

临床肺炎链球菌常见序列型青霉素耐药性的流行病学研究

高薇¹, 史伟¹, 陈长会², 文德年³, 田进², 姚开虎¹

1. 首都医科大学附属北京儿童医院、北京市儿科研究所, 儿科学国家重点学科, 教育部儿科重大疾病研究重点实验室, 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心, 儿童呼吸道感染性疾病研究北京市重点实验室, 北京 100045;
2. 酉阳土家族苗族自治县人民医院, 重庆医科大学附属第一医院酉阳医院, 重庆 409899;
3. 中江县人民医院, 四川 618100

摘要: 从菌种的水平研究和阐述临床分离的肺炎链球菌青霉素耐药机制存在一定的局限。为探讨以序列型 (Sequence type, ST) 为基础研究肺炎链球菌青霉素耐药机制的可行性, 本研究分析了 1997~2014 年间北京常见 STs 肺炎链球菌 488 株和 2015 年重庆酉阳县、四川中江县常见 STs 菌株 88 株的青霉素最低抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 的分布及年份分布。结果显示北京分离株中除了 ST342 外, 属于某一种 ST 的所有分离株的青霉素 MIC 值具有一定分布范围, 或者 <0.25 mg/L, 或者 ≥ 0.25 mg/L。青霉素 MIC <0.25 mg/L 的分离株多分布于 2001 年以前, 此年份后 ≥ 0.25 mg/L 的分离株出现, 并逐渐成为主要种群。但这个年份分布规律对于某一种 ST 并不明显, 某一种 ST 在最初发现的几个年份中就具有不同青霉素 MIC 水平的分离株。重庆酉阳县和四川中江县常见 STs 型青霉素 MIC 分布于 $0.25\sim 2.0$ mg/L (≥ 0.25 mg/L), 包括 ST271、ST320 和 ST81。本研究从流行病学角度揭示了肺炎链球菌临床分离株常见 STs 的青霉素 MIC 值分布规律, 支持以 STs 为基础研究其青霉素耐药机制。

关键词: 肺炎链球菌; 序列型; 耐药性; 青霉素

Epidemiological study on the penicillin resistance of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates identified as the common sequence types

Wei Gao¹, Wei Shi¹, Changhui Chen², Denian Wen³, Jin Tian², Kaihu Yao¹

1. Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education, National Key Discipline of Pediatrics (Capital Medical University), National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, Beijing Key Laboratory of Pediatric Respiratory Infec-

收稿日期: 2016-04-21; 修回日期: 2016-07-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81371853)和重庆市医学科研计划项目(编号: 20142221)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81371853) and Chongqing Medical Scientific Project (No.20142221)]

作者简介: 高薇, 专科, 主管技师, 研究方向: 儿童呼吸道感染常见病病原菌的耐药。E-mail: weigw2000@sina.com

史伟, 研究生, 实习研究员, 研究方向: 儿童呼吸道感染常见病病原菌的耐药机制。E-mail: shiwei613115@126.com

高薇和史伟为并列第一作者。

通讯作者: 姚开虎, 博士研究生, 研究员, 研究方向: 儿童呼吸道感染常见病病原菌的流行病学特征。E-mail: jiuhu2655@sina.com

田进, 本科, 副主任技师, 研究方向: 细菌耐药和个体化治疗。E-mail: 272045853@qq.com

DOI: 10.16288/j.ycz.16-142

网络出版时间: 2016/8/12 10:44:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160812.1044.010.html>

tion Diseases, Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China;

2. Youyang Hospital, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; People's Hospital of Chongqing Youyang County, Chongqing 409899, China;

