维普资讯 http://www.cqvip.com

Distribution and pharmacokinetics after intravenous injection of ciprofloxacin in the rabbit eye

Yang Shuqun, et al
Department of ophthalmology, the second college of clinical medicine

The intraocular concentration of ciprofloxacin was measured by high performance liquid chromatography after single intravenous injection ciprofloxacin in the rabbit eye. The peak concentrations (Cmax) of ciprofloxacin in lachrymal fluid , cornea, aqueous humour, iris－ciliary body, lens, vitreous body were 8.92±2.88, 142.84±25.02, 11.06±2.80, 99.32±10.60, 30.28±1.91 and 8.10±1.71μg/g · ml, respectively. The half－life($t1/2<\beta$) of various concentrations in lachrymal fluid, cornea, aqueous humour, iris－ciliary body, lens and vitreous body was 1.49±0.97, 1.66±0.13, 2.09±0.51, 2.01±0.44, 1.52±0.92 and 1.21±0.66h, respectively. The results indicate that ciprofloxacin can penetrate intraocular various tissure.

KEY WORDS Ciprofloxacin; Distribution; Pharmacokinetics; HPLC

结核分支杆菌rpoB基因突变和耐利福平的相关性研究

临床学院检验科 张玉洪* 胥 飚 阳 苹
药剂科 何 芳

提 要 研究结核分支杆菌rpoB基因突变及其与利福平(RFP)耐药性的关系,建立快速检测耐药基因型的分子药敏试验方法. 用PCR－SSCP分析结核分支杆菌rpoB基因. 结果显示PCR扩增rpoB基因为属特异性。81株结核分支杆菌的PCR－SSCP图谱与H37Rv为对照,35株敏感菌仅有一株位置有区别;46株耐药菌有42株有明显区别;检测阳性率为91.3%;特异性97.1%。证明rpoB基因突变是结核分支杆菌耐利福平的主要机理,PCR－SSCP可简便快速地检出rpoB基因的突变,有助于结核分支杆菌耐药性的快速检测和研究。

关键词 结核分支杆菌; 耐药; 利福平; rpoB基因; 聚合酶链反应; 单链构象多态性
中图分类号 R446.5

结核病是我国较严重的传染病,利福平(RFP)作为抗结核治疗的主要药物之一,对结核病的有效控制发挥了重要作用。近年来结核分支杆菌的RFP耐药性及耐多药性(MDR)导致了结核病的疗效降低,防治困难,已引起了公众对结核分支杆菌耐药性以及结核病快速诊断和有效控制的广泛关注。近年的研究表明RFP耐药性发生的机制是由于其作用靶分子RNA多聚酶亚单位的编码基因(rpoB)突变所致[1,2],rpoB基因个别密码的替换,导致了RNA聚合酶分子原有的利福平结合位点的构象发生改变,失去了结合利福平的能力,研究发现所有rpoB基因的突变都集中在一个23个氨基酸的区域内。针对该突变区域建立了聚合酶链反应加单链构象多态性分析(PCR－SSCP)法,并与传统的药敏试验对照,证实其检测结果与药物敏感试验结果基本一致。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 H37RV标准菌株及其它非结核分支杆菌

* 男,1963－07出生,主管技师

维普资讯 http://www.cqvip.com

由中国药品生物制品检定所提供。46株耐RFP和35株RFP敏感结核菌株来自于结核病防治所;其中RFP高度耐药28株,低度耐药18株。耐药检测方法参照结核病诊断细菌学检验规程[3]进行;RFP耐药标准:高度耐药250μg/ml,低度耐药50ug/ml.

1.2 DNA提取 用20%Chelex-100裂解法提取DNA,详见参考文献[4]。提取的DNA经用IS6110引物PCR扩增鉴定证明其均为结核分支杆菌。

1.3 PCR (1)引物采用KimBJ等[5]设计的一对引物,其序列为TR8:5'-TCG CCG CGA TCA AGG AGT-3' TR9: 5'-TGC ACG TCG CGG ACC TCC A-3'。由上海生物工程研究中心合成和纯化。(2)PCR扩增采用常规PCR反应体系,扩增程序为:94℃预变性3min,94℃变性30s;65℃复性30s;72℃延伸45s共35个循环,最后72℃延伸5min(PE9600型PCR基因扩增仪)。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳后紫外检测,若出现157bp扩增带再作SSCP分析。

1.4 SSCP分析 (1)电泳取PCR产物5μl加变性上样缓冲液5μl(含95%甲酰胺,0.05% 溴酚蓝,0.05%二甲苯腈,20mmol/L EDTA)混匀,置95℃水浴5分钟后在冰浴中急冷,加样于垂直凝胶板(交联度3.5%,浓度为8%,厚度0.8mm聚丙烯酰胺凝胶),以0.5×TBE电泳缓冲液、电压7V/cm电泳6~8小时。(2)硝酸银染色:10%醋酸固定20分钟后水洗3次;0.012mol/L硝酸银染20分钟后水冲洗20~30s;0.28mol/L碳酸钠显色,直到条带信号足够强而背景不太高,水洗5~10s;10%醋酸固定5min观察结果。

2 结果

2.1 特异性 用TR8、TR9对牛结核分支杆菌,猿猴分支杆菌,堪萨斯分支杆菌,瘰疬分支杆菌,苏加分支杆菌,蟾蜍分支杆菌,海分支杆菌,龟分支杆菌分别进行扩增结果均为阳性。对大肠杆菌,肺炎球菌,甲型链球菌,肺炎克雷伯氏菌,铜绿假单胞菌等非分支杆菌分别进行扩增结果均为阴性。证明rpoB基因扩增具有属特异性。

