

金黄色葡萄球菌临床分离株的溶血表型研究

高菊, 翁胜男, 冷贵云, 李昕, 姚杰, 周强, 唐伟
(安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601)

摘要 目的 探讨金黄色葡萄球菌临床分离株的溶血表型。方法 采用三点接种法检测 105 株临床样本分离金黄色葡萄球菌的溶血表型; 实时荧光定量聚合酶链式反应检测 4 种溶血素基因(*hla*、*hly*、*hlc* 和 *hld*) mRNA 表达量; VITEK 2 GP639 药敏卡检测常用抗生素耐药性; DNA 凝胶电泳法检测 *mecA*、*sea*、*tst* 和 *pvl* 基因携带率; 微孔板成膜结晶紫染色法检测生物膜形成能力; CCK-8 法检测巨噬细胞毒性。结果 金黄色葡萄球菌临床分离株中检出 7 种溶血表型。不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株在溶血素基因 mRNA 表达量、常用抗生素耐药性、毒力基因携带率、生物膜形成能力、小鼠巨噬细胞毒性作用等方面均有差异($P < 0.05$)。结论 金黄色葡萄球菌临床分离株的溶血表型多样, 应当引起微生物检验、临床治疗和院感防控等多维度重点关注。

关键词 金黄色葡萄球菌; 临床分离株; 溶血表型; 溶血素; 耐药性; 毒力

中图分类号 R 378.1+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)07-1312-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.021

金黄色葡萄球菌是一种条件致病菌, 常栖息在皮肤、皮脂腺和黏膜表面, 健康人携带率约 20% ~ 30%^[1], 其能够产生溶血素、葡萄球菌肠毒素、毒性休克综合征毒素、杀白细胞素等多种毒素^[2]。这些毒素会损伤红细胞、血小板、白细胞等, 引发急性组织损伤和炎症, 导致疔、痈、肺炎、脑膜炎、骨髓炎、菌血症、急性胃肠炎、烫伤样皮肤综合征、毒性休克综合征等, 严重危害人类的生命健康^[3-4]。

在哥伦比亚绵羊血琼脂平板(blood agar plate, BAP) 上, 金黄色葡萄球菌菌落周围通常可见明显的完全溶血环。然而, 既往国内外文献陆续报道了 2 种不完全溶血表型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* with incomplete hemolytic phenotypes, SIHP), 二者(SIHP-1 和 SIHP-2) 在耐药性、致病性、毒力等多方面, 异于临床上常见的完全溶血表型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* with complete hemolytic phenotype, SCHP)^[5-6]。研究^[7-8]表明, 亚抑菌浓度抗生素能够影响金黄色葡萄球菌多种溶血素基因的表达, 很可能是导致 SIHP 出现的重要原因。迄今, 由于抗生素的不合理使用依然难以杜绝, 金黄色葡萄球菌时常遭受亚抑菌浓度不同种类抗生素以及机

体免疫系统的多重复合压力。因此, 理论上金黄色葡萄球菌临床分离株的溶血表型存在多样性可能。该研究旨在临床分离株中探讨金黄色葡萄球菌的溶血表型, 以及不同溶血表型金黄色葡萄球菌的溶血素基因表达量、毒力基因携带率、耐药性、生物膜形成能力和细胞毒性等, 以期为临床早期诊断、合理用药以及制定个性化治疗方案提供关键依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与细胞来源 105 株金黄色葡萄球菌分离自 2021—2023 年安徽医科大学第二附属医院患者的血液、分泌物、痰液和引流液(排除同一患者同一部位), 经 Microflex LT MALDI-TOF 质谱分析仪鉴定确认。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自北京斯贝福生物技术有限公司。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 和 ATCC 25923 为质控菌株, 来自安徽医科大学第二附属医院检验科微生物室保藏。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。

1.2 主要试剂与仪器 哥伦比亚绵羊 BAP(货号: 90 mm, 合肥天达诊断试剂有限公司), Taq-PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒、DMEM 培养基、Luria-Bertani 肉汤、青-链霉素溶液、胎牛血清、磷酸盐缓冲液[货号: B639295-0080、B518625-0100、E600003-0500、A507002-0250、E607011-0100、E600001-0500、E607008-0500, 生工生物工程(上海) 有限公司], 胰蛋白胍大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB) (货号:

2025-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 82102460)

作者简介: 高菊, 女, 硕士研究生;

唐伟, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:

tangwei317822887@sina.com

CM0129B,英国奥克赛德公司),96孔平底无菌微孔板(货号:1014000,浙江塞宁生物科技有限公司),96孔圆底无菌微孔板(货号:11510,北京兰杰柯科技有限公司),DNA提取试剂盒(货号:EH-30101,北京全式金生物科技有限公司),逆转录试剂盒(货号:B22106,上海吐露港生物科技有限公司),CCK-8试剂(货号:E607320-0001,上海碧云天生物技术有限公司)。VITEK 2 Compact System和VITEK 2 AST-GP639检测试剂卡片(型号:VITEK 2 Compact、VITEK 2 GP-AST-GP639,法国梅里埃生物公司),基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪(型号:microTOF II,德国布鲁克公司),比浊仪(型号:REF21250,法国梅里埃生物公司),酶标仪(型号:ST360,上海科华生物工程股份有限公司),QuantStudio 5荧光定量PCR仪(型号:QuantStudio 5,美国赛默飞世尔公司)。