3. People's Hospital of Zhongjiang County, Sichuan 618100, China

Abstract: There were some limitation in the current interpretation about the penicillin resistance mechanism of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates at the strain level. To explore the possibilities of studying the mechanism based on the sequence types (ST) of this bacteria, 488 isolates collected in Beijing from 1997–2014 and 88 isolates collected in Youyang County, Chongqing and Zhongjiang County, Sichuan in 2015 were analyzed by penicillin minimum inhibitory concentration (MIC) distribution and annual distribution. The results showed that the penicillin MICs of the all isolates covering by the given ST in Beijing have a defined range, either <0.25 mg/L or 0.25 mg/L, except for the ST342. The isolates with penicillin MIC <0.25 mg/L were mainly collected before 2001, after which the isolates with MIC 0.25 mg/L occurred and became the major population gradually. This law of year distribution, however, was not obvious for any specific ST. The isolates covering by any given ST could be determined with different penicillin MICs in the first few years after it was identified. The penicillin MIC of isolates identified as common STs and collected in Youyang County, Chongqing and Sichuan Zhongjiang County, including the ST271, ST320 and ST81, was around $0.25\sim 2$ mg/L (0.25 mg/L). Our study revealed the epidemiological distribution of penicillin MICs of the given STs determined in clinical *S. pneumoniae* isolates, suggesting that it is reasonable to research the penicillin resistance mechanism based on the STs of this bacteria.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; sequence type; drug resistance; penicillin

目前研究发现,肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)对青霉素形成耐药性的主要原因是因为其菌体表面的青霉素结合蛋白(Pencilin penicillin binding protein, PBP)变异降低了与青霉素亲和力所致^[1]。通过对肺炎链球菌耐药菌株和敏感菌株的比较,或通过将可疑的耐药变异基因转入敏感菌株 R6 等研究方法,已经发现一些导致青霉素耐药的基因变异规律。例如, *pbp2x* 和/或 *pbp2b* 变异导致低水平耐药; *pbp2x* 和/或 *pbp2b* 变异是 *pbp1a* 变异介导高水平耐药的必要前提;其他 *pbps* 变异可能偶尔参与青霉素耐药;非 *pbps* 基因,如 *murMN* 变异也会参与肺炎链球菌青霉素耐药^[1]。但与已知的对肺炎链球菌红霉素、喹诺酮类耐药机制的认识比较起来^[2,3],对青霉素的耐药机制的认知还相对缺乏,尚未确定具体变异序列及其产生的机制。国内临床肺炎链球菌的监测结果与上述认识基本相符,对分离株的研究也仅发现了一些多态性变异位点^[4,5]。本课题组近期对特定血清型肺炎链球菌序列型(Sequence type, ST)构成的分析表明,在抗生素选择压力下,肺炎链球菌种群构成发生了明显的序列型替换,当前的耐

药菌株的 STs 与先前流行的敏感菌株的 STs 获得耐药变异进化的结果并不一致^[6~10],提示从基于菌种水平研究肺炎链球菌青霉素耐药机制存在一定的局限性,可能需要更为细致的分型水平开展研究。

本研究分析了 1997~2014 年北京常见 STs 肺炎链球菌和 2015 年重庆酉阳县、四川中江县常见 STs 分离株的青霉素最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)的分布及年份分布,从流行病学角度探讨肺炎链球菌临床分离株常见 STs 的青霉素 MIC 值分布规律,分析以 STs 为基础研究肺炎链球菌青霉素耐药机制的可行性,为将来的耐药机制研究指引方向。

1 材料和方法

1.1 菌株

1997~2015 年北京儿童医院微生物免疫室收集的肺炎链球菌,纳入分析的菌株包括两部分:(1)1997~2014 年北京儿童医院分离株 488 株,属于包含 10 株或更多菌株的 STs 型;(2)2015 年于重庆市酉阳县和四川省中江县分离株 88 株,属于含有 5 株或更多菌

株的 STs 型。以上菌株均经 E-test 方法检测了青霉素 MIC。

1.2 血清分型

所有菌株均按荚膜肿胀实验进行血清型或群的鉴定,分型血清购自丹麦国家血清研究所 (States Serum Institut, Denmark), 操作步骤和判断标准按文献^[11]进行。

1.3 抗菌药物敏感性检测

采用 E-test 法检测菌株对青霉素的 MIC 值。药敏培养基为 Mueller-Hinton(英国 OXOID 公司)加 5% 脱脂羊血, 25 mL/90 mm 平皿。操作按照美国临床及实验室标准协会(CLSI)M2-A6 及纸条生产厂家瑞典 AB Biodisk 公司说明进行^[12]。药敏检测质控菌株为肺炎链球菌 ATCC49619。

