

A-S3-12

呼吸系统感染肺炎克雷伯菌中 I 类整合子基因盒的相关研究

高 昂,王昕凝,丁 印,石志源;指导教师:于 红

青岛大学医学院 2010 级临床医学

【目的】肺炎克雷伯菌是医源性感染的重要致病菌之一,随着临床大剂量抗生素的不规范使用,肺炎克雷伯菌多重耐药菌株日趋增多,常导致治疗的失败和病程迁延。I 类整合子是肺炎克雷伯菌中分布最普遍的整合子,其携带的耐药基因盒在细菌耐药性方面起关键作用,且整合子的分布及携带的基因盒存在明显的地区差异性。目前尚未见青岛地区肺炎克雷伯菌整合子的研究报道,本研究旨在探讨 I 类整合子的分布、基因盒的组成及其与耐药表型的关系,明确青岛地区肺炎克雷伯菌中 I 类整合子及其携带的基因盒流行情况,为临床合理应用抗生素提供可靠依据。

【方法】收集 2011 年至 2013 年青岛市立医疗集团分离鉴定的呼吸系统感染的非重复肺炎克雷伯菌 82 株,采用美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的 K-B 法测定细菌对 16 种常用抗菌药物的敏感性;提取细菌基因组 DNA,PCR 检测整合子保守区的整合酶基因;对保守区阳性的菌株进行可变区基因的 PCR 扩增,将回收纯化的 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体,经琼脂糖凝胶电泳及 PCR 鉴定后,重组克隆送往华大基因公司进行测序,通过在线 Blast 和 DNA Star 软件进行同源比对分析,确定 I 类整合子携带的耐药基因盒。

【结果】82 株肺炎克雷伯菌对 16 种常用抗菌药物的耐药率为 2.3%~72.1%,其中对头孢唑林、哌拉西林和头孢吡辛类药物的耐药率达 60%以上;I 类整合子的阳性率为 76.82%,I 类整合子可变区扩增片段大小从 750~2 500 bp 不等,测序结果显示其携带的 11 种基因盒主要包括编码氨基糖苷类耐药性的 aad 家族(aadA1、aadA2、aadA5、aadB)、aac 家族(aacA4)、编码磺胺类耐药性的 dfr 家族(dfrA1、dfrA5、dfrA12)、编码氯霉素耐药性的 catB8 基因及功能不明的 orfF 及 orfC 基因,共组成 7 种不同的基因盒排列组合(已向 GeneBank 申请登录)。

【结论】青岛地区呼吸系统感染肺炎克雷伯菌中 I 类整合子的阳性率较高,其携带的耐药基因盒主要赋予细菌对氨基糖苷类和磺胺类的耐药性,这些耐药基因盒的不同排列组合构成了肺炎克雷伯菌多重耐药的物质基础。

关键词:肺炎克雷伯菌; I 类整合子; 基因盒; 耐药

A-S3-13

ZHX2 调控 HBV 转录活性的研究

徐蕾琪;指导教师:马春红

山东大学 2010 级临床医学八年制

【目的】乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是原发性肝细胞癌(HCC)发生的重要因素,HBV 的复制与表达受宿主肝细胞内多种转录因子调控,寻找宿主细胞内抑制 HBV 启动子活性的转录因子,将为实现控制 HBV 复制、阻断 HCC 发生提供重要理论依据。研究证实,新型转录抑制因子 ZHX2 能抑制肝癌重要标志物 AFP 和 GPC3 的表达,并通过抑制 cyclinA/E 启动子,在 HCC 发生中发挥抑癌作用。本室前期研究发现 HCC 组织中 ZHX2 表达与 HBcAb 相关,然而 ZHX2 是否抑制 HBV 转录迄今尚未报道。本研究旨在探索 ZHX2 对 HBV 基因启动子活性的调控作用及其分子机制。

【方法】设计引物,以 pcDNA3-HBV1.1 质粒为模板 PCR 扩增获得 HBV 不同启动子片段,克隆入 pGL3-Basic,构建 HBV 启动子报告基因表达载体。ZHX2 过表达载体分别与 HBV 不同启动子报告基因表达载体共转染肝癌细胞系 HepG2.2.15、BEL7402、HepG2 细胞,双荧光素酶报告基因检测启动子活性变化;干扰 NF- κ B 后检测启动子活性变化。在 HepG2.2.15 细胞过表达 ZHX2,ELISA、RT-PCR、蛋白质印迹法检测 HBV 基因转录

