

河北省 19F 型和 19A 型侵袭性肺炎链球菌耐药性分析及多位点序列分型分析

贾肇一, 何宝花, 王乐雨, 张洪斌, 张永茂, 孙印旗

河北省疾病预防控制中心 河北省传染病病原鉴定分析与流行病学重点实验室(筹), 石家庄 050021

摘要: **目的** 了解河北省侵袭性肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Spn) 19F 型和 19A 型的耐药特征及多位点序列分型(multilocus sequence type, MLST)分布。**方法** 19F 型和 19A 型采用多重聚合酶链式反应(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)进行筛选分析;采用微量营养肉汤稀释法对其进行 11 种常见药物的药物敏感性试验,测定其最低抑菌浓度值(minimum inhibitory concentration, MIC)并进行药物敏感性的判断;采用 MLST 技术对菌株进行序列分型分析。**结果** 15 株 19F 型侵袭性 Spn 对利奈唑胺、万古霉素、左氧氟沙星呈现出完全敏感。9 株 19A 型侵袭性 Spn 对氯霉素、利奈唑胺、万古霉素、头孢噻肟、左氧氟沙星呈现出完全敏感。15 株 19F 型侵袭性 Spn 共检出 4 种序列分型(sequence type, ST), 3 株属于新的 ST 型, 优势 STs 为 ST-271 (9 株, 60.00%); 9 株 19A 型侵袭性 Spn 共检出 2 种 ST 型, 优势 STs 为 ST-320 (8 株, 88.89%)。**结论** 本地区 19F 型和 19A 型侵袭性 Spn 耐药现象较为严重, 且存在多重耐药; 19F 型的基因型具有多变性和复杂性, 而 19A 型的基因型则较为紧凑。

关键词: 侵袭性肺炎链球菌; 血清型 19F; 血清型 19A; 耐药性; 多位点序列分型

中图分类号: R563.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2021)05-0546-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.05.003

Antibiotic resistance and multi-locus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotypes 19F and 19A isolates in Hebei Province

JIA Zhao-yi, HE Bao-hua, WANG Le-yu, ZHANG Hong-bin, ZHANG Yong-mao, SUN Yin-qi

Hebei Provincial Key Laboratory of Pathogens and Epidemiology of Infectious Diseases,

Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang, Hebei 050021, China

Corresponding authors: SUN Yin-qi, E-mail: hbsunyq@hotmail.com; ZHANG Yong-mao, E-mail: sandymm@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the antibiotic resistance characteristics of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotypes 19F and 19A isolates and the distribution of multi-locus sequence type (MLST) in Hebei Province. **Methods** Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay was used to determine the serotypes 19F and 19A. Microdilution broth method was employed to test the antibiotic resistance to 11 drugs. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined, and the antibiotic resistance was analyzed. MLST was performed to determine the sequence types (STs) of serotypes 19F and 19A. **Results** Fifteen strains of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19F were completely sensitive to linezolid, vancomycin and levofloxacin hydrochloride. Nine strains of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A were completely susceptible to chloramphenicol, linezolid, vancomycin, cefotaxime and levofloxacin hydrochloride. Four STs were detected in fifteen strains of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19F, three of which belonged to the new STs, and the dominant ST was ST-271 (9 strains, 60.00%). Two STs were detected in nine strains of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A, and the dominant ST was ST-320 (8 strains, 88.89%). **Conclusion** The antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotypes 19F and 19A isolates in Hebei Province is serious, and there exists a multiple drug resistance pattern. The genotypes of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19F are variable and complex, while the genotypes of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A are compact.

