

网络出版时间:2024-09-25 09:56:56 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240924.1712.007

新型不完全溶血表型金黄色葡萄球菌的微生物学特征

唐伟^{1,2},冷贵云¹,高菊¹,王亚武¹,姚杰¹,周强¹,徐元宏²

(¹安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601;

²安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022)

摘要 目的 探讨一种新型不完全溶血表型金黄色葡萄球菌(SIHP)的微生物学特征。方法 采用三点接种法检测溶血表型,共纳入11株新型SIHP和33株随机匹配的完全溶血表型金黄色葡萄球菌(SCHP)。采用微量肉汤稀释法检测新型SIHP和SCHP的耐药特征,冻干兔血浆检测凝固酶活性,玻片法检测触酶活性,实时荧光定量PCR检测溶血素基因mRNA水平,微孔板法检测红细胞毒性,微孔板成膜结晶紫染色法检测生物膜形成能力,微量培养法监测生长曲线。结果 与SCHP相比,新型SIHP的hla、hly、hlc和hld四种溶血素基因表达谱不同;新型SIHP对青霉素、苯唑西林、庆大霉素、喹诺酮类、克林霉素和复方磺胺甲噁唑的耐药率更高;新型SIHP不仅具有更强的溶血毒性、血浆凝固酶活性和生物膜形成能力,而且对数期生长更快。结论 新型SIHP的微生物学特征有别于SCHP,耐药性和致病性更强,应引起临床重视。

关键词 金黄色葡萄球菌;溶血素;溶血表型;微生物学特征;耐药性;致病性

中图分类号 R 378.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1535-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.007

金黄色葡萄球菌在自然界中分布广泛,可栖息

在皮肤或机体与外界相通的腔道,是一种十分重要的条件致病菌,常引起局部化脓性或全身性感染。金黄色葡萄球菌分泌的外毒素能够导致食物中毒、烫伤样皮肤综合征或毒性休克综合征。金黄色葡萄球菌连续多年都是分离率最高的革兰阳性病原菌^[1-2]。根据全国细菌耐药监测网(China Antimicrobial Resistance Surveillance System, CARSS, <http://www.carss.cn>)公布的数据,金黄色葡萄球菌

2024-07-12 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82102460)

作者简介:唐伟,男,博士研究生;

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

徐元宏,男,教授,博士生导师,主任技师,通信作者, E-mail: xyhong1964@163.com

filtrates and diluents of novel SIHP and *Staphylococcus aureus* with complete hemolytic phenotype (SCHP) were co-incubated with 1% human red blood cells and HCC827 cells. Hemoglobin release method was used to detect red blood cell toxicity, CCK-8 method was used to detect HCC827 cell activity. Ion selective electrode method, colorimetric method and immunofluorescence method were used to detect potassium (K^+), lactate dehydrogenase (LDH) and interleukin-6 (IL-6) concentrations in the incubation supernatants. **Results** The filtrate and diluent of novel SIHP could significantly damage the activity of HCC827 cells, causing K^+ and LDH leakage. The filtrate and 1:3 diluent of novel SIHP resulted in a decrease and an increase in IL-6 secretion in HCC827 cells, respectively. Compared with SCHP, the filtrate and diluent of novel SIHP had stronger red blood cell toxicity and more severe K^+ leakage in HCC827 cells. **Conclusion** The filtrate of novel SIHP can damage the cell membrane, lead to content release and kill NSCLC cells, with a stronger toxicity than SCHP.

Key words *Staphylococcus aureus*; hemolytic phenotype; filtrate; non-small cell lung cancer; cytotoxicity; anti-tumor activity

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee(No. 2023AH053170)

Corresponding authors Zhou Qiang, E-mail: zhouqiang1973@163.com; Chen Liwen, E-mail: chenliwen@ahmu.edu.cn

的临床标本分离率为 9.2%, 仅次于大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌^[3]。

在血琼脂平板上, 典型的完全溶血表型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* with complete hemolytic phenotype, SCHP) 菌落周围可见明显的 β -溶血环。然而, 从 2015 年开始, 国内外文献^[4-11] 陆续报道的两种不完全溶血表型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* with incomplete hemolytic phenotypes, SIHP) 在药敏、毒力和致病力等方面与 SCHP 相比存在较大差异。2021 年 7 月开始, 该院检出一种新型 SIHP, 现将新型 SIHP 菌株的微生物学特征报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 11 株新型 SIHP 和随机匹配的 33 株 SCHP, 分离自 2021 年 7 月至 2023 年 7 月安徽医科大学第二附属医院患者的呼吸道、肠道、尿道、血液、皮肤和感染组织等(剔除同一患者相同部位的标本), 经过 VITEK 2 GP 鉴定卡、Microflex LT MALDI-TOF 质谱分析仪和 16S rRNA 扩增测序, 3 种方法共同鉴定确认为金黄色葡萄球菌。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(ATCC29213、ATCC25923、ATCC29212 和表皮葡萄球菌)来自安徽医科大学第二附属医院检验科微生物室。

