·调查报告与分析·

枣庄地区儿童感染 15B 型肺炎链球菌分子生物学特征分析：基于 2022—2023 年哨点医院监测数据

李会会，赵毅，王莉莉，尹雪茹，刘品

枣庄市疾病预防控制中心病原微生物科，枣庄 277000
通信作者：刘品，E-mail：ppinliu@126.com；王莉莉，E-mail：836294368@qq.com

【摘　要】目的　了解 2022—2023 年山东省枣庄地区儿童感染肺炎链球菌（SP）血清型流行情况，利用全基因组测序技术分析 15B 型 SP 的耐药机制、致病机理和多位点序列分型（MLST）特点，为疫苗研发和临床抗生素治疗提供数据支持。**方法**　收集枣庄地区 2022—2023 年≤14 岁儿童感染肺炎患者的 87 株 SP 分离株，使用聚合酶链式反应（PCR）技术进行 SP 血清型检测，对 15B 型 SP 进行药敏试验、全基因组测序和生物信息学分析。**结果**　枣庄地区流行的 SP 血清型主要是 19 F（41.4%）、6 B（18.4%）、15 B（13.8%）和 23 F（11.5%），13 价肺炎球菌结合疫苗（PCV13）疫苗血清型覆盖率为 77%，23 价肺炎球菌多糖疫苗（PPSV23）疫苗血清型覆盖率为 92%；15B 型 SP 对克林霉素、红霉素、四环素和复方新诺明耐药率均为 100%，多重耐药率为 100%，携带耐药基因 *ermB*、*rlmA*（Ⅱ）、*tetM*、*patA*、*patB* 和 *pmrA*，其中耐药基因 *ermB*、*rlmA*（Ⅱ）和 *tetM* 与耐药表型一致；15B 型 SP 全部携带毒力基因 *cbpG*、*pce/cbpE*、*pavA*、*pfbA*、*lmb*、*slrA*、*plr/gapA*、*cbpD*、*lytA*、*lytB*、*lytC*、*hysA*、*nanA*、*nanB*、*eno*、*cps4A*、*cps4B*、*cps4C*、*cps4D*、*zmpB*、*iga*、*cppA*、*htrA/degP*、*tig/ropA*、*piaA*、*psaA*、*piuA* 和 *ply*；大部分（83.3%）携带 *pspA* 基因；小部分（16.7%）携带 *pspC/cbpA*、*srtB*、*srtC*、*srtD*、*rrgA*、*rrgB*、*rrgC*。ST 9 785 是本地区 15B 型 SP 的主要型别。**结论**　15B 型是枣庄地区非 PCV 13 血清型覆盖的菌株血清型中主要流行的 PPSV 23 血清型，主要基因型为 ST 9 785，15B 型 SP 对克林霉素、红霉素、四环素和复方新诺明全部耐药，并出现严重的多重耐药现象。

【关键词】 15B 型肺炎链球菌；血清型；耐药性；耐药基因；毒力基因；多位点序列分型（MLST）；枣庄市

Molecular biological characteristics of *Streptococcus pneumoniae* serotype 15B isolated from children in Zaozhuang city: a study based on surveillance data in sentinel hospitals from 2022 to 2023

LI Huihui, ZHAO Yi, WANG Lili, YIN Xueru, LIU Pin (*Department of Pathogenic Microbiology*, *Zaozhuang Center for Disease Control and Prevention*, *Zaozhuang* 277000, *China*)
Corresponding authors: LIU Pin, E-mail: ppinliu@126.com; WANG Lili, E-mail: 836294368@qq.com

