

网络出版时间: 2024-12-26 16:51:32 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1136.020>

CAMP 阴性无乳链球菌的鉴定及耐药特征

王 秀, 冷贵云, 唐 伟, 周 强

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601)

摘要 目的 探究 CAMP 阴性无乳链球菌的鉴定及耐药特征。方法 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和 CAMP 试验, 鉴定 33 株疑似无乳链球菌。16S rDNA 验证 CAMP 阴性菌株; 实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测 CAMP 阴性菌株的 *cfb* 基因; 微量肉汤稀释法进行药敏检测, 对比 CAMP 阴性和阳性菌株的耐药率。结果 MALDI-TOF MS 鉴定显示, 33 株均为无乳链球菌。CAMP 试验表明, 其中 7 株阴性, 经 16S rDNA 完成菌株验证。这 7 株的 qPCR 结果显示, 只有 1 株检出 *cfb*, 为阳性。药敏报告显示, CAMP 阴性和阳性菌株对青霉素 G、头孢吡肟、头孢噻肟、万古霉素和利奈唑胺均敏感, 前者对氯霉素和四环素的耐药率(28.57%、85.71%)略高于后者(15.38%、57.69%), 对莫西沙星、左氧氟沙星和红霉素的耐药率(14.29%、14.29%、42.86%)略低于后者(34.62%、34.62%、57.69%), 但差异无统计学意义。结论 CAMP 阴性无乳链球菌的耐药性无异于 CAMP 阳性菌株, 但传统的 CAMP 试验和只针对 *cfb* 的 qPCR 的鉴定, 容易造成临床漏检。MALDI-TOF MS 是一项快速、简便、准确的鉴定技术, 值得推广。

关键词 无乳链球菌; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; CAMP 试验; 16S rDNA; 荧光定量聚合酶链式反应; *cfb*

中图分类号 R 378.1+2; Q 93-331; R 446.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)01-0142-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.020

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*), 即 B 群链球菌(Group B *Streptococcus*, GBS), 常寄居于呼吸道、泌尿生殖道、胃肠道的致病菌, 可引起多种侵袭性疾病^[1]。无乳链球菌产生的 Christis、Atkins、Munch-peterson(CAMP)因子, 可促进金黄色葡萄球菌鞘磷脂酶活性, 在两菌交界处形成溶血加强区^[2], 即 CAMP 试验阳性, 一直是鉴定无乳链球菌的经典方法^[3-4], CAMP 因子的编码基因(CAMP factor, *cfb*)被视为高特异性保守序列, 常作为分子靶标^[5]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是一种新型软电离有机质谱技术, 分析微生物中具有种属特征的成分^[6], 常用于病原微生物的鉴定^[7-8]。另外, 16S rDNA 的结构和功能具有高度保守性, 也广泛用于鉴定菌株。

自从研究者分离出 CAMP 阴性无乳链球菌^[9]后, 国内外陆续有关于 *cfb* 缺失导致无乳链球菌逃

避临床分子检测的报道^[10-13]。该研究采用 MALDI-TOF MS 和 16S rDNA 相结合鉴定 CAMP 阴性菌株, 并进行 *cfb* 及药敏检测, 为 CAMP 阴性无乳链球菌的精确鉴定及耐药特征奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源及鉴定 33 株无乳链球菌, 分离自 2023 年 5—12 月安徽医科大学第二附属医院患者的尿液、羊水、阴道分泌物、血液等(剔除同一患者相同部位的标本), 经 MALDI-TOF MS 和 CAMP 试验共同鉴定。16S rDNA 片段电泳法验证 CAMP 阴性菌株。上述菌株均分离自常规临床送检样本, 属于免伦理审查范围。对照菌株(金黄色葡萄球菌 ATCC25923、屎肠球菌 ATCC29212、无乳链球菌 ATCC13813 和肺炎链球菌 ATCC49619)来自本院微生物室。

