

• 论 著 •

多耐药鲍曼不动杆菌噬菌体 D218 的生物学特性研究^{*}张春鸣¹, 徐 彬², 向 军³, 高 晶^{4△}(1. 上海市徐汇区中心医院 200031; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院 202150;
3. 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤科 200025; 4. 复旦大学附属妇产科医院检验科, 上海 200011)

摘要:目的 筛选可用于裂解多耐药鲍曼不动杆菌的噬菌体, 为噬菌体治疗多耐药鲍曼不动杆菌治疗提供新的方案。方法 以上海各家医院临床分离到的多耐药鲍曼不动杆菌为宿主菌, 从不同环境中分离鲍曼不动杆菌噬菌体, 负染法电镜观察其形态及大小, 并分析 pH 和温度对其稳定性的影响, 并对噬菌体 DNA 进行测序及相关基因功能分析。结果 从医院下水道污水中分离得到了一株耐药性鲍曼不动杆菌的烈性噬菌体 D218, 电镜观察其为长尾噬菌体, 头部呈多面体立体对称结构, 直径约 65 nm, 尾长约 100 nm, 尾宽约 15 nm。此株噬菌体在 pH 3~11 及 4~50 °C 的环境下具有较高活性。其基因组全长 102 449 bp, GC 含量为 37.2%, 编码 167 个 ORFs。结论 筛选到了一株新的对 pH 值及温度均稳定的耐药鲍曼不动杆菌烈性噬菌体 D218, 为噬菌体用于耐药性鲍曼不动杆菌的院内感染的预防控制及噬菌体库的建立增添了新的数据。

关键词:多耐药鲍曼不动杆菌; 噬菌体; 感染治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.004

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)07-0876-04

Biological characteristics of bacteriophage D218 of multiple drug resistance *Acinetobacter baumanii*^{*}ZHANG Chunming¹, XU Bin², XIANG Jun³, GAO Jing^{4△}

(1. Xuhui District Central Hospital, Shanghai 200031, China; 2. Chongming Branch Hospital, Affiliated Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 202150, China; 3. Department of Burn, Affiliated Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To screen the bacteriophage for splitting multiple drug resistance *Acinetobacter baumanii* to provide a new scheme for the phage therapy of multiple drug resistance *Acinetobacter baumanii* infection. **Methods** Multiple drug resistance *Acinetobacter baumanii* isolated from hospitals in Shanghai served as the host bacteria. The bacteriophages were isolated from different environments. The morphology and size of bacteriophages were observed by electron microscope with negative staining. The influence of pH and temperature on its stability was analyzed. The phage DNA was extracted and sequenced. The related gene function was analyzed. **Results** A virulent phage named D218 of drug-resistance *Acinetobacter baumanii* was isolated from the effluent sewerage of hospital. The electron microscopy observation showed that it is a long-tail phage of polyhedron symmetric structure, with a diameter of about 65 nm, the tail length of about 100 nm and width of about 15 nm. The phage kept high activity at pH 3~11 and temperature 4~50 °C. The genome size is 102 449 bp with GC content of 37.2%. It encodes 167 ORFs. **Conclusion** A new virulent phage D218 of drug-resistance *Acinetobacter baumanii* is isolated, which is stable to pH and temperature, which increases the new data for its application in hospital infection prevention and control, and the phage library setup.

Key words: multiple drug-resistance *acinetobacter baumanii*; bacteriophage; infection treatment

鲍曼不动杆菌在自然界环境中广泛分布, 常存在于人或动物体表、泌尿生殖道和呼吸道, 是引起严重院内感染最常见的条件致病菌^[1]。据 2015 年中国耐药检测网(CHINET)数据显示, 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类的亚胺培南或美罗培南的耐药率全国为 59.0%, 各省鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药率为 25.6%~82.1%, 为革兰阴性菌引起感染的主要致病菌, 并有逐年上升的趋势。噬菌体在 1915 年由 Felix d' Herelle 首先发现, 并逐步在治疗细菌感染方面显示出其优越性, 如东欧在一个世纪前开始用噬菌体应用于严重细菌感染治疗^[2]。但是 1928 年弗莱明发现青霉素以后, 人们大规模工业化生产抗菌药物, 使得噬菌体应用于细菌感染治疗的研究停滞不前。但近年来由于多耐药菌的不断出现和新型抗菌药物研发速度的减慢, 噬菌体疗法作为抗菌药物的替代疗法又重新进入了人们的视野, 目前其针对多耐药菌感染性疾病治疗的有效性也不断有