【Abstract】 Objective　To understand the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* (SP) serotypes among children in Zaozhuang, Shandong from 2022 to 2023 and study the antibiotic resistance mechanism, pathogenic mechanis, and MLST typing characteristics of SP serotype 15B strains by whole genome sequencing, thus providing data support for vaccine development and clinical antibiotic treatment. **Methods**　A total of 87 SP isolates from children (≤ 14 years old) infected with pneumonia in Zaozhuang from 2022 to 2023 were collected. PCR was used for serotype testing. Antimicrobial sensitivity tests, whole genome sequencing, and bioinformatics analysis were conducted for SP serotype 15B strains. **Results**　The SP serotypes prevalent in this region were mainly 19F (41.4%), 6B (18.4%), 15B (13.8%), and 23F (11.5%). The serotype coverage rate of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) was 77%, and that of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23) was 92%. SP serotype 15B had a resistance rate of 100% to clindamycin, erythromycin, tetracycline, and compound sulfamethoxazole, with the multi-drug resistance rate of 100%. SP serotype 15B carried resistance genes *ermB*, *rlmA*(Ⅱ), *tetM*, *patA*, *patB*, and *pmrA*. The resistance genes (*ermB*, *rlmA*(Ⅱ), and *tetM*) and resistance phenotypes were consistent. All the SP serotype 15B strains carried virulence genes *cbpG*, *pce*/*cbpE*, *pavA*, *pfbA*, *lmb*, *slrA*, *plr*/*gapA*, *cbpD*, *lytA*, *lytB*, *lytC*, *hysA*, *nanA*, *nanB*, *eno*, *cps4A*, *cps4B*, *cps4C*, *cps4D*, *zmpB*, *iga*, *cppA*, *htrA*/*degP*, *tig*/*ropA*, *piaA*, *psaA*, *piuA*, and *ply*. Most (83.3%) of them carried *pspA*, and a small portion (16.7%) carried *pspC*/*cbpA*, *srtB*, *srtC*, *srtD*, *rrgA*, *rrgB*, and *rrgC*. ST9785 was the main sequence type of SP serotype 15B in this region. **Conclusions**　The serotype 15B is the predominant PPSV23 serotype among the strains not covered by PCV13, and ST9785 is the main sequence type. SP serotype 15B in this region is fully resistant to clindamycin, erythromycin, tetracycline, and methoxybenzylamine/sulfamethoxazole and shows severe multi-drug resistance.

【Keywords】 *Streptococcus pneumoniae* serotype 15B; serotype; antibiotic resistance; antibiotic resistance genes; virulence genes; multi-locus sequence typing (MLST); Zaozhuang city

开放获取：CC BY-NC-ND 4.0 DOI：10.11847/zgggws1146556
基金项目：2022 年度山东省医务职工科技创新计划项目（SDYWZGKCJH2022098）
第一作者：李会会（1986—），副主任技师，硕士，研究方向：病原微生物检测。
收稿日期：2024-12-03　修回日期：2025-09-15　录用日期：2025-10-14
利益冲突：不存在　伦理审查：已获取　出版授权：全体作者已与编辑部签署作者贡献声明及版权转让协议

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)是一种革兰氏阳性球菌，是全球细菌性肺炎和脑膜炎的主要病因，可导致菌血症、急性中耳炎、鼻窦炎、气管炎等疾病[1]，被认为是儿童呼吸道细菌感染最重要的致病菌之一。在<5 岁儿童中，SP 是致死率较高病原体[2]。迄今为止，已经发现 46 个血清群中的 100 多个血清型[3]。接种肺炎链球菌结合疫苗能够显著降低肺炎链球菌疾病的发病率，但是也导致致病性 SP 血清型分布的变化[4–6]，因此持续监测 SP 血清型的分布变化和病原特征具有重要意义。目前国内对 15B 型 SP 的研究较少，而山东枣庄地区更是缺乏对 15B 型 SP 的研究。本研究通过监测山东省枣庄地区 2022—2023 年 SP 分离株的血清型分布，利用全基因组测序技术对 15B 型 SP 进行耐药机制、致病机理和 MLST 序列特征分析，有助于预防和控制 SP 感染，为疫苗研发和临床治疗提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 菌种来源　样本来自山东枣庄市 2 家三级甲等医院(枣庄市妇幼保健院和滕州市中心人民医院)2022 年 6 月—2023 年 11 月因感染肺炎就诊的儿童患者，本研究涉及的临床样本相关信息已通过枣庄市疾病预防控制中心伦理委员会的审核(批准号：ZZCDCLL2025002)，菌株编号与临床数据关联信息仅限研究组成员在保密条件下访问。病例纳入标准：(1)确诊为肺炎，肺炎病例应具备急性感染表现；(2)年龄≤14 岁；(3)从临床样本中分离和鉴定出 SP 菌株；(4)未接种肺炎链球菌相关疫苗。排除同一患者多次入院和连续分离自同一患者的菌株。将收集的 SP 疑似菌株接种于血平板，在 5% CO_2，37 ℃ 的培养箱培养 18～20 h，利用微生物质谱仪对培养物进行复核确证，最终获得 87 株 SP 分离株。试验中使用的质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎链球菌 ATCC49619 均购自美国菌种保藏中心。