1.3 引物设计 根据 GenBank 数据库中的 α 、 β 、 γ 、 δ 4种溶血素基因(hla、hla、hlc、hld)和毒力基因(sea、tst、pvl)序列,使用 NCBI Primer-BLAST 工具设计上下游特异性引物。引物合成由生工生物工程(上海)有限公司完成,引物序列见表1。

1.4 溶血表型检测 复苏金黄色葡萄球菌菌株,配制 3.0×10^8 CFU/mL 菌液。在 BAP 表面,采用三点接种法依次接种 0.5 μ L 菌液。待菌液干燥后,将平板置于 35 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育 20 h,再 4 $^{\circ}$ C 冷藏 20 h,拍照记录冷藏前后菌落周围溶血现象。使用 ATCC 29213 和 ATCC 25923 作为完全溶血表型和不完全溶血表型对照。

1.5 溶血素基因 hla、hla、hlc 和 hld 的 mRNA 水平检测 菌株接种于 BAP,在 35 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。按照 RNA 提取试剂盒说明书,使用溶菌酶、溶葡萄球菌蛋白酶和蛋白酶 K 裂解菌体,提取、纯化 RNA。测定 RNA 纯度和浓度后,将各菌株的总 RNA 浓度调节一致,并逆转录为 cD-

NA。按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书,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 $^{\circ}$ C 30 s,变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,退火延伸 55 $^{\circ}$ 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。

1.6 常用抗生素药敏检测 将复苏后的金黄色葡萄球菌菌株,按照 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪的操作要求,使用 AST-GP639 药敏卡进行药敏试验。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。共检测 15 种抗生素,包括青霉素、苯唑西林、庆大霉素、利福平、左氧氟沙星、莫西沙星、红霉素、克林霉素、达托霉素、复方新诺明、利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁、替加环素和头孢洛林。以苯唑西林最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC) ≥ 4 μ g/mL 或头孢西丁 MIC ≥ 8 μ g/mL,判定为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。

1.7 mecA、sea、tst 和 pvl 检测 按照 DNA 提取试剂盒说明书,提取、纯化菌株的 DNA。按照 Taq-PCR 试剂盒说明书,扩增 mecA、sea、tst 和 pvl 基因。sea 基因的反应条件设置如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。mecA、tst 和 pvl 基因的反应条件设置如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。配制 1% 琼脂糖凝胶,电泳后观察预期位置上是否出现扩增条带。

1.8 生物膜形成实验 采用微孔板成膜结晶紫染色法检测生物膜形成能力。使用 TSB 培养基,将菌株的过夜培养物稀释至 1.5×10^6 CFU/mL,200 μ L/孔加入 96 孔平底无菌微孔板。以 200 μ L TSB 为空白对照。设置 4 个平行孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h。磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,以去除松散附着细菌,晾干。70%

表1 引物名称及序列

Tab.1 The primer names and sequences

Gene	GenBank number	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Product (bp)
hla	KT279561	TGGTTAGCCTGGCCTTCAG	ATTTGCACCAATAAGGCCGC	190
hla	EF690812	GGGGCAATATAAACGCGCTG	CTGATTGAGAACGGCCGACT	167
hlc	D42143	TTGCACAAGACCCAACCTGGT	AGCATCCATGTTTCTGCCGT	173
hld	AB043555	GGAAGGAGTGATTCAATGGCA	AGTGAATTTGTCACTGTGTCCG	88
16S rDNA	MW453042.1	TAACCTCGGGAAACCGGAGC	GGACCGTGTCTCAGTTCAG	194
mecA	KC243783	AACCTCTGCTCAACAAGTTCCA	AACGTTGTAACCAACCCCAAGA	164
sea	M18970	TGCAGGGAACAGCTTTAGGC	TGTACCACCCGCACATTGAT	248
tst	J02615	ACAGATGGCAGCATCAGCTT	GGCCCATACTTTAAGGGGCT	239
pvl	FJ895586	TATTGCTGATGGCGCTGAGG	GAAAGCCACCTCATTGCTT	211

甲醇处理 30 min, 固定生物膜。磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。干燥后, 加入 1% (wt/vol) 结晶紫溶液, 200 μ L/孔, 染色 5 min。去除染液, 用无菌水洗涤至洗液清晰。将 96 孔板倒置晾干后, 加入 95% 乙醇溶液 200 μ L/孔, 静置 20 min, 以完全溶解进入生物膜的染料。使用酶标仪, 测定各孔吸光度 (optical density, OD) 值。