1.1.2 主要试剂和仪器 冻干兔血浆(青岛海博生物技术有限公司); 冰醋酸(上海麦克林生化科技股份有限公司); 0.22 μm 的除菌滤器(美国密理博公司); 3% 过氧化氢溶液(山东瑞泰奇洗涤消毒科技有限公司); 液氮研磨管(上海净信实业发展有限公司); 96 孔平底无菌微孔板和 96 孔圆底无菌微孔板(美国康宁公司); 哥伦比亚绵羊血琼脂平板(BAP)和结晶紫染液(合肥天达诊断试剂有限公司); VITEK 2 GP 鉴定卡和 AST-GP639 药敏卡(法国生物梅里埃公司); Luria-Bertani (LB) 肉汤、戊二醛溶液、基因引物和细菌总 RNA 快速抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司); ToloScript RT EasyMix 荧光定量 PCR 逆转录试剂盒和 SYBR Green Master mix 荧光定量 PCR 预混试剂盒(上海吐露港生物科技有限公司)。Microflex LT MALDI-TOF 质谱仪(德国布鲁克公司); 冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司); Spectra max i3x 多功能酶标仪(美国美谷分子仪器公司); 麦氏比浊仪和

VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪(法国生物梅里埃公司); NanoDrop 超微量分光光度计和 QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔公司)。

1.2 方法

1.2.1 溶血表型检测 将经过复苏的菌株, 调整菌液浓度至 1.0 麦氏浊度。在 BAP 上, 采用三点接种法, 依次接种 0.5 μl 菌液。35 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 20 h, 随后 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 20 h。拍照记录冷藏前后菌落周围溶血区的变化。

1.2.2 药敏检测 将复苏后的菌株, 按照 VITEK-2 Compact 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。依据美国临床实验室标准化协会制订的标准(CLSI M100-S29) 判断药敏结果。其中, 以苯唑西林最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC) $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 或头孢西丁 MIC $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, 判定为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。

1.2.3 血浆凝固酶活性检测 取 800 μl 金黄色葡萄球菌的 LB 肉汤过夜培养物, 加入含有冻干兔血浆的西林瓶。轻轻摇动瓶身混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。每 30 min 观察 1 次, 合计 6 h。观察时, 将西林瓶缓慢倾斜或倒置, 判断内容物的凝固状态。根据凝块体积($V_{\text{凝块}}$) 占内容物总体积($V_{\text{内容物}}$) 的比例, 将血浆凝固酶活性分为: 阴性[(-), 内容物不凝固]、弱阳性[(\pm), $V_{\text{凝块}} < 1/2 V_{\text{内容物}}$]、阳性[(+), $1/2 V_{\text{内容物}} \leq V_{\text{凝块}} < V_{\text{内容物}}$] 和强阳性[(++), $V_{\text{凝块}} = V_{\text{内容物}}$]。ATCC29213 和 ATCC25923 为阳性对照。表皮葡萄球菌为阴性对照。

1.2.4 触酶活性检测 用无菌接种环挑取适量菌体, 涂抹在洁净载玻片上。之后, 加 2 滴 3% 双氧水, 30 s 内观察有无气泡产生。如果肉眼可见气泡生成, 则菌株触酶阳性。反之, 菌株触酶阴性。ATCC29213 和 ATCC25923 为阳性对照。ATCC29212 为阴性对照。

1.2.5 溶血素基因 mRNA 水平检测 根据 GenBank 中收录的金黄色葡萄球菌四种溶血素基因(*hla*、*hlb*、*hlc*、*hld*) 和管家基因(*gyrB*) 的 DNA 序列, 利用 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> 设计上下游引物(表 1)。引物合成由上海生工公司完成。液氮研磨法破碎金黄色葡萄球菌细胞壁。按照上海生工细菌总 RNA 快速抽提试剂盒说明书, 提取金黄色葡萄球菌 RNA。利用 NanoDrop

表1 引物名称及序列

Tab. 1 The primer names and corresponding sequences

Gene	GenBank number	Forward sequence	Reverse sequence	Product (bp)
<i>hla</i>	KT279561	TGGTTTAGCCTGGCCTTCAG	ATTTGCACCAATAAGGCCCGC	190
<i>hlb</i>	EF690812	GGGGCAATATAAACGCGCTG	CTGATTGAGAACGGCCGAGT	167
<i>hlc</i>	D42143	TTGCACAAGACCCAACCTGCT	AGCATCCATGTTTCTGCCGT	173
<i>hld</i>	AB043555	GGAAGGAGTGATTCAATGGCA	AGTGAATTTGTTCACCTGTGTCG	88
<i>gyrB</i>	M86227	ACGAAGGTGCTACGCATGAA	TGTACCTGCCACTTGTGGAT	278

超微量分光光度计,测定 RNA 纯度和浓度。将各金黄色葡萄球菌的总 RNA 浓度调节一致,并按照逆转录试剂盒的要求逆转录为 cDNA。按照实时荧光定量 PCR 试剂盒的步骤,分别加入目的基因引物、cDNA、专用预混液和水。设置反应条件如下:预变性 95 °C 30 s,变性 95 °C 10 s,退火延伸 60 °C 30 s,实时监测荧光量 40 个循环。每个基因设置 3 个复孔,重复检测 3 次。以 *gyrB* 为内参,2^{-ΔΔC_T}法评估 *hla*、*hlb*、*hlc* 和 *hld* mRNA 的相对水平。

