

无乳链球菌 *cfb* 完全缺失导致 荧光定量 PCR 假阴性的分子机制

王 秀,冷贵云,杨韵司,唐 伟,周 强,姚 杰
(安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601)

摘要 目的 评估基于 CAMP 因子基因(*cfb*)的荧光定量 PCR(qPCR)检测无乳链球菌出现假阴性的原因,并深入分析其分子机制。方法 收集 76 例阴道分泌物标本,分别采用靶向 *cfb* 的 qPCR 法和细菌培养法进行检测。对 4 例 qPCR 阴性但培养阳性的可疑菌株,通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、乳胶凝集抗原检测和 CAMP 试验进行鉴定;利用 MGI DNBSEQ-T7 和 Nanopore-PromethION 48 测序平台进行全基因组分析;基于 16S rRNA 基因构建系统发育树和环形进化树进行菌株确认;进行多位点序列分型(MLST);基于拼接序列和原始数据,对 *cfb* 序列进行比对分析;设计 *cfb* 特异性引物进行全长扩增及琼脂糖凝胶电泳验证。结果 4 株可疑菌株经 MALDI-TOF MS、抗原检测及 16S rRNA 基因分析均确认为无乳链球菌,MLST 分型均为 ST-862 型。CAMP 试验阴性,全基因组序列比对未发现 *cfb* 或其同源序列,*cfb* 特异性 PCR 扩增无产物,分子层面确认 *cfb* 完全缺失。结论 无乳链球菌 *cfb* 的完全缺失是导致基于该靶标的 qPCR 检测假阴性的分子机制。提示以单一 *cfb* 为靶标的 qPCR 检测存在局限性,可能影响临床诊断和治疗决策,需引起重视。

关键词 无乳链球菌;荧光定量 PCR;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;*cfb*;全基因组测序;多位点序列分型

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)09-1624-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.008

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, *S. agalactiae*), 又称为 B 族链球菌(group B *Streptococcus*, GBS), 其携带的 CAMP 因子基因(CAMP factor gene, *cfb*)高度保守,其序列及其邻近保守区域常作为分子诊断靶点^[1-2]。*cfb* 编码的 CAMP 因子可显著增强金黄色葡萄球菌 β -溶血素活性,导致两者共培养时在交界处会形成独特的箭头型溶血区^[3-4], 即 *S. agalactiae* 特异性的 CAMP 反应。

然而,近年国内外研究陆续报道了能够逃避 *S. agalactiae* 分子诊断的菌株^[2,5-9]。Tickler et al^[8] 对漏检菌株进行全基因组测序发现,其 *cfb* 及邻近保守区域存在 4 种不同大小染色体片段的缺失;随后, Creti et al^[5] 也证实了 *cfb* 新的缺失类型。尽管国内亦有漏检报道,但对 *cfb* 缺失的具体情况了解有限。为此,该研究对 4 株 qPCR 阴性的 *S. agalactiae*, 通过全基因组测序比对及对 *cfb* 基因全长扩增验证,系统探究了其逃避 qPCR 检测的分子机制。该结果为

临床实验室分子检测技术的改良和标准修订提供重要的理论依据,进而推动临床检测工作的优化和完善。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源及鉴定 收集了 2023 年 5 月—12 月期间安徽医科大学第二附属医院患者的阴道分泌物共 76 例。从中筛选出 4 株细菌培养阳性但 qPCR 检测阴性的疑似 *S. agalactiae* 分离株作为研究对象,编号分别为 9A、41B、44C、76D。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。菌株鉴定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)、抗原检测和 16S rRNA 基因测序分析。对照菌株(*S. agalactiae* ATCC 13813、屎肠球菌 ATCC 29212、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923)来自本院微生物室。

1.1.2 主要仪器与试剂 哥伦比亚绵羊血琼脂平板(合肥天达公司);*cfb* 引物、DNA Marker 和 PCR Master Mix(上海生工生物公司,货号: H510012-0002、B500345-0050、B110006-0001);*S. agalactiae* 核酸检测试剂盒(北京博尔诚科技有限公司;货号:

2025-07-01 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;

姚 杰,男,主任技师,硕士生导师,通信作者, E-mail:
cele1028@163.com

C-006); *S. agalactiae* 抗原检测试剂盒(北京金沃夫生物工程科技有限公司); NucleoBond® HMW DNA 试剂盒(德国迈纳德公司,货号: B518255-0050); 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司,型号: Tanon 1600 型); 电泳仪(美国伯乐公司,型号: Mini-Sub Cell GT); 全自动荧光 PCR 分析仪(上海罗氏诊断产品有限公司,型号: cobas z 480); NanoDrop 超微量分光光度计(美国赛默飞世尔公司,型号: NanoDrop One); 二代 MGI DNBSEQ 测序仪(深圳华大智造科技股份有限公司,型号: T7); 三代 Nanopore 测序仪(英国牛津纳米孔技术有限公司,型号: PromethION 48)。

1.2 方法

1.2.1 靶向 *cfb* 的 qPCR 法检测 采用全自动荧光 PCR 分析仪,参照核酸检测试剂盒操作步骤进行操作。所用的引物与探针靶向 *S. agalactiae* 基因组 CAMP 因子种属特异性保守区域(无高频 SNP 位点),检测结果判读及解释均以试剂盒说明书为准。

1.2.2 MALDI-TOF MS 检测 使用一次性枪头将研究菌株涂抹在 96 孔的靶板上,加 1 μ L 70% 甲酸裂解菌体,靶板干燥后,加 1 μ L 基质溶液形成共结晶膜,共结晶膜在激光照射下能够吸收能量并电离细菌中的生物分子。电离后的分子在电场作用下通过飞行时间分析器,最终形成质谱峰图。分值 ≥ 2.000 表明菌株鉴定具有高置信度^[10]。

1.2.3 *S. agalactiae* 抗原(乳胶法)检测 严格按照制造商的操作说明,使用 *S. agalactiae* 抗原检测试剂盒进行抗原检测。质控线(C 线)有红色线条,检测线(T 线)有一条红色线条表明样本存在 *S. agalactiae* 抗原。反之,阴性。

1.2.4 CAMP 试验 在血琼脂平板中央接种待测菌株和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923,两菌垂直划线并相距 0.5~1 cm。35 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后,垂直交界处出现溶血加强区则 CAMP 阳性;反之,阴性。屎肠球菌 ATCC29212 和 *S. agalactiae* ATCC13813 分别作为阴性对照和阳性对照。

1.2.5 全基因组测序及分析 使用 NucleoBond® HMW DNA 试剂盒,提取基因组 DNA(gDNA)。采用 NanoDrop 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳技术,检测 gDNA 浓度、纯度及完整性,对合格的 gDNA 进行高通量测序与信息分析。在文库制备过程中,依次进行基因组 DNA 片段化、末端补齐、3'端加 A,测序接头连接,PCR 扩增以及产物纯化等操作。文库构建后,通过 MGI DNBSEQ-T7 和 MinION

Flow Cell 平台,对 gDNA 进行测序。使用 Canu 软件对获得的原始测序读段,进行修整和组装,利用 nex-topolish(v1.4.1)和 Pilon(v1.18)校对基因