1.9 细胞毒性实验 复苏金黄色葡萄球菌菌株, 使用 Luria-Bertani 肉汤配制 1.5×10^8 CFU/mL 菌液。使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 配制 RAW264.7 小鼠巨噬细胞悬液。以每孔 5 000 个细胞加入 96 孔平底无菌微孔板, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 2~4 h。然后, 向各孔中加入 100 μ L 菌液, 设置 3 个复孔。DMEM 对照孔只含细胞悬液, 空白对照孔只含 DMEM 培养基。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、90% 湿度条件下孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 在 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, 检测各孔 OD 值。细胞活性 (%) = $(OD_{\text{金黄色葡萄球菌}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{DMEM}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.10 统计学处理 使用 SPSS25.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以 $n(\%)$ 表示。多组之间比较采用单因素方差分析、非参数检验或 χ^2 检验, 两组样本间比较采用 LSD- t 检验、Kruskal-Wallis H 检验、Mann-Whitney U 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 金黄色葡萄球菌临床分离株检出的 7 种溶血表型 35 $^{\circ}$ C 孵育 20 h 后, 典型的 SCHP 菌落周围可见明显的完全溶血环; 经过 4 $^{\circ}$ C 冷藏, 溶血环尺寸稍有增大, 见图 1A。弱溶血表型金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* with weak hemolytic phenotype, SWHP) 菌落周围几乎观察不到溶血环, 见图 1B。SIHP-1 菌落周围仅有一层深色不透明、边缘清晰的不完全溶血环, 见图 1C。SIHP-2 菌落周围有两层溶血环, 内层完全溶血环较小、透亮, 外层不完全溶血环较大、暗淡; 4 $^{\circ}$ C 冷藏后, 内层完全溶血环尺寸稍有增大, 见图 1D。此外, 另有 3 种不同于既往文献报道的溶血表型, 经过归纳后初步命名为: SIHP-3、SIHP-4 和 SIHP-5。其中, SIHP-3 菌落周围有一个明亮、半透明、微分层的不完全溶血环, 见图 1E。SIHP-4 菌落周围有两层溶血环, 内层完全溶血环较小、透明, 外层不完全溶血环较大、半透明, 见图 1F。4 $^{\circ}$ C 冷藏前, SIHP-5 菌落周围的双溶血环表型

类似于 SIHP-4; 然而, 冷藏后, 溶血环不仅尺寸稍有增大, 而且进一步分层, 可见三层溶血环, 内层完全溶血环透明, 中层不完全溶血环暗淡, 外层不完全溶血环几近透明, 见图 1G。SIHP-1、SIHP-2、SIHP-3、SIHP-4 和 SIHP-5 相邻菌落的不完全溶血环交界处都会形成一个透明的线性溶血增强区。相比之下, ATCC29213 和 ATCC25923 菌落周围的溶血表型, 分别类似于 SCHP 和 SIHP-2, 见图 1H、1I。

2.2 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的 4 种溶血素 mRNA 表达量 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法评估 4 种溶血素基因 (hla、hly、hlc 和 hld) 的 mRNA 相对水平。以 16S rDNA 为内参, 将金黄色葡萄球菌 ATCC29213 的 4 种靶基因表达水平归为 1。结果如图 2 所示, 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的 hla、hly、hlc 和 hld 基因 mRNA 表达量有差异 ($P < 0.05$)。

2.3 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株对常用抗生素的耐药性 SIHP 菌株的 MRSA 比例高于 SWHP 和 SCHP 菌株。SWHP 和 SIHP-5 菌株均对青霉素耐药。SCHP 对苯唑西林、左氧氟沙星和莫西沙星的耐药率低于 5 种 SIHP; 对庆大霉素的耐药率低于 SIHP-1、SIHP-3 和 SIHP-5; 对复方新诺明的耐药率低于 SIHP-3 和 SIHP-5。SIHP-1 和 SIHP-5 对红霉素的耐药率高于 SWHP。所有菌株均对利福平、利奈唑胺、万古霉素、替加环素、替考拉林和头孢洛林敏感。见表 2。

表 2 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株对常用抗生素的耐药率 (%)

Tab. 2 Antibiotic resistance rates of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different hemolytic phenotypes (%)

Antibiotics	SWHP	SCHP	SIHP-1	SIHP-2	SIHP-3	SIHP-4	SIHP-5
Penicillin	100.0	85.7	90.9	92.0	92.3	90.9	100.0
Benzoxymycin	36.3	35.7	63.6	64.0	61.5	63.6	70.0
Gentamicin	9.0	7.1	18.1	4.0	23.0	9.0	20.0
Rifampicin	0	0	0	0	0	0	0
Levofloxacin	9.0	7.1	27.2	16.0	30.7	18.1	20.0
Moxifloxacin	9.0	7.1	18.1	12.0	38.4	18.1	15.0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	9.0	7.1	9.0	8.0	15.4	9.0	15.0
Clindamycin	36.3	42.9	72.7	56.0	69.2	45.5	60.0
Daptomycin	0	0	0	0	7.6	0	10.0
Erythromycin	36.3	42.8	72.7	52.0	61.5	54.5	75.0
Linezolid	0	0	0	0	0	0	0
Vancomycin	0	0	0	0	0	0	0
Teicoplanin	0	0	0	0	0	0	0
Tigecycline	0	0	0	0	0	0	0
Ceftaroline	0	0	0	0	0	0	0

