

肺炎链球菌 *ciaH*/R 基因重组表达及 *CiaH*/R 与 β -内酰胺类耐药相关性

孙爱华¹, 樊欢², 夏肖萍³, 李向阳⁴, 严杰²

(1. 浙江医学高等专科学校, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江大学医学院 病原生物学系, 浙江 杭州 310058;

3. 浙江大学医学院 附属邵逸夫医院检验科, 浙江 杭州 310016;

4. 温州医学院附属第二医院检验科, 浙江 温州 325000)

[摘要] 目的: 构建肺炎链球菌 *ciaH* 和 *ciaR* 基因的原核表达系统, 探讨 *CiaH* 和 *CiaR* 封闭后细菌耐药性变化。方法: 采用 PCR 扩增全长 *ciaH* 和 *ciaR* 基因, 以常规基因工程技术建立其原核表达系统。采用 SDS-PAGE 及 Bio-Rad 凝胶图象分析系统检测目的重组蛋白 r*CiaH* 和 r*CiaR* 表达量。制备 r*CiaH* 和 r*CiaR* 抗血清及其 IgG。检测 IgG 胞外或胞内封闭肺炎链球菌菌株 *CiaH* 和 *CiaR* 后, 细菌对青霉素和头孢噻肟耐药性的变化。结果: 与报道序列比较, 所克隆的 *ciaH* 和 *ciaR* 基因核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 99.9%~100% 和 100%。所构建的工程菌 *E. coli* BL21DE3^{pET42a-*ciaH*} 和 *E. coli* BL21DE3^{pET42a-*ciaR*} 能高效表达目的重组蛋白 r*CiaH* 和 r*CiaR*, 其产量分别高达细菌总蛋白的 33% 和 45%。r*CiaH*、r*CiaR* 抗血清及其 IgG 免疫双扩散效价分别为 1:4、1:4 和 1:1、1:1。 *CiaH*-IgG 胞外或胞内封闭 *CiaH*、*CiaR*-IgG 胞内封闭 *CiaR* 后, 青霉素及头孢噻肟敏感菌株可出现对两种抗生素的耐药性, 但对耐药菌株耐药性无明显影响。结论: 成功地构建了肺炎链球菌 *ciaH*/*ciaR* 基因原核表达系统, 为深入研究该 TCS 与耐药性关系奠定了基础。 *CiaH* 和 *CiaR* 均与肺炎链球菌对青霉素及头孢噻肟耐药性有关。

[关键词] 链球菌, 肺炎/药物作用; 基因, 细菌; β 内酰胺抗药性; 二元信号传导系统; *ciaH*/*ciaR* 基因; β -内酰胺类抗生素; 耐药性

[中图分类号] R 377.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)06-0605-07

Recombinant expression of *Streptococcus pneumoniae* *ciaH*/R genes and their correlation with β -lactam antibiotic resistance

SUN Ai-hua¹, FAN Huan², XIA Xiao-ping³, LI Xiang-yang⁴, YAN Jie² (1. Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. Department of Laboratory Medicine, The Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China; 4. Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital, Wenzhou

收稿日期: 2008-07-15 修回日期: 2008-09-29

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(X206956); 卫生部科研基金资助项目(WKJ2007-2-005)

作者简介: 孙爱华(1968—), 女, 硕士, 副教授, 从事细菌分子耐药机制的研究。

通讯作者: 严杰(1956—), 男, 教授, 博导, 主要从事病原微生物致病机制及基因工程疫苗研究; E-mail: Med_bp@zju.edu.cn

Medical College, Wenzhou 325000, China)

