

4 株 CAMP 阴性无乳链球菌的全基因组测序分析

王秀,姚杰,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 探讨 4 株 CAMP 阴性无乳链球菌(*S. agalactiae*)的全基因组测序分子特征。方法 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)筛选可疑菌株。对于确认为 *S. agalactiae* 的菌株,进一步开展 CAMP 试验。针对 CAMP 阴性菌株,利用 MGI DNBSEQ-T7 和 MinION Flow Cell 测序平台进行全基因组测序。测序结果重点分析多位点序列分型(MLST)、毒力基因和耐药基因。采用全自动 Phoenix M50 药敏仪对 CAMP 阴性菌株进行药敏检测。结果 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 被纳入研究。全基因组测序分析显示,4 株 CAMP 阴性菌株均为 ST862 型;携带 22 种与荚膜多糖、 β -溶血素和透明质酸酶相关的毒力基因,以及 7 种与大环内酯类、林可酰胺类、多肽类和氨基糖苷类相关的耐药基因。药敏结果显示,4 株 CAMP 阴性菌株对青霉素 G、头孢吡肟、头孢噻肟、万古霉素、利奈唑胺、左氧氟沙星、莫西沙星和氯霉素均敏感;其中 3 株对红霉素耐药;1 株对克林霉素耐药。结论 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 均为 ST862 型,携带多种毒力基因及耐药基因,对红霉素耐药率高,应引起临床重视。

关键词 无乳链球菌;CAMP 阴性;全基因组测序;多位点序列分型;毒力基因;耐药基因

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0707-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.017

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, *S. agalactiae*),也称 B 族链球菌(Group B *Streptococcus*, GBS),是人类胃肠道和生殖道常见定殖菌。当宿主抵抗力下降,可能会引起多种侵袭性感染^[1],包括菌血症、肺炎、尿路感染和皮肤/软组织感染等,是高危人群(孕妇、新生儿、老年人等)发病和死亡的主要原因之一。*S. agalactiae* 产生的 CAMP 因子具备增强金黄色葡萄球菌 β -溶血素溶解红细胞能力的特性,在两菌交界处发生共溶血的 CAMP 现象,是临床鉴定 *S. agalactiae* 的经典试验^[2]。文献^[3]曾报道有学者分离出牛源性 CAMP 阴性 *S. agalactiae*,但直到临床实验室 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的陆续报道^[4-6],才引起了学者的广泛关注。然而,目前已有的研究^[7-9]大多集中在分子检测漏检的原因剖析。针对 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 分子特征的研究,目前国内鲜见报道。该研究采用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)鉴定菌株。进一步利用 CAMP 试验筛选出 CAMP 阴性 *S. agalactiae*,对筛选出菌株进行全基因组测序(whole genome sequencing, WGS),旨在为今后流行病学的研究积累一定实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 CAMP 阴性菌株的来源及鉴定 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae*,编号 9A、41B、44C、76D,分离自 2023 年 5 月—2023 年 12 月在安徽医科大学第二附属医院临床常规送检样本。由 MALDI-TOF MS 鉴定为 *S. agalactiae*。对照菌株(金黄色葡萄球菌 ATCC25923、屎肠球菌 ATCC29212、*S. agalactiae* ATCC13813 和肺炎链球菌 ATCC49619)来自该院微生物室。

1.1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF MS(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(上海太仓沪试剂有限公司);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(合肥天达诊断试剂有限公司);细菌全基因组提取试剂盒(德国迈纳德公司);NanoDrop 超微量分光光度计(美国赛默飞世尔公司);MGI DNBSEQ-T7 测序仪(深圳华大智造科技股份有限公司);MinION Flow Cell 测序

2024-12-25 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82102460);安徽医科大学校科研基金项目(编号:2021xkj050)

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

仪(英国牛津纳米孔技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MALDI-TOF MS 检测 挑取单个纯菌落点涂在 96 孔的靶板上,滴加 1 μ l 70% 甲酸,待干燥后,再滴加 1 μ l 基质溶液,菌落干燥后,上机检测,形成特征性的质量图谱,其横坐标为离子质荷比,纵坐标为离子峰,与数据库参考图谱比较,分值 ≥ 2.000 表明菌株鉴定具有高置信度。

