# 对喹诺酮类药物耐药的志贺菌 [illegible]基因突变的研究

向 前[1]，俞守义[2]，王 红[2]（第一军医大学[1]南方医院医教部，流行病学教研室，广东 广州 510515）

摘要：目的 研究福氏志贺菌对喹诺酮类药物的耐药机制。方法 对38株耐药的福氏志贺菌[illegible]基因的N末端编码区进行PCR扩增后，用SSCP方法检测突变，然后测序。结果 福氏志贺菌[illegible]基因PCR-SSCP显示有8株突变，测序结果揭示存在2个导致氨基酸改变的基因点突变：83位TCG（Ser）→TTG（Leu）突变和87位GAC（Asp）→GGC（Gly）突变。结论 [illegible]基因点突变与福氏志贺菌对喹诺酮类药物的高水平耐药有密切关系。

关键词：志贺菌属；[illegible]基因；喹诺酮
中图分类号：R939.9 文献标识码：A 文章编号：1000-2588(2001)12-0935-03

## [illegible]

XIANGQian[1], YUShou-yi[2], WANGHong[2]
([1]DepartmentofMedicalTeachingandResearch, NanfangHospital, [2]DepartmentofEpidermiology, FirstMilitaryMedicalUniversity, Guangzhou 510515, China)

[illegible]：To study the resistance mechanism of quinolone against [illegible]. [illegible]：The N-terminal coding region of [illegible] gene of 38 quinolone-resistant [illegible] were amplified by PCR and mutations detected by single-strand conformation polymorphism (SSCP), followed by sequence analysis. [illegible]：Eight isolates were found to be positive for [illegible] mutations, and DNA sequence analysis of [illegible] gene revealed 2 mutations that resulted in changes of the amino acids (Ser-83→Leu, Asp-87→Gly). [illegible]：[illegible] gene mutations is closely related to high resistance of [illegible] to quinolone.

[illegible]：[illegible] gene; quinolone

在研究大肠杆菌喹诺酮类耐药过程中，人们发现耐受喹诺酮的大肠埃稀氏菌拓扑异构酶Ⅱ A亚基编码基因（[illegible]）末端67~106密码子区域常发生突变，因而推测该基因热点区域的突变可能引起拓扑异构酶变化，从而导致大肠杆菌对喹诺酮类的耐药，由此将该区域称为喹诺酮类药物耐药决定区（quinolone resistance-determining region, QRDR）[illegible]。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 电泳仪：垂直电泳槽及其附件购自北京博联仪器厂；PCR仪为美国GeneAmp PCR System 9700和德国BiometraPCR仪。

1.1.2 试剂 丙烯酰胺：N,N'-亚甲基双丙烯酰胺：过硫酸铵：Tris碱：N,N,N',N'-四甲基乙烯基二胺（TEMED）：5%甲酰胺：二甲苯青均购自Gene公司。dNTP：Taq酶等其它试剂购自大连宝生生物公司。

### 1.2 菌株

112株F2a志贺菌分别由江门市卫生防疫站、海南、内蒙古、深圳罗湖区卫生防疫站惠赠，按常规培养、保存。江门株表示为"Jxx"、海南株表示为"Hxx"、内蒙古株表示为"Nxx"、深圳株表示为"SHxx"。对诺氟沙星耐药的38株福氏志贺菌[illegible]作为单链构象多态性（SSCP）研究的对象。福氏2aT32株（由王红博士提供）作为参考株。

### 1.3 方法

1.3.1 聚合酶链反应（PCR） 由于志贺菌在遗传学上与大肠埃希菌相近，因此我们根据大肠埃希菌K-12的DNA旋转酶基因序列[illegible]，用GoldKey软件设计引物，并由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR扩增片段位于[illegible]基因131~225位点，PCR扩增产物为295 bp。上游引物：5'-TACACGTCGCGTACTTTACG-3'；下游引物：5'-TCTCTTTT CAGATCGGCC-3'。染色体DNA的提取见参考文献[illegible]。50 μl PCR混合液包括：10×PCR缓冲液5 μl，去离子水35 μl，dNTP（1 mmol/L）6 μl，引物（10 μmol/L）各1 μl，Taq酶1 U，模板DNA（1 mmol/μl）2 μl。PCR条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃1 min，56 ℃30 min，72 ℃30 min，共30个循环；反应结束后72 ℃延伸5 min。