1.2 主要仪器及试剂　血平板(北京陆桥技术股份有限公司)；肺炎链球菌核酸多重 PCR 血清分型检测试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司)；链球菌药敏检测板(美国 Thermo 公司)；FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit 基因组提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)；QuantStudio5 荧光定量 PCR 仪、全自动微生物鉴定和药敏分析系统和 CO_2 培养箱(美国 ThermoFisher 公司)；毛细管电泳仪(德国 QIAGEN 公司)；微生物质谱仪 MBT Compass(德国 BRUKER 公司)，以上试剂均经过验收合格后在有效期内使用，仪器经过检定校准合格后投入使用。

1.3 实验方法

1.3.1 PCR 分型鉴定　SP 分离株的纯培养物提取 DNA，利用 PCR 技术，通过 A、B、C、D 4 个 PCR 反应进行核酸扩增，用毛细管电泳仪对核酸扩增产物进行电泳分析，根据扩增条带的大小对常见的 23 种血清型(血清型 1、2、3、4、5、6 B、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F 和 33 F)SP 进行分型。

1.3.2 药敏试验　采用微量肉汤法进行药物敏感性试验，根据链球菌药敏检测板使用说明书并结合菌落特性，将菌悬液调至 0.5 麦氏浊度，接种至药敏板后，使用全自动微生物鉴定和药敏分析仪进行培养和结果判读。使用大肠埃希氏菌 ATCC25922 进行质控。根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准[7] 判定 SP 对以下 14 种抗生素的敏感(S)、中度敏感(I)和耐药(R)结果：阿莫西林(amoxicillin, AMX)、头孢吡肟(cefepime, FEP)、头孢噻肟(cefotaxime, CTX)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、克林霉素(clindamycin, CM)、红霉素(erythromycin, E)、左氧氟沙星(levofloxacin, LVX)、利奈唑胺(linazolamide, LZD)、美罗培南(meropenem, MEM)、莫西沙星(moxifloxacin, MXF)、青霉素(penicillin, P)、四环素(tetracycline, TET)、复方新诺明(methoxybenzylamine/sulfamethoxazole, SXT)、万古霉素(vancomycin, VA)。

1.3.3 全基因组测序　采用 FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit 基因组提取试剂盒提取 SP 分离株基因组 DNA，使用 NovaSeq X Plus 平台进行 SP 地建库测序，并对原始数据进行去除接头和低质量 reads 处理以及对测序数据进行质控(由北京诺禾致源科技股份有限公司完成)，使用 CLC Genomics Workbench 22.0.2 分析软件进行测序数据拼接工作，获得 SP 分离株的基因组序列。

1.3.4 耐药基因及毒力基因分析　将 15B 型 SP 分离株基因组拼接序列分别上传耐药基因数据库(The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)(https://card.mcmaster.ca/)和毒力因子数据库(Virluence Factor Database, VFDB)(http://www.mgc.ac.cn/VFs/)，在线进行相关耐药基因和毒力基因的预测。

1.3.5 MLST 序列特征分析及聚类分析　将 15B 型 SP 分离株基因组拼接序列上传到 PubMLST 分子分型数据库中的 *Streptococcus pneumoniae* 模块平台(https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae)，进行相应的管家基因的比对，获得菌株的 MLST 分型，利用 MEGA 5.2.2 进行系统发育树构建。

2 结 果

2.1 SP 血清型别分布情况 2022 年 6 月—2023 年 11 月，从感染肺炎儿童患者痰液样本中共分离获得 87 株 SP 分离株，进行多重 PCR 分析，有 80 株(92%)可以鉴定出血清型，7 株(8%)SP 分离株的血清型不在试剂盒检测范围内，未做分型。分析结果显示 19F(41.4%)是主要血清型，其次为 6 B(18.4%)、15 B(13.8%)和 23 F(11.5%)，包含少量的 18 C(2.3%)、22 F(1.1%)、7 F(1.1%)、14(1.1%)型和 3(1.1%)型血清型。PCV13 疫苗血清型覆盖率为 77%，PPSV 23 疫苗血清型覆盖率为 92%，在非 PCV 13 血清型覆盖的菌株中，主要流行的 PPSV23 血清型为 15 B。