Keywords: invasive *Streptococcus pneumoniae*; serotype 19F; serotype 19A; antibiotic resistance; multi-locus sequence type

基金项目: 河北省科技计划项目课题(16277745D); 河北省科技支撑项目课题(14277733D)

作者简介: 贾肇一(1983-), 男, 河北沧州人, 硕士, 副主任技师, 主要从事病原生物检验工作。贾肇一和何宝花为共同第一作者。

通信作者: 孙印旗, E-mail: hbsunyq@hotmail.com; 张永茂, E-mail: sandymm@163.com。

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Spn)是引起大叶性肺炎的病原菌, 同时也是引起侵袭性疾病如败血症、脑膜炎、心内膜炎等的常见病原菌, 也是 5 岁以下儿童死亡的主要原因之一^[1]。Spn 引起侵袭性疾病的致病力和定植力主要是与血清型相关^[2], 世界范

围内 90% 以上的 Spn 侵袭性感染由 16 种左右的血清型引起,包括 19F、23F、19A、6B、14、6A 等^[3],其中 19F、19A 作为主要的致病血清型,常引起较严重的侵袭性疾病^[4]。疫苗的预防接种可以有效地降低侵袭性疾病的发生率,而血清分型可为相关疫苗的选择提供有力的依据^[5]。血清型 19F 和血清型 19A 在荚膜的合成过程中,可发生遗传物质的互相交换,导致型别的互换^[6]。各地区的耐药菌株与血清型分布有特定的关联^[7],河北省常见的侵袭性耐药菌株主要的血清型为 19F 和 19A^[8]。本研究以河北省 2014—2016 年收集的 19F 型和 19A 型侵袭性 Spn 菌株作为研究对象,通过耐药性分析以及多位点序列分型(multilocus sequence type, MLST)分析,了解河北省 19F 型和 19A 型侵袭性 Spn 的耐药情况及序列(sequence type, ST)分型特点,为侵袭性 Spn 流行的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 分离自 2014—2016 年河北省儿童医院收集到的 14 岁以下儿童的脑脊液、血液等无菌部位的侵袭性 Spn 菌株,经多重聚合酶链式反应(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)鉴定为 19F 型和 19A 型,其中 19F 型 15 株,19A 型 9 株。

1.2 仪器与试剂 日本 SANYO (CO-18AIC 型) CO₂ 培养箱,日本 SANYO (MIR154 型) 低温恒温培养箱,美国 Thermo (1285 型) 生物安全柜,美国 ABI (9700 型) 普通 PCR 仪,西安天隆 (NP968 型) 全自动核酸提取仪。哥伦比亚血平板购自 OXOID 公司,96 孔药敏板购自上海复星生物技术有限公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自西安天隆公司。

1.3 菌株鉴定 将新鲜纯培养的 Spn 菌株,刮取菌苔,严格按照草兰氏阳性菌基因组 DNA 提取试剂盒使用操作说明书进行 DNA 的提取,以 *cpsA* 基因作为内对照,对提取后的菌株核酸样本进行 19F 和 19A 血清型的特异性 PCR 鉴定,采用 mPCR 扩增的方法,分为 9 个 PCR 反应对待测样品进行分型,每个反应均包括多对不同的血清型引物及作为内对照的 *cpsA* 引物,引物序列和反应体系参考 WHO 相关文献^[9]。依次对样品进行扩增,扩增条件:95 ℃ 预变性 15 min,94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 90 s,72 ℃ 延伸 60 s,35 个循环后 72 ℃ 再延伸 10 min。PCR 扩增结束后,1.0% 琼脂糖电泳。根据扩增片段长度,确定样品所属型别。

1.4 药敏实验 采用微量营养肉汤稀释法测定 24 株侵袭性 Spn 菌株对青霉素 (PEN)、美罗培南 (MEM)、氯霉素 (CHL)、利奈唑胺 (LZD)、复方新诺明 (SXT)、

万古霉素 (VARS)、头孢噻肟 (CTX)、头孢曲松 (CRO)、左氧氟沙星 (LVX)、红霉素 (ERY)、克林霉素 (CLI) 11 种抗菌药物的最低抑菌浓度值 (minimum inhibitory concentration, MIC),操作规程和结果判读按照最新版 (2019 年版) 美国临床和实验室标准委员会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 推荐的抗微生物药物敏感性试验执行标准进行。Spn ATCC-49619 作为质控菌株 (由国家疾病预防控制中心传染病所提供)。