1.2.6 红细胞毒性检测 金黄色葡萄球菌菌株接种 LB 肉汤,37 °C 过夜培养。7 000 r/min 离心 10 min、滤过除菌,获取无菌发酵上清液 (cell-free supernatant, CFS)。将各菌株 100 μl CFS 原液、1:1 (原液/PBS) 稀释液、1:3 稀释液和 1:7 稀释液,依次加入 96 孔圆底无菌微孔板中。然后,加入 1% 洗涤人红细胞悬液,100 μl/孔,轻轻混匀。37 °C 孵育 15 h,1 400 r/min 离心 5 min,分离出孵育上清液。将孵育上清液对应转移到 1 个新的 96 孔平底无菌微孔板中,100 μl/孔。使用美谷分子 Spectra max i3x 多功能酶标仪,以 570 nm 和 600 nm 双波长,测定各孔吸光度值 (optical density, OD)。阴性对照孔加入 100 μl 生理盐水和 100 μl 1% 洗涤人红细胞悬液;阳性对照孔加入 100 μl 超纯水和 100 μl 1% 洗涤人红细胞悬液。

1.2.7 生物膜形成能力检测 采用微孔板成膜结晶紫染色法检测生物膜形成能力^[12]。使用 LB 肉汤,将各菌株的过夜培养物稀释至 1 × 10⁶ CFU/ml,加入 96 孔平底无菌微孔板中,200 μl/孔。每个菌株设置 5 个平行孔,37 °C 孵育 36 h。去除培养孔内上清液,用无菌水洗涤 3 次,以去除松散附着细菌。每孔加入 200 μl 2.5% 戊二醛,反应 30 min,以固定生物膜。去除固定液,用无菌水洗涤 3 次。干燥后,加入 0.2% (wt/vol) 结晶紫溶液,200 μl/孔,染色 15 min。去除染液,用无菌水洗涤,直至洗液清晰。将 96 孔板倒置晾干,拍照。随后,加入 30% 醋酸溶液,200 μl/孔,静置 20 min,使进入生物膜的染料完全

溶解。使用美谷分子 Spectra max i3x 多功能酶标仪,测定各孔 OD₅₈₅。阴性对照孔加入 200 μl LB 肉汤。根据文献^[13]报道,生物膜形成的吸光度 cut-off 值 (OD_c) 为阴性对照孔吸光度值的两倍。基于各孔的 OD₅₈₅ 值,将菌株分为非生物膜形成菌 (OD₅₈₅ < OD_c)、弱生物膜形成菌 (OD_c ≤ OD₅₈₅ < 2OD_c) 和强生物膜形成菌 (OD₅₈₅ ≥ 2OD_c)。

1.2.8 生长曲线监测 微量培养法对菌株的生长动力学进行监测^[14]。使用 LB 肉汤,将各菌株的过夜培养物稀释至 1 × 10⁶ CFU/ml,加入 96 孔平底无菌微孔板中,200 μl/孔。每个菌株设置 2 个平行孔,37 °C 孵育。使用美谷分子 Spectra max i3x 多功能酶标仪,定时监测各孔的 OD₆₀₀。使用 Origin 2021 软件绘制生长曲线。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。多组之间比较采用单因素方差分析或非参数检验,两组样本间比较采用 LSD 检验、Kruskal-Wallis 检验、Mann-Whitney 检验或独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血琼脂平板上金黄色葡萄球菌的溶血表型

35 °C 孵育 20 h 后,SCHP 菌落周围出现双层完全溶血环,其内层稍小、透明、边缘清晰,外层较大、半透明、边缘模糊;4 °C 冷藏后,溶血环尺寸稍有增大 (图 1A)。相比之下,新型 SIHP 菌落周围有一个较大、半透明、边缘清晰的不完全溶血环,两个相邻菌落的不完全溶血环之间会形成一个线性溶血增强区;冷藏后,溶血环不仅尺寸稍有增大,而且分层 (图 1B)。新型 SIHP 菌株与 SCHP 菌株的溶血表型差异显著。ATCC29213 菌落周围的溶血环特征类似于 SCHP,只是各阶段溶血环尺寸稍小 (图 1C)。ATCC25923 菌落周围出现双层溶血环,其内层是一个很小、透明、边缘清晰的完全溶血环,外层是一个较大、暗淡、边缘清晰的不完全溶血环;冷藏后,溶血环尺寸稍有

增大(图 1D)。

2.2 新型 SIHP 和 SCHP 的耐药性分析 新型 SIHP 菌株与 SCHP 菌株对 15 种抗生素的耐药率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。如图 2 所示,新型 SIHP 菌株对青霉素(90.91%)、苯唑西林(45.45%)、庆大霉素(9.09%)、左氧氟沙星(9.09%)、莫西沙星(9.09%)、克林霉素(45.45%)和复方磺胺甲噁唑(18.18%)的耐药率高于 SCHP 菌株(84.85%、27.27%、3.03%、6.06%、6.06%、36.36% 和 6.06%)。其余 8 种抗生素,二者间耐药率差异无统计学意义。

2.3 血浆凝固酶活性 ATCC29213(+ +), ATCC25923(+ +),表皮葡萄球菌(-)。11 株新型 SIHP 菌株中,2 株(+),9 株(+ +)。33 株 SCHP 菌株中,11 株(-),5 株(±),2 株(+),15 株(+ +)。新型 SIHP 菌株的血浆凝固酶活性强于 SCHP 菌株,差异有统计学意义($Z = -2.454, P = 0.014$)。