研究报道^[3]。而生物工程噬菌体也已克服了许多传统噬菌体疗法的缺陷, 使靶向给药或逆转耐药菌的耐药性成为可能^[4]。本研究通过对耐药鲍曼不动杆菌的生物学特性和基因组学进行研究, 为噬菌体用于多重耐药鲍曼不动杆菌的院内感染预防控制以及感染治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料 从上海交通大学医学院附属瑞金医院和上海第六人民医院临床分离获得的菌株中筛选出 60 株多重耐药鲍曼不动杆菌, -80 °C 保存备用, 需要时接种至 LB 培养 37 °C 培养过夜。噬菌体分离自瑞金医院下水道未经处理的污水。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离 从瑞金医院下水道取未经处理的污水 50 mL, 加入 CaCl₂ 使其终浓度为 1 mmol/L, 3 800 g 离心 15 min, 去除沉淀; 将上清液分别依次经孔径为 0.45 μm 和

* 基金项目: 上海市科学技术委员会自然科学基金资助项目(16ZR1420800); 上海青年临床医技人才(临床检验专业)培养资助计划资助项目(沪卫医基[2016]04 号)。

作者简介: 张春鸣, 女, 主管护师, 主要从事护理管理研究。 △ 通信作者, E-mail: gaojing1511@163.com。

0.22 μm 的滤膜过滤。将 60 株多耐药鲍曼不动杆菌培养至对数期, 分别与上述处理过的上清液混合, 双层琼脂法铺板, 隔日观察噬菌体斑的形成。对得到的噬菌斑经 3 次纯化后进一步进行研究。

1.2.2 氯化铯不连续密度梯度离心法纯化噬菌体 以含有 MgCl_2 的 LB 液体培养基培养宿主菌和噬菌体混合液, 37 °C 培养 8 h。向培养液中加入 NaCl 使其终浓度为 0.5 mmol/L, 加入氯仿使其终浓度为 2%, 充分混匀后 4 °C 过夜。去除下层氯仿后 4 °C 低温离心 20 min, 收集上清液, 加入固体 PEG8000, 使其终浓度为 10% (w/v), 于 4 °C 静置 8 h。离心 20 min, 收集沉淀, 并将沉淀溶于适量的 SM buffer 中重悬。按照 1:1 的比例加入氯仿, 充分混匀, 离心后取上清液。以氯化铯密度梯度离心上清液, 吸取目的条带, 并以 SM buffer 透析 3 次。透析好的噬菌体进一步用于噬菌体 DNA 的抽提和透射电镜形态观察。

1.2.3 噬菌体效价的测定 10 倍连续稀释噬菌体液至 100~108 浓度范围, 将宿主菌培养至对数生长期, 取 1 μL 的噬菌体稀释液和宿主菌充分混合, 室温吸附 5 min 后, 使用双层琼脂平板法铺板, 8 h 后计数噬菌斑数量, 平行试验 3 次。

1.2.4 噬菌体宿主谱的研究 培养至对数期的宿主菌铺双层琼脂平板, 将纯化的噬菌体滴于固体平板上, 8 h 后观察噬菌斑的产生, 确定噬菌体的裂解能力; 根据噬菌斑的透明度和大小确定噬菌体对宿主菌的作用。

1.2.5 噬菌体生物学特性

1.2.5.1 酸碱稳定性试验 以 1:100 的比例混合噬菌体与不同 pH 值的 SM 缓冲液 (pH 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12), 于 37 °C 作用 1 h, 双层琼脂平板法测定不同处理组的噬菌体效价, 重复 3 次。

1.2.5.2 热稳定性试验 将噬菌体液于 4 °C、37 °C、50 °C、60 °C 和 70 °C 水浴中作用 1 h 后, 双层琼脂平板法测定噬菌体效价, 重复 3 次。

1.2.5.3 吸附试验 培养宿主菌使其 OD₆₀₀ 为 0.6, 以 MOI=0.01 的比例混合菌液和噬菌体, 混合后于不同的时间点取样 0.1 mL, 加入 0.9 mL 液体 LB 培养基, 以 13 800 g 离心 30 s。取上清 50 μL 与 400 μL 宿主菌充分混匀, 以双层琼脂平板法测定效价, 吸附到宿主菌上的噬菌体量可以根据减少的噬菌体数量来计算得出, 重复 3 次。