[Abstract] **Objective:** To construct prokaryotic expression systems of *Streptococcus pneumoniae* *ciaH* and *ciaR* genes, and to determine their correlation with drug resistance. **Methods:** The total length of *ciaH* and *ciaR* genes was amplified by PCR and their prokaryotic expression systems were established by using routine genetic engineering technique. SDS-PAGE was applied to measure the outputs of target recombinant proteins rCiaH and rCiaR. Rabbits antisera and IgGs against rCiaH and rCiaR were prepared. The resistance to penicillin and cefotaxime of *S. pneumoniae* strains was examined after CiaH and CiaR were extracellularly and intracellularly blocked by the IgGs. **Results:** The homogeneity of nucleotide and amino acid sequences of the cloned *ciaH* and *ciaR* genes with the reported sequences was 99.9~100% and 100%, respectively. The recombinant bacteria *E. coli* BL21DE3^{pET42a-ciaH} and *E. coli* BL21DE3^{pET42a-ciaR} were able to express the target recombinant proteins rCiaH and rCiaR with efficiency. The outputs of rCiaH and rCiaR were 33% and 45% of the total bacterial proteins, respectively. The double immunodiffusion titers of rCiaH antiserum, rCiaR antiserum, rCiaH-IgG and rCiaR-IgG were 1:4, 1:4, 1:1 and 1:1, respectively. After CiaH was extracellularly or intracellularly blocked by CiaH-IgG, and CiaR was intracellularly blocked by CiaR-IgG, the penicillin-sensitive or cefotaxime-sensitive strains developed resistance to the two antibiotics; but the blocks did not change that of penicillin-resisting or cefotaxime-resisting strains. **Conclusion:** The prokaryotic expression systems of *S. pneumoniae* *ciaH/ciaR* genes have been successfully constructed in this study. Both the CiaH and CiaR may be involved in penicillin and cefotaxime resistance of the bacterium.

[Key words] *Streptococcus pneumoniae*/drug eff; Genes, Bacterial; Beta-Lactam resistance; Two-component signal transduction system; *ciaH/ciaR* genes; β -lactam antibiotics; Drug resistance

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008, 37(6):605-611.]

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是社区获得性肺炎的主要病原菌,也可引起中耳炎、菌血症、脑膜炎等疾病^[1]。近年肺炎链球菌感染相关疾病的发病率和病死率逐年上升,其原因与 β -内酰胺类抗生素耐药的肺炎链球菌菌株流行密切相关^[2-3]。CiaH/CiaR是肺炎球菌二元信号传导系统(two-component signal transduction system, TCS)之一。*ciaH*基因缺失突变的肺炎链球菌不能出现感受态,同时产生对青霉素及头孢噻肟(国内药名为头孢噻肟)的耐药性^[4-5]; CiaR与细菌感受态及耐药性形成无关^[6]。CiaH是跨膜组氨酸激酶,其胞外N端有感应器功能,胞内C端有激酶活性; CiaR

是胞浆内转录调节蛋白,被CiaH磷酸化后激活^[4-6]。已知任何细胞信号传导系统中,由转录调节蛋白而非激酶来调控靶基因^[7],故CiaH/CiaR在肺炎球菌对青霉素和头孢噻肟产生耐药性的作用仍有待于阐明。

本研究中,我们克隆并构建了*ciaH*和*ciaR*基因原核表达系统,制备了重组表达蛋白rCiaH和rCiaR抗血清及其IgG,以期为进一步研究*ciaH/ciaR*基因及其产物CiaH、CiaR与肺炎链球菌感受态缺失耐药的相关性研究提供手段。与此同时,我们检测了上述IgG封闭靶蛋白后肺炎链球菌菌株对青霉素和头孢噻肟耐药性的变化。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒来源 肺炎链球菌 ATCC6306 株及其 17 株临床菌株分别由温州医学院李向阳教授、浙江大学附属邵逸夫医院夏肖萍主管技师、浙江省人民医院吕火祥主任技师提供。T-A 克隆质粒及克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司,原核表达载体 pET42a 和表达宿主菌 *E. coli* BL21 均购自 Novagen 公司。