1.2.2 CAMP 试验 挑取金黄色葡萄球菌 ATCC25923 在血平板中央划一横线,随后垂直接种 *S. agalactiae*,两者相距 0.5~1.0 cm。35 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后,观察垂直交界处溶血现象。出现溶血加强区,CAMP 阳性;反之,CAMP 阴性。屎肠球菌 ATCC29212 为阴性对照,*S. agalactiae* ATCC13813 为阳性对照。

1.2.3 全基因组测序及分析 按照 NucleoBond[®] HMW DNA 试剂盒的操作步骤,对 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的基因组 DNA 进行提取。提取完成后,利用 NanoDrop 超微量分光光度计测定 DNA 浓度和纯度,通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。测定合格后进行高通量测序与信息分析。文库制备包括基因组 DNA 片段化、末端补齐、3'端加 A、测序接头连接、PCR 扩增与纯化产物等步骤。基因组测序采用 MGI DNBSEQ-T7 和 MinION Flow Cell 测序平台。数据处理环节,使用 Canu 等软件对原始读数的修整和组装。利用 nextpolish (v1.4.1) 和 Pilon (v1.18) 对基因组序列校对。基因分析方面,利用综合抗生素耐药性数据库(The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)分析耐药基因。应用毒力因子数据库(Virulence Factors Of Pathogenic Bacteria, VFDB)解析毒力基因。通过对 7 对管家基因(adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK, tkt)^[10] 测序和序列比对,对菌株进行多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)。

1.2.4 药物敏感性试验 遵循 Phoenix M50 全自动微生物鉴定药敏仪操作要求,运用微量肉汤稀释法,对 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 进行药敏试验。试验过程,选用肺炎链球菌 ATCC49619 作为质控菌株。试验结果判读,严格按照美国临床实验室标准化协会制订的标准(CLSI M100-S29)。

1.2.5 CAMP 阳性标准菌株 *S. agalactiae* ATCC13813 基因组分析 通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的

“Genomes”数据库,搜索 *S. agalactiae* ATCC13813 的基因组序列,完成序列检索后,重点分析耐药基因和毒力基因。

2 结果

2.1 菌株鉴定 经 MALDI-TOF MS 鉴定,菌株的鉴定分值均 ≥ 2.000 ,该分值区间对应的鉴定结果具有高度的准确性与可靠性,见表 1。

表 1 菌株鉴定
Tab.1 Strain identification

Strain numbers	CAMP test	Log score values
9A	Negative	2.323
41B	Negative	2.215
44C	Negative	2.129
76D	Negative	2.304

2.2 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的 CAMP 试验结果

35 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后,观察两种菌生长线垂直交界处的溶血现象,见图 1。与 CAMP 阳性标准菌株 *S. agalactiae* ATCC13813 相比,菌株(B1、B2)在两菌交界处溶血加强区较小,但仍存在溶血增强效应,CAMP 试验阳性。相比之下,菌株(9A、41B、44C、76D)在两菌交界处完全未出现溶血加强区,CAMP 试验阴性。

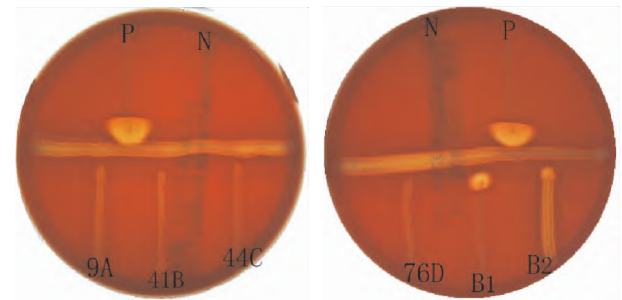


图 1 *S. agalactiae* 的 CAMP 试验结果

Fig.1 The CAMP test of results *S. agalactiae*

9A,41B,44C,76D: CAMP-negative *S. agalactiae*; B1, B2: CAMP-positive *S. agalactiae*; P: *S. agalactiae* (ATCC13813); N: *Enterococcus faecalis* (ATCC29212)。

2.3 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的 MLST 分型结果

在完成全基因组测序后,针对 7 对管家基因展开序列比对分析,通过网站(<https://github.com/tseemann/mlst>)数据查询,最终判定 4 株均为 MLST 分型 ST862 型。