1.1.2 仪器与试剂 Microflex LT MALDI-TOF 质谱仪(德国布鲁克公司); 质谱样品处理基质(北京布鲁克微生物技术有限公司); 甲酸(太仓沪试试剂有限公司); Phoenix M50 全自动微生物鉴定药敏分析仪(美国碧迪公司); 哥伦比亚绵羊血琼脂平板(合肥天达公司); 16S rDNA 片段引物(上海生工生物公司); Tanon1600 型全自动凝胶成像分析系统

2024-11-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82102460); 安徽医科大学校科研基金(编号: 2021xkj050); 安徽省转化医学研究院科研基金(编号: 2021zhxy-C47)

作者简介: 王 秀, 女, 硕士研究生;

周 强, 男, 副教授, 主任技师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: zhouqiang1973@163.com

(上海天能科技有限公司);电泳仪(美国伯乐公司);DNA Marker 和 PCR Master Mix(上海生工生物工程技术服务有限公司);QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔公司);无乳链球菌核酸检测试剂盒(博尔诚北京科技有限公司);冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司);液氮研磨管(上海净信实业发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MALDI-TOF MS 检测 挑取单个纯菌落在 96 孔的靶板上,滴加 1 μ l 70% 甲酸,干燥后添加 1 μ l 基质溶液,待靶板干燥后,装载到仪器上,进行测量和分析。鉴定分值 ≥ 2.000 为高置信度^[8]。

1.2.2 CAMP 试验 将金黄色葡萄球菌 ATCC25923 在血平板中央划一横线,再取疑似菌株与前一划线作垂直接种,两者相距 0.5 ~ 1 cm。放置 35 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后观察。垂直交界处呈现箭头状溶血区,为 CAMP 试验阳性;反之,为 CAMP 试验阴性。以屎肠球菌 ATCC29212 为阴性对照、无乳链球菌 ATCC13813 为阳性对照。

1.2.3 16S rDNA 检测 通过 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> 设计 16S rDNA 片段引物(正向序列:5'-GCCTCATAGCGGGGGGATAAC-3';反向序列:5'-GTGTCTCAGTCCCAG TGTGG-3'),产物大小为 205 bp。将 7 株 CAMP 阴性和随机匹配的 3 株 CAMP 阳性无乳链球菌接种于血平板上,35 $^{\circ}$ C 培养 24 h。收集新鲜适量的菌落于聚丙烯液氮研磨专用管,通过液氮研磨裂解无乳链球菌细胞壁。进而采用酚氯提取法提取纯化细菌 DNA。PCR 扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 2.5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,50 ~ 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,经凝胶成像系统显像观察结果。

1.2.4 药敏检测 将 7 株 CAMP 阴性和 26 株 CAMP 阳性无乳链球菌,按照 Phoenix M50 全自动微生物鉴定药敏仪的操作要求,使用微量肉汤稀释法进行药敏试验。肺炎链球菌 ATCC49619 为质控菌株。结果判读及解释参照美国临床实验室标准化协会制订的标准(CLSI M100-S29) 文件进行。

1.2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative PCR, qPCR) 将 7 株 CAMP 阴性无乳链球菌,同期随机匹配 3 株 CAMP 阳性无乳链球菌作为对照,按照无乳链球菌核酸检测试剂盒操作说明书,采用全自动荧光 PCR 分析仪,测定菌株 *cfb* 表达情况。结果判读及解释参照试剂盒说明书。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计数资料以数值(%) 表示,两组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAMP 试验结果 35 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,菌株(87、98、99)在两菌生长线分开的区域均呈箭头透明溶血区,CAMP 试验阳性;相比之下,菌株(9、41、44、76、90、95、96)均未出现溶血加强区(图 1A、B),CAMP 试验阴性。33 株无乳链球菌,其中 7 株 CAMP 试验阴性。

