

• 论 著 •

## 广州地区儿童分离株青霉素耐药肺炎链球菌青霉素结合蛋白基因分型\*

黄艳梅<sup>1</sup>, 林晓敏<sup>2#</sup>, 麦嘉良<sup>1,2</sup>, 梁秉绍<sup>1</sup>, 谢永强<sup>1</sup>, 钟华敏<sup>1</sup>, 邓秋莲<sup>1</sup>, 周珍文<sup>1△</sup>

(1. 广州市妇女儿童医疗中心 510120; 2. 广州医科大学 510120)

**摘要:**目的 了解广州地区儿童分离株青霉素耐药肺炎链球菌(PNSP)的分子流行病学,为肺炎链球菌感染性疾病防控提供实验依据。方法 设计特异性引物,PCR 扩增 PNSP 青霉素结合蛋白基因 PBP1A、PBP1B、PBP2A、PBP2B、PBP2X、PBP3,进行测序分析。并使用 Hinf I 对 PCR 产物进行酶切,分析其限制性片段长度多态性(RFLP)。结果 成功提取 PNSP 的 DNA,PCR 结果显示:50 株耐青霉素肺炎链球菌中:含 PBP1A、PBP1B、PBP2A、PBP2B、PBP2X 及 PBP3 的菌株阳性率分别为 48.9%、64.4%、71.1%、31.1%、40.0%、31.1%。测序显示,它们与 GenBank 已知序列的同源性分别为 99%、98%、100%、97%、95%、100%。使用 Hinf I 的 RFLP 分析显示:PBP1A、PBP1B、PBP2A、PBP3 仅有一种基因型;PBP2B、PBP2X 有两种基因型的,阳性率分别为 71.4%、28.6%、66.7%、33.3%。结论 广州肺炎链球菌儿童分离株耐青霉素基因的分布以 PBP2A、PBP1B、PBP1A 为主。使用 Hinf I 酶切,PBP2B、PBP2X 具有两种基因型,其中优势型均大于 65%。

**关键词:**肺炎链球菌; 青霉素; 耐药; 青霉素结合蛋白

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.003

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2017)07-0873-04

Penicillin-binding proteins genotyping of penicillin resistance *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Guangzhou area\*HUANG Yanmei<sup>1</sup>, LIN Xiaomin<sup>2#</sup>, MAI Jialiang<sup>1,2</sup>, LIANG Bingshao<sup>1</sup>,XIE Yongqiang<sup>1</sup>, ZHONG Huamin<sup>1</sup>, DENG Qiulian<sup>1</sup>, ZHOU Zhenwen<sup>1△</sup>

(1. Guangzhou Municipal Women and Children's Medical Center, Guangzhou,

Guangdong 510120, China; 2. Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120)

**Abstract: Objective** To understand the molecular epidemiology of penicillin resistance *Streptococcus pneumoniae* (PNSP) isolated from children in Guangzhou area to provide the experimental basis for clinical prevention and control of *Streptococcus pneumoniae* infectious diseases. **Methods** Specific primers were designed according to Genbank, penicillin binding protein (PBP) genes PBP1A, PBP1B, PBP2A, PBP2B, PBP2X, PBP3 were amplified by PCR. The sequencing analysis was performed. The PCR products were digested by Hinf I, and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) was analyzed. **Results** DNA of PNSP was successfully extracted, the PCR results showed that in 50 strains of PNSP, the positive rates of bacterial strains containing PBP1A, PBP1B, PBP2A, PBP2B, PBP2X and PBP3 were 48.9%, 64.4%, 71.1%, 31.1%, 40.0% and 31.1% respectively. The sequencing showed that their homologies with known sequences in GenBank were 99%, 98%, 100%, 97%, 95% and 100% respectively. Using RFLP in Hinf I showed that PBP1A, PBP1B, PBP2A and PBP3 only had one kind of genotype, PBP2B and PBP2X had two kinds of genotypes, the positive rates were 71.4%, 28.6%, 66.7% and 33.3% respectively. **Conclusion** The gene distribution of PNSP strains among children in Guangzhou is dominated by PBP2A, PBP1B and PBP1A, there are two subtypes in PBP2B, PBP2X when digested by Hinf I, in which the predominant subtype >65%.