1.2 *ciaH* 和 *ciaR* 基因的扩增 采用细菌基因组 DNA 提纯试剂盒 (BioColor) 提取肺炎链球菌 ATCC6306 株基因组 DNA。提取的 DNA 溶于 TE 缓冲液中,紫外分光光度法测定其浓度和纯度^[9]。参考肺炎链球菌 R6 株 *ciaH* 和 *ciaR* 基因序列 (GenBank accession No.: NC_003098)^[10],根据其内切酶图谱分析结果及表达载体 pET42a 多克隆位点,自行设计扩增 *ciaH* 和 *ciaR* 基因的引物。引物由上海 Novagen 公司合成。扩增 *ciaH* 基因引物序列:上游 5'-CGC CAT ATG (Nde I) TTC AGT AAA CTT AAA-3',下游 5'-CGC CTC GAG (Xho I) TTT CTT CTT TTT AGA TGG-3'。扩增 *ciaR* 基因引物序列:上游 5'-CGC CAT ATG (Xho I) ATA AAA ATC TTA TTG-3',下游 5'-CGC CTC GAG (Xho I) CTG AAC ATC TTT TAA AAG-3'。PCR 总体积 100 μ L,内含 2.5 mol/L 各 dNTP、250 nmol/L 各引物、2.5 U EX-Pfu 酶 (TaKaRa)、100 ng DNA 模板、1 $\times$ PCR 缓冲液 (pH8.3)。PCR 参数:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。采用 1 μ g/mL 溴乙锭预染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,*ciaH* 和 *ciaR* 基因扩增条带预期大小分别为 1335 bp 和 675 bp。

1.3 T-A 克隆、亚克隆和测序 采用 BioColor 公司 3S 柱离心式琼脂糖 DNA 小量快速纯化试剂盒提取 PCR 产物。采用 TaKaRa 公司 T-A 克隆试剂盒将目的扩增片段克隆至质粒 pMD-18-T 中,转化入 *E. coli* DH5 α 并在 LB 培养基中扩增后,用小量碱变性法分别提取重组质粒 pMD18-T-*ciaH* 和 pMD18-T-*ciaR*^[8]。Nde I 和 Xho I 双酶切 pMD18-T-*ciaH* 和 pMD18-T-

-*ciaR* 进行初步鉴定,然后委托上海 Invetrogen 公司测序。pMD18-T-*ciaH* 和 MD18-T-*ciaR* 及表达载体 pET42a 分别用 Nde I 和 Xho I 双酶切,琼脂糖电泳后回收目的片段,采用 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa) 分别将各目的基因片段与线性化 pET42a 连接后再次测序^[8]。

1.4 重组蛋白表达及提纯 所构建的原核表达系统 *E. coli* BL21DE3^{pET42a-*ciaH*} 和 *E. coli* BL21DE3^{pET42a-*ciaR*},在含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 诱导培养 6 h。采用 10% SDS-PAGE 及 BioRad 凝胶图象分析系统分别了解上述目的重组蛋白表达情况及测定其表达量。采用 Ni-NTA 亲和层析法提纯表达的 rCiaH 和 rCiaR。

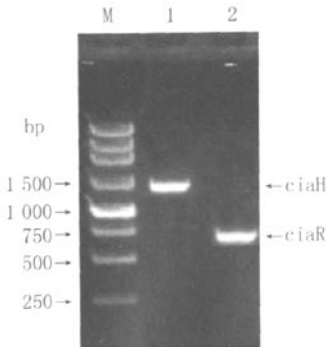
1.5 重组蛋白抗血清及其 IgG 的制备 rCiaH 和 rCiaR 各 1 mg 与等量弗氏完全佐剂混合后,皮内注射免疫家兔 4 次,每次间隔 1 周。末次免疫后 10 d,采集家兔心血分离血清。将兔抗血清与等量生理盐水混合,加入 1/2 体积饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C 中搅拌 30 min 沉淀球蛋白,取沉淀对 pH7.4、0.01 mol/L PB 充分透析后过 DEAE-52 柱 (Pharmacia),洗脱液为上述 PB,第一洗脱峰即为 IgG。肺炎链球菌 ATCC6306 株及其 17 株临床菌株接种于含 8% 脱纤维羊血的 M-H 液体培养基 (Oxoid) 中,5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下培养至 A₅₅₀ $\approx$ 0.08。采用免疫双扩散试验测定各抗血清及其 IgG 效价。另将 rCiaH-IgG 和 rCiaR-IgG 用 PBS 进行 1:10、1:25、1:50、1:100、1:200、1:400 和 1:800 稀释,采用玻片凝集试验测定其凝集效价。