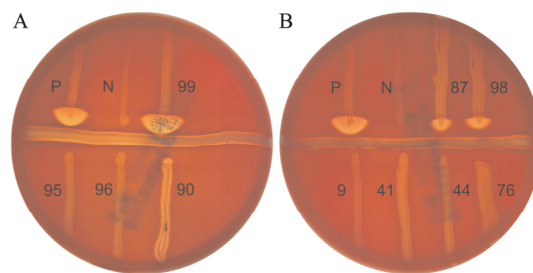


图 1 无乳链球菌的 CAMP 试验结果

Fig.1 The CAMP assay results of *Streptococcus agalactiae* strains 9, 41, 44, 76, 90, 95, 96: CAMP-negative *Streptococcus agalactiae*; 87, 98, 99: CAMP-positive *Streptococcus agalactiae*; P (positive): *Streptococcus agalactiae* (ATCC13813); N (negative): *Enterococcus faecalis* (ATCC29212).

2.2 菌株鉴定 7 株 CAMP 阴性菌株 MALDI-TOF MS 鉴定分值 ≥ 2.000 ,结果具有高置信度,见表 1。无乳链球菌 16S rDNA 片段 PCR 产物大小为 205 bp,随机匹配 3 株 CAMP 阳性无乳链球菌作为对照,在目的位置均可见单一、干净、清晰的条带(图 2),7 株 CAMP 阴性菌株证实为无乳链球菌。

表 1 菌株鉴定
Tab.1 Strain identification

Strain numbers	CAMP assay	Log score values
9	negative	2.341
41	negative	2.185
44	negative	2.192
76	negative	2.373
90	negative	2.012
95	negative	2.230
96	negative	2.100

2.3 qPCR 的检测结果 随机匹配的 3 株(87、98 和 99) CAMP 阳性无乳链球菌作为对照,检测 7 株(9、41、44、76、90、95、96) CAMP 阴性无乳链球菌 *cfb*

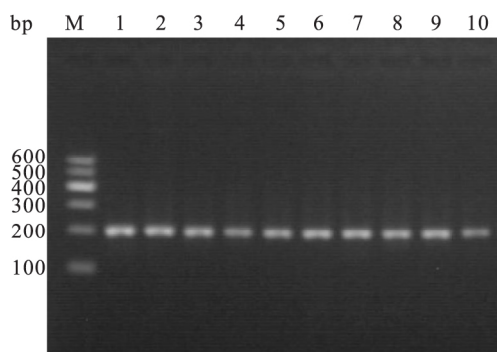


图2 10株无乳链球菌16S rDNA片段PCR扩增电泳图

Fig. 2 PCR amplification electrophoresis result of

10 *Streptococcus agalactiae* 16S rDNA

M: Marker (600 bp); 1–7: CAMP-negative *Streptococcus agalactiae*; 8–10: CAMP-positive *Streptococcus agalactiae*.

表达情况。结果显示,只有1株(90) qPCR 检出 *cfb*, 为阳性,见图3。

2.4 CAMP 阴性和 CAMP 阳性无乳链球菌的耐药性分析 7株 CAMP 阴性和26株 CAMP 阳性无乳链球菌对10种抗生素的耐药率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。如表2所示,两者对青霉素G、头孢吡肟、头孢噻肟、万古霉素和利奈唑胺均敏感;对氯霉素、莫西沙星和左氧氟沙星有一定的耐药率,而对四环素和红霉素耐药率较高。前者对氯霉素和四环素的耐药率(28.57%、85.71%)略高于后者(15.38%、57.69%),对莫西沙星、左氧氟沙星和红霉素的耐药率(14.29%、14.29%、42.86%)略低于后者(34.62%、34.62%、57.69%),见表2。