2.2 全基因组测序结果 12 株 15B 型 SP 经全基因组测序组装完成的细菌基因组框架图碱基大小为 2.07～2.13 Mbp，contig 数为 22～41 个，G+C 含量为 39.51%～39.62%。

2.3 15B 型 SP 的耐药情况(表 1) 药敏试验显示，12 株 15B 型 SP 对克林霉素、红霉素、四环素和复方新诺明耐药率均为 100%。对头孢噻肟、氯霉素、左氧氟沙星、利奈唑胺、莫西沙星和万古霉素全部敏感。阿莫西林和青霉素的耐药率为 41.7%(5/12)，美罗培南耐药率 58.3%(7/12)，头孢吡肟耐药率 8.3%(1/12)，多重耐药率均为 100%。使用耐药基因数据库 CARD 对以上菌株的全基因序列进行耐药基因分析，发现 12 株 15B 型 SP 的耐药基因携带情况高度一致，均携耐药基因 *ermB*、*rlmA*(Ⅱ)和 *tetM*，耐药基因与耐药表型一致。

表 1 15 B SP 对 14 种抗生素的耐药性和耐药基因携带情况
Table 1 Resistance and resistance genes of SP serotype 15B to 14 antibiotics

菌株名称	抗生素耐药情况														耐药基因比对一致性/%					
	AMX	FEP	CTX	CHL	CM	E	LVX	LZD	MEM	MXF	P	TET	SXT	VA	*ermB*	*rlmA*(Ⅱ)	*patA*	*patB*	*pmrA*	*tetM*
ZZ0848SP	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0459SP	R	I	I	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0460SP	I	I	S	S	R	R	S	S	I	S	S	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0465SP	I	I	S	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0472SP	I	I	S	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0814SP	R	I	S	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0639SP	R	I	I	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0074SP	S	S	I	S	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0149SP	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0156SP	S	S	I	S	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0627SP	R	I	I	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
ZZ0637SP	R	R	I	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	99.87	100	100	100	100	100
耐药率/%	41.7	8.3	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0	58.3	0.0	41.7	100.0	100.0	0.0						

注：R：耐药，I：中度敏感，S：敏感。

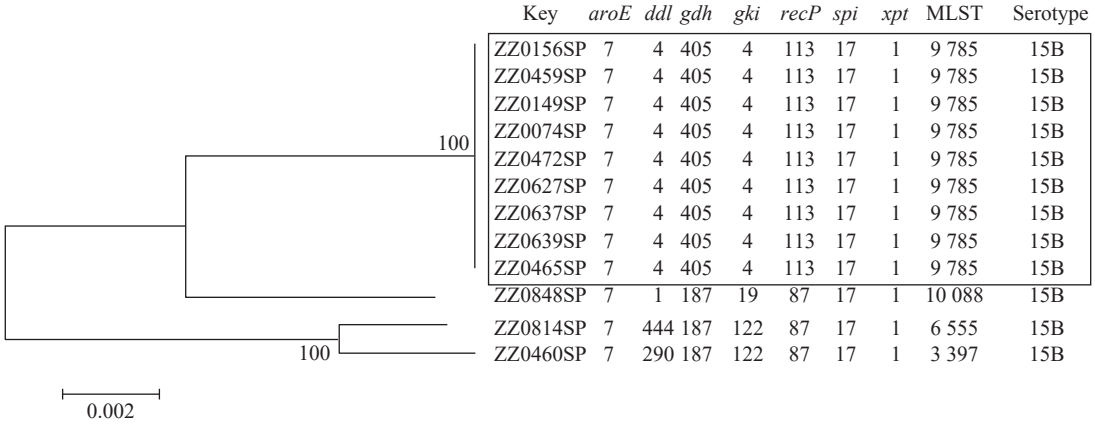
2.4 15B 型 SP 的毒力基因携带情况(表 2) 使用的毒力因子数据库主要包括胞外酶基因、溶血素基因、免疫调节基因、营养代谢因子、黏附相关基因等。经统计分析，12 株 15B 型 SP 都携带毒力基因 *cbpG*、*pce/cbpE*、*pavA*、*pfbA*、*lmb*、*slrA*、*plr/gapA*、*cbpD*、*lytA*、*lytB*、*lytC*、*hysA*、*nanA*、*nanB*、*eno*、*cps4A*、*cps4B*、*cps4C*、*cps4D*、*zmpB*、*iga*、*cppA*、*htrA/degP*、*tig/ropA*、*piuA*、*psaA*、*piaA* 和 *ply* 基因。83.3%(10/12)菌株携带 *pspA* 基因；仅 16.7%(2/12)菌株携带 *pspC/cbpA*、*srtB*、*srtC*、*srtD*、*rrgA*、*rrgB*、*rrgC*。