1.6 MIC 的测定 将上述肺炎链球菌 ATCC6306 株及其 17 株临床菌株培养物 3 000 r/min 离心 30 min 沉淀细菌,然后用 pH 7.4、0.01 mol/L PBS 洗涤细菌 3 次后 PBS 重悬。采用麦氏比浊法将细菌悬液浓度分别调节至 1×10^7 、 2×10^7 和 4×10^7 CFU/ml。取 2×10^7 CFU/ml 细菌悬液 0.5 ml,分别加入等体积用 PBS 1:100 稀释的 rCiaH 或 rCiaR-IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。rCiaH-IgG 和 rCiaR-IgG 分别用含 0.1% 皂角甙 (Sigma) 和 0.01% 溶菌酶 (Sigma) 的 PBS 稀释成 1:25,取 0.5 ml 加入等体积 2×10^7

CFU/ml 细菌悬液,37℃ 孵育 30 min。上述与不同抗体胞外或胞内作用后的菌液 5000 r/min 离心 15 min,取细菌沉淀重悬于等量灭菌 PBS 中^[9]。在含 8% 脱纤维羊血的 M-H 液体培养基中加入青霉素与头孢噻肟(浙江可立思安药业有限公司),使抗生素的终浓度分别为 0.03、0.06、0.12、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μg/ml,分装试管,每管 1.9 ml,然后分别加入 1×10^7 CFU/ml 和上述抗血清封闭后菌液 100 μl,5% CO₂、37℃ 条件下培养 24 h,观察细菌生长情况。若菌株对青霉素 MIC > 0.25 μg/ml、头孢噻肟 MIC > 0.5 μg/ml 者判为耐药^[10]。实验中同时设置用 0.1% 皂角甙和 0.01% 溶菌酶处理,但不加抗体的对照以及正常细菌对照。

2 结果

2.1 PCR 结果 *ciaH* 和 *ciaR* 基因扩增产物见图 1。

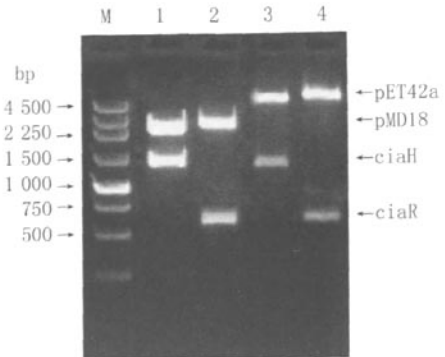


M: marker (BioAsia); 第 1 和 2 泳道: *ciaH* 和 *ciaR* 基因扩增条带

图 1 *ciaH* 和 *ciaR* 基因扩增片段

Fig. 1 The amplification fragments of *ciaH* and *ciaR* genes

2.2 T-A 克隆和亚克隆及测序结果 目的重组质粒的 Nde I 和 Xho I 酶切图谱见图 2。与已经公布的肺炎链球菌 R6 株 *ciaH* 和 *ciaR* 基因序列 (GenBank accession No.: NC_003098) 比较^[11], *ciaH* 基因核苷酸和氨基酸序列完全相同, *ciaR* 基因核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 99.9% 和 100%。T-A 克隆和亚克隆的序列测定结果完全相同。

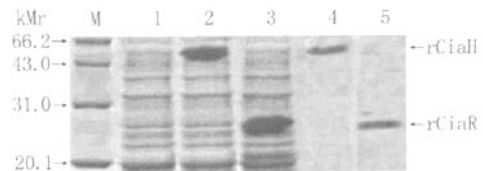


M: marker (BioAsia); 第 1 至 4 泳道: pMD18-*ciaH*, pMD18-*ciaR*, pET42a-*ciaH* 和 pET42a-*ciaR* 的 Nde I 及 Xho I 酶切图谱