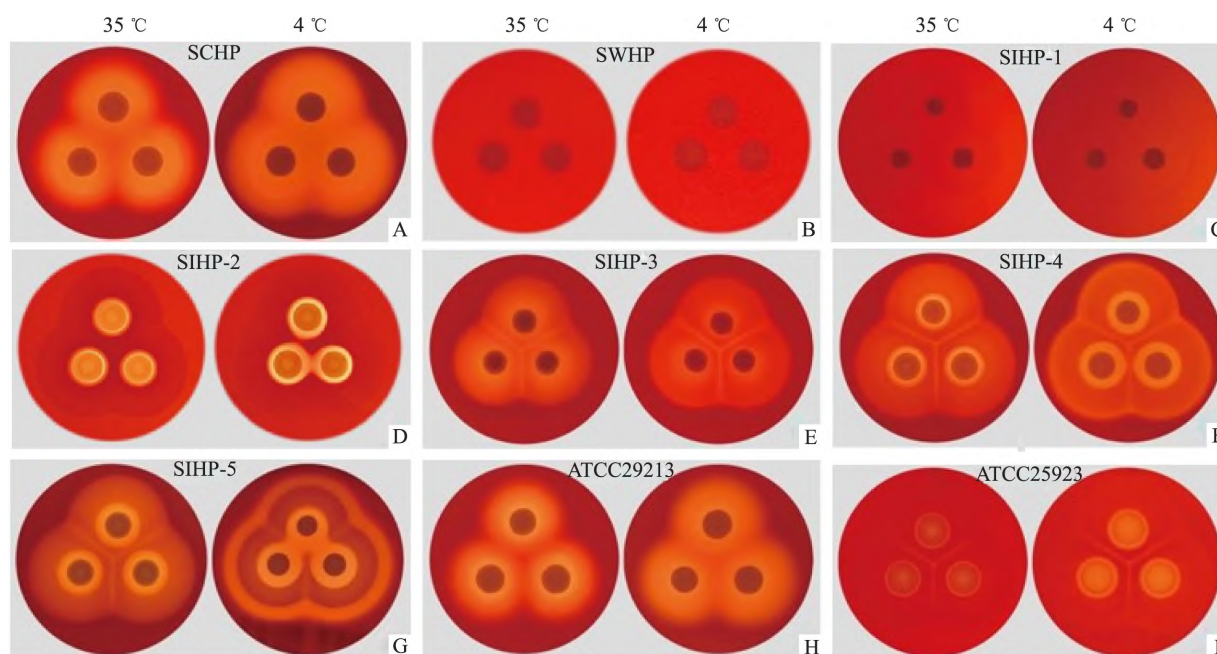


图1 金黄色葡萄球菌临床分离株在 BAP 上的溶血表型

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

A: Hemolytic phenotype of SCHP on BAP; B: Hemolytic phenotype of SWHP on BAP; C: Hemolytic phenotype of SIHP-1 on BAP; D: Hemolytic phenotype of SIHP-2 clinical isolate on BAP; E: Hemolytic phenotype of SIHP-3 clinical isolate on BAP; F: Hemolytic phenotype of SIHP-4 clinical isolate on BAP; G: Hemolytic phenotype of SIHP-5 clinical isolate on BAP; H: Hemolytic phenotype of *Staphylococcus aureus* ATCC29213 on BAP; I: Hemolytic phenotype of *Staphylococcus aureus* ATCC25923 on BAP.

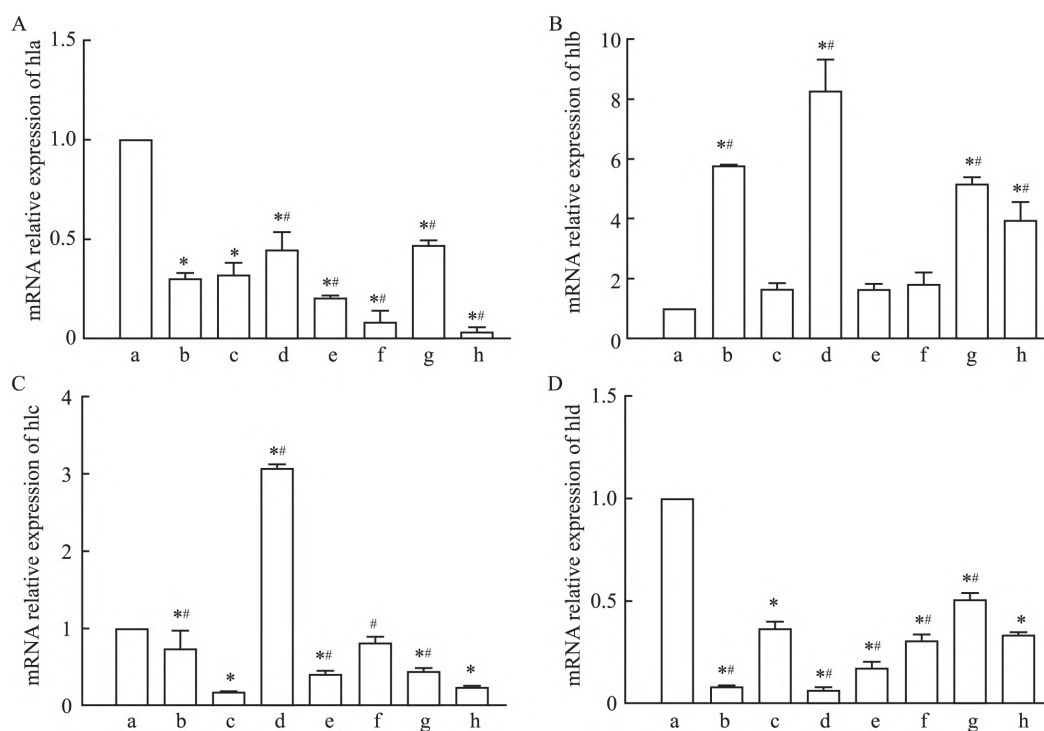


图2 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的4种溶血素基因 mRNA 水平对比

Fig.2 Comparison of the mRNA levels of four hemolysin genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates

A: The expression of hla; B: The expression of hlb; C: The expression of hlc; D: The expression of hld; a: ATCC29213; b: SWHP; c: SCHP; d: SIHP-1; e: SIHP-2; f: SIHP-3; g: SIHP-4; h: SIHP-5; * $P < 0.05$ vs ATCC29213; # $P < 0.05$ vs SCHP.