1.5 MLST 登陆 MLST 网站 (<http://pubmlst.org/spneumoniae>), 下载 Spn 的 7 对管家基因 (*aroE*、*gdh*、*gki*、*recP*、*Spni*、*xpt* 和 *ddl*) 的引物序列,由北京华大基因公司合成。普通 PCR 法扩增 Spn 菌株的 7 对管家基因,扩增反应体系为 30 μl,其中 15 μl 2×Master Mix, 1.5 μl Primer F (10 μM), 1.5 μl Primer R (10 μM), DNA 样品 2 μl, 10 μl ddH₂O; 反应条件为: 94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环, 72 ℃ 5 min。扩增产物送测序,序列拼接后,提交至 Spn MLST 网站,获得对应的等位基因号及序列号。

1.6 结果分析 使用 Excel 2010 软件进行整理, SPSS 19.0 软件对耐药率进行统计分析。分类变量进行 χ^2 检验,不符合 χ^2 检验条件的用 Fisher 确切概率法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 BioNumerics 进行 ST 序列数据的处理并进行菌株进化聚类分析。

2 结果

2.1 菌株鉴定结果 经过生化鉴定与血清型分型鉴定, 24 株侵袭性 Spn 标本中包括 15 株 19F 血清型和 9 株 19A 血清型。

2.2 菌株来源分布 19F 型菌株标本来源为脑脊液 5 株 (33.33%)、全血 5 株 (33.33%)、肺泡灌洗液 2 株 (13.33%)、脓液 2 株 (13.33%)、胸腔积液 1 株 (6.68%); 19A 型菌株标本来源为全血 5 株 (55.56%)、肺泡灌洗液 2 株 (22.22%)、胸腔积液 2 株 (22.22%)。

2.3 药物敏感性 药敏结果显示, 15 株 19F 型侵袭性 Spn 菌株对利奈唑胺、万古霉素、左氧氟沙星呈现出完全敏感,其 MIC 值分别为 0.125~1 mg/L 和 0.5~1 mg/L; 对美罗培南、氯霉素呈现较低的耐药率,均为 6.67%,其 MIC 值分别为 $\leq 0.03 \sim 2$ mg/L 和 0.5~1 mg/L; 对青霉素、复方新诺明、头孢噻肟、头孢曲松则呈现出较高的耐药率,均大于 50%; 对红霉素、克林霉素的耐药率达到 100%, 见表 1。9 株 19A 型侵袭性 Spn 菌株,对利奈唑胺、氯霉素、万古霉素、头孢噻肟、左氧氟沙星均呈现出完全敏感,未出现耐药菌株,其 MIC 值分别为

0.5~1、2~4、0.125~0.5、1~2 和 0.5~1 mg/L;对复方新诺明、红霉素、克林霉素呈现出 100% 的耐药,见表 2。19F 和 19A 型侵袭性 Spn 对复方新诺明、红霉素和克林霉素均表现出了很高的耐药性,而两者对氯霉素、利奈唑胺、万古霉素和左氧氟沙星则呈现出了很高的敏感性。19F 型侵袭性 Spn 菌株对头孢噻肟和头孢曲松表现出了较高的耐药性,但 19A 型侵袭性 Spn 对头孢噻肟和头孢曲松则表现出了较高的敏感性。

表 1 15 株 19F 型侵袭性 Spn 对抗菌药物的 MIC 值及耐药情况 (n,%)

抗生素	MIC 值 (mg/L)	耐药 (R)	中介 (I)	敏感 (S)
青霉素	≤0.06-8	8(53.33)	5(33.33)	2(13.33)
美罗培南	≤0.03-2	1(6.67)	12(80.00)	2(13.33)
氯霉素	2-16	1(6.67)	0(0.00)	14(93.33)
利奈唑胺	0.125-1	0(0.00)	0(0.00)	15(100.00)
复方新诺明	0.25/4.75->8/152	13(86.67)	1(6.67)	1(6.67)
万古霉素	0.125-0.5	0(0.00)	0(0.00)	15(100.00)
头孢噻肟	≤0.06-4	9(60.00)	3(20.00)	3(20.00)
头孢曲松	≤0.06-4	9(60.00)	3(20.00)	3(20.00)
左氧氟沙星	0.5-1	0(0.00)	0(0.00)	15(100.00)
红霉素	>32	15(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
克林霉素	>16	15(100.00)	0(0.00)	0(0.00)