2.4 触酶活性 SCHP 菌株与新型 SIHP 菌株的触酶活性检测结果均呈阳性反应。

2.5 溶血素基因 mRNA 水平 以 ATCC25923 的四种溶血素 mRNA 表达水平作为参照,分别计算

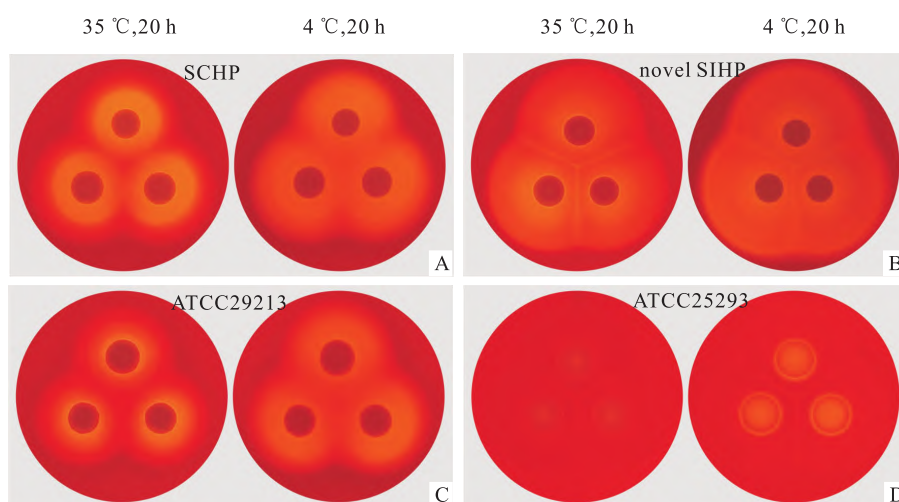


图 1 金黄色葡萄球菌在哥伦比亚绵羊 BAP 上的溶血表型

Fig.1 Hemolytic phenotype of *Staphylococcus aureus* on Colombian sheep blood agar plates

A: Hemolytic phenotype of SCHP on BAP; B: Hemolytic phenotype of novel SIHP on BAP; C: Hemolytic phenotype of ATCC29213 on BAP; D: Hemolytic phenotype of ATCC25923 on BAP

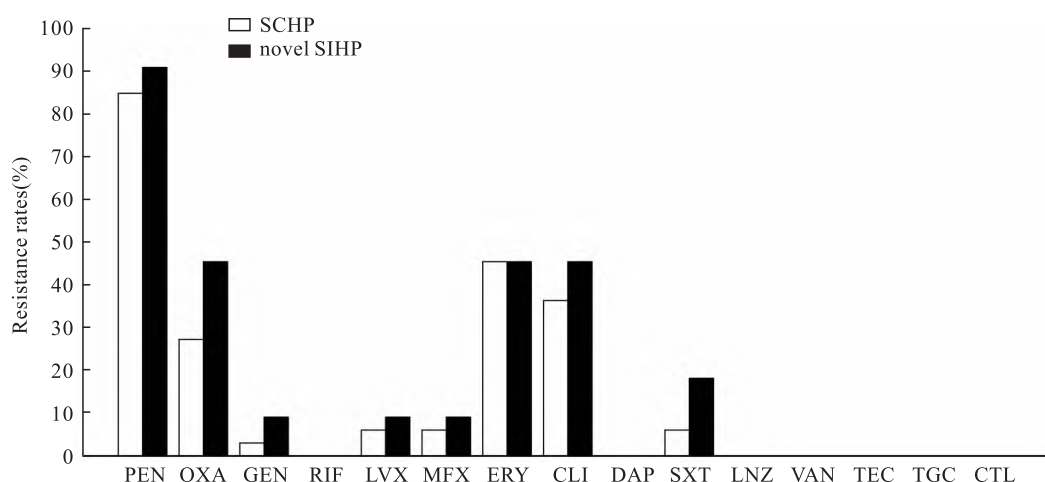


图 2 SCHP 和新型 SIHP 对 15 种常用抗生素的耐药率对比

Fig. 2 Comparison of resistance rates between SCHP and novel SIHP to 15 commonly used antibiotics

PEN: penicillin; OXA: oxacillin; GEN: gentamicin; RIF: rifampicin; LVX: levofloxacin; MFX: moxifloxacin; ERY: erythromycin; CLI: clindamycin; DAP: daptomycin; SXT: trimethoprim/sulfa-methoxazole; LNZ: linezolid; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; TGC: tigecycline; CTL: ceftaroline.