**Key words:** streptococcus pneumoniae; penicillin; resistance; penicillin-binding protein

肺炎链球菌(*streptococcus pneumoniae*, SP)是社区获得性肺炎的主要致病菌,是导致儿童肺炎、脑膜炎、鼻窦炎、支气管炎和中耳炎等疾病的重要病原菌,其导致的严重感染是儿童死亡的重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。

随着青霉素的广泛应用,在 20 世纪 60 年代出现了青霉素耐药的肺炎链球菌(PNSP)。PNSP 耐药主要原因是青霉素结合蛋白变异引起的<sup>[3]</sup>。青霉素结合蛋白(PBP)是一类结合在细菌细胞膜上的酶,是 β-内酰胺类抗菌药物的主要靶点。β-内酰胺类药物通过环酰胺的羧基共价结合到 PBP 的丝氨酸活性位点引起酰化作用,抑制转肽酶和羧肽酶活性,导致细菌网状细胞壁无法形成最终引起细菌死亡<sup>[4]</sup>。PBPs 的突变是介导 β-内酰胺类耐药的主要原因。现发现 6 种 PBPs 主要由高分子量[(80~90×10<sup>3</sup>)]的 PBPS 2X、2B、1A、1B、2A 组成,即

HMMBP, 和低分子量(45×10<sup>3</sup>)的 PBP3 (LMM PBP) 组成<sup>[5]</sup>。为了解广州地区儿童分离株中 PNSP PBP 的分子流行情况,分析广州市妇女儿童医疗中心儿童分离 50 株 PNSP PBP 6 种基因型的携带率及 Hinf I 酶切限制性片段长度多态性(RFLP),为肺炎链球菌儿童感染的防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 2012 年 1 月到 2013 年 12 月广州市妇女儿童医疗中心检验科微生物室收集的年龄为 15 岁以下患者的标本,其中分离自痰标本 15 株,咽拭子 13 株,耳分泌物 20 株,血液及脑脊液标本各 1 株,共 50 株。

**1.2 菌株鉴定及药敏** 所有菌株均在 VITEK2 COMPACT60 机上鉴定及药敏且 MIC PG > 2。标准菌株: ATCC49619。

\* 基金项目:广东省科技厅项目(2014A020212013);广州市医药科技项目(20131A011053)。

作者简介:黄艳梅,女,主管技师,主要从事微生物检验研究。 # 共同第一作者:林晓敏,女,初级技师,主要从事临床检验研究。

△ 通信作者, E-mail: zzw6248@126.com。

**1.3 DNA 模板的制作**<sup>[6]</sup> 挑取单菌落置于含有 50 μL 灭菌蒸馏水中,100 °C 煮沸 10 min, 12 000 r/min,离心 2 min,上清液作为 DNA 模板。

**1.4 引物的设计及合成** 根据 Genbank Streptococcus pneumoniae R6 基因序列 Taxonomy ID:171101 设计引物,由 invitrogen 公司合成,引物序列如表 1 所示。

表 1 各引物序列及相关资料

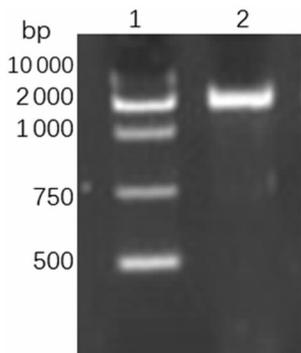
基因	引物	Tm 值	片段长度 (bp)
PBP1A	P1: CGCGGATCCATGAACAAACAACTATCC P2: AAACCTCGAGTTATGGTTGCTGCTGGTTGAG	56	2 160
PBP1B	P1: CGCGGATCCATGCAAAATCAATTAATGAAT P2: AAACCTCGAGTTATCGTCTGCGCCCTTGAA	55	2 466
PBP2A	P1: CGCGGATCCATGAAATAGATAAATATTTTG P2: AAACCTCGAGTTAGCGAAATAGATTGACT	49	2 196
PBP2B	P1: CGCGGATCCATGAGACTGATTTGTATGAG P2: CGCCTCGAGCTAGTTCATTGGATGGTATT	55	2 040
PBP2X	P1: GCGGGATCCATGAAGTGGACAAAAAGAGTA P2: ACAGGGCGGCTTAGTCTGCTAAAGTTAATT	57	2 253
PBP3	P1: CGCGGATCCATGAAAAAATATTTTTAACTTTG P2: CGCCTCGAGTTATAATTTCTCGTTACGAAA	51	1 242