表 2 9 株 19A 型侵袭性 Spn 对抗菌药物的 MIC 值及耐药情况 (n,%)

抗生素	MIC 值 (mg/L)	耐药 (R)	中介 (I)	敏感 (S)
青霉素	4-8	2(22.2)	7(77.7)	0(0.00)
美罗培南	0.5	1(11.1)	8(88.8)	0(0.00)
氯霉素	2-4	0(0.00)	0(0.00)	9(100.00)
利奈唑胺	0.5-1	0(0.00)	0(0.00)	9(100.00)
复方新诺明	4/76->8/152	9(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
万古霉素	0.125-0.5	0(0.00)	0(0.00)	9(100.00)
头孢噻肟	1-2	0(0.00)	0(0.00)	9(100.00)
头孢曲松	1-2	0(0.00)	5(55.5)	4(44.44)
左氧氟沙星	0.5-1	0(0.00)	0(0.00)	9(100.00)
红霉素	>32	9(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
克林霉素	>16	9(100.00)	0(0.00)	0(0.00)

2.4 ST 型分布及聚类分析 本研究中 15 株 19F 型侵袭性 Spn 中,共检出 4 种 ST 型,其中有 3 株属于新的 ST 型,主要 ST 型为 ST-271 (9 株,60.00%),其次为 ST-1464 (1 株,6.67%)、ST-1937 (1 株,6.67%)、ST-7758 (1 株,6.67%);9 株 19A 型侵袭性 Spn 菌株中有 2 种 ST 型,主要 ST 型为 ST-320 (8 株,88.89%),其次为 ST-320 (1 株,11.11%),见图 1。

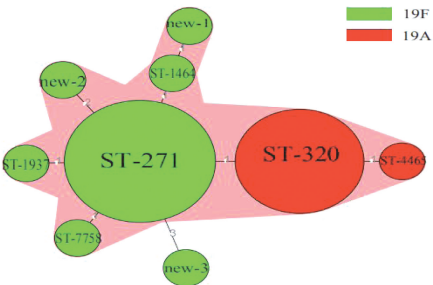


图 1 侵袭性 Spn 19F 和 19A 血清型与 ST 型最小生成树分布关系

在 7 个等位基因中,如果有 4 个及以上位点相同的,可以定义为同一克隆群 (clonal complex, CC)。根据 BioNumerics 软件构建的最小生成树结果分析,MLST 数据库显示 ST-320 型与 ST-271 型的 6 个等位基因 (aroE、gdh、gki、recP、spi、xpt) 的序列号相同,只有 ddl 等位基因号不同,因此它们属于同一克隆群 CC320 克隆群。15 株 19F 型侵袭性 Spn 菌株中有 14 株 (93.33%) 都属于 CC320 克隆群,1 株为新的 ST 型,且该 ST 型不属于 CC320 克隆群;9 株 19A 型侵袭性 Spn 菌株均属于 CC320 克隆群。

3 讨论

Spn 是社区获得性肺炎感染最常见的致病菌之一,可导致鼻窦炎、中耳炎、肺炎等常见非侵袭性感染,而当 Spn 侵入血液循环或者侵入脑脊液、心包、胸膜、关节腔等无菌场所,则可引起菌血症、败血症、胸膜炎、关节炎等侵袭性 Spn 疾病 (invasive pneumococcal disease, IPD) [10]。IPD 作为疫苗可预防疾病,在 5 岁以下儿童中发病率较高,是严重威胁全球人类生命健康的疾病之一 [11]。除此之外,IPD 造成的经济负担也较为严重,已成为世界范围内严重的公共卫生问题 [10-11]。