1.2.5.4 感染曲线试验 培养宿主菌至对数期, 分别以 MOI=0.0、0.1、1.0 接种噬菌体于培养至对数期的宿主菌中。每隔 30 min 测菌液的 OD₆₀₀ 值, 重复 3 次。

1.2.5.5 一步生长曲线测定 培养宿主菌至对数期, 取 5 mL 菌液 8 000 g 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀重悬于 300 μL 的液体 LB 培养基中。将噬菌体液以 MOI=0.01 的比例加入宿主菌重悬液, 37 °C 孵育 15 min 后, 12 800 g 离心 10 min, 弃上清, 加 LB 培养基重悬, 重悬后 0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140 min 分别取样, 以双层琼脂平板法测定效价, 重复 3 次。

1.2.6 噬菌体电镜观察 将氯化铯不连续密度梯度离心纯化后的噬菌体用 0.1×PBS 洗涤, 戊二醛 4 °C 固定 30 min, 离心弃上清, 含噬菌体的沉淀用 0.1×PBS 洗涤, 磷钨酸负染, 戊二醛固定 30 min, 使用透射电镜观察噬菌体形态结构。

1.2.7 噬菌体 DNA 提取及测序 将氯化铯不连续密度梯度离心纯化后的噬菌体用 λ 噬菌体 DNA 抽提试剂盒进行 DNA 抽提。经电泳检测后, 委托上海人类基因组研究中心进行测序。采用 GeneMarkS^[5]、GLIMMER^[6] 和 RAST^[7] 来预测噬菌

体基因组的 ORFs, 采用 UniProt 和 InterPro 来预测 ORFs 的功能^[8-9], 并将预测到的 ORFs 在毒力因子库 (<http://mvirdb.llnl.gov/>) 和耐药基因库 (<http://ardb.cbc.umd.edu/>) 中进行数据比对, 分析基因组上携带耐药基因和毒力基因的基本情况, 再通过 tRNA Scan-SE 确定基因组上是否存在 tRNA 基因^[10]。

2 结 果

2.1 噬菌体分离及其形态 从上海交通大学医学院附属瑞金医院下水道未经处理的污水样本中分离到了 1 株鲍曼不动杆菌的烈性噬菌体, 并把它命名为 D218。经透射电子显微镜观察, 该噬菌体头部呈多面体立体对称结构, 直径约 65 nm。D218 为长尾科噬菌体, 尾长约 100 nm, 尾宽约 15 nm。见图 1。

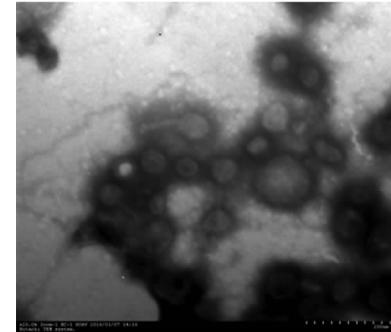
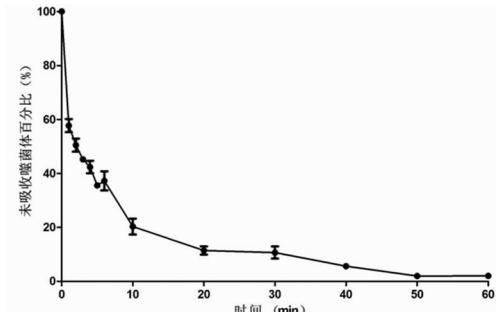


图 1 鲍曼不动杆菌噬菌体 D218 的透射电镜图像

2.2 宿主谱分析 采用双层平板法, 在测试的 60 株耐药鲍曼不动杆菌中, D218 对其中 32 株裂解, 裂解率为 53.33%。

2.3 噬菌体感染宿主菌的能力

2.3.1 吸附曲线 以临床分离得到的鲍曼不动杆菌为宿主菌研究 D218 的吸附作用。结果表明 5 min 后有 60% 的 D218 吸附于宿主菌, 20 min 后大约有 90% 的噬菌体吸附到宿主菌上, 见图 2。



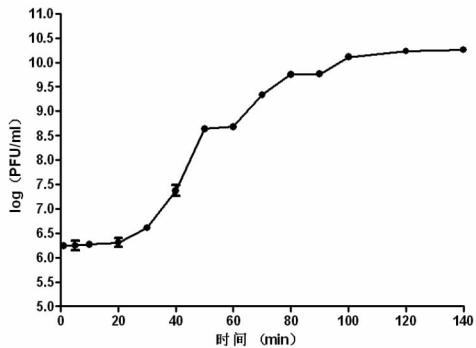
注: 纵坐标表示离心去除游离噬菌体后上清液中残留噬菌体的百分比, 横坐标表示噬菌体 D218 和宿主菌共同作用的时间。