2.4 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的毒力因子检测结果 运用 BLAST 程序,将 CAMP 阴性 *S. agalactiae*

的基因蛋白序列与 VFDB 数据库进行比对分析。比对时,将基因和其相对应的毒力因子功能注释信息结合起来,得到注释结果。比对结果,仅保留取完全匹配百分比 >90% 的数据。在此筛选条件下,其中 3 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 检测出与荚膜多糖 (capsular polysaccharide, CPS)、溶血素 (beta-hemolysin/cytolysin) 和透明质酸酶 (hyaluronidase, HAase) 相关的共 22 种毒力基因;另外 1 株菌株 76D 除 hylB 基因外,检出 21 种毒力基因。毒力基因对应的毒力因子和毒力基因名称,详见表 2。

表 2 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的毒力基因检测结果

Tab. 2 Toxicity gene detection results of four strains of

CAMP-negative *S. agalactiae*

Virulence factor	Name of virulence gene	VFDB ID
CPS	cpsA cpsL cpsE neuA	VFG001352 VFG001339 VFG001348
	neuC neuB cpsK cpsD	VFG001335 VFG001337 VFG001338
	cpsC neuD cpsF	VFG001340 VFG001349 VFG001350
		VFG001336 VFG001347
Beta-hemolysin/cytolysin	cylI cylJ cylF cylA	VFG005788 VFG005791 VFG005785
	cylB cylD cylG cylK	VFG005776 VFG005779 VFG005764
	aepC cylX	VFG005767 VFG005794 VFG005770
		VFG005761
HAase	hylB	VFG001334

2.5 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的耐药基因测序结果

采用 BLAST 程序,将 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的基因蛋白序列与 CARD 数据库进行比对。为保证结果的准确性和特异性,仅选取完全匹配百分比 >99% 的数据作为比对结果。经此严格筛选,共检测出 7 种耐药基因,具体如下:天然耐药特性的 mprF 基因;介导大环内酯类抗生素耐药的 mreA 基因;导致林可酰胺类抗生素耐药的 lnuB 基因;引发多肽类抗生素耐药的 oprA 基因;以及介导氨基糖苷类抗生素耐药的 vatE、ant(6)-Ia 和 aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia 基因。在所有检测的菌株中,mprF 和 mreA 基因是共同携带的耐药基因。此外,菌株 41B 检出 oprA 和 vatE 基因,菌株 76D 检出 ant(6)-Ia、aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia 和 lnuB 基因。4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的耐药基因所对应的药物耐药表型和耐药机制,详见表 3。

2.6 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的药敏试验结果

4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的药敏结果显示,均对青霉素 G、头孢吡肟、头孢噻肟、万古霉素、利奈唑胺、左氧氟沙星、莫西沙星和氯霉素敏感;耐药性方面,有 1 株对克林霉素耐药,3 株对红霉素耐药,详

见表 4。进一步探究耐药基因与耐药表型的关联时发现,1 株克林霉素耐药株检出 lnuB 基因;3 株红霉素耐药株均检出 mreA 耐药基因;然而,红霉素敏感株 9A 也检出大环内酯类抗生素耐药的 mreA 基因,万古霉素敏感株 41B 却检出多肽类抗生素耐药的 oprA 基因。

表 3 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 的耐药基因检测结果

Tab. 3 Detection results of resistance genes in four strains of CAMP negative *S. agalactiae*

Drug class	Gene name	Resistance mechanism
Macrolide antibiotic/ lincosamide antibiotic	mreA lnuB	Antibiotic efflux
Oxazolidinone antibiotic/phenicolantibiotic	oprA mprF	Antibiotic target alteration
Aminoglycoside antibiotic	ant(6)-Ia aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia vatE	Antibiotic inactivation

表 4 4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 10 种抗菌药物的药敏结果

Tab. 4 Drug sensitivity results of 10 antimicrobial agents for four CAMP-negative *S. agalactiae*