SCHP 菌株、新型 SIHP 菌株和 ATCC29213 的 *hla*、*hlb*、*hlc* 和 *hld* mRNA 相对表达量。结果如图 3 所示,各金黄色葡萄球菌菌株间 *hla* mRNA 相对表达量差异无统计学意义。新型 SIHP 菌株的 *hlb* mRNA 相对表达量低于 ATCC25923 ($P < 0.001$), *hlc* mRNA 相对表达量高于 SCHP 菌株 ($P = 0.009$), *hld* mRNA 相对表达量低于 ATCC29213 ($P < 0.001$)。SCHP 菌株的 *hlb* mRNA 相对表达量低于 ATCC25923 ($P < 0.001$), *hlc* mRNA 相对表达量低于 ATCC29213 ($P = 0.027$) 和 ATCC25923 ($P < 0.001$), *hld* mRNA 相对表达量低于 ATCC29213 ($P = 0.008$)。ATCC29213 的 *hlb* mRNA 相对表达量低于 ATCC25923 ($P < 0.001$), *hld* mRNA 相对表达量高于 ATCC25923 ($P = 0.001$)。

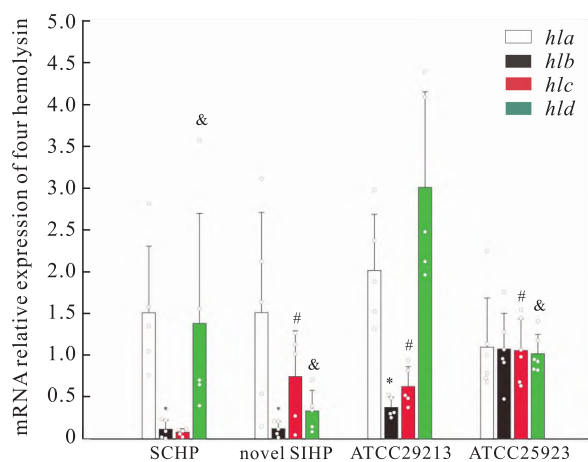


图3 金黄色葡萄球菌四种溶血素 mRNA 的相对表达量比较

Fig. 3 Relative expression level of mRNA of the four hemolysins in *Staphylococcus aureus*

hla: α -hemolysin gene; *hlb*: β -hemolysin gene; *hlc*: γ -hemolysin gene; *hld*: δ -hemolysin gene; # $P < 0.05$ vs SCHP; & $P < 0.05$ vs ATCC29213; * $P < 0.05$ vs ATCC25923

2.6 溶血毒性 新型 SIHP 菌株的 CFS 原液对红细胞溶血的溶血毒性明显强于 SCHP 菌株,差异有统计学意义 ($t = -3.941$, $P = 0.004$),见图 4A。将 CFS 原液用 PBS 1:1 稀释后,新型 SIHP 菌株对红细胞的溶血毒性仍然强于 SCHP 菌株 ($t = -2.750$, $P = 0.025$),见图 4B。将 CFS 原液用 PBS 1:3 和 1:7 稀释后,新型 SIHP 菌株对红细胞的溶血毒性与 SCHP 菌株相比,差异无统计学意义,见图 4C、4D。

2.7 生物膜形成能力 如图 5A 所示,60% 新型 SIHP 菌株属于强生物膜形成菌。相比之下,

ATCC29213、ATCC25923 以及全部 SCHP 菌株属于弱生物膜形成菌。SCHP 菌株的生物膜形成能力弱于新型 SIHP 菌株 ($P < 0.001$) 和 ATCC29213 ($P = 0.008$)。新型 SIHP 菌株的生物膜形成能力强于 ATCC25923 ($P = 0.004$)。

2.8 生长曲线 SCHP 菌株、新型 SIHP 菌株、ATCC29213 和 ATCC25923 的生长曲线各有特点(图 5B)。12 h 之前的 SCHP 菌株和 ATCC25923,以及 10 h 之前的新型 SIHP 菌株和 ATCC29213,对数期生长曲线高度相似。后两者的生长速率快于前两者。30 h 左右的 ATCC29213 和 ATCC25923,以及 SCHP 菌株和新型 SIHP 菌株,稳定期生长曲线高度相似。前两者的菌体数量大于后两者。

3 讨论

金黄色葡萄球菌持续或反复性感染机体后,会在免疫系统和抗生素的压力下,产生小菌落变异 (small colony variants, SCVs)^[15]。与亲本菌株相比,SCVs 菌株在 BAP 上,生长缓慢、无色或色素生成明显减少,溶血明显减弱甚至不溶血。然而,这种改变是一个过程,其中必然会有过渡态菌株的产生,其结果也不一定是 SCVs。金黄色葡萄球菌主要分泌 α 、 β 、 γ 和 δ 四种溶血素。研究^[16-19]表明,亚抑菌浓度抗生素会影响 α -溶血素的表达,导致其产量降低(大环内酯类、氨基糖苷类、克林霉素、夫西地酸)、轻微增加(氟喹诺酮类)或明显增加(β -内酰胺类)。此外,亚抑菌浓度的环丙沙星或甲氧苄啶可以通过去除 *hla*-前噬菌体,促进 β -溶血素的表达^[20-21]。尽管未见 γ -溶血素和 δ -溶血素的相关研究,但是可以推测,它们的表达大概率也会受到亚抑菌浓度抗生素的影响。由此可见,临床标本中分离出多样溶血表型金黄色葡萄球菌有其合理性和必然性,四种溶血素的差异性表达是根本原因。安徽医科大学第二附属医院检出的新型 SIHP,在血琼脂平板上的溶血表型独特,具有很强的辨识度。与 SCHP 菌株相比,新型 SIHP 菌株的溶血素基因表达谱不同,对青霉素、苯唑西林、庆大霉素、左氧氟沙星、莫西沙星、克林霉素和复方磺胺甲噁唑的耐药率更高,这也印证了其亲本菌株的演化历程。