1.4 多位点序列分型(Multi locus sequence typing, MLST)

PCR 法扩增肺炎链球菌的 7 个持家基因(*aroE*、*gdh*、*gki*、*recP*、*spi*、*xpt* 和 *ddl*), 所用引物参照文献^[13]合成。扩增产物由北京擎科生物技术有限公司进行 PCR 产物纯化和测序, 将测序结果分析后提交到 MLST 分型数据库 (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>)上确定等位基因型和 ST 分型。

1.5 统计分析

应用软件 WHONET5.3 进行抗菌药物 MIC 值和年份分布的分析。

2 结果与分析

2.1 北京不同 STs 型青霉素 MIC 值分布

1997~2014 年北京不同血清型中常见 STs 肺炎链球菌分离株的青霉素 MIC 分布见表 1。从表中可见,特定 ST 的青霉素 MIC 分布局限于一定范围内,不同 STs 的分布范围有所不同。如 ST982 的 MIC 值分布范围为 0.016~0.064 mg/L, ST90 的 MIC 为 0.25~2.0 mg/L。如果将青霉素 MIC 分为 <0.25 mg/L 和 0.25 mg/L 两种情况,除了 ST342 外(45 株中 42 株青霉素 MIC<0.25 mg/L, 另有 3 株 0.25 mg/L), 其他 STs 所覆盖菌株仅分布于其中一侧。

2.2 北京不同青霉素 MIC 值分离株的年代分布

北京不同青霉素 MIC 值肺炎链球菌的分离年份见表 2。从总体看,青霉素 MIC 值<0.25 mg/L 的分离株多分布于 2001 年以前,此后 0.25 mg/L 的分离株出现,并渐增多。但对于特定 ST 分离株来说,随着年份变化,高青霉素 MIC 值分离株增多的现象并不明显(图 1)。除了 ST876、ST271 的高青霉素 MIC 值的菌株(ST876: 2 mg/L; ST271: 8 和 16 mg/L)

表 1 1997~2014 年北京不同血清型中常见 ST 肺炎链球菌分离株的青霉素 MIC 分布

Table 1 The penicillin MIC distribution of the pneumococcal isolates identified as the common ST with different serotype in Beijing, 1997~2014

群/型	STs	株数	青霉素 MIC(mg/L)										
			0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
6 群	982	52	8	31	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	90	30	0	0	0	0	1	6	18	5	0	0	0
	4542	16	13	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2912	10	1	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0
14 型	875	38	28	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	876	29	0	0	0	0	0	14	12	3	0	0	0
19F 型	983	40	2	3	18	17	0	0	0	0	0	0	0
	271	85	0	0	0	0	0	5	42	29	5	2	2
19A 型	320	101	0	0	0	0	0	2	42	47	8	2	0
23F 型	342	45	0	0	11	31	2	0	1	0	0	0	0
	81	42	0	0	0	0	0	6	20	16	0	0	0
总计		488	52	53	45	48	3	33	135	100	13	4	2

表 2 北京 488 株不同青霉素 MIC 值肺炎链球菌的分离年份
Table 2 The annual distribution of the pneumococcal isolates identified as the common ST with different penicillin MIC in Beijing

青霉素 MIC(mg/L)	菌株总数	分离年份 1997~2014*(分离株数)												
		1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2010	2013	2014
0.016	52	16	0	4	6	6	9	4	7	0	0	0	0	0
0.032	53	5	1	2	8	12	5	3	11	1	1	4	0	0
0.064	45	8	1	3	7	7	5	2	7	5	0	0	0	0
0.125	48	14	1	1	3	13	2	2	2	9	1	0	0	0
0.25	3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0.5	33	0	0	0	0	3	4	0	0	2	0	17	4	3
1	135	2	0	0	0	8	9	5	11	4	4	25	51	16
2	100	0	0	0	0	5	2	2	4	2	17	11	37	20
4	13	0	0	0	0	0	1	2	1	1	2	2	4	0
8	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0
16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