Antibiotic	Results of sensitivity to antibiotics			
	9A	41B	44C	76D
Chloramphenicol	S	S	S	S
Erythromycin	S	R	R	R
Clindamycin	S	S	S	R
Levofloxacin	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	S
Cefotaxime	S	S	S	S
Penicillin G	S	S	S	S
Vancomycin	S	S	S	S
Linezolid	S	S	S	S
Moxifloxacin	S	S	S	S

2.7 CAMP 阳性标准菌株 *S. agalactiae* ATCC13813 耐药基因和毒力基因分析

通过 NCBI 数据库检索该菌的基因组序列,进而开展耐药基因和毒力基因预测分析。耐药基因预测时,将比对结果设定为完全匹配百分比 >99%,检出 mprF 和 mreA 耐药基因。毒力基因预测时,将比对结果阈值调整为完全匹配百分比 >90%,经分析,共检出与 CPS、HAase 以及 CAMP 因子相关的 14 种毒力因子,详见表 5。

3 讨论

S. agalactiae 的致病性,与其毒力基因及其编码蛋白密切相关。其中,CPS 是 *S. agalactiae* 重要的毒力因子之一。CPS 结构赋予菌株光滑的表面,

表5 *S. agalactiae* ATCC13813 的毒力基因检测结果Tab.5 Toxicity gene detection results of *S. agalactiae* ATCC13813

Virulence factor	Name of virulence gene	VFDB ID
CPS	cpsA cpsL neuA	VFG001352 VFG001339 VFG001335
	neuC neuB cpsD	VFG001337 VFG001338 VFG001349
	cpsC neuD cpsF	VFG001350 VFG001336 VFG001347
	cpsB cpsG cpsE	VFG001351 VFG001346 VFG001348
CAMP factor	cfb	VFG001333
HAase	hylB	VFG001334

这一特性有助于抑制中性粒细胞和吞噬细胞的活化,干扰补体防御机制,进而促使 *S. agalactiae* 成功规避宿主免疫系统的识别与攻击,形成免疫逃避现象^[11]。由 hylB 毒力基因编码的 HAase,能够降解结缔组织间质中的透明质酸,破坏结缔组织中的蛋白多糖,促进菌株在机体的扩散。HAase 的活性水平让 *S. agalactiae* 得以逃避子宫的免疫防线,从而使得上行感染以及早产的发生几率显著增加^[12]。cfb 基因编码的 CAMP 因子是成孔毒素,它能裂解宿主红细胞,进而造成机体损伤^[13]。该研究中,CAMP 阳性 *S. agalactiae* 标准菌株 ATCC13813 检出了 CPS 相关的 12 种毒力基因、HAase 相关的 hylB 基因以及 CAMP 因子的 cfb 基因。相较之下,CAMP 阴性 *S. agalactiae* 额外检测出 10 种与 β -溶血素相关的毒力基因。 β -溶血素具有显著的细胞毒活性与高效的抗氧化特性,有助于 *S. agalactiae* 在感染宿主时更好地实现免疫逃避^[11];并且,CAMP 阴性 *S. agalactiae* 也检出 11 种与 CPS 相关的毒力基因和 hylB 基因。因此,CAMP 阴性 *S. agalactiae* 携带的毒力基因在免疫逃避和侵袭感染发挥重要作用,对其在宿主体内生存、扩散以及致病过程中产生不可小觑的影响。

耐药基因是耐药表型产生的遗传学基础。该研究中,CAMP 阳性 *S. agalactiae* 标准菌株 ATCC13813 检出 mreA 耐药基因。与此同时,4 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae*,均检测出介导大环内酯类抗生素耐药的 mreA 基因。然而,其中有 1 株对红霉素敏感。另有 1 株对万古霉素敏感,却检出与多肽类抗生素耐药相关的 oprA 基因。这 2 株均出现耐药基因与对应的耐药表型不一致的情况。造成这种不相符的原因有多种,其中包括基因表达差异,不同菌株在不同环境下,耐药基因的表达水平可能有所不同,从而影响耐药表型的呈现;另外,耐药机制的复杂性也是重要因素,耐药过程往往涉及多种基因和生化途径的相互作用,单一耐药基因的检测并不能完全