1.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 单链构象多态性，见参考文献[illegible]。

1.3.3 测序 SSCP阳性的菌株及T32、PCR产物送中山医科大学达安基因诊断公司测序。

收稿日期：2001-04-08
作者简介：向 前（1971-），男，湖北天门人，2001年毕业于第一军医大学，硕士，电话：020-85141023，e-mail：ll@fimmu.edu.cn

## 2 结果

### 2.1 PCR扩增产物

用2%琼脂糖袁0 V电压电泳结果见图1遥扩增产物为295bp的DNA片段遥

112株志贺菌分离株及参照株T32均可扩增出特异的gyrA片段遥扩增产物与设计片段大小一致遥

### 2.2 福氏志贺菌的[illegible]PCR-SSCP

PCR产物变性后袁经8%聚丙烯亮5 0 V电压袁h电泳后银染遥结果见图2遥

[illegible]基因扩增产物变性后经聚丙烯凝胶电泳袁呈现出三种不同的SSCP图谱袁分别以SSCP-Ⅰ亮S-CP-Ⅱ亮SCP-Ⅲ型表示袁SCP-Ⅰ型是以T32为代表的阴性株曰SSCP-Ⅱ是以J1亮3亮N3亮H16亮H20亮H25亮SH1突变株曰SSCP-Ⅲ型是J13突变株遥未加变性剂双链只有一条带遥

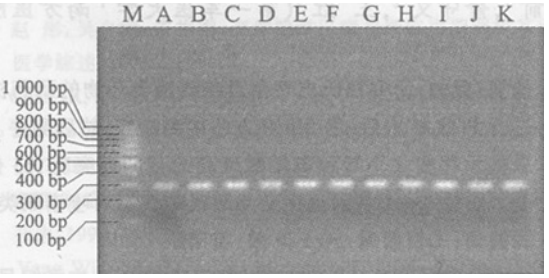


图1 福氏志贺菌[illegible]基因扩增产物电泳图谱

[illegible]

A~K:Sample;M:Marker

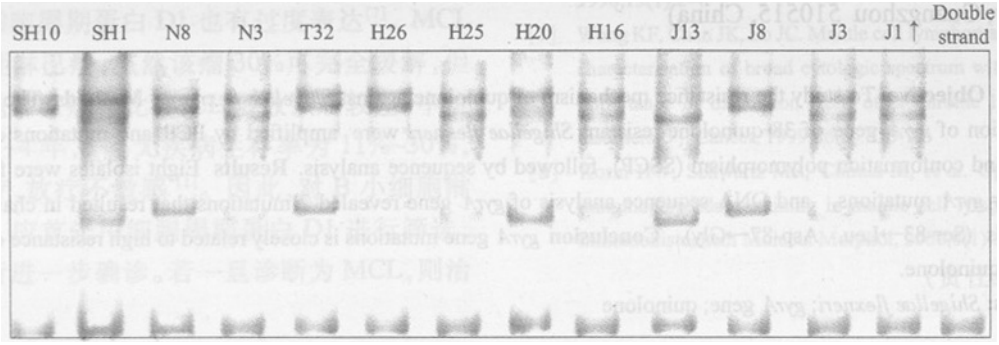


图 圆福氏志贺菌[illegible]基因[illegible]图谱

[illegible]

### 2.3 测序结果

测序结果显示SSCP-Ⅱ(J1亮3亮H1亮N3亮H16亮H20亮H25)均有83位TCG渊Ser冤→TTG渊Leu冤突变袁SSCP-Ⅲ(J13)不仅有83位TCG渊Ser冤→TTG渊Leu冤突变袁还有87位GAC渊Asp冤→GGC渊Gly冤突变遥