2.4 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的 *mecA*、*sea*、*tst*、*pvl* 基因检测 MRSA 菌株均携带 *mecA* 基因,而非 MRSA 菌株均未检出 *mecA* 基因。SWHP 和 SCHP 菌株的 *sea*、*tst* 和 *pvl* 基因同时携带率分别为 18.2% 和 20.8%,明显低于 SIHP-1 (54.5%)、SIHP-2 (52.0%)、SIHP-3 (53.8%)、SIHP-4 (54.5%) 和 SIHP-5 (40.0%)。不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的 *mecA*、*sea*、*tst*、*pvl* 基因扩增结果见图 3 和表 3。

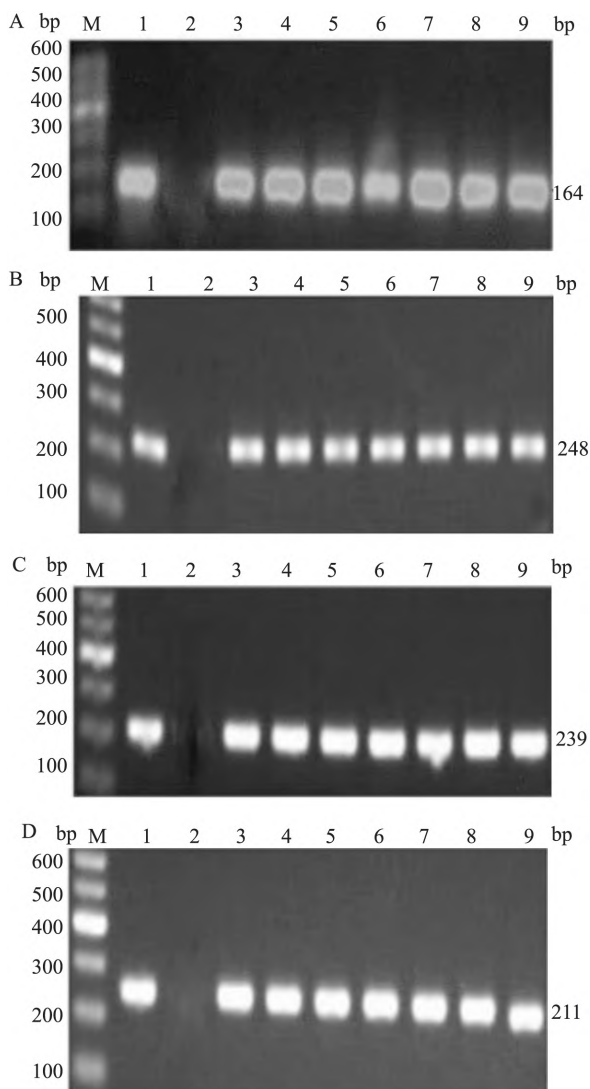


图3 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的 *mecA*、*sea*、*tst*、*pvl* 基因 PCR 电泳结果

Fig. 3 PCR amplification results of *mecA*, *sea*, *tst*, and *pvl* genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates

A: PCR amplification results of *mecA* gene; B: PCR amplification results of *sea* gene; C: PCR amplification results of *tst* gene; D: PCR amplification results of *pvl* gene; M: DNA marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3: SWHP; 4: SCHP; 5: SIHP-1; 6: SIHP-2; 7: SIHP-3; 8: SIHP-4; 9: SIHP-5.

2.5 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的生物膜形成能力 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的生物膜形成能力有差异。ATCC25923、SWHP、SCHP 之间的生物膜形成能力无明显差异。与 SCHP 比较,SIHP-1、SIHP-2、SIHP-3、SIHP-4 和 SIHP-5 的生物膜形成能力更强(均 $P < 0.05$)。见图 4。

表3 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的 *mecA*、*sea*、*tst*、*pvl* 基因检出率(%)

Tab. 3 Positive Rates of *mecA*, *sea*, *tst*, and *pvl* genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different hemolytic phenotypes (%)

Genes	SWHP	SCHP	SIHP-1	SIHP-2	SIHP-3	SIHP-4	SIHP-5
<i>mecA</i>	36.3	35.7	63.6	64.0	61.5	63.6	70.0
<i>sea</i>	63.6	29.2	100.0	76.0	84.6	63.6	80.0
<i>tst</i>	90.9	25.0	90.9	88.0	92.3	81.8	90.0
<i>pvl</i>	27.3	37.5	81.8	68.0	76.9	63.6	80.0