注：* 菌株分离年份有中断。

分离时间明显晚于其最初发现年份外，其他 STs 在最初发现的几个年份中就具有不同青霉素 MIC 水平的分离株；且在其流行年份，不同青霉素 MIC 水平的菌株同时存在。除了 ST320 主要分布于 0.25 mg/L 的 STs 在 2000~2005 之间陆续出现，并逐渐增多，只有 ST90(青霉素 MIC 值 0.25~2.0 mg/L)在 2004 年以后再没有分离到。1997 年分离到 1 株 ST320，其青霉素 MIC 为 1 mg/L，但直到 2001 年又分离得到 ST320 菌株。

2.3 重庆酉阳和四川中江不同 STs 型分离株的青霉素 MIC 值分布

2015 年重庆酉阳和四川中江肺炎链球菌分离株常见 STs 的青霉素 MIC 分布见表 3。青霉素 MIC 值 0.064 mg/L 的菌株中没有发现覆盖超过 5 株的 ST，覆盖 5 株以上的 STs 青霉素 MIC 分布 0.25~2.0 mg/L，包括 ST271、ST320 和 ST81，它们的 MIC 分布与北京相应 STs 的范围相同。有一些在北京分离株中曾经或现在较为常见的 STs 型在酉阳和中江较为少见，如 ST90、ST983、ST876，但仅有的分离株青霉素 MIC 也符合北京分离株的范围。也出现了一些在北京分离株中未见或少见的 STs，如 ST3173、ST902、ST9396 等，它们的 MIC 分布 0.25~1.0 mg/L。

3 讨 论

在细菌耐药机制的研究中，“耐药”主要是指与敏感菌株比较，MIC 值升高^[1]，与临床定义的“耐药”不同。要科学应对细菌耐药就必须充分认识细菌耐药机制。在实验室内，经含抗生素培养基的逐步筛选可获得耐药株，对其耐药机制的研究可以获得清晰确定的结论。但对青霉素耐药肺炎链球菌来说，已经证明实验室筛选耐药株和临床菌株具有不同的耐药性形成途径，在实验室筛选株中发现的变异位点与临床菌株不同，发现的多个非 PBP 耐药机制也没有在临床菌株中得到印证^[1]。

在临床肺炎链球菌青霉素耐药机制的研究中，常常是比较耐药株和敏感株的基因序列或多态性^[4,14]，或者与青霉素敏感株 R6(原血清型为 2 型)的基因序列进行比较，或将变异序列转入 R6 菌株^[15,16]，分析和验证青霉素耐药相关的基因变异。长期研究发现肺炎链球菌青霉素耐药主要与 *pbp2x* 和/或 *pbp2b* 变异，以及在此在上述变异基础上出现的 *pbp1a* 变异有关^[1]。这种机制的认识与临床长期的耐药性监测结果也相符：青霉素耐药肺炎链球菌越来越常见，肺炎链球菌青霉素 MIC₅₀、MIC₉₀ 和最大 MIC 值都随年份逐渐升高；对于同一血清型分离株的分析显