## 3 讨论

对于与T32菌株有相同PCR-SSCP图谱的菌株袁认为其QRDR段无突变或突变尚不足以改变单链的构象曰与T32菌株PCR-SSCP图谱不同的菌株袁认为其QRDR段有突变曰具有不同特征的SSCP图谱袁提示该菌株有不同突变特征遥

细菌对喹诺酮类药物产生耐药机制主要为三方面[illegible]渊冤DNA旋转酶基因点突变袁特别是喹诺酮耐药决定区的突变曰渊冤膜孔蛋白缺失所致的膜通透性下降曰渊冤主动外排遥其中喹诺酮耐药决定区的突变占主导地位遥大肠杆菌喹诺酮类抗生素耐药研究结果表明袁[illegible]基因的突变热点是GyrA亚基的83位Ser渊丝氨酸冤或87位Asp渊天冬氨酸冤遥研究[illegible]认为83位突变引起耐药的机制是陨3位TCG渊Ser冤是旋转酶的一个活性位点袁突变后活性位点消失袁药物不能与之结合曰或者是突变后旋转酶的构像发生了改变袁喹诺酮类药物难以到达活性位点遥从而使细菌形成了对喹诺酮类药物的耐药遥

112株志贺菌分离株[illegible]基因PCR-SSCP分析结果展示喹诺酮类抗生素敏感株[illegible]基因片段无突变袁而在38株对诺氟沙星耐药分离株中袁具有较高耐药水平的分离株呈现两种不同的突变特征院1亮3亮J13亮H16亮H20亮H25亮N3亮H1株均存在[illegible]基因83位TCG渊Ser冤→TTG渊Leu冤突变曰J13不仅具备83位TCG渊Ser冤→TTG渊Leu冤突变袁而且还存在[illegible]基因87位GAC渊Asp冤→GGC渊Gly冤突变遥

结合耐药程度分析袁不难看出突变株耐药水平均高于非突变株袁多点突变分离株J13渊诺氟沙星MIC>40 滋g/ml冤的耐药水平高于单点突变分离株渊诺氟沙星MIC<24 滋g/ml冤遥结果表明袁志贺菌喹诺酮类抗生素耐药株基因突变类型与大肠杆菌喹诺酮类抗生素耐药株基本一致遥而且不同点突变类型与耐药程度的变化亦基本相符遥

参考文献:

[illegible] YoshidaH,KojimaT,YanmagishiJ, [illegible]Quinoloneresistance-de-

temininggregionintheDNAgyrase 基因geneof 耗耐药菌株咱J Anti AgentsChem,1990,34:1271-2.
咱1暂 向 前, 王 红, 吴爱军, 等.112 株福氏志贺菌的耐药分析咱J暂.疾病控制杂志,2001,5(1):84-5.
咱2暂 SwanbergSL,WangJC.Cloningandsequencingofthe 耗耐药菌株基因genecodingfortheAsubunitofDNAgyrase咱J暂.MolBiol,1987,197:729-36.
咱3暂 谷志远. 现代医学分子生物学 咱M暂 北京: 人民军医出版社,1998.445-9.
咱4暂 LewinCS, AllenRA, AmyesSGB. Potentialmechanismsofresistancetothemodernfluorinated4-quinolones咱J暂.J MedMicrobiol,1990,31:153-61.
咱5暂 NikaidoH.Multidrugefflux pumpsofgram-negativebacteria咱J暂.J Bacteriol,1996,178:5853-9.
咱6暂 HiroakiY.Quinoloneresistance-determiningregionintheDNAgyrasegyrBgeneof 耗耐药菌株咱J暂.Anti AgentsChem,1991,35:1647-50.