图 2 鲍曼不动杆菌噬菌体 D218 的吸附曲线

2.3.2 一步生长曲线 如图 3 所示一步生长曲线可以看出, 其潜伏期为 20 min, 其繁殖一代产生子代噬菌体的时间大约为 90 min。裂解量可以通过爆发末期噬菌体滴度与感染初期宿主菌浓度的比值计算得出, 噬菌体 D218 的裂解量约为 185 pfu/cell, 即平均每个宿主菌被 1 个 D218 噬菌体裂解约能产生 185 个子代噬菌体。

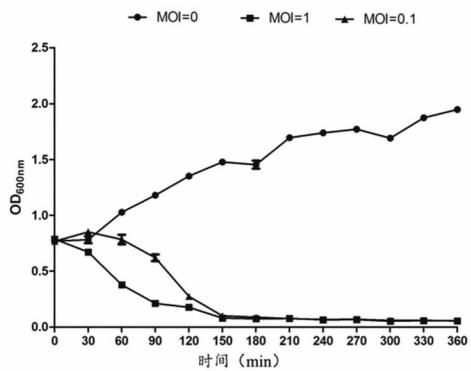
2.3.3 感染曲线 当 MOI 分别为 0.1 和 1.0 时, 噬菌体 D218 对宿主菌的生长有明显的抑制作用, MOI 为 0.1, 作用 120 min 后具有明显的抑制效果; 当 MOI 为 1.0 时, 作用 60 min 即具有明显的抑制效果。无论 MOI 为 0.1 还是 1.0, 作用 120 min 后, 噬菌体 D218 可以完全抑制多耐药宿主菌的正常

生长,见图4。



注:纵坐标表示混合培养后噬菌体 D218 的滴度,横坐标表示噬菌体 D218 和宿主菌的培养时间。

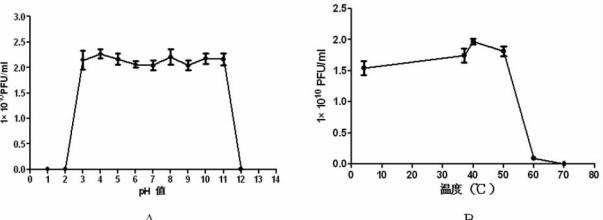
图 3 噬菌体 D218 的一步生长曲线



注: 横坐标表示噬菌体 D218 与宿主菌的孵育时间, 纵坐标表示培养液中 OD600 值的变化情况。

图 4 噬菌体 D218 的感染曲线

2.4 噬菌体 D218 的 pH 稳定性及温度稳定性 通过对 D218 的 pH 稳定性研究发现, 不同 pH 对噬菌体 D218 的活性存在一定的影响, D218 滴度在 pH3-11 缓冲液中作用 1 h 后仍能保持稳定性和较高的活性(图 5 A)但是在 pH≤2 或 pH≥12 时, 即强酸或强碱条件下, 噬菌体几乎丧失活性; 在 4 ℃、37 ℃、40 ℃、50 ℃ 温度作用 1 h 后, 滴度维持稳定水平。当温度升高至 60 ℃ 时, 其活性迅速下降至 5% 以下, 当温度升高到 70 ℃ 后, 噬菌体滴度几乎接近于 0(图 5 B)。

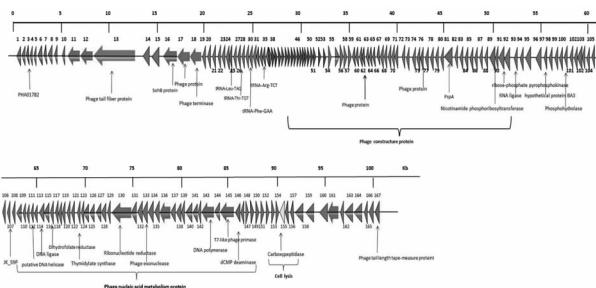


注:A 表示 pH 值对噬菌体 D218 的影响,纵坐标表示噬菌体的滴度,横坐标表示不同 pH 值;B 表示温度变化对噬菌体 D218 的影响,纵坐标表示噬菌体滴度,横坐标表示温度。