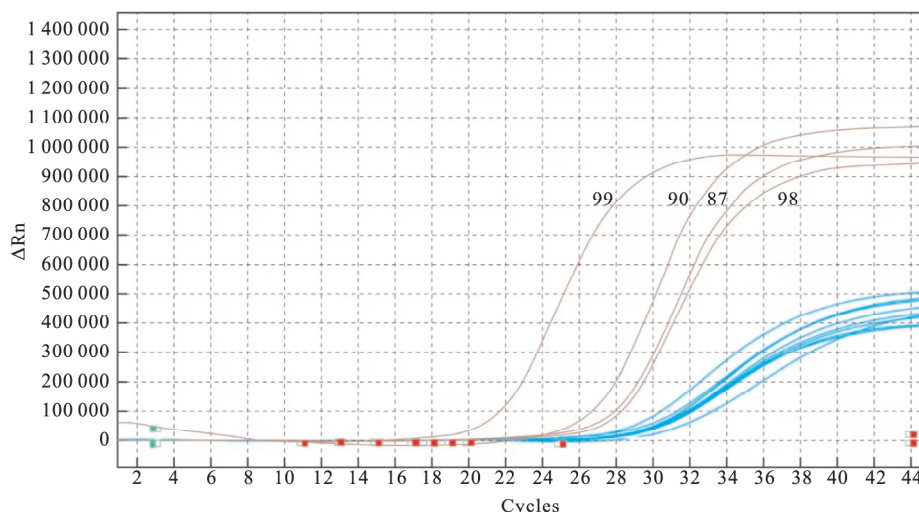


图3 10株无乳链球菌qPCR的扩增曲线

Fig. 3 Amplification curves of 10 *Streptococcus agalactiae* strains using qPCR

Coinciding curves at the bottom: 9, 41, 44, 76, 95, 96.

表2 CAMP 阴性和 CAMP 阳性无乳链球菌对10种抗生素的耐药率比较

Tab. 2 Comparison of antibiotic resistance rates between CAMP-positive and CAMP-negative *Streptococcus agalactiae*

Antibiotic	CAMP-negative <i>Streptococcus agalactiae</i> (n=7)		CAMP-positive <i>Streptococcus agalactiae</i> (n=26)		χ^2 value	P value
	n	Rate (%)	n	Rate (%)		
Tetracycline	6	85.71	15	57.69	1.87	0.22
Chloramphenicol	2	28.57	4	15.38	0.64	0.58
Erythromycin	3	42.86	15	57.69	0.49	0.67
Moxifloxacin	1	14.29	9	34.62	1.08	0.40
Levofloxacin	1	14.29	9	34.62	1.08	0.40
Cefepime	0	0	0	0	—	—
Cefotaxime	0	0	0	0	—	—
Penicillin G	0	0	0	0	—	—
Vancomycin	0	0	0	0	—	—
Linezolid	0	0	0	0	—	—

3 讨论

基于 CAMP 因子产生的 CAMP 试验,一直是鉴定无乳链球菌的经典试验^[4]。然而,广州、贵州等地区出现 CAMP 阴性无乳链球菌的报道^[15-16]。国外,Tickler et al 通过对 15 株无乳链球菌测序发现,其 *cfb* 区域或附近出现了四种不同大小染色体片段缺失(缺失范围为 181 bp ~ 49 kb)^[13]。此后,Creti et al^[11]对 6 株无乳链球菌测序发现,其 *cfb* 均呈现不同大小的缺失(缺失范围为 7 ~ 33 kb)。另外,早有研究^[7]发现无乳链球菌的 *cfb* 大小完整,但转录异常也可导致 CAMP 因子阴性。总之,无乳链球菌的变异是存在的,并且是大范围的。据此推测,该研究结合 MALDI-TOF MS 技术和 16S rDNA 精确鉴定的 7 株 CAMP 阴性菌株,其 qPCR 结果显示,只有 1 株检出 *cfb*,为阳性,可能是 *cfb* 突变、缺失或转录异常导致 CAMP 因子阴性。MALDI-TOF MS 检测的是微生物自身保守且具有种特异性的肽/蛋白质指纹图谱^[8],因此,对 CAMP 阴性无乳链球菌的鉴定有明显优势。

CAMP 因子是无乳链球菌重要的毒力因子^[13],研究表明,无乳链球菌的毒力与耐药性互为关联^[9]。然而,该研究中,CAMP 阴性和 CAMP 阳性菌株耐药性并无统计学差异。但是,CAMP 阴性无乳链球菌对四环素耐药率(85.71%)高于 CAMP 阳性无乳链球菌(57.69%),与 Zhou et al^[10]研究有所不同。可能还是菌株来源和数量不同导致研究结果有差异。后续,可进一步多中心、更大样本量的研究加以验证,并对 CAMP 阴性无乳链球菌进行全基因组测序,进一步探讨其毒力和耐药性。