表 2　15B 型 SP 的毒力基因携带情况
Table 2　Virulence genes carried by SP serotype 15B

毒力基因类别	主要毒力基因	毒力基因比对一致性/%												携带率/%
		ZZ0848SP	ZZ0074SP	ZZ0149SP	ZZ0156SP	ZZ0459SP	ZZ0460SP	ZZ0465SP	ZZ0472SP	ZZ0627SP	ZZ0637SP	ZZ0639SP	ZZ0814SP	
黏附相关	*cbpG*	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	pce/cbpE	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	pspC/cbpA	—	—	—	—	—	100	—	—	—	100	—	—	16.7
	pavA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	pfbA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	srtB	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	16.7
	srtC	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	16.7
	srtD	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	16.7
	rrgA	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	16.7
	rrgB	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	16.7
	rrgC	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	16.7
	lmb	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	slrA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	plr/gapA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
胞外酶	*cbpD*	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	lytA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	lytB	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	lytC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	hysA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	nanA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	nanB	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	eno	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
免疫调节	*cps4A*	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	cps4B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	cps4C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	cps4D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	pspA	—	100	100	100	100	—	100	100	100	100	100	100	83.3
	zmpB	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	iga	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	cppA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	htrA/degP	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	tig/ropA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
营养代谢因子溶血素相关	*psaA*	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	piaA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	piuA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0
	ply	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.0

注：“—”表示无该项数据。

2.5　15B 型 SP 的 MLST 序列特征分析及聚类分析（图 1）　根据 PubMLST 网站，对 7 个管家基因在线分析，12 株 15B 型 SP 的 MLST 分型分别为 ST9785、ST3397、ST6555 和 ST10088。利用 MEGA 软件构建系统发育树，可见 12 株 15B 型 SP 聚类为 4 个 cluster，最主要的 cluster 为 ST9785 型，是本地区 15B 型 SP 主要 ST 型，占比 75%（9/12）。



Key	*aroE*	*ddl*	*gdh*	*gki*	*recP*	*spi*	*xpt*	MLST	Serotype
ZZ0156SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0459SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0149SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0074SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0472SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0627SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0637SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0639SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0465SP	7	4	405	4	113	17	1	9 785	15B
ZZ0848SP	7	1	187	19	87	17	1	10 088	15B
ZZ0814SP	7	444	187	122	87	17	1	6 555	15B
ZZ0460SP	7	290	187	122	87	17	1	3 397	15B

图 1　15B 型 SP MLST 聚类分析结果

Fig. 1　Cluster analysis of SP serotype 15B strains based on MLST results

3 讨　论

本研究显示，山东省枣庄市儿童感染 SP 主要是 19 F 型，占到全部菌株的 41.4%，其次为 6 B 型、15B 型和 23 F 型，PCV13 疫苗的血清型覆盖率为 77%，PPSV23 疫苗的血清型覆盖率高达 92%。有研究报告显示，自从发展中国家开始接种 PCV13 以来，15 B 型 SP 的分离率一直在增加，在中国儿童中，非 PCV13 涵盖的 15B 型 SP 很常见，并且 15 B 是主要血清型，应当引起重视[8]。在本地区流行的血清型中，15B 型检出率高达 13.8%，是枣庄地区非 PCV 13 血清型覆盖的菌株血清型中，主要流行的 PPSV23 血清型。与柳州市的研究结果一致[9]，因此应该加强 SP 的血清型监测，持续关注 15 群 SP 的流行状况，并优化肺炎链球菌疫苗的血清型组成，提高其覆盖度。