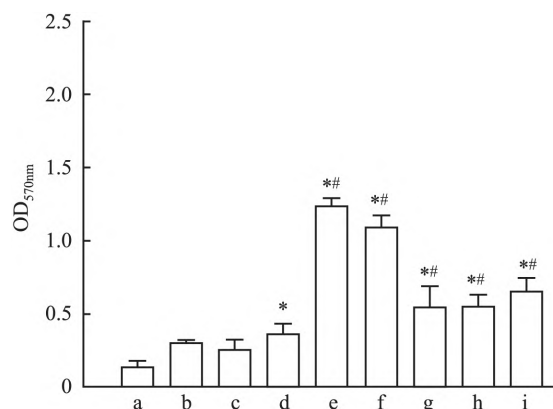


图4 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的生物膜形成能力对比

Fig. 4 Comparison of biofilm formation abilities among *Staphylococcus aureus* clinical isolates

a: TSB control; b: ATCC25923; c: SWHP; d: SCHP; e: SIHP-1; f: SIHP-2; g: SIHP-3; h: SIHP-4; i: SIHP-5; * $P < 0.05$ vs TSB control; # $P < 0.05$ vs SCHP.

2.6 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的细胞毒性 与 DMEM 细胞对照组比较,不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株对 RAW264.7 小鼠巨噬细胞均有细胞毒作用,能够降低小鼠巨噬细胞的增殖活性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

本研究在金黄色葡萄球菌临床分离株中检出 7

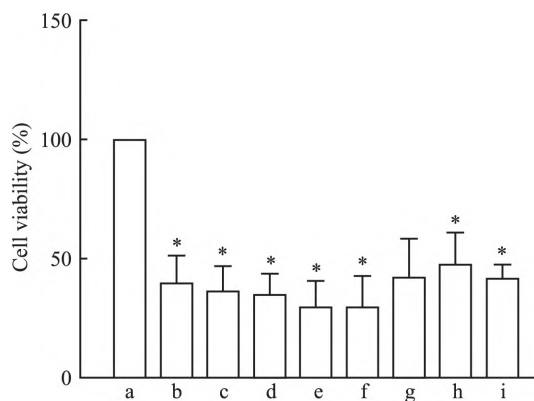


图5 不同溶血表型金黄色葡萄球菌临床分离株的细胞毒性对比

Fig. 5 Comparison of cytotoxicity among *Staphylococcus aureus* clinical isolates

a: DMEM control; b: ATCC25923; c: SWHP; d: SCHP; e: SI-HP-1; f: SIHP-2; g: SIHP-3; h: SIHP-4; i: SIHP-5; * $P < 0.05$ vs DMEM control.

种溶血表型。其中, SIHP-3、SIHP-4 和 SIHP-5 的溶血表型各具特点, 具有很强的辨识度。SIHP 的 2 个相邻菌落的不完全溶血环交界处, 均会形成一个透明的线性溶血增强区, 之前的一些研究也有此发现^[5-6, 9-10]。其机制很可能类似于对流免疫电泳中的沉淀线形成, 即 2 个相邻菌落分泌的 β -溶血素在适当的位置相遇, 进而导致溶血活性增强。

金黄色葡萄球菌主要分泌 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种溶血素, 破坏红细胞的细胞膜。溶血素在菌株定植和致病过程中起到非常重要的作用, 其基因的差异性表达会影响金黄色葡萄球菌的溶血表型。通常, 绵羊 BAP 上 α -溶血素会导致菌落周围出现透明、边缘模糊的完全溶血环, 而深色不透明、边缘清晰的不完全溶血环被认为是由 β 溶血素引起的。 δ -溶血素被认为能够导致金黄色葡萄球菌菌落周围呈现深色半透明、边缘模糊的不完全溶血环。然而, γ -溶血素则被认为不能导致任何可见的溶血环。 β -溶血素是一种具有鞘磷脂酶和生物膜连接酶活性的冷热溶血素。35 °C 孵育后, 再经过 4 °C 冷藏, 可以增强 β -溶血素的溶血活性。此外, 有研究报道^[11], β -溶血素能够部分抑制 α -溶血素的溶血活性, 大幅增强 δ -溶血素的溶血活性, 从而导致完全溶血环的边缘模糊区域缩小和透明区域扩大。既往研究^[7-8, 12]表明, 亚抑菌浓度不同种类抗生素会诱发溶血素基因的差异性表达。大环内酯类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类、克林霉素、夫西地酸、氟喹诺酮类大部分抗生素, 都会影响 α 溶血素基因 (hla) 的表达, 环丙沙星、甲氧苄啶则会通过去除 hlb-前噬菌体促进 β -溶血素基因

(hlb) 的表达。尽管未见 γ -溶血素基因 (hle) 和 δ -溶血素基因 (hld) 的相关研究, 但可以合理推测, 它们的表达很可能也会受到亚抑菌浓度抗生素的调控。因而, 金黄色葡萄球菌临床分离株中检出多样溶血表型有其合理性和必然性。本研究中, SIHP 对常用抗生素的耐药性总体上高于 SCHP, 这也在一定程度上反映了抗生素在金黄色葡萄球菌临床分离株溶血表型演化过程中的作用。