金黄色葡萄球菌感染的严重程度受菌体表面相关毒力因子、外毒素和胞外酶等多种毒力因子的影响^[22]。其中,溶血素除了传统的溶血功能之外,还能够损伤白细胞,抑制免疫反应,促进生物膜形成,导致细胞坏死或凋亡^[23]。血浆凝固酶能使血液中

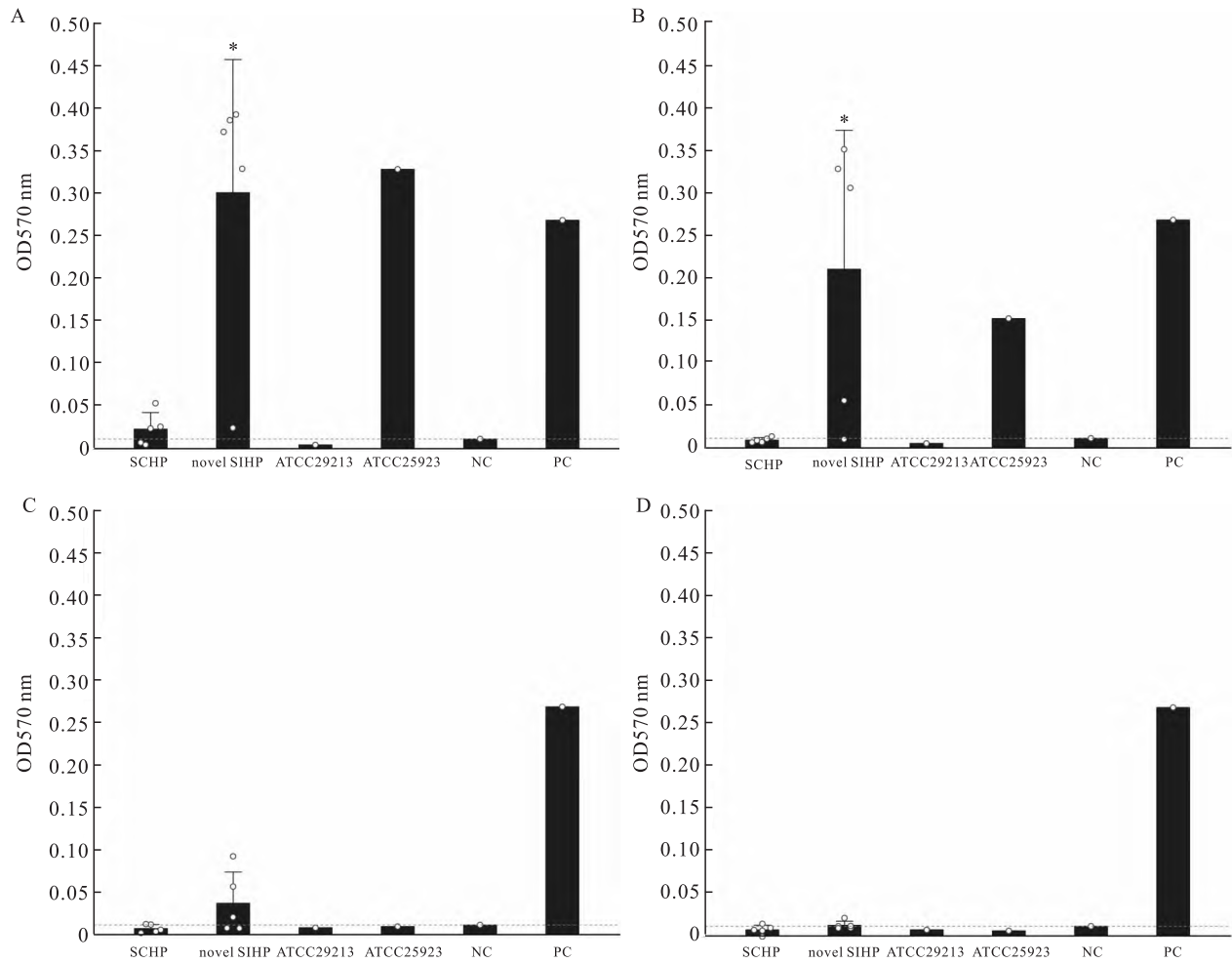


图4 金黄色葡萄球菌 CFS 原液及其稀释液对人红细胞的溶血毒性对比

Fig.4 Hemolytic toxicity of *Staphylococcus aureus* (CFS and its dilution) on human red blood cells

A: Hemolytic toxicity of 100 µl CFS on human red blood cells; B: Hemolytic toxicity of 100 µl CFS dilution (1 : 1) on human red blood cells; C: Hemolytic toxicity of 100 µl CFS dilution (1 : 3) on human red blood cells; D: Hemolytic toxicity of 100 µl CFS dilution (1 : 7) on human red blood cells; NC: Negative control; PC: Positive control; * $P < 0.05$ vs SCHP