**1.5 PBP 基因 PCR 扩增** 应用 TAKARA 公司 Taq DNA Polymerase 试剂盒进行 PCR。热循环参数为:95 °C 预变性 5 min,变性 95 °C 30 s,退火时间 °C 30 s 退火温度见上表,72 °C 延伸 30 s,72 °C 延长 5 min,共 30 个循环<sup>[7]</sup>。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,紫外检测仪下观察并保存图像。PCR 产物送 invitrogen 公司测序验证。测序结果用 PUBMED blast 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行同源性分析。

**1.6 酶切目的基因进行限制性片段性长度多态性分析** PCR 产物 6 μL 加入 Hinf I 限制性内切酶及牛血清白蛋白(BSA)各 2 μL,于 37 °C 水浴 1 h。酶切产物进行 2% 的凝胶电泳 1 h<sup>[8]</sup>。紫外检测仪下观察并保存图像。

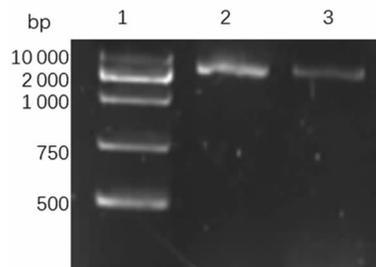
**2 结果**

**2.1 PBP 基因的扩增** 以耐青霉素肺炎链球菌 DNA 为模板进行 PCR,结果显示 PBP1A、PBP1B、PBP2A、PBP2B、PBP2X 条带 2 000 bp 左右,PBP3 的条带 1 000 bp 左右,与理论值相符。如图 1、图 2 所示。不含有这 6 种青霉素结合蛋白基因的菌株有 5 株,占 10.0%。45 株耐青霉素肺炎链球菌中:PBP1A、PBP1B、PBP2A、PBP2B、PBP2X 各占比例分别为:48.9%、64.4%、71.1%、31.1%、40.0%、31.1%。如表 2 所示。其中单各基因中 PBP2A、PBP1B 所占比例较大,超过 50.0%。同时存在多个基因组合中,最多见的是同时含有 PBP2a、2b、PBP1b 基因有 14 株,占 28.0%,其次为同时含有 pbp1b、pbp2a 基因,有 12 株,占 24.0%。



注:1 表示 DNA marker DL 10 000;2 表示 PBP2B 的 PCR 扩增产物。

图 1 PBP2B 的 PCR 结果



注:1 表示 DNA marker DL 10 000;2、3 表示 PBP2A 的 PCR 扩增产物。

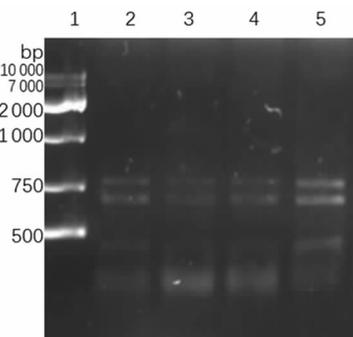
图 2 PBP2A 的 PCR 结果

表 2 50 株肺炎链球菌 PBPS 基因各占比例

基因型	PBP1A	PBP1B	PBP2A	PBP2B	PBP2X	PBP3
阳性率 (n/n)	22/45	29/45	32/45	14/45	18/45	14/45
所占比例 (%)	48.90	64.40	71.10	31.10	40.00	31.10

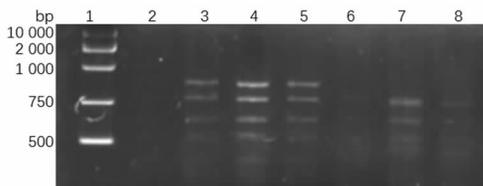
**2.2 PBP 的同源性分析** 根据 invitrogen 公司在 DNA 序列分析仪上分析的核苷酸序列,PUBMED/BLAST 工具与相应基因进行比对。