图 5 噻唑类 D218 的酸碱稳定性及热稳定性曲线

2.5 噬菌体基因组的结构特点及基因功能预测 对多耐药鲍曼不动杆菌烈性噬菌体 D218 进行全基因组测序,全基因组结构图如图 6 所示。测序结果显示 D218 基因组全长为 102 449 bp,GC 含量为 37.2%。通过 glimmer、GeneMarks、RAST 和生物信息学方法预测得到 167 个开放阅读框(Open reading frame,ORF),其中 144 ORFs 编码的蛋白为未知功能蛋白,23 ORFs 编码已知功能基因蛋白。ORF155 编码溶菌酶,其核酸

序列与鲍曼不动杆菌噬菌体 vB 的溶菌酶有 93% 相似, 同属于溶菌酶类家族 cl00222。运用全基因组序列在 NCBI 数据库进行 BlastN 分析, 未有与 D218 相似的噬菌体序列。将毒力基因和耐药基因库中的序列与所有预测到的 D218 的 ORFs 进行比对后未发现编码任何毒力基因和耐药基因。除此之外, 通过软件 tRNAscan-SE-1.23 完成 tRNA 的预测, 发现 D218 基因组序列中含有多种 tRNA 序列, 如 Leu-tRNA、Gln-tRNA、Thr-tRNA、Asp-tRNA、Pro-tRNA、Ile-tRNA、Tyr-tRNA、Met-tRNA、Phe-tRNA 和 Arg-tRNA。



注:噬菌体 D218 的基因组全长 102 449 bp, 共有 167 个开放阅读框, 图中不同的颜色代表有注释功能的开放阅读框, 灰色为假定蛋白。

图 6 噬菌体 D218 的全基因组结构图

3 讨 论

近年来鲍曼不动杆菌已成为院内感染的主要条件致病菌病原体。多耐药鲍曼不动杆菌强大的抵抗抗菌药物作用的能力引起研究者广泛关注^[1,11]。大量鲍曼不动杆菌耐药菌株的出现和流行,以及其在重症监护病房引起的伤口迁延不愈^[12]及高死亡率^[13],已经使其耐药问题成为全球抗感染领域关注的焦点。

在此情况下,噬菌体疗法重新进入人们的视线。噬菌体具有高度的特异性,能有效裂解细菌从而达到抗菌目的;同时由于噬菌体对动物或者植物细胞没有裂解活性,所以具有较高的安全性;噬菌体普遍存在于自然界,来源广泛,所以噬菌体的分离和扩增具有较好的可行性;噬菌体的鸡尾酒疗法也可以防止噬菌体耐药性的产生^[14]。早在 20 世纪 40 年代抗菌药物出现之前,噬菌体成功被用来治疗例如细菌性痢疾等疾病;20 世纪 90 年代在前苏联的军队中也应用于感染性疾病的治疗,取得良好效果。所以,在抗菌药物治疗失败的情况下,噬菌体疗法作为一种替代疗法引起广泛关注^[15]。

噬菌体 D218 全基因组序列与鲍曼不动杆菌噬菌体 Abp53 全基因组序列覆盖率仅为 10%，覆盖部分相似性为 98%，与鲍曼不动杆菌噬菌体 vB 覆盖率为 60%，覆盖部分相似性为 84%。因此噬菌体 D218 的全基因组测序后发现是一株新的还未报道过的鲍曼不动杆菌噬菌体^[16]，且编码的 ORFs 与毒力基因和耐药基因库比对后发现，并不携带毒力基因和耐药基因^[17]。对测试菌株进行裂解结果表明，其裂解谱较宽，可裂解测试菌株的近 53.33%，这一种新的耐药鲍曼不动杆菌的噬菌体为鲍曼不动杆菌噬菌体库增加了新的选择。

同时其潜伏期比较短,对宿主菌的吸附速度快,裂解能力较强,这些特点为其临床使用提供了基础。其具有良好的酸碱稳定性及较强的温度适应范围,保存及使用方便也为临床使用提供了便利,这些特征为其开发为噬菌体制剂并应用于临床奠定了基础。

D218 全基因组序列通过 glimmer、GeneMarks、RAST 和生物信息学方法共预测得到 167 个 ORF, 其中第 153 个 ORF 为溶菌酶, 该溶菌酶仅与 NCBI 数据库中鲍曼不动杆菌噬菌体 vB_BacM1 的溶菌酶相似, 基因水平比较覆盖率为 93%, 覆盖部分相似

性为 83%^[18]，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^[19]。

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 Bioinfor*, 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 φkm18p, 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 ΦAB2 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 β-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) 1a, 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]. *Brit 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)