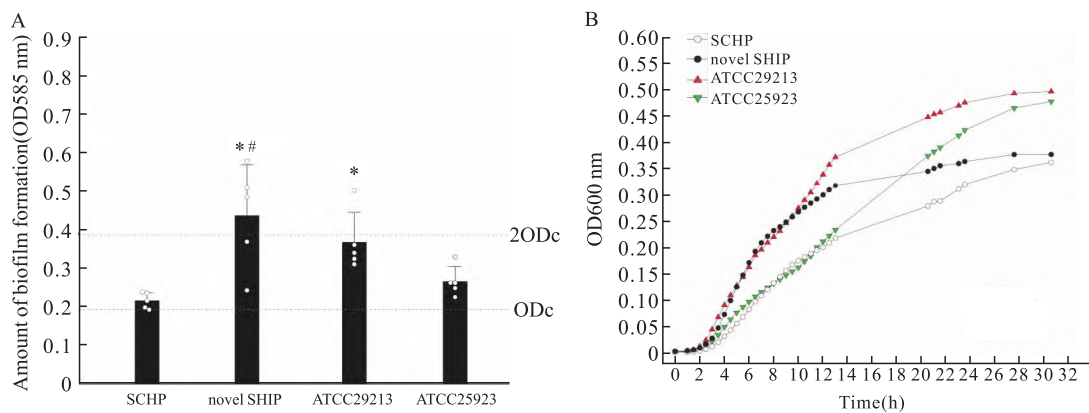


图5 金黄色葡萄球菌的生物膜形成能力和生长曲线

Fig.5 The biofilm formation ability and growth curve of *Staphylococcus aureus*

A: The biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus*; * $P < 0.05$ vs SCHP; # $P < 0.05$ vs ATCC25923; B: The growth curve of *Staphylococcus aureus*

的纤维蛋白原变为不溶性纤维蛋白,形成凝块包裹菌体,从而阻碍吞噬细胞的吞噬。生物膜是由多糖细胞间黏附素、胞外 DNA、蛋白质和淀粉样纤维构成的多层膜样聚合物,可以大幅增强细菌的抗吞噬能力、黏膜表面定植能力和耐药性^[24-25]。本研究结果显示,与 SCHP 菌株相比,新型 SIHP 菌株不仅具有更强的溶血毒性、血浆凝固酶活性和生物膜形成能力,而且对数期生长更快。因此,新型 SIHP 菌株具有更强的致病性。

综上所述,新型 SIHP 菌株的微生物学特征有别于常见的典型 SCHP 菌株,临床上应予以关注。由于菌株数量和来源有限,所述结果需要多中心、更大样本量的研究加以验证。

参考文献

- [1] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1): 15 - 31.
- [1] China Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antimicrobial resistance of bacteria: surveillance report from China Antimicrobial Resistance Surveillance System in 2014 - 2019 [J]. Chin J Infect Control, 2021, 20(1): 15 - 31. doi:10.12138/j.issn.1671-9638.20216170.
- [2] 全国细菌耐药监测网. 2020 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(2): 122 - 36. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20211118-00721.
- [2] China Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2020 national antimicrobial resistance surveillance report [J]. Chin J Lab Med, 2022, 45(2): 122 - 36. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20211118-00721.
- [3] 全国细菌耐药监测网. 2021 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(6): 566 - 81. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20230119-00040.
- [3] China Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2021 national antimicrobial resistance surveillance report [J]. Chin J Lab Med, 2023, 46(6): 566 - 81. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20230119-00040.
- [4] 廖晚珍. 首次发现“网状样” β -溶血的金黄色葡萄球菌[C]//中国微生物学会临床微生物学专业委员会. 第六届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛论文汇编. 长沙: 出版者不详, 2015:104.
- [4] Liao W Z. First discovery of reticulate β -hemolytic *Staphylococcus aureus* [C]. Clinical Microbiology Professional Committee of the Chinese Society of Microbiology. Proceedings of the Microbiology and Immunology Forum of the 6th China Clinical Microbiology Conference. Changsha: [s. n.], 2015:104.
- [5] Zhang H, Zheng Y, Gao H, et al. Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* strains with an incomplete hemolytic phenotype [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6: 146. doi:10.3389/fcimb.2016.00146.
- [6] 郑毅, 谢小芳, 杜鸿, 等. 不完全溶血型金黄色葡萄球菌溶血素及毒力等相关基因的研究[J]. 中华临床感染病杂志, 2016, 9(3): 236 - 42. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2016.03.006.
- [6] Zheng Y, Xie X F, Du H, et al. Analysis of the hemolysin and virulence-related genes of incomplete hemolytic *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Clin Infect Dis, 2016, 9(3): 236 - 42. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2016.03.006.
- [7] 崔林全, 梁艳. 双溶血环金黄色葡萄球菌的菌落特征及其对抗菌药物的敏感性分析[J]. 中国保健营养, 2016, 26(7): 312.
- [7] Cui L Q, Liang Y. Colony characteristics of double hemolytic *Staphylococcus aureus* and its sensitivity analysis of antimicrobial agents [J]. China Health Care Nutrition, 2016, 26(7): 312.
- [8] 刘美清, 兰英, 蔡曼, 等. 双溶血环金黄色葡萄球菌的菌落特征与药物敏感性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(9): 1921 - 3. doi:10.11816/cn.ni.2016-151906.
- [8] Liu M Q, Lan Y, Cai M, et al. Colony features and drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* with double hemolytic rings [J]. Chin J Nosocomiol, 2016, 26(9): 1921 - 3. doi:10.11816/cn.ni.2016-151906.
- [9] Gao M, Sang R, Wang G, et al. Association of pvl gene with incomplete hemolytic phenotype in clinical *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 1649 - 56. doi:10.2147/IDR.S197167.
- [10] 梁颖, 卢一, 刘玉磊, 等. 双溶血环金黄色葡萄球菌导致严重脓毒症一例[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(9): 1046 - 9. doi:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.09.020.
- [10] Liang Y, Lu Y, Liu Y L, et al. A case of severe sepsis caused by *Staphylococcus aureus* with double hemolytic rings [J]. Chin J Emerg Med, 2018, 27(9): 1046 - 9. doi:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.09.020.
- [11] Pérez V, Custódio D, Silva E, et al. Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil [J]. Braz J Microbiol, 2020, 51(4): 2111 - 22. doi:10.1007/s42770-020-00363-5.
- [12] Bernal-Bayard J, Thiebaud J, Brossaud M, et al. Bacterial capsular polysaccharides with antibiofilm activity share common biophysical and electrokinetic properties [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2553. doi:10.1038/s41467-023-37925-8.
- [13] Tang J, Kang M, Chen H, et al. The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria [J]. Sci China Life Sci, 2011, 54(9): 863 - 9. doi:10.1007/s11427-011-4195-5.
- [14] Hu X, Jiang S, Xu F, et al. Engineering and functional analysis of yeast with a monotypic 40S ribosome subunit [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(6): e2114445119. doi:10.1073/pnas.2114445119.
- [15] Atalla H, Gyles C, Mallard B. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease [J]. Anim Health Res Rev, 2011, 12(1): 33 - 45. doi:10.1017/S1466252311000065.