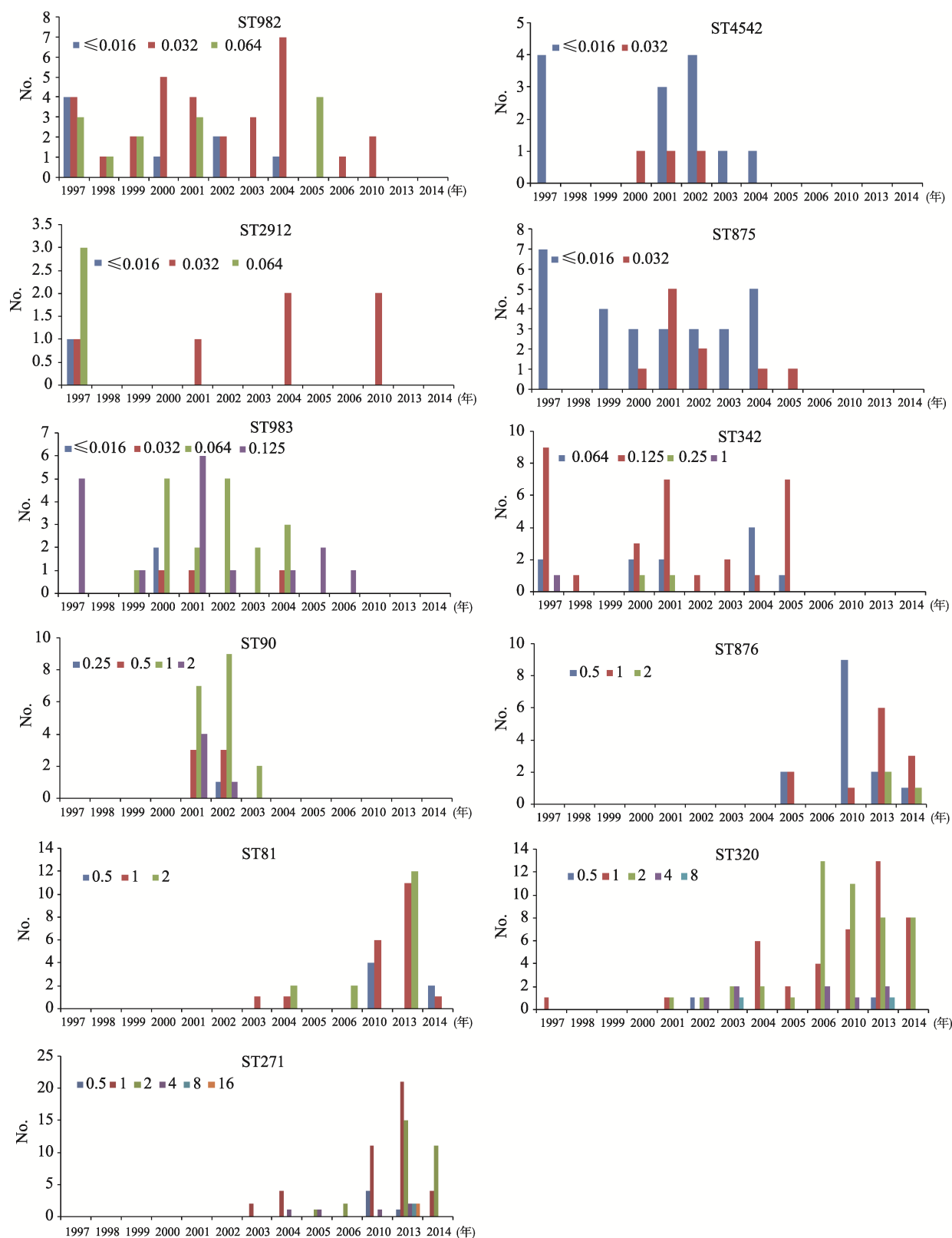


图 1 北京肺炎链球菌常见 STs 不同青霉素 MIC 值(mg/L)分离株的年代分布

Fig. 1 The annual distribution of the pneumococcal isolates identified as the common STs with different penicillin MIC (mg/L) in Beijing

表 3 2015 年重庆酉阳和四川中江肺炎链球菌分离株常见 STs 的青霉素 MIC 分布
Table 3 The penicillin MIC distribution of the pneumococcal isolates expressing the common STs in Youyang, Chongqing and Zhongjiang, Sichuan, 2015

地区	群/型	STs	株数	青霉素 MIC(mg/L)				
				0.125	0.25	0.5	1	2
酉阳	6 群	3173	8	0	0	0	8	0
		902	5	0	1	1	3	0
		90*	1	0	0	1	0	0
	14 型	876	9	0	0	2	7	0
	19F 型	271	13	0	0	0	8	5
		983*	1	1	0	0	0	0
	19A 型	320	13	0	0	0	8	4
	23F 型	81	9	0	0	0	4	5
中江	6 群	90	5	0	0	5	0	0
	14 型	876*	1	0	0	1	0	0
	19F 型	271	10	0	0	4	6	0
	19A 型	320*	2	0	0	0	2	0
	23F 型	81	6	0	0	2	4	0
	23A 型	9396	5	0	0	4	1	0

注：* 为本研究中北京分离株常见的 STs。

示了相似结果^[6-10]。本研究也显示北京分离株中，主要分布于 0.25 mg/L 的 STs 在 2000~2005 之间陆续出现，并逐渐增多，成为主要群体。