反映菌株的实际耐药情况。另外,有 1 株 CAMP 阴性 *S. agalactiae* 检测出 3 种氨基糖苷类耐药基因,研究^[14]表明,这些耐药基因可能通过表达特定的酶类,对氨基糖苷类药物进行修饰,进一步增强菌株对氨基糖苷类药物的耐受能力。基于氨基糖苷类分子本身不易穿透革兰阳性细菌的细胞壁特性,氨基糖苷类药物不被推荐用于 *S. agalactiae* 感染的临床治疗。临床指南^[15]明确指出,青霉素是治疗 *S. agalactiae* 感染的一线首选药物。对青霉素过敏的患者,临床通常会建议采用红霉素作为替代治疗药物。然而,CAMP 阴性 *S. agalactiae* 对红霉素耐药率高,提示临床用药选择时,需充分考虑 *S. agalactiae* 对红霉素的耐药情况,谨慎制定治疗方案。

综上所述,CAMP 阴性 *S. agalactiae* 致病性强,对红霉素耐药率高,临床应予以重视。鉴于菌株数量和来源有限,后续将开展多中心、大样本量的深入研究,对当前结果进行全面且严谨的验证。

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.
- [1] 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.
- [2] 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): 71-4. doi:10.1128/jcm.1.2.171-174.1975.
- [3] Hassan A A, Akineden O, Lämmler 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.
- [4] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.

- [6] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Jones N, Bohnsack J F, Takahashi S, et al. Multilocus sequence typing system for group B Streptococcus[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6): 2530–6. doi:10.1128/JCM.41.6.2530–2536.2003.
- [11] Armistead B, Oler E, Adams Waldorf K, et al. The double life of group B Streptococcus: asymptomatic colonizer and potent pathogen[J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(16): 2914–31. doi:10.1016/j.jmb.2019.01.035.
- [12] Vornhagen J, Quach P, Boldenow E, et al. Bacterial hyaluronidase promotes ascending GBS infection and preterm birth [J]. *mBio*, 2016, 7(3): e00781–16. doi:10.1128/mBio.00781–16.
- [13] Lang S, Palmer M. Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38167–73. doi:10.1074/jbc.M303544200.
- [14] Ramirez M S, Tolmasky M E. Aminoglycoside modifying enzymes [J]. *Drug Resist Updat*, 2010, 13(6): 151–71. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003.
- [15] Verani J R, McGee L, Schrag S J, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010[J]. *MMWR Recomm Rep*, 2010, 59(RR–10): 1–36. doi:10.2307/42001049.

Whole genome sequencing analysis of four strains of CAMP negative *Streptococcus agalactiae*

Wang Xiu, Yao Jie, Leng Guiyun, Tang Wei, Zhou Qiang

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

Abstract Objective To explore the molecular characteristics of four CAMP negative *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) in whole genome sequencing. **Methods** The identification of suspicious bacterial strains was conducted using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). For the strains confirmed as *S. agalactiae* through identification, further CAMP experiments were conducted. For CAMP negative strains, whole genome sequencing was performed using MGI DNBSEQ-T7 and MinION Flow Cell sequencing platforms. Subsequently, multi-locus sequence typing (MLST), virulence genes and resistance genes of the strains were compared and analyzed using various databases. Phoenix M50 fully automatic drug sensitivity analyzer was employed to determine the sensitivity of the bacterial strains to commonly used antibiotics. **Results** Four CAMP-negative *S. agalactiae* strains were included. Whole-genome sequencing analysis revealed that all four CAMP-negative *S. agalactiae* strains belonged to the ST862 type. These strains harbored 22 virulence genes associated with capsular polysaccharides, β -hemolysin, and hyaluronidase, as well as seven resistance genes linked to macrolides, lincosamides, polypeptides, and aminoglycosides. Antimicrobial susceptibility testing revealed that CAMP-negative *S. agalactiae* was susceptible to penicillin G, cefepime, cefotaxime, and vancomycin. However, three strains exhibited resistance to erythromycin, and one strain demonstrated resistance to clindamycin. **Conclusion** Four CAMP negative *S. agalactiae* of the ST862 type possess multiple virulence and drug resistance genes, showing high resistance to erythromycin, warranting clinical attention.

Key words *Streptococcus agalactiae*; CAMP-negative; whole genome sequencing analysis; multi-locus sequence typing; virulence genes; resistance genes

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82102460); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2021xkj050)

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