图 2 目的重组质粒内切酶图谱

Fig. 2 Endonuclease maps of the recombinant plasmids

2.3 重组蛋白表达和提纯效果 在 0.5 mmol/L IPTG 诱导下, *rCiaH* 和 *rCiaR* 表达量分别为细菌总蛋白的 33% 和 45%; Ni-NTA 提纯的 *rCiaH* 和 *rCiaR* 经 SDS-PAGE 后均显示为单一的蛋白条带(图 3)。



M: marker (BioAsia); 第 1 泳道: 无插入片段的 pET42a; 第 2 和 3 泳道: 分别为表达的 *CiaH* 和 *rCiaR*; 第 4 和 5 泳道: 分别为提纯 *rCiaH* 和 *rCiaR*

图 3 *rCiaH* 和 *rCiaR* 表达和提纯效果

Fig. 3 Expression and purification effects of *rCiaH* and *rCiaR*

2.4 兔抗血清及其 IgG 效价 *rCiaH*、*rCiaR* 抗血清、*rCiaH*-IgG、*rCiaR*-IgG 免疫双扩效价分别为 1:4、1:4、1:1 和 1:1。*rCiaH*、*rCiaR* 抗血清、*rCiaH*-IgG、*rCiaR*-IgG 玻片凝集效价分别为 1:400、0:1:100 和 1:100。

2.5 MIC 值测定结果 肺炎链球菌 ATCC6306 以及临床菌株 SP1、2、5、7、10、11、

13、19 和 21 株均对青霉素及头孢噻肟均敏感, SP4、8、9、20 和 SP24 株对青霉素耐药但对头孢噻肟敏感,SP15、17 和 18 株对青霉素和头孢噻肟均耐药。CiaH-IgG 胞外或胞内、CiaR-IgG 胞内封闭CiaH 后,对青霉素及头孢噻肟敏感的菌株出现该两种抗生素的耐药性,但 CiaR-IgG 胞外封闭 CiaR 对耐药性无影响;对青霉素或头孢噻肟耐药的菌株,CiaH-IgG 或 CiaR-IgG 胞内或胞外封闭均不影响其耐药性。此外,与未经皂角甙和溶菌酶处理的各菌株 MIC 值比较,上述两种试剂处理后各菌株 MIC 值无明显改变。见表 1。

表1 肺炎链球菌CiaH/CiaR封闭前后药敏试验结果

Table 1 Results of drug sensitive test of *S. pneumoniae* before and after CiaH/CiaR blocking

菌株	药物	MIC(μg/ml)					
		CiaH 外封闭	CiaH 内封闭	CiaR 外封闭	CiaR 内封闭	未封闭对照	正常对照
ATCC6306	青霉素	0.25	0.25	0.06	0.25	0.06	0.12
	头孢噻肟	2*	2*	0.12	2*	0.12	0.12
SP1	青霉素	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	头孢噻肟	2*	2*	0.5	2*	0.5	0.5
SP2	青霉素	1*	0.5*	0.12	1*	0.12	0.12
	头孢噻肟	1*	1*	0.25	1*	0.25	0.25
SP5	青霉素	0.5*	0.5*	0.12	0.5*	0.12	0.12
	头孢噻肟	1*	1*	0.25	1*	0.25	0.25
SP7	青霉素	4*	4*	0.25	4*	0.25	0.25
	头孢噻肟	2*	2*	0.12	2*	0.25	0.25
SP10	青霉素	0.25	0.25	0.12	0.25	0.12	0.12
	头孢噻肟	2*	1*	0.25	2*	0.12	0.25
SP11	青霉素	0.5	0.5	0.12	0.5	0.12	0.12
	头孢噻肟	4*	2*	0.5	2*	0.5	0.5
SP13	青霉素	2*	2*	0.12	1*	0.06	0.12
	头孢噻肟	4*	2*	0.12	2*	0.12	0.25
SP19	青霉素	1*	1*	0.25	0.5*	0.25	0.25
	头孢噻肟	2*	2*	2*	1*	0.25	0.25
SP21	青霉素	0.5*	0.5*	0.12	0.5*	0.12	0.25
	头孢噻肟	2*	2*	2*	2*	0.25	0.5
SP4	青霉素	4*	4*	2*	4*	4*	4*
	头孢噻肟	2*	2*	0.25	1*	0.25	0.5
SP8	青霉素	2*	2*	2*	2*	2*	4*
	头孢噻肟	4*	2*	0.5	2*	0.5	0.5
SP9	青霉素	4*	2*	2*	4*	2*	2*
	头孢噻肟	2*	2*	0.25	2*	0.25	0.25
SP20	青霉素	2*	2*	2*	2*	2*	2*
	头孢噻肟	4*	4*	0.25	2*	0.25	0.5
SP24	青霉素	2*	2*	2*	2*	2*	2*
	头孢噻肟	4*	4*	0.5	2*	0.5	0.5
SP15	青霉素	4*	4*	4*	4*	4*	4*
	头孢噻肟	1*	2*	2*	1*	2*	2*
SP17	青霉素	2*	2*	2*	2*	2*	2*
	头孢噻肟	4*	4*	4*	4*	4*	4*
SP18	青霉素	1*	0.5*	1*	0.5*	1*	2*
	头孢噻肟	4*	2*	4*	2*	4*	4*