**2.3 PBP 的 RFLP 分析** 酶切目的基因的限制性长度多态性分析,结果显示只有一种基因型的有:PBP1A、PBP1B、PBP2A、PBP3,如图 3 所示;有 2 种基因型的有 PBP2B、PBP2X。PBP2B 2 种基因型分别占 71.4% 和 28.6%;PBP2X 分别占 33.3% 和 66.7%,如图 4 所示。



注:1 表示 DNA marker DL10 000;2~5 表示 PBP2A 的酶切产物。

图 3 PBP2A 多态性分析



注:1 表示 DNA marker DL 10 000;3~5 表示 PBP2X-gene-I 的酶切产物;6~8 表示 PBP2X-gene-II 的酶切产物。

图 4 PBP2X 多态性分析

PBP1A 的序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12900983 号核苷酸序列一致性为 99%,仅 5 个核苷酸差异。PBP1B 的序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12901301 号核苷酸序列一致性为 98%,仅 47 个核苷酸差异。PBP2A 的序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12901196 号核苷酸序列一致性为 100%;I 型 PBP2B 序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12901941 号核苷酸序列一致性为 97%,有 64 个核苷酸差异;II 型 PBP2B 序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12901941 号核苷酸序列一致性为 98%,有 46 个核苷酸差异;I 型 PBP2X 序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12900956 号的核苷酸序列一致性为

99%；Ⅱ型 PBP2X 序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12900956 号的核苷酸序列一致性为 95%；PBP3 的序列与 GENE BANK 里 geneID 为 12901667 号的核苷酸序列一致性为 100%。表明分析菌株中 PBP 具高度保守性，其 PBP2A、

PBP3 与 GeneBank 中序列完全一致。

基因序列分析结果如表 3 所示，结果显示 PBP2A、PBP3 与 Gen Bank 中序列完全一致，其他各个 PBPS 与 Gen Bank 同源性都达 95%以上，提示分析菌株中 PBP 基因具高度保守。

表 3 肺炎链球菌 PBPS 与 Genbank 序列比对结果

基因型	PBP1A	PBP1B	PBP2A	PBP2B		PBP2X		PBP3
				I	II	I	II	
GenBank 比对序列编号	129000983	12901301	12901196	12901941		12900956		12901667
差异的核苷酸数量(bp)	5	47	0	64	46	5	100	0
同源性(%)	99	98	100	97	98	99	95	100

### 3 讨 论

肺炎链球菌定植于人的鼻咽部，大约 40% 的人携带这种病菌，能引发肺炎、菌血症和脑膜炎，对人类的健康构成了一定的威胁，其感染每年导致 300 万儿童死亡<sup>[8-9]</sup>。更为严重的是，近年来肺炎链球菌对青霉素耐药呈上升趋势，已出现多重耐药菌株，是临床感染控制的难题<sup>[10]</sup>。在美国，上世纪 80 年代肺炎链球菌青霉素耐药率不到 5%，而且均为低水平耐药（中介），到 90 年代初，总青霉素耐药率迅速上升到 17%，目前已经超过 30%<sup>[1-2]</sup>。1997 年，我国文献报道的肺炎链球菌耐药率还仅在 8.8%~22.5% 间，但在最近的调查中，肺炎链球菌对青霉素的耐药率已高达 42.7%，出现快速上升趋势<sup>[4]</sup>。

青霉素耐药主要是 PBPs 结构发生了改变，从而降低了其与 β-内酰胺类药物的亲和性。本研究显示广州地区儿童分离株 PNSP 青霉素耐药率为 75.3%，较重庆地区 45.42% 高<sup>[11]</sup>，较南京地区 74.6%<sup>[12]</sup> 和上海地区儿童青霉素耐药率 81.3%<sup>[13]</sup> 大致相同。