- [16] Moneib N A, Shibl A M, el-Said M A, et al. Macrolides induced suppression of virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* [J]. *J Chemother*, 1993, 5 (5): 289 – 92. doi:10.1080/1120009x.1993.11739246.
- [17] Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller K P, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(11): 2817 – 23. doi:10.1128/AAC.42.11.2817.
- [18] Worlitzsch D, Kaygin H, Steinhuber A, et al. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(1): 196 – 202. doi:10.1128/AAC.45.1.196 – 202.2001.
- [19] Kernodle D S, McGraw P A, Barg N L, et al. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin *in vitro* induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model [J]. *J Infect Dis*, 1995, 172(2): 410 – 9. doi:10.1093/infdis/172.2.410.
- [20] Goerke C, Köller J, Wolz C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(1):171 – 7. doi:10.1128/AAC.50.1.171 – 177.2006.
- [21] Rohmer C, Wolz C. The role of *hly*-converting bacteriophages in *Staphylococcus aureus* host adaption [J]. *Microb Physiol*, 2021, 31(2): 109 – 22. doi:10.1159/000516645.
- [22] Grumann D, Nübel U, Bröker B M. *Staphylococcus aureus* toxins—their functions and genetics [J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 21: 583 – 92. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.013.
- [23] Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2: 12. doi:10.3389/fcimb.2012.00012.
- [24] Foster T J, Geoghegan J A, Ganesh V K, et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(1):49 – 62. doi:10.1038/nrmicro3161.
- [25] McCarthy H, Rudkin J K, Black N S, et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 5: 1. doi:10.3389/fcimb.2015.00001. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2024.09

Characterization of *Staphylococcus aureus* strains with novel incomplete hemolytic phenotype

Tang Wei^{1,2}, Leng Guiyun¹, Gao Ju¹, Wang Yawu¹, Yao Jie¹, Zhou Qiang¹, Xu Yuanhong²

¹*Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;*

²*Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)*

Abstract Objective To explore the microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) with novel incomplete hemolytic phenotype (SIHP). **Methods** Hemolytic phenotypes were detected and categorized by using the three-point inoculation method. A total of 11 novel SIHP and 33 randomly matched *S. aureus* with complete hemolytic phenotype (SCHP) were included. Antibiotic susceptibility test was performed using broth microdilution method. Coagulase test was performed with freeze-dried rabbit plasma. Catalase activity was detected by slide catalase test. Expression of hemolysin genes was detected by qRT-PCR. Toxicity to human red blood cells was assessed by microplate method. Microplate biofilm formation was measured using crystal violet staining method. Growth kinetic determination was performed through microcultivation assay. **Results** Compared with SCHP, the expression profiles of the four hemolysin genes (*hla*, *hly*, *hlc*, and *hld*) in the new SIHP were different. The new SIHP had higher resistance rates to penicillin, oxacillin, gentamicin, quinolones, clindamycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Furthermore, the new SIHP had stronger hemolytic toxicity, plasma coagulase activity, and biofilm formation ability. Additionally, the new SIHP grown faster in the logarithmic phase. **Conclusion** Taken together, the microbiological characteristics of the new SIHP are different from those of SCHP, including stronger antibiotic resistance and pathogenicity, which should be paid more attention by clinicians.

Key words *Staphylococcus aureus*; hemolysin; hemolytic phenotype; microbiological characteristics; antibiotic resistance; pathogenicity

Fund program National Natural Science Foundation of China(No. 82102460)

Corresponding authors Zhou Qiang, E-mail: zhouqiang1973@163.com; Xu Yuanhong, E-mail: xyhong1964@163.com