURYA N, JANGRA M, TAMBAT R, et al. Alliance of efflux pumps with β -Lactamases in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. *Microb Drug Resist*, 2019, 25(8): 1155-1163.
- [8] WANG X, CHEN H, ZHANG Y, et al. Genetic characterisation of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to tigecycline: role of the global regulator RamA and its local repressor RamR[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 45(6): 635-640.
- [9] KIM E S, JEONG J Y, CHOI S H, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *QepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 65(3): 335-338.
- [10] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(3): 233-243.
- [11] PULZOVA L, NAVRATILOVA L, COMOR L. Alterations in outer membrane permeability favor drug-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(4): 413-420.
- [12] HOOPER D C, JACOBY G A. Mechanisms of drug resistance; quinolone resistance[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1354(1): 12-31.
- [13] YUHAN Y, ZIYUN Y, YONGBO Z, et al. Over expression of AdeABC and AcrAB-TolC efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2016, 49(2): 165-171.
- [14] ZHANG X, CHEN D, XU G, et al. Molecular epidemiology and drug resistant mechanism in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194000.
- [15] 翟俊斌, 曹小利, 程莉, 等. 肺炎克雷伯菌的敏感性及其质粒介导的耐药基因的分布特点分析[J]. *临床输血与检验*, 2020, 22(4): 425-429.
- [16] LI J, ZHANG H, NING J, et al. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2019, 8: 44.
- [17] CHENG L, CAO X L, ZHANG Z F, et al. Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of OqxAB and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2016, 15: 1.
- [18] SUBHADRA B, KIM J, KIM D H, et al. Local repressor AcrR regulates AcrAB efflux pump required for biofilm formation and virulence in *Acinetobacter nosocomialis*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 270.

(收稿日期: 2021-10-25 修回日期: 2022-06-18)

(上接第 1873 页)

- [12] IMAMURA M, MORIMOTO T, NOMURA T, et al. Independent prognostic impact of preoperative serum carcinoembryonic antigen and cancer antigen 15-3 levels for early breast cancer subtypes[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1): 26.
- [13] MOAZZEZY N, BOUZARI S, OLOOMI M. Comparative study of blood, tissue and serum levels of carcinoembryonic antigen (CEA) detection in breast cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(10): 2979-2985.
- [14] 赵彬, 王俊然, 郑素琴. KISS-1 基因对人肺鳞状细胞癌细胞 YTMCLC-90 增殖及侵袭能力的影响[J]. *中国医药*, 2018, 13(1): 48-50.
- [15] 赵天源, 常延河, 张艳敏, 等. 非小细胞肺癌中 KISS-1、MMP-2 和 MVD 的表达及意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2020, 36(2): 199-202.
- [16] 孟晓明, 王爱民, 樊丽伟, 等. 肿瘤转移抑制基因 Kiss1 在结直肠腺瘤和结直肠癌组织的表达及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(5): 866-868.
- [17] HSIAO C L, LIU L C, SHIH T C, et al. The association of matrix metalloproteinase-8 promoter genotypes in breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(4): 2181-2185.
- [18] PARK H J, KIM M K, KIM Y, et al. Gastrin-releasing peptide promotes the migration of vascular smooth muscle cells through upregulation of matrix metalloproteinase-2 and -9[J]. *BMN Rep*, 2017, 50(12): 628-633.
- [19] 李朋, 徐玲, 胡慧, 等. 早期乳腺癌患者血清 MMP 和 HER-2 胞外结合域的表达及临床意义[J]. *国际外科学杂志*, 2018, 45(4): 238-243.
- [20] 刘鹏勇, 王新, 佟旭. CDK2 和 KISS-1 在乳腺癌中的表达及临床效果的探析[J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2018, 35(2): 31-33.
- [21] 罗俊波, 郑瑞锋, 王彦威, 等. 血清 MMP-2、MMP-9 和 CA15-3 水平在乳腺癌中的临床病理学意义及预后价值[J]. *实用癌症杂志*, 2019, 34(2): 195-199.

(收稿日期: 2021-06-27 修回日期: 2022-05-12)