内和外封闭:IgG 进入菌细胞内或菌细胞外与CiaH 或CiaR 结合;未封闭对照:经皂角甙和溶菌酶处理但未用IgG 封闭;正常对照:未经皂角甙和溶菌酶处理及IgG 封闭;* :耐药

3 讨 论

早已证实,不同病原菌耐 β -内酰胺类抗生素的机制主要有细菌产生 β -内酰胺酶、膜通透性改变、青霉素结合蛋白(penicillin-binding proteins, PBPs)种类差异及突变^[12]。尤其是 PBPs 种类不同或突变,对肺炎链球菌的青霉素耐药性有很大影响。国外文献报道,肺炎链球菌对青霉素的耐药性主要为 PBPs 突变所致^[13-15]。国内李向阳等报道,与青霉素敏感肺炎链球菌 R6 株比较,青霉素敏感肺炎链球菌临床菌株 pbp2B 基因序列相似性可达 99.3%,青霉素耐药临床菌株 pbp2B 基因序列相似性仅为 86.1%^[16]。然而,有学者发现头孢菌素作用肺炎链球菌时有两种方式:哌拉西林裂解细菌,头孢噻肟杀菌但不裂解细菌^[17],提示存在一种与 PBPs 无关的作用机制。

CiaH 与肺炎链球菌产生青霉素及头孢噻肟耐药性有关,CiaR 则否^[4-6],但作为 TCS 中直接调控靶基因表达的转录调节蛋白 CiaR,不参与该耐药性产生过程是难以解释的^[7]。为了阐明 CiaH/CiaR 在肺炎链球菌对 β -内酰胺类抗生素耐药中的作用机制,我们克隆并构建了 ciaH 和 ciaR 基因及其原核表达系统,制备了表达产物的兔抗血清及其 IgG。与报道的相应序列比较^[9],本研究所克隆的 ciaH 和 ciaR 基因核苷酸和氨基酸序列相似性高达 99.1%~100%和 100%,提示 ciaH 和 ciaR 基因序列十分保守。所构建的原核表达系统 *E. coli* BL21DE3^{pET42a-ciaH} 和 *E. coli* BL21DE3^{pET42a-ciaR} 在 IPTG 诱导下,能高效表达目的重组蛋白 rCiaH 和 rCiaR,其产量分别可达细菌总蛋白的 33%和 45%。所制备的 rCiaH 和 rCiaR 抗血清及其 IgG 的免疫双扩效价分别可达 1:4 和 1:1。上述实验结果为今后的目的基因敲除、基因与表达产物功能研究、靶分子阻断和表达水平检测、锚定 CiaH 和 CiaR 进行磷酸化水平测定等奠定了基础。

CiaH 是跨膜蛋白,CiaR 是胞浆蛋白^[4-6],故菌细胞外抗血清可封闭 CiaH,但不能封闭 CiaR,本研究中 rCiaH-IgG 可凝集肺炎链球菌、rCiaR-IgG 不能凝集肺炎链球菌也说明了这一点。有文献报道,细胞在皂角甙处理或细菌在皂