近期本课题组对特定血清型肺炎链球菌种群结构的研究发现，菌群青霉素 MIC 逐年升高，但当前流行的耐药菌株 STs 与既往流行的敏感株 STs 并不相同，存在明显的序列型替换。如 19F 型中 ST271 替换 ST983 成为主要克隆^[6]，19A 型中 ST320 取代 ST3546^[7]，23F 中 ST81 替换了 ST342^[8]，14 型中 ST876 取代了 ST875^[10]。序列型替换说明抗生素选择压力筛选了具有特定遗传背景的序列型(或克隆)，而不是原来流行序列型(或克隆)中出现了耐药变异群体。

本研究详细分析了具有连续监测数据的北京分离的肺炎链球菌常见 STs 型和青霉素 MIC 值的分布，表明特定 STs 的青霉素 MIC 分布限于一定范围，不同 ST 的青霉素 MIC 值范围有所不同，特定 ST 型覆盖菌株几乎都分布于 0.25 mg/L 的一侧(<0.25 mg/L 或 0.25 mg/L)，而不同 STs 的青霉素 MIC 值范围不同。在连续多年的监测中，青霉素 MIC 分布于

<0.25 mg/L 的 STs 并没有分离到进一步升高到 0.25 mg/L 以上的菌株；同时，青霉素 MIC 分布于 0.25 mg/L 的 STs 没有分离到过更低 MIC 的菌株。在分离到特定 ST 的最初阶段，具有不同青霉素 MIC 值的分离株均可发现，但是并不能明显地看到随着年份，同一 ST 菌株的青霉素 MIC 值愈来愈高的规律。本研究中同时分析了与北京相距遥远的重庆酉阳、四川中江县 2015 年肺炎链球菌分离株常见 STs 的青霉素 MIC 值分布，在这两个县也发现了较多 ST81、ST271 和 ST320，其青霉素 MIC 分布为 0.5~2 mg/L，低限与北京相应 STs 的数据相当，再次反映了这些克隆本身的特性；高限的差异可能反应了地区间抗生素选择压力的差别。另外，在酉阳和中江还出现了一些在北京分离株中未见或少见的 STs，其青霉素 MIC 0.25 mg/L。其实，在最近的种群调查中，北京肺炎链球菌中新分离到很多青霉素 MIC 0.25 mg/L 的序列型，如 ST1937、ST9780、ST10094、ST10096、ST10097、ST10100 等。这些流行病学变化和差异说明抗生素选择压力有利于某些肺炎链球菌种群克隆的成长，这些克隆的耐药变异可以使之获得较高水

平的青霉素耐药性。

上述研究结果提示：(1)不同遗传背景的肺炎链球菌本身可能具有不同青霉素敏感水平。肺炎链球菌遗传多态性是很丰富的，荚膜血清型是该菌的表型特征之一，已经认识到肺炎链球菌的荚膜血清型超过 94 个^[17]，它们的荚膜基因簇的序列存在明显差异^[16]。荚膜基因簇序列在长期变异进化过程中，位于其两侧的 *pbp2x* 和 *pbp1a* 也必定发生各种变异，反之亦然。早已经证明耐药性和血清型变异可以同时发生^[18]。另外，已确认的肺炎链球菌多位点序列分型(MLST)更是超过了 11659 个(<http://pubmlst.org/spneumoniae/>)，显示了多变的肺炎链球菌遗传背景。本研究中 1997 年分离的一株 ST320，其青霉素 MIC 值为 1.0 mg/L，但到 2001 年才又分离到该 ST 菌株，并逐渐增多，说明 ST320 早已存在，只是因为不占优势，所以很难分离到。但经长期抗生素选择压力作用后可成为优势群体；也提示 ST320 本身对青霉素的敏感性就比较低。(2)肺炎链球菌获得青霉素耐药水平可能受不同遗传背景的影响。1997 年肺炎链球菌分子流行病学网(Pneumococcal Molecular Epidemiology Network, PMEN)建立时就注意到耐药性肺炎链球菌常常为少数特定的克隆，目前，该网命名了(<http://www.pneumogen.net/pmen/>)43 个克隆，包括 Spain^{23F}-1(ST81)、Spain^{6B}-2(ST90)、Taiwan^{19F}-14(ST236，ST236 与 ST320 同为 ST271 的单位点变异型)等。在抗生素选择压力下，新发现流行播散的克隆不断出现^[19,20]。本研究中对于同一 ST 不同青霉素 MIC 值菌株的年代分布显示特定 ST 在最初发现的几个年份中就具有不同青霉素 MIC 水平的分离株，分离株的 MIC 分布没有明显的逐渐升高的流行病学特征，提示只要具有相应的遗传背景，就可能快速变异获得较高耐药性，并不需要逐步积累。既往研究已经证明肺炎链球菌在临床环境中能够快速进化，以适应环境^[21]；而且在进化过程中，常常摄取相近种的多个 DNA 片段^[22,23]。在合适的抗生素选择压力下，很可能从具有一定遗传背景的克隆中快速筛选出耐药性明显升高的群体，反之，某些遗传背景的克隆在临床环境中并不能获得青霉素耐药性，或者仅能低幅度升高 MIC 值。