# 新生儿无脾综合征 1 例报告

李秋平袁 封志纯渊第一军医大学珠江医院儿科袁广东 广州 510282冤

关键词院新生儿袁无脾综合征
中图分类号院R657.6 文献标识码院B 文章编号院000-2588(2001)12-0937-01

## 1 临床资料

患儿男袁d袁因出生后皮肤青紫尧呼吸困难 1 d 入院遥患儿为第 1 胎第 1 产袁孕 40 周剖宫产娩出袁出生体质量为 2.8kg袁羊水Ⅲ度浑浊袁量少袁约 100ml遥患儿出生时皮肤青紫袁min 阿氏评分 7 分袁后皮肤青紫加重袁呼吸困难袁反应差袁 min 阿氏评分 5 分遥经气管插管尧袁苏气囊辅助呼吸尧吸痰及静脉推注肾上腺素尧地塞米松和纳洛酮等处理后袁病情无明显改善转入我科遥母孕期体健袁家族无特殊遗传病史遥查体院体温 36.9 益袁脉搏 130 次 /min袁呼吸 50 次 /min袁身长 50cm,头围 33cm袁足月儿外貌袁颜面及躯干皮肤苍白袁口唇及四肢末梢发绀遥前囟稍隆起袁呼吸促袁轻度吸气三凹征袁双肺呼吸音粗袁可闻及少许湿罗音袁心前区无隆起袁心率 130 次 /min袁心律齐袁未闻及明显杂音遥腹平软袁肝脾未触及遥四肢肌张力稍高遥入院后查血常规院白细胞 24.1G/L袁淋巴细胞 35.2%袁中性粒细胞 59.4%袁红细胞 4.93T/L袁血红蛋白 158g/L袁血小板 259G/L遥血气分析院pH 7.084袁$O_2$ 10.5kPa袁$CO_2$ 6.1kPa袁标准碳酸氢根 13.0 mmol/L袁实际碳酸氢根 13.6mmol/L袁阴离子间隙 22mmol/L遥入院后依据病史尧体征及检查结果袁初步诊断为院新生儿窒息和胎粪吸入综合征曰新生儿缺血缺氧性脑病遥经持续气道正压给氧尧镇静尧脱水尧抗炎尧补液及营养支持治疗袁患儿病情无好转袁呼吸困难加重袁入院当天即予以呼吸机辅助呼吸袁但病情无好转袁 d 后死亡遥尸检结果院心脏室间隔下部见一约 0.2 cm伊0.2 cm 的缺损曰脾脏缺如曰双肺淤血尧出血袁胎粪尧羊水吸入曰肝尧脑尧肾等脏器淤血遥遂确诊为无脾综合征遥

## 2 讨论

无脾综合征渊vemarksyndrome冤又名无脾伴先天性心脏病综合征尧脾脏发育不全综合征等遥本病于 1940 年首先由 Roklius 报告袁955 年由 Ivemark 作了详细的描述遥其特征为先天性脾脏发育不全或无脾袁伴有先天性心脏病如大血管转位尧室间隔缺损等袁并可有胸腹腔内脏位置异常遥本病病因未明袁可能与胚胎 4耀 周时某些致畸因素如母亲妊娠期病毒感染等有关遥这种致畸因素造成胚胎发育终止而形成以心血管脏器的畸形为主的多发畸形遥胚胎 24耀7 周是脾尧肺叶发生袁肺静脉发育以及胃尧十二指肠最后固定的时期袁此发育阶段停顿袁可造成这种先天性的多脏器畸形的病症遥无脾综合征有家族史报道袁为常染色体隐性遗传袁较为罕见咱1暂遥患儿生后多表现为持续青紫袁呼吸困难曰心脏杂音袁脾脏缺如或微小曰心血管造影可见畸形袁以二腔心尧肺动脉发育不全尧三腔心尧大血管转位尧室间隔缺损以及永存动脉干为主袁胃肠可有转位遥血液检查可见正成红细胞尧周围血红细胞可见豪周氏渊Howell-Jolly冤小体及 Heiz 小体等无脾征象遥本病尚无可靠有效的治疗方法袁预后不良袁多在新生儿期尧乳幼儿期袁因重复感染尧多系统栓塞致心肺功能衰竭而死亡袁 年内死亡率高达 80%遥

收稿日期院2001-03-21
作者简介院李秋平渊1975-冤,男,袁江西新余人袁998 年毕业于同济医科大学袁本科袁医师袁电话院020-85143731

## 参考文献院

咱1暂 洪庆成, 江敬铭. 儿科综合征咱M暂.天津科学技术出版社,1994.268-9.