在 PBP 基因进行 RFLP 分析得到图谱，只有一种基因型的有：PBP1A、PBP1B、PBP2A、PBP3，有 2 种基因型的有 PBP2B、PBP2X。由于地域差异，RFLP 分析所用的菌株及所用的限制性内切酶不尽相同，本研究所得基因图谱分析与丁晶晶等<sup>[12]</sup>、姚开虎<sup>[14]</sup> 所得的多种基因图谱有所不同。实验中，笔者发现 45 株 PNSP 中最常见的耐药型基因型为 BPB2A 占 64%，其次为 PBP1B，占 54%，PBP1A 占 44%，PBP2X 占 36%，PBP2B 及 PBP3 各占 28%。苏州地区儿童 SP 临床分离株基因序列比较结果显示 PBP1A 基因检出率为 21.0%，PBP2B 基因检出率为 13.6%<sup>[15]</sup>，重庆地区 PNSP 中 PBP2A 基因检出率占 81.7%，约 40% 的菌株存在 PBP1A 基因。由于菌株来源于不同地区，受当地抗生素应用习惯的影响，导致细菌存在不同的耐药基因型，各地区检测结果存在差异。

研究表明，肺炎链球菌对青霉素的耐药主要是由于 3 种高分子量的青霉素结合蛋白（PBPs）PBP1<sub>A</sub>、PBP2<sub>B</sub>、PBP2<sub>X</sub> 变异而导致对青霉素的亲和力降低引起<sup>[16]</sup>。β-内酰胺类抗生素主要的耐药决定因子是 PBP2B 和 PBP2X，其亲和力下降导致低水平耐药，同时联合 PBP1A 改变导致高水平耐药的基础<sup>[17]</sup>，通常单个的 PBP 基因变异只会造成菌株低水平耐药，高水平耐药性通常是多个 PBP 联合变异的结果<sup>[18]</sup>，说明耐药基因是逐渐获得的。本实验结果显示青霉素的高耐药株大部分是 PBP2A、PBP1B、PBP1A 的同时变异引起的。

综上所述，由于各地区的环境、医疗环境、青霉素使用习惯等因素的不同，造成耐青霉素肺炎链球菌存在不同程度的突变，从而对用药效果也造成影响。因此，根据本研究结果显示

对于控制本地区儿童的肺炎链球菌感染，需检测并结合肺炎链球菌的青霉素结合蛋白基因突变情况进行合理用药，这对临床更有效的治疗肺炎链球菌感染及合理用药从而控制耐药率有重要意义。

### 参考文献

- [1] Fani F, Leprohon P, Légaré D, et al. Whole genome sequencing of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* reveals mutations in penicillin-binding proteins and in a putative Iron permease[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(11): R115.
- [2] 潘玲, 周侠. 青霉素结合蛋白 pbp1a 的克隆表达和对肺炎链球菌耐药性的影响[J]. *中国病原生物学杂志*, 2012, 7(12): 901-923.
- [3] Ghuyssen M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases[J]. *Trends Microbiol*, 1994, 10(2): 372-380.
- [4] Jamin M, Damblon C, Millier S, et al. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with beta-lactams[J]. *Biochem J*, 1993, 292(Pt 3): 735-741.
- [5] 周宇, 王长振, 侯黎, 等. 肺炎链球菌中青霉素结合蛋白 PBP3 的功能与结构研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(8): 3319-3322.
- [6] 黄艳梅, 周帅, 陈吟霜, 等. 金黄色葡萄球菌 EsxA 基因的克隆及表达[J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(6): 728-730.
- [7] 周珍文, 关锐梨, 夏慧敏, 等. 幽门螺杆菌临床分离株尿素酶基因 B 的原核表达、纯化及免疫活性[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(20): 3673-3675.
- [8] 俞桑洁, 胡翼云, 高薇, 等. 肺炎链球菌的耐药性和 pbp2b 基因扩增产物图谱的相关性[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(4): 311-313.
- [9] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates [J]. *Lancet*, 2009, 374(9693): 893-902.
- [10] Falleiros-Arlant H, Berezin N, Avila-Aguero L, et al. Epidemiological burden of invasive pneumococcal disease in children and adolescents with predisposing risk factors [J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 38(1): 1-6. (下转第 879 页)