有研究报道 19F 与 19A 在荚膜合成过程中,可发生遗传物质的交换,导致型别的替换 [14]; 19F 与 19A 作为常见的引起 IPD 的致病性血清型,同时也是耐药性 Spn 的常见血清型 [12]。本研究选取 24 株侵袭性 Spn 19F、19A 血清型菌株,通过微量营养肉汤稀释法检测其对 11 种常见药物的 MIC 值以及药物敏感性判定。结果显示,19F 与 19A 血清型菌株均对红霉素和克林霉素表现出全部耐药,且 MIC 值较高,耐药情况十分严重,耐药率远远高出美国 [15]、加拿大 [16] 等地,提示在本地区出现临床怀疑或者明确诊断为 19F 型或 19A 型 Spn 感染时,不建议选择大环内酯类抗生素治疗。19F 型和 19A 型菌株均对利奈唑胺的敏感率为 100%,可能与本地区未将其作为首选治疗药物有关,同时由于利奈唑胺的作用部位和作用方式较独特,不易在体外诱导产生耐药。本研究中的菌株对万古霉素表现出 100% 的敏感性,这与姚开虎等 [17] 的研究结果一致,但由于万古霉素药理作用较复杂,且可能存在肾毒性,因此并不推荐使用该药物。对左氧氟沙星的敏感率均为 100%,这可能与左氧氟沙星并不推荐用于儿童 [18],而本研究中菌株来源均为儿童有关。19F 血清型对复方新诺明、青霉素、头孢噻肟、头孢曲松的耐药率较高,均达 50% 以上,因此,已不适合将以上药物

应用于由 19F 型引起的侵袭性 Spn 疾病的治疗;而对美罗培南、氯霉素表现出较低的耐药率,提示可将这两种药物作为本地区临床治疗首选药物。19F 血清型菌株存在多重耐药,这可能与本研究中的菌株携带多种耐药基因有关,但需要进一步验证。19A 型菌株对美罗培南、青霉素的耐药率较低,但中介率较高,提示青霉素、美罗培南不适合作为治疗的首选药物。对头孢噻肟、头孢曲松较敏感,这可能与 19A 型菌株的检出率较低有关,因此,不能作为临床治疗用药的参考依据,这种情况在以后的研究中可通过增加菌株数量进一步探讨。

MLST 是近年来发展较快的基于核酸序列测定的细菌分型方法,具有分辨力高、操作简便、快速得到实验结果并且便于不同实验室比较等优点^[19]。目前 Spn 的 MLST 数据库中,已收录的 ST 型有 4 000 多种,说明 Spn 在基因水平上具有多变性和复杂性^[20]。本研究中,19F 型共检出 3 种 ST 型,且以 ST-271 型为主,这与国内广州^[21]、北京^[7]等地报道的结果一致。19A 共检出 2 种 ST 型,且以 ST-320 型为主,这与美国的报道相符^[22]。通过 BioNumerics 软件构建的最小生成树聚类分析,19F 血清型以 ST-271 型为中心,其余 5 种分布其周围,其中 1 种新的未命名的 ST 型不属于 CC320/271 复合群,说明 19F 型的基因型具有多变性和复杂性;19A 型的 ST 型较紧凑,且所有 19A 型均属于 CC320/271 复合群。BioNumerics 聚类分析中显示 ST-271 型与 ST-320 型只有一个等位基因位点的差异,且同属于一个 CC320/271 复合群,但其在血清型上分别表现为 19F 与 19A,这可能是因为荚膜多糖在合成的过程中发生转换,从而导致与荚膜多糖密切相关的血清型发生改变,但克隆群菌株的基因型未发生改变。