表达。

【结果】 成功构建 HBV 核心启动子(core promoter, CP)、前 S1 区启动子(SPI)、前 S2 及 S 区启动子(SPII)和 X 基因启动子(XP) 的报告基因表达载体 pGL3-CP、pGL3-SPI、pGL3-SPII、pGL3-XP。4 种载体在不同细胞中均表现出良好启动子活性($P < 0.05$)。共转染及双荧光素酶报告基因检测结果显示, HepG2. 2. 15 细胞内 ZHX2 过表达可明显抑制 CP、SPII、XP 活性($P < 0.01$); 干扰 NF-YA 可抑制 SPII 活性($P < 0.05$), 并消除了过表达 ZHX2 对 SPII 启动子的作用, 提示 ZHX2 通过抑制 NF-YA 下调 SPII 活性。蛋白质印迹结果证实了 ZHX2 的过表达效果; 与对照组相比, ZHX2 过表达组 actin 水平基本一致, 提示 ZHX2 并非通过影响细胞增殖而调节 HBV 转录。ELISA 结果显示, ZHX2 转染 6 h 后细胞上清中的 HBsAg、HBeAg 显著降低 ($P < 0.05$); RT-PCR 结果发现, ZHX2 转染 48 h 后明显降低 HBV pgRNA 表达, 进一步证明 ZHX2 能抑制 HBV 基因的转录活性。

【结论】 ZHX2 能抑制 HBV CP、SPII、XP 启动子活性, 并抑制 HBV pgRNA 的合成, 降低 HBV 抗原表达, 提示 ZHX2 在 HBV 相关疾病防治中的潜在价值。

关键词: HBV; 启动子; ZHX2; 转录调控

A-S3-14

不动杆菌的分离与鉴定

张帆, 张弛; 指导教师: 刘新
沈阳医学院 2011 级临床医学

【目的】 鲍曼不动杆菌是一类非发酵、专性需氧的革兰阴性球杆菌, 是临床常见的条件致病菌之一。近年来鲍曼不动杆菌感染率不断上升, 其耐药率也逐年增强。鲍曼不动杆菌几乎对所有抗生素呈现高度耐药, 给临床治疗带来极大困难。噬菌体是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒, 具有严格的宿主特异性, 只能在活的微生物细胞内复制、增殖。毒性噬菌体在宿主菌内复制增殖, 并最终裂解细菌, 其特殊的生物学特性有望成为临床上治疗细菌感染新的有效手段。温和噬菌体能将基因组整合于宿主菌染色体中, 不产生子代噬菌体, 不裂解细菌, 使菌体处于溶原状态。本课题通过分离鉴定鲍曼不动杆菌噬菌体, 研究噬菌体对耐药性的鲍曼不动杆菌的影响。

【方法】 采集污水, 人及动物上呼吸道内和医院 ICU 环境的标本, 经 CaCl_2 处理后, 离心取上清液, 细菌滤器滤过, 将滞留在滤膜上的细菌进行分离传代培养, 纯化; 染色镜检, 观察细菌形态、排列, 初步生化试验筛选、ATB 生化鉴定菌种; 药敏试验选择耐药菌株; 经噬斑试验, 分离或诱导毒性噬菌体; 负染色法制备电镜标本, 观察其超微结构。

【结果】 ICU 环境中, 特别是呼吸机导管可分离到鲍曼不动杆菌, 鲍曼不动杆菌表面存在温和噬菌体, 呈多边形, 细菌耐药性明显, 为多重耐药。

【结论】 耐药的鲍曼不动杆菌菌体表面存在温和噬菌体, 未裂解细菌, 可能将基因整合于宿主菌体, 研究噬菌体与不动杆菌耐药性的相关性, 通过诱导毒性噬菌体, 裂解细菌, 可治疗和控制细菌性感染, 将为防治鲍曼不动杆菌引起的医院感染带来希望。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 毒性噬菌体; 温和噬菌体; 耐药性