性为 83%<sup>[18]</sup>,同属于溶菌酶类家族(cl00222)。噬菌体裂解酶与穿孔素协同作用可以直接裂解宿主菌,进一步对此裂解酶的深入研究可为噬菌体应用于院内感染的防控和多重耐药菌感染的治疗提供新的靶标<sup>[19]</sup>。

## 参考文献

- [1] Doi Y, Murray GL, Peleg AY. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36(1): 85-98.
- [2] Cooper CJ, Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Adapting drug approval pathways for Bacteriophage-Based therapeutics [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7(12): 1209.
- [3] Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases [J]. *J Infect Chemother*, 2005, 11(5): 211-219.
- [4] Viertel TM, Ritter K, Horz HP. Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multi-drug-resistant pathogens [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(9): 2326-2336.
- [5] Lukashin AV, Borodovsky MG. Hmm: new solutions for gene finding [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(4): 1107-1115.
- [6] Delcher AL, Harmon D, Kasif S, et al. Improved microbial gene identification with GLIMMER [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(23): 4636-4641.
- [7] Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 75.
- [8] Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, et al. The Universal Protein Resource [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: D154-159.
- [9] McDowall J, Hunter S. InterPro protein classification [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 694(1): 37-47.
- [10] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(5): 955-964.
- [11] Huang H, Dong Y, Yang ZL, et al. Complete sequence of pABTJ2, a plasmid from *Acinetobacter baumannii* MDR-

TJ, carrying many phage-like elements [J]. *Genom Proteom Bioinform*, 2014, 12(4): 172-177.

- [12] Mendes JJ, Leandro C, Mottola C, et al. In vitro design of a novel lytic bacteriophage cocktail with therapeutic potential against organisms causing diabetic foot infections [J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63(Pt 8): 1055-1065.
- [13] Jin J, Li ZJ, Wang SW, et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates [J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(2): 156.
- [14] Shen GH, Wang JL, Wen FS, et al. Isolation and characterization of  $\phi$ km18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46537.
- [15] Chen LK, Liu YL, Hu A, et al. Potential of bacteriophage  $\Phi$ AB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *BMC Microbiol*, 2013, 13(2): 154.
- [16] Peng F, Mi Z, Huang Y, et al. Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB\_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates [J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14(2): 181.
- [17] Jeon J, Kim JW, Yong D, et al. Complete genome sequence of the podoviral bacteriophage YMC/09/02/B1251 ABA BP, which causes the lysis of an OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from a septic patient [J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 12437-12438.
- [18] Lee CN, Tseng TT, Lin JW, et al. Lytic myophage Abp53 encodes several proteins similar to those encoded by host *Acinetobacter baumannii* and phage phiKO2 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(19): 6755-6762.
- [19] Cui Z, Shen W, Wang Z, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* phage JD001 [J]. *J Virol*, 2012, 86(24): 13843.

(收稿日期:2016-11-24 修回日期:2017-01-16)

(上接第 875 页)

- [11] 景春梅,王偲. 2009—2014 年重庆地区儿童感染肺炎链球菌的耐药性及血清分型研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(1): 64-69.
- [12] 丁晶晶,苗立云,李燕,等. 江苏省南京地区肺炎链球菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药及传播机制 [J]. *实用临床医药杂志*, 2014, 18(1): 22-26.
- [13] Hang YJ, Chen YS, Wang ZW, et al. Serological and molecular capsular typing, antibiotic susceptibility and multi-locus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive and non-invasive infections [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(12): 2296-2303.
- [14] 姚开虎,佟月娟,俞桑洁,等. 肺炎链球菌青霉素结合蛋白基因多态性与其青霉素敏感性的关系 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(12): 1107-1110.
- [15] 耿倩. 苏州地区呼吸道感染儿童肺炎链球菌携带率、耐药

现状和分子流行病学研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2014.

- [16] Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, et al. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) la, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, intermediate and-resistant pneumococci [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(12): 1273-1280.
- [17] Crook DWM, Spratt BG. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Britis Med Bull*, 1998, 54(5): 595-610.
- [18] Hotomi M, Togawa A, Kono M, et al. PspA family distribution, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolated from upper respiratory tract infections in Japan [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58124.

(收稿日期:2016-11-22 修回日期:2017-01-14)