迄今, 共发现 33 种葡萄球菌肠毒素^[13]。其中, 葡萄球菌肠毒素 A 属于经典葡萄球菌肠毒素, 能够导致强烈的呕吐、腹泻和胃肠炎。呕吐是金黄色葡萄球菌食物中毒的一个关键特征且具有自限性, 与葡萄球菌肠毒素 A 蛋白序列中的一个 9 ~ 19 个氨基酸的二硫环肽有关。产生毒性休克综合征毒素 1 的金黄色葡萄球菌分离株会导致感染者出现毒性休克综合征, 至少累及胃肠道、肌肉、黏膜、肾、肝、血液或中枢神经系统中的 3 个, 表现为低血压、高热、皮疹和脱屑, 严重者会发生休克甚至多器官衰竭^[14]。体外实验^[15]表明, 克林霉素、泰地唑胺、利奈唑胺和替加环素会降低金黄色葡萄球菌菌株毒性休克综合征毒素 1 的表达, 而 β -内酰胺类则会增加其表达。杀白细胞素由 LukS-PV 和 LukF-PV 两个 pvl 基因共同转录, 可诱导细胞膜上的孔隙, 损伤细胞膜。临床样本中分离的金黄色葡萄球菌菌株的 pvl 基因阳性率与感染的严重程度相关, 国内的阳性率为 7.4% ~ 15.5%^[16], 美国约为 36.0%^[17]。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, 加剧感染^[18]。本研究中, SIHP 临床分离株的 sea、tst 和 pvl 基因同时携带率大于 SWHP 和 SCHP, 生物膜形成能力强于 SCHP, 提示 SIHP 具有更强的毒力和致病力。金黄色葡萄球菌毒力基因的表达, 由一个复杂的调节系统控制, 这个调节系统由环境因素和宿主因素组成, 包括双组分系统 (AgrAC、SaeRS、SrrAB 和 ArlRS)、SarA 蛋白家族和 σ 因子, 能够适时调控金黄色葡萄球菌的黏附、定植、抗生素耐药以及组织损伤等。金黄色葡萄球菌临床分离株会因宿主免疫系统和亚抑菌浓度抗生素的刺激触发自身调节系统, 导致毒力变化。这在本研究的结果中也得到了一定程度的印证。

综上所述, 金黄色葡萄球菌临床分离株的溶血表型多样, 不同溶血表型分离株在溶血素基因 mRNA 表达量、常用抗生素耐药性、毒力基因携带率、

生物膜形成能力、小鼠巨噬细胞毒性作用等方面均有差异,临床上应予以关注。由于菌株数量和来源有限,上述结果需要多中心、更大样本量的研究加以验证。

参考文献

- [1] Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, et al. *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments[J]. *Toxins*, 2021, 13(10): 677. doi: 10.3390/toxins13100677.
- [2] Vaughn J M, Abdi R D, Gillespie B E, et al. Genetic diversity and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis[J]. *Microb Pathog*, 2020, 144: 104171. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104171.
- [3] Cheung G Y C, Otto M. Virulence mechanisms of staphylococcal animal pathogens[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14587. doi: 10.3390/ijms241914587.
- [4] Van Der Meeren B T, Millard P S, Scacchetti M, et al. Emergence of methicillin resistance and Pantone-Valentine leukocidin positivity in hospital- and community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Beira, Mozambique[J]. *Trop Med Int Health*, 2014, 19(2): 169–76. doi: 10.1111/tmi.12221.
- [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] 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.
- [7] 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.
- [8] Goerke C, Koller 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.
- [9] Haque R U, Baldwin J N. Types of hemolysins produced by *Staphylococcus aureus*, as determined by the replica plating technique[J]. *J Bacteriol*, 1964, 88(5): 1442–7. doi: 10.1128/jb.88.5.1442–1447.1964.
- [10] 唐伟,冷贵云,高菊,等. 新型不完全溶血型金黄色葡萄球菌的微生物学特征[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(9): 1535–42. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.09.007.
- [10] Tang W, Len G Y, Gao J, et al. Microbiological characteristics of the new incomplete hemolytic phenotype *Staphylococcus aureus* [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(9): 1535–42. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.09.007.
- [11] Wang L J, Yang X, Qian S Y, et al. Identification of hemolytic activity and hemolytic genes of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children [J]. *Chin Med J*, 2020, 133(1): 88–90. doi: 10.1097/CM9.0000000000000571.
- [12] Rohmer C, Wolz C. The role of hlb-converting bacteriophages in *Staphylococcus aureus* host adaption [J]. *Microb Physiol*, 2021, 31(2): 109–22. doi: 10.1159/000516645.
- [13] Cieza M Y R, Bonsaglia E C R, Rall V L M, et al. Staphylococcal enterotoxins: description and importance in food [J]. *Pathogens*, 2024, 13(8): 676. doi: 10.3390/pathogens13080676.
- [14] Spaulding A R, Salgado-Pabón W, Kohler P L, et al. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26(3): 422–47. doi: 10.1128/CMR.00104–12.
- [15] Chen J, Zhou H, Huang J, et al. Virulence alterations in *Staphylococcus aureus* upon treatment with the sub-inhibitory concentrations of antibiotics [J]. *J Adv Res*, 2021, 31: 165–75. doi: 10.1016/j.jare.2021.01.008.
- [16] 曾云祥,林高贵,梁世周,等. 携带杀白细胞素基因金黄色葡萄球菌临床感染菌株的回顾性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(2): 276–9, 291. doi: 10.11816/cn.ni.2017–162895.
- [16] Zeng Y X, Lin G G, Liang S Z, et al. Retrospective study of clinical *Staphylococcus aureus* isolates carrying with pantone-valentine leukocidin gene [J]. *Chin J Nosocomiology*, 2017, 27(2): 276–9, 291. doi: 10.11816/cn.ni.2017–162895.
- [17] Brown M L, O'Hara F P, Close N M, et al. Prevalence and sequence variation of pantone-valentine leukocidin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(1): 86–90. doi: 10.1128/JCM.05564–11.
- [18] Mc Carthy 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.