综上所述，本研究从流行病学角度揭示了肺炎

链球菌临床分离株常见 STs 的青霉素 MIC 值分布规律，支持以 STs 为基础研究其青霉素耐药机制。肺炎链球菌临床分离株的 STs 与其青霉素 MIC 值，及其进一步获得更高水平青霉素耐药之间密切相关。提示对于临床肺炎链球菌来说，青霉素类(或 β -内酰胺类)抗生素选择压力首先要筛选具有不同青霉素敏感水平克隆，在此基础上再选择可获得更高水平耐药的变异群体。因此，研究肺炎链球菌临床分离株青霉素耐药机制时，应基于菌株的遗传背景资料，才有可能确定菌株获得的耐药相关变异，明确具体的变异类型和位点。Ip 等^[24]近期对 ST320/271 克隆就开展了研究，找到了一些具体的变异位点。另一方面，这一点对于临床选择抗生素可能更具意义，对于 MIC 为 0.5 mg/L 的分离株，如果是 ST90 或 ST876，其青霉素最高达 2 mg/L，仍落在临床药敏检测的敏感范围；但对于 ST271 或 ST320 的菌株则可能达到 8 mg/L 的耐药水平，甚至更高。

参考文献(References):

- [1] Hakenbeck R, Brückner R, Denapate D, Maurer P. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol*, 2012, 7(3): 395–410. [DOI]
- [2] Zhou WQ, Yao KH, Zhang G, Yang YH, Li Y, Lv Y, Feng J. Mechanism for transfer of transposon Tn2010 carrying macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* and its effects on genome evolution. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(6): 1470–1473. [DOI]
- [3] Zhang G, Wang C, Sui ZH, Feng J. Insights into the evolutionary trajectories of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(9): 2499–2506. [DOI]
- [4] Yao KH, Tong YJ, Yu SJ, Shen XZ, Yang YH. The relationship between penicillin-binding protein genes restriction polymorphism and penicillin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae*. *Chin J Lab Med*, 2006, 29(12): 1107–1110.
姚开虎, 佟月娟, 俞桑洁, 沈叙庄, 杨永弘. 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. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(12): 1107–1110. [DOI]
- [5] Li SY, Shen XZ, Wang YH, Yang YH. Alterations of *murM* gene and high-level penicillin-resistant as well as ceftriaxone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Chin J Microbiol Immunol*, 2004, 24(10): 823–827.