预防 Spn 感染最有效的手段是接种肺炎球菌疫苗^[23-24]。但疫苗的长期使用,导致主要流行的血清型发生变化,发生“血清型替换”现象^[25],最早上市的 23 价 Spn 多糖疫苗 PPV23 和 7 价 Spn 结合疫苗 PCV7 中包含 19F 血清型,但不包含 19A 血清型。2010 年,美国推出的 13 价多糖结合疫苗 PCV13,19F 和 19A 血清型均包括在内,可以起到很好的预防作用。提示在今后 Spn 疫苗的推广使用中,应关注类似血清型 19F 与血清型 19A 的荚膜转换问题,减少因血清型改变引起的“疫苗逃避”。

参考文献

[1] Bogaert D, de Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonization;

- the key to pneumococcal disease [J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4(3):144-154.
- [2] 刘民, 马秋月. 肺炎链球菌相关疾病流行病学研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2018, 34(11):1449-1452.
- [3] Pan F, Han L, Huang W, et al. Serotype distribution, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Shanghai, China [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11):e0142892.
- [4] Denham BC, Clarke SC. Serotype incidence and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in Scotland, 1999-2002 [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 4):327-331.
- [5] 中华医学会儿科学分会, 中华预防医学会. 儿童肺炎链球菌性疾病防治技术指南(2009 年版) [J]. *中华儿科杂志*, 2010, 48(2):104-111.
- [6] 邓力, 印根权. 侵袭性肺炎链球菌病研究进展[J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(1):94-97.
- [7] 刘春林, 赵春江, 刘昱东, 等. 侵袭性肺炎链球菌 148 株血清型、耐药性及分子分型研究[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(22):1565-1570.
- [8] 王颖童, 郭映辉, 王茜, 等. 河北省 2014 年 43 株侵袭性肺炎链球菌血清型分析[J]. *中国疫苗和免疫*, 2016, 22(1):6-9.
- [9] World Health Organization. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO manual [Z]. 2011-12-01.
- [10] 李迟佳, 王亚亭. 侵袭性肺炎链球菌疾病的研究进展[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2010, 25(10):776-778.
- [11] Chen Y, Deng W, Wang SM, et al. Burden of pneumonia and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in China among children under 5 years of age: a systematic literature review [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27333.
- [12] 歹丽红, 董琳, 李海燕, 等. 儿童侵袭性与非侵袭性肺炎链球菌耐药性的对照研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, (4):303-307.
- [13] 宁桂军, 尹遵栋. 中国肺炎球菌病疾病负担研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2018, 34(11):13-15.
- [14] Dunne EM, Tikkanen L, Balloch A, et al. Characterization of 19A-like 19F pneumococcal isolates from Papua New Guinea and Fiji [J]. *New Microb New Infect*, 2015, 7:86-88.
- [15] Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1 - 4 [J]. *Ann Clin Microb Antimicrob*, 2008, 7(1):1.
- [16] Low DE, de Azavedo J, Weiss K, et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 2000 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(5):1295-1301.
- [17] 姚开虎, 史伟. 儿童肺炎链球菌耐药现状[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016, 31(4):252-256.
- [18] 李真, 戴丽. 氟喹诺酮类抗菌药物在成人社区下呼吸道感染中的临床应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(4):595-597.
- [19] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(6):3140-3145.
- [20] Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology [J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11(10):479-487.
- [21] 周婧杰, 叶惠芬, 徐邦牢, 等. 广州地区老年人肺炎链球菌临床分离株的青霉素耐药研究与分子分型[J]. *热带医学杂志*, 2008, 8(10):1020-1023.
- [22] Moore MR, Gertz RE, Woodbury RL, et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005 [J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(7):1016-1027.
- [23] 孙嘉璐, 唐倩如, 王海滨. 13 价肺炎球菌多糖结合疫苗安全性的 meta 分析[J]. *实用预防医学*, 2019, 26(7):871-873.
- [24] 王华庆, 安志杰. 肺炎球菌性疾病免疫预防专家共识(2017 版) [J]. *中国预防医学杂志*, 2018, 19(3):161-191.
- [25] Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination [J]. *Lancet*, 2011, 378(9807):1962-1973.

收稿日期:2020-05-13