Hemolytic phenotype analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Gao Ju, Weng Shengnan, Leng Guiyun, Li Xin, Yao Jie, Zhou Qiang, Tang Wei

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

Abstract Objective To investigate the hemolytic phenotypes of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Methods** The hemolytic phenotypes of 105 *Staphylococcus aureus* isolates were analyzed and summarized using the three-point inoculation method. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to measure the mRNA expression levels of four hemolysin genes (hla, hlb, hlc, and hld); The VITEK 2 GP639 antimicrobial susceptibility card was used to detect resistance to commonly used antibiotics; DNA gel electrophoresis was performed to determine the prevalence

网络出版时间: 2025-06-30 13:46:08 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0858.017>

ET-1 在中枢神经系统特发性炎症性脱髓鞘疾病中的表达及其临床意义

宋晨蕊^{1,2}, 刘艳群¹, 毕晓莹¹(¹ 海军军医大学附属第一医院神经内科, 上海 200433;² 海军军医大学附属第三医院神经内科, 上海 201805)

摘要 目的 探究中枢神经系统特发性炎症性脱髓鞘疾病(IIDDs)进程中,内皮素-1(ET-1)的表达水平与疾病残疾程度的相关性。方法 纳入45例中枢神经系统脱髓鞘疾病患者,其中IIDDs患者25例,中枢神经系统血管性脱髓鞘疾病患者20例,同时纳入健康对照组10例。用ELISA的方法测定患者血清ET-1水平,并进一步分析IIDDs组患者血清ET-1水平与实验室检验指标、情绪认知功能及疾病残疾程度的相关性。结果 ①在三组中,IIDDs组血清ET-1含量最高($P < 0.0001$),血清ET-1在血管性脱髓鞘疾病组表达水平较健康对照组降低,但差异无统计学意义。②IIDDs中EDSS评分重度障碍患者血清ET-1水平较EDSS评分轻中度障碍患者升高($Z = -3.250$, $P = 0.001$);EDSS评分与血清ET-1水平($r_s = 0.503$, $P = 0.010$)、脑脊液总蛋白($r_s = 0.475$, $P = 0.016$)、脑脊液白蛋白($r_s = 0.480$, $P = 0.020$)、脑脊液IgG($r_s = 0.544$, $P = 0.007$)、脑脊液IgA($r_s = 0.660$, $P = 0.002$)及脑脊液IgM($r_s = 0.555$, $P = 0.011$)水平存在正相关性。③IIDDs组患者血清ET-1水平与脑脊液IgM水平($r_s = 0.455$, $P = 0.044$)存在正相关性,与外周免疫指标无明显相关性($P > 0.05$)。结论 血清ET-1水平反映了IIDDs临床症状的严重程度,且与外周免疫指标无明显相关性,但与疾病严重程度及脑脊液IgM水平存在正相关性,提示血清ET-1水平可反映中枢神经系统炎症程度,并在IIDDs发生发展中起到重要作用。

关键词 中枢神经系统特发性炎症性脱髓鞘疾病; 内皮素-1; 中枢神经系统血管性脱髓鞘; 中枢神经系统炎症; 残疾程度; 情绪认知功能

中图分类号 R 74

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)07-1319-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.022

2025-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82371495); 海军军医大学第一附属医院青年培育项目(编号: 2021JCQN10)

作者简介: 宋晨蕊,女,硕士研究生;

刘艳群,女,副主任医师,通信作者, E-mail: liuyanqun588@sina.com;

毕晓莹,女,主任医师,博士生导师,通信作者, E-mail: bixi-aoying2013@163.com

中枢神经系统特发性炎症性脱髓鞘疾病(idiopathic inflammatory demyelinating disease, IIDDs)是一组由免疫系统介导攻击髓鞘而引起的大脑神经系统疾病,主要包括多发性硬化(multiple sclerosis, MS)、视神经脊髓炎谱系疾病(neuromyelitis optica spectrum disorders, NMOSD)、急性播散性脑脊髓炎等^[1]。该病发病机制复杂,且髓鞘损伤后无法完全修复,轴突损伤无法逆转,导致永久性神经功能障碍

of the *mecA*, *sea*, *tst*, and *pvl* genes; The microtiter plate crystal violet staining method was used to assess biofilm formation ability; The CCK-8 assay was used to evaluate cytotoxicity against macrophages. **Results** Seven hemolytic phenotypes were identified among the *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Differences were found among *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different hemolytic phenotypes in terms of mRNA expression levels of hemolysin genes, antibiotic resistance, virulence gene prevalence, biofilm formation ability, and cytotoxicity to mouse macrophages ($P < 0.05$). **Conclusion** *Staphylococcus aureus* clinical isolates exhibit diverse hemolytic phenotypes, which should be a focus across multiple dimensions, including microbiological testing, clinical treatment, and nosocomial infection prevention and control.

Key words *Staphylococcus aureus*; clinical isolate; hemolytic phenotype; hemolysin; antibiotic resistance; virulence

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

Corresponding author Tang Wei, E-mail: tangwei317822887@sina.com