综上所述,CAMP 阴性无乳链球菌的变异大范围存在,其耐药性无异于 CAMP 阳性菌株,但传统的 CAMP 试验和只针对 *cfb* 的 qPCR 的鉴定,容易造成其临床漏检。MALDI-TOF MS 是一项快速、简便、准确的鉴定技术,值得推广。

参考文献

- [1] 时翠娟,王刚,李亚娟,等. 尿路感染 B 群链球菌的耐药特征与 CAMP 试验敏感性分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(10): 1516 - 20. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492. 2021.10.002.
- [2] Shi C X, Wang G, Li Y J, et al. Analysis of drug-resistant characteristics of group B *Streptococcus* in urinary tract infection and sensitivity of CAMP test [J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(10): 1516 - 20. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492. 2021.

- 10.002.
- [3] Christie K, Atkins N E, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group b *streptococci* [J]. Aust J Exp Biol Med, 1944, 22(3): 197 - 200. doi: 10.1038/icb.1944.26.
- [4] Wilkinson H W. CAMP-disk test for presumptive identification of group B *streptococci* [J]. J Clin Microbiol, 1977, 6(1): 42 - 5. doi: 10.1128/jcm.6.1.42 - 45.1977.
- [5] Darling C L. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material [J]. J Clin Microbiol, 1975, 1(2): 171 - 4. doi: 10.1128/jcm.1.2.171 - 174.1975.
- [6] Thwe P M, Faron M L, Pride D T, et al. Multicenter evaluation of the Cepheid xpert GBS LB XC test [J]. J Clin Microbiol, 2022, 60(12): e0135622. doi: 10.1128/jcm.01356 - 22.
- [7] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4): 241 - 9. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009 - 8158. 2019.04.004.
- [8] Hu J H, Ma X L, Wang H, et al. Expert consensus on standardized operation of MALDI-TOF MS in clinical microbial identification [J]. Chin J Lab Med, 2019, 42(4): 241 - 9. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009 - 8158. 2019.04.004.
- [9] Sandrin T R, Goldstein J E, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review [J]. Mass Spectrom Rev, 2013, 32(3): 188 - 217. doi: 10.1002/mas.21359.
- [10] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(4): 543 - 51. doi: 10.1086/600885.
- [11] Hassan A A, Akineden O, Lämmle C, et al. Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis [J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2002, 49(5): 257 - 9. doi: 10.1046/j.1439 - 0450.2002.00553.x.
- [12] Zhou J, Zhang L, Zhang Y, et al. Analysis of molecular characteristics of CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* strains [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1189093. doi: 10.3389/fmicb.2023.1189093.
- [13] Creti R, Imperi M, Stanziale A, et al. Group B *streptococci* (GBS) strains evading molecular diagnostics showed novel chromosomal deletions encompassing the CAMP-factor (*cfb*) encoding gene [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2023, 42(7): 913 - 6. doi: 10.1007/s10096 - 023 - 04620 - x.
- [14] Guo D, Xi Y, Wang S, et al. Is a positive Christie-Atkinson-Munch-Peterson (CAMP) test sensitive enough for the identification of *Streptococcus agalactiae*? [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 7. doi: 10.1186/s12879 - 018 - 3561 - 3.
- [15] Tickler I A, Tenover F C, Dewell S, et al. *Streptococcus agalactiae* strains with chromosomal deletions evade detection with molecular methods [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(4): e02040 - 18. doi: 10.1128/jcm.02040 - 18.