枣庄地区的 15B 型 SP 对克林霉素、红霉素、四环素和复方新诺明耐药率 100%，并对 4～6 种抗生素同时耐药，以克林霉素（林可酰胺类）+红霉素（大环内酯类）+四环素+复方新诺明（磺胺类）的耐药模式为主，与苏州市和柳州市的研究结果一致[9–10]，多重耐药现象严重，为临床治疗带来困难。从分子水平了解 SP 的耐药机制，对解决其耐药性问题至关重要，深入研究其耐药情况和机制可为临床用药提供数据支持。通过分析其全基因组序列的耐药基因，发现该 15B 型 SP 均携带耐药基因 *ermB*、*rlmA*（Ⅱ）、*tetM*、*patA*、*patB* 和 *pmrA*。其中 *ermB* 是红霉素耐药相关基因，由其介导的核糖体甲基化修饰是 SP 对大环内酯类耐药的最主要机制[11]；*tetM* 是四环素类抗生素耐药相关基因，可阻止四环素与核糖体结合而失去抑菌作用，导致四环素出现耐药[12]；*rlmA*（Ⅱ）存在于许多革兰氏阳性细菌中，可使 23S rRNA 甲基化，对大环内酯类和林可酰胺类抗生素产生耐药性[13]。*ermB*、*rlmA*（Ⅱ）、*tetM* 耐药基因与耐药表型一致率均为 100%。本研究中 15B 型 SP 全部携带耐药基因 *patA*、*patB* 和 *pmrA*，却均对氟喹诺酮类抗生素（左氧氟沙星和莫西沙星）敏感，耐药基因与耐药表型高度不一致。这是由于虽然耐药基因 *patA*、*patB* 和 *pmrA* 可以介导药物外排，引起喹诺酮类药物耐药的产生，但是喹诺酮类药物耐药机制与抗菌靶点突变有关，喹诺酮类耐药决定区的基因突变才是产生耐药性的主要原因[14]。

SP 致病能力和毒力因子密切相关，SP 常见的毒力因子包括荚膜多糖和黏附因子，如胞外酶、IgA1 蛋白酶、金属离子吸收因子、蛋白酶和毒素因子，这些因子参与了 SP 相关疾病的发病机制[15]。深入研究 SP 的毒力基因不仅可以了解其致病力还可以为开发下一代蛋白质疫苗提供关键候选靶点，极高的携带率表明了开发疫苗的潜力[16]。本地区的 15B 型 SP 主要分别携带了 29～35 个毒力基因，其中胞外酶基因（*cbpD*、*lytA*、*lytB*、*lytC*、*hysA*、*nanA*、*nanB*、*eno*）、溶血素基因（*ply*）、免疫调节基因（*cps4A*、*cps4B*、*cps4C*、*cps4D*、*zmpB*、*iga*、*cppA*、*htrA/degP*、*tig/ropA*）、营养代谢因子（*psaA*、*piaA*、*piuA*）、黏附相关基因（*cbpG*、*pce/cbpE*、*pavA*、*pfbA*、*lmb*、*slrA*、*plr/gapA*）的携带率为 100%，*pspA* 携带率 83.3%，*pspC/cbpA*、*rrgA*、*rrgB*、*rrgC*、*srtB*、*srtC* 和 *srtD* 携带率 16.7%。*pspA* 是 SP 的菌体表面蛋白，可结合人乳铁蛋白，具有抑制补体系统活化的功能，*pspA* 的缺失将会导致 SP 定植、入侵能力的下降[17]。*pspC/cbpA* 基因表达的肺炎链球菌表面蛋白 C（PSPC）是菌株侵入肺部及血液系统的必要毒力因子[18]。*rrgA*、*rrgB*、*rrgC*、*srtB*、*srtC* 和 *srtD* 属于 *rlrA* 基因毒力岛，主要调控肺炎链球菌 PI–1 菌毛结构的表达[9]。溶血素基因 *ply* 是 SP 的外毒素相关基因，其产物为肺炎球菌溶血素，导致炎症的发生[19]。*lytA* 基因主要编码自溶酶 A，可促进毒素和免疫逃避因子的传播，易被青霉素和万古霉素激活，介导细菌自溶从而导致毒素及