角甙和低浓度溶菌酶联合处理时,高浓度的 IgG 可进入胞内^[18]。本研究中,我们采用类似方法将高浓度 rCiaH-IgG 和 rCiaR-IgG 导入菌细胞内,从而可探讨 CiaR 与肺炎链球菌对青霉素和头孢噻肟耐药的相关性。药敏试验结果显示,皂角甙和溶菌酶处理前后各菌株 MIC 值无明显变化,提示该两种试剂低浓度作用时对细菌的药物敏感性影响不大。CiaH-IgG 胞外或胞内、CiaR-IgG 胞内封闭 CiaH 后,对青霉素及头孢噻肟敏感的菌株易出现该两种抗生素的耐药性;对青霉素或头孢噻肟耐药的菌株,CiaH-IgG 或 CiaR-IgG 胞内或胞外封闭均不影响其耐药性;这种 CiaH/CiaR 信号通路被阻断后敏感或耐药菌株出现不同耐药性变化的现象,尚未见国内外文献报道。上述结果提示,CiaH 和 CiaR 均仅仅与肺炎链球菌敏感菌株产生对青霉素和头孢噻肟耐药性有关,但对肺炎链球菌耐药菌株耐药性不产生影响,其机制有待于深入研究。

References:

- [1] HOSHINO K, WATANABE H, SUGITA R, et al. High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(11):4357-4359.
- [2] THORUSBERRY C, JONES M B, HICKEY M L, et al. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in the United States, 1997-1998 [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1999, 44(6):749-759.
- [3] LEE N Y, SONG J H, KIM S, et al. Carriage of antibiotic resistant pneumococci among Asian children; a multinational surveillance by the Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP) [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 32(10):1463-1468.
- [4] GUENZI E, GASC A M, SICARD M A, et al. A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Mol Microbiol*, 1994, 12(3):505-515.

- [5] GIAMMARINARO P, SICARD M, GASC A M. Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Microbiology*, 1999, 145(Pt 8): 1859-1869.
- [6] AHN S J, WEN Z T, BURNE R A. Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159 [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(3): 1631-1642.
- [7] PATERSON G K, BLUE C E, MITCHELL T J. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(pt 4): 355-363.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [M]. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1. 21-1. 52, 2. 60-2. 80, 7. 30-7. 35, 9. 14-9. 22.
- [9] LIU Y Y, ZHENG W, LI W L, et al. Pathogenesis of leptospirosis; interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2007, 196: 233-239.
- [10] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Information Supplement* [M]. Updated Tables for the NCCLS Antimicrobial Susceptibility Testing Standard. 2006; M56-58.
- [11] HOSKINS J A, ALBORN W J, ARNOLD J, et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6 [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183 (19): 5709-5717.
- [12] HAKENBECK R, COYETTE J. Resistant penicillin binding proteins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(4): 332-340.
- [13] MACHEBOEUF P, DI GUILLI A M, JOB V, et al. Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 577-582.
- [14] HAKENBECK R, GREBE T, ZAHNER D, et al. Beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*; penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins [J]. *Mol Microbiol*, 1999, 33(4): 673-678.
- [15] DU PLESSIS M, BINGEN E, KLUGMAN K P. Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *streptococcus pneumonia* with reduced susceptibility to amoxicillin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46 (8): 2349-2357.
- [16] YANG J H, ZHOU Y Z, LI X Y, et al (杨锦红, 周义正, 李向阳, 等). Study of *Streptococcus pneumoniae* pbp2B gene mutation and drug resistance phenotype [J]. *Chinese Journal of Medical Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 2007, 27(7): 628. (in Chinese)
- [17] POZZI G, MASALA L, IANNELLI F, et al. Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*; two allelic variants of the peptide pheromone [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178 (20): 6087-6090.
- [18] LIU Y Y, ZHENG W, LI L W, et al. Pathogenesis of leptospirosis; interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2007, 196: 233-239.

[责任编辑 张荣连]