- 李绍英, 沈叙庄, 王咏红, 杨永弘. murM 基因变异与肺炎链球菌青霉素高度耐药及头孢曲松耐药的相关性. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(10): 823–827. [DOI]
- [6] Li QH, Yao KH, Yu SJ, Ma X, He MM, Shi W, Yang YH. Spread of multidrug-resistant clonal complex 271 of serotype 19F *Streptococcus pneumoniae* in Beijing, China: characterization of serotype 19F. *Epidemiol Infect*, 2013, 141(12): 2492–2496. [DOI]
- [7] Xue L, Yao KH, Yu SJ, Liu ZJ, Qian J, Shen XZ, Yang YH. Molecular epidemiology of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Beijing, 1997–2006. *Chin Med J*, 2011, 124(12): 1769–1774. [DOI]
- [8] Ma X, Yao KH, Yu SJ, Zhou L, Li QH, Shi W, He MM, Yang YH. Genotype replacement within serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* in Beijing, China: characterization of serotype 23F. *Epidemiol Infect*, 2013, 141(8): 1690–1696. [DOI]
- [9] Shi W, Yao KH, He MM, Yu SJ, Yang YH. Population biology of 225 serogroup 6 *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in China. *BMC Infect Dis*, 2014, 14(1): 467. [DOI]
- [10] He MM, Yao KH, Shi W, Gao W, Yuan L, Yu SJ, Yang YH. Dynamics of serotype 14 *Streptococcus pneumoniae* population causing acute respiratory infections among children in China (1997–2012). *BMC Infect Dis*, 2015, 15(1): 266. [DOI]
- [11] Sørensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(8): 2097–2100. [DOI]
- [12] Kelly LM, Jacobs MR, Appelbaum PC. Comparison of agar dilution, microdilution, E-test, and disk diffusion methods for testing activity of cefditoren against *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(10): 3296–3299. [DOI]
- [13] Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 1998, 144(11): 3049–3060. [DOI]
- [14] Sanbongi Y, Ida T, Ishikawa M, Osaki Y, Kataoka H, Suzuki T, Kondo K, Ohsawa F, Yonezawa M. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(6): 2244–2250. [DOI]
- [15] Sauerbier J, Maurer P, Rieger M, Hakenbeck R. *Streptococcus pneumoniae* R6 interspecies transformation: genetic analysis of penicillin resistance determinants and genome-wide recombination events. *Mol Microbiol*, 2012, 86(3): 692–706. [DOI]
- [16] Lin F, Zheng MQ, Zeng AP, Ding D, Wen SY, Wang SQ. Study on PBPs genes of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Zhejiang province. *Hereditas (Beijing)*, 2005, 27(6): 965–971.
林峰, 郑敏巧, 曾爱平, 丁玎, 文思远, 王升启. 浙江地区青霉素耐药肺炎链球菌 PBPs 基因及氨基酸序列研究. 遗传, 2005, 27(6): 965–971. [DOI]
- [17] Calix JJ, Porambo RJ, Brady AM, Larson TR, Yother J, Abeygunwardana C, Nahm MH. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J Biol Chem*, 2012, 287(33): 27885–27894. [DOI]
- [18] Trzciński K, Thompson CM, Lipsitch M. Single-step capsular transformation and acquisition of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 2004, 186(11): 3447–3452. [DOI]
- [19] Baek JY, Kim SH, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song JH. Prevalence of antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 11A isolates in Korea, during 2004–2013, due to the increase of multidrug-resistant clone, CC166. *Infect Genet Evol*, 2016, 38: 122–125. [DOI]
- [20] Ardanuy C, de la Campa AG, García E, Fenoll A, Calatayud L, Cercenado E, Pérez-Trallero E, Bouza E, Liñares J. Spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8-ST63 multidrug-resistant recombinant Clone, Spain. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(11): 1848–1856. [DOI]
- [21] Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, McGee L, von Gottberg A, Song JH, Ko KS, Pichon B, Baker S, Parry CM, Lambertsen LM, Shahinas D, Pillai DR, Mitchell TJ, Dougan G, Tomasz A, Klugman KP, Parkhill J, Hanage WP, Bentley SD. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science*, 2011, 331(6016): 430–434. [DOI]
- [22] Straume D, Stamsås GA, Håvarstein LS. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol*, 2015, 33: 371–380. [DOI]
- [23] Jensen A, Valdórrson O, Frimodt-Møller N, Hollingshead S, Kilian M. Commensal streptococci serve as a reservoir for β -lactam resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(6): 3529–3540. [DOI]
- [24] Ip M, Ang I, Liyanapathirana V, Ma H, Lai R. Genetic analyses of penicillin binding protein determinants in multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serogroup 19 CC320/271 clone with high-level resistance to third-generation cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(7): 4040–4045. [DOI]