其他毒力因子的释放，使病情加重[20]，因此治疗携带 *lytA* 基因的 SP 应避免使用青霉素和万古霉素抗生素。

对 15B 型 SP 的 7 个管家基因在线分析发现 MLST 分型分别为 ST9785、ST3397、ST6555 和 ST-10088，其中 75% 的 15B 型 SP 基因分型为 ST9785，是本地区主要流行的 15B 型 SP 基因型。经数据分析发现本地区相同 ST 型的 15B 型 SP，携带的毒力基因基本一致，耐药基因完全一致，和其他 ST 型略有差异。

本研究通过分析枣庄地区 SP 的血清型分布，了解当地 SP 流行情况和 PCV13 疫苗的实际血清型覆盖情况，发现 15B 型 SP 是本地区流行的非 PCV13 疫苗血清型，并出现了严重的多重耐药现象，应当持续监测。由于收集的 SP 分离株数量有限，通过有限的数据只能对当地 SP 流行状况和病原特征有初步的了解，后续还需要不断加强监测以建立本地区的 SP 全基因组数据库，为细菌性传染病的防控提供数据支持。

数据可用性声明　本研究的原始数据因涉及患者隐私保护等原因无法公开共享。

参考文献

[1] 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): 1453-1455.

[2] GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. The Lancet, 2022, 400(10369): 2221-2248.

[3] Ganaie F, Saad J S, McGee L, et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large *cps* fragment from an oral streptococcus[J]. mBio, 2020, 11(3): e00937-e01020.

[4] Ubukata K, Takata M, Morozumi M, et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine on genotypic penicillin resistance and serotype changes, Japan, 2010–2017[J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(11): 2010-2020.

[5] Kim S H, Chung D R, Song J H, et al. Changes in serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients in Asia: emergence of drug-resistant non-vaccine serotypes[J]. Vaccine, 2020, 38(38): 6065-6073.

[6] Nakano S, Fujisawa T, Ito Y, et al. Nationwide surveillance of paediatric invasive and non-invasive pneumococcal disease in Japan after the introduction of the 13-valent conjugated vaccine, 2015–2017[J]. Vaccine, 2020, 38(7): 1818-1824.

[7] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 32nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.

[8] Shi W, Du Q Q, Yuan L, et al. Antibiotic resistance and molecular biological characteristics of non-13-valent-pneumococcal conjugate vaccine serogroup 15*Streptococcus pneumoniae* isolated from children in China[J]. Frontiersin Microbiology, 2022, 12: 778985.

[9] 李玲. 柳州 5 岁以下儿童医院相关肺炎链球菌的耐药和分子特征研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.

[10] Dai G, Wang T, He Y T, et al. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae*isolates among children in Suzhou, China[J]. Translational Pediatrics, 2023, 12(12): 2203-2212.

[11] 黄李丹, 杨美娟, 孙爱华, 等. 肺炎链球菌耐药分子机制的研究进展 [J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(3): 275-280.

[12] 丘丹萍, 李泰阶, 王柏莲, 等. 广西玉林市住院患者肺炎链球菌的血清型分布及耐药性分析 [J]. 中国热带医学, 2022, 22(11): 1037-1042.

[13] Lebars I, Husson C, Yoshizawa S, et al. Recognition elements in rRNA for the tylosin resistance methyltransferase RlmA^{II}[J]. Journalof Molecular Biology, 2007, 372(2): 525-534.

[14] 刘杨, 欧宁. 喹诺酮类药物的作用机制耐药机制及研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2014, 22(2): 140-143.

[15] 李文宇. 儿童肺炎链球菌致病相关标志物的全基因组关联研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2022.

[16] Zhao W T, Pan F, Wang B J, et al. Epidemiology characteristics of *Streptococcus pneumoniae*from children with pneumonia in Shanghai: a retrospective study[J]. Frontiers in Celluarand Infection Microbiology, 2019, 9: 258.

[17] 胡大康, 张瑾, 王冬国, 等. 毒力基因 *pspA* 在肺炎链球菌入侵血液系统中的作用研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(8): 1821-1823, 1826.

[18] Voss S, Hallström T, Saleh M, et al. The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin[J]. Journalof Biological Chemistry, 2013, 288(22): 15614-15627.

[19] Weiser J N, Ferreira D M, Paton J C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(6): 355-367.

[20] Mellroth P, Sandalova T, Kikhney A, et al. Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*[J]. mBio, 2014, 5(1): e01120-e01213.