2.2 SSCP结果通过与H37Rv标准株rpoB基因带谱与46株耐RFP和35株RFP敏感株的rpoB基因带谱进行比较。结果见表1。

表1 81株结核分支杆菌临床分离株PCR-SSCP结果

	RFP高度耐药	RFP低度耐药	RFP敏感	合计
PCR-SSCP(+)	27	15	1	43
PCR-SSCP(-)	1	3	34	38
合计	28	18	35	81

3 讨论

目前结核分支杆菌的药敏试验仍采用传统的绝对浓度法、比例法等。但由于结核分支杆菌生长缓慢,而耐药菌株的生长更为缓慢,使耐药性测定需要6-8周的时间,不能在患者治疗的初期及时提供耐药信息, 故使目前的化疗方案不能科学地遵从个体化的原则,而造成了财力的浪费,不应出现的药物毒副作用及由于传染源得不到及时控制造成的对社会乃至医护人员的危害。近年随着分子生物学技术的发展和对结核分支杆菌研究的逐步深入,利福平耐药性的发生机制系由于结核分支杆菌编码RNA聚合酶β-亚基(rpoB)的基因突变所致。这在本研究中得到了进一步证实。

在常见的几种抗结核药物中,RFP耐药的机理研究已经比较清楚,突变分布在69个碱基23个氨基酸范围内,在rpoB基因核心区域15个点内,多为单个碱基突变,突变频率最高的是氨基酸密码子531(丝氨酸→亮氨酸)上,次之为526(组氨酸→酪氨酸),还有516,尽管一些文献报道的突变范围有些不同,但突变集中在rpoB基因核心区域却是一致的,基因突变的检出率都在90%以上。而其它几种抗结核药物一是耐药机理尚不完全清楚或是突变不是集中于某个区域,给基因的快速检测造成一定的困难,在MDR结核分支杆菌临床分离株中,75%rpoB和耐异烟肼的KatG基因均有突变,因而有人提出检测rpoB基因突变作为MDR诊断的代表性标志[6]。运用PCR-SSCP可以很方便地检测出这种突变,我们对46株耐药菌的检测,高度耐药96.4%检出,低度耐药83.3%检出,总检测出率91.3%。少数耐药菌株(8.7%)未能检测出突变是否提示可能有该区域外的突变或可能是基因的产物影响了渗透及新陈代谢从而引起耐药[7]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

尽管RFP的耐药被认为是耐MDR的一个代表,运用PCR－SSCP只能证明有其突变,而不能进行突变的定位和类型。特别是当发生同义突变(氨基酸相同,但密码子不同)或者即使发生错义突变引起了氨基酸的改变但不是RFP结合的关键部位,这样就不会引起临床的耐药从而引起假阳性,我们对35株敏感菌的检测中结果显示仅有一株为假阳性,该株菌的电泳位置与H37RV参考株位置不同,且与其它耐药株均不同,是否为同义突变所致引起的假阳性有待进一步确定。所以有作者建议[6]进行序列分析以证实其突变的类型。目前国内外报告PCR－SSCP方法检测的特异性都在98％以上,证明rpoB基因发生同义突变的可能性很低,若进行大样本数的比较分析,将各种突变之间的SSCP位置关系更加精确地肯定下来将可能通过SSCP图谱推测rpoB的位置和性质。目前扩增该段区域的引物均为属特异性引物,除能扩增结核分支杆菌外,还能扩增除结核而外的其它分支杆菌,因此在用TR8,TR9引物扩增rpoB基因之前,须用IS6110引物扩增待分析的培养菌株,首先证明分离株均为结核分支杆菌,以提高该法的特异性。

PCR－SSCP是一种较好的检测基因突变的方法,因其简便,快速,一般的分子生物学实验室都具备这种条件,12－24小时便可完成一次检测,现已被普遍接受。影响SSCP分析的因素很多,因此分析时条件的选择对突变的有效检出至关重要。我们体会到影响SSCP分析的因素主要有扩增片段的长度,变性液的种类,凝胶的交联度,电泳缓冲液,电压等.其中最主要的因素是凝胶内温度的恒定,可能是温度直接影响DNA分子内部稳定力的形成以及所决定的单链构象,因而影响检测的结果。在进行电泳时凝胶温度须保持在4－10℃之间可以获得满意的结果。

参 考 文 献

1.Hunt JM, et al.Diagn Microbiol Infect dis.1994; 18: 219
2.Whelen AC, et al.J Clin Microbiol.1995; 33:556
3.中国防痨协会. 中国防痨杂志 1996; 18:28
4.陈一平,等. 中华医学检验杂志 1994; 17:223
5.Kim BJ, et al.J Clin Microbiol.1997; 35:492
6.Telenti AP,et al.Lancet.1993; 341:647
7.Kapur VL, et al. J Clin microbiol.1994; 32:1095

(收稿日期 1999－03－05)

Study on rpoB gene mutation in rifampin－ resistant mycobacterium tuberculosis

Zhang Yuhong, et al
Department of clinical laboratories, college of clinical medicine

To evaluate the relationship between rpoB gene mutation and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis and to set up a molecular method for detecting genes related with multi－drug resistance. Eighty－one clinical ısolates of Mycobacterium tuberculosis were analyzed by PCR－SSCP technique with H37RV reference strains as control group .Result show rpoB gene belong to genus specificity .Characteristics of SSCP graph in thirty－ four sensitive strains were the same as H37Rv except for one straime specificity 91.3%. RpoB gene mutation association closely with rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis.The PCR－SSCP technique is helpful for rapid detection and study of rifampin－resistant Mycobacterium tuberculosis.

KEY WORDS Mycobacterium tuberculosis; Drug tolerance; Rifampin; RpoB gene; Polymerase chain reaction; Polymorphism, Single－stranded conformational