- [4] Ratner H B, Weeks L S, Stratton C W. Evaluation of spot CAMP test for identification of group B *streptococci* [J]. *J Clin Microbiol*, 1986, 24(2): 296–7. doi: 10.1128/jcm.24.2.296–297.1986.
- [5] 邓颖颖, 孔银波, 姜长宏, 等. B群链球菌 CAMP 阴性株的表型及分子特征初步分析 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3): 164–9. doi:10.3969/j.issn.1674–6929.2019.03.003.
- [5] Deng Y Y, Kong Y B, Jiang C H, et al. Preliminary analysis of phenotypic and molecular characterization of CAMP-negative Group B *Streptococcus* clinical isolate [J]. *J Mol Diagn Ther*, 2019, 11(3): 164–9. doi:10.3969/j.issn.1674–6929.2019.03.003.
- [6] 刘家玲, 袁 军, 胡方芳. 贵州地区孕晚期妇女生殖道无乳链球菌定植筛查及 CAMP 试验阴性的 GBS 菌株基因测序分析研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(1): 14–8. doi:10.3969/j.issn.1671–7414.2018.01.004.
- [6] Liu J L, Yuan J, Hu F F. Screening of *Streptococcus agalactiae* of genitourinary tract in the late pregnant women in Guizhou province and the genetic sequencing analysis [J]. *J Mod Lab Med*, 2018, 33(1): 14–8. doi:10.3969/j.issn.1671–7414.2018.01.004.
- [7] Podbielski A, Blankenstein O, Lütticken R. Molecular characterization of the *cfb* gene encoding group B *streptococcal* CAMP-factor [J]. *Med Microbiol Immunol*, 1994, 183(5): 239–56. doi:10.1007/BF00198458.
- [8] Rajagopal L. Understanding the regulation of group B *streptococcal* virulence factors [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(2): 201–21. doi:10.2217/17460913.4.2.201.
- [9] 范 雪, 邵 伟, 赵艳坤, 等. 无乳链球菌毒力基因与耐药性的相关性研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(1): 375–84. doi:10.16431/j.cnki.1671–7236.2021.01.041.
- [9] Fan X, Shao W, Zhao Y K, et al. Research progress on the correlation between virulence genes and drug resistance of *Streptococcus agalactiae* [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2021, 48(1): 375–84. doi:10.16431/j.cnki.1671–7236.2021.01.041.

Identification and resistance characteristics of CAMP-negative *Streptococcus agalactiae*

Wang Xiu, Leng Guiyun, Tang Wei, Zhou Qiang

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore identification and resistance characteristics of CAMP-negative *Streptococcus agalactiae*. **Methods** Using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and the CAMP assay, 33 presumptive strains of *Streptococcus agalactiae* were identified. The CAMP-negative strains were further validated through 16S rDNA, while the CAMP factor encoding gene (*cfb*) was detected using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Antimicrobial susceptibility testing was conducted using the microbroth dilution method, and the resistance rates of CAMP-negative and CAMP-positive strains were compared. **Results** Based on MALDI-TOF MS identification, all 33 strains were classified as *Streptococcus agalactiae*. Among them, 7 strains tested negative for CAMP were subsequently confirmed as *Streptococcus agalactiae* through 16S rDNA. The qPCR results indicated that, only 1 strain showed *cfb* presence. The CAMP-negative and CAMP-positive strains were sensitive to penicillin G, cefepime, cefotaxime, vancomycin, and linezolid. The resistance rates of the former to chloramphenicol and tetracycline (28.57%, 85.71%) were slightly higher than the latter (15.38%, 57.69%), while the resistance rates to moxifloxacin, levofloxacin, and erythromycin (14.29%, 14.29%, 42.86%) were slightly lower than the latter (34.62%, 34.62%, 57.69%), but was not significant. **Conclusion** Drug resistance of CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* is the same as CAMP-positive strains, but traditional CAMP assay and *cfb*-targeted qPCR can result in missed detections. MALDI-TOF MS offers a quick, simple, and accurate identification method that merits wider adoption.

Key words *Streptococcus agalactiae*; MALDI-TOF MS; CAMP assay; 16S rDNA; qPCR; *cfb*

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82102460); Research Project of Anhui Medical University (No. 2021xkj050); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2021zhyx-C47)

Corresponding author Zhou Qiang, E-mail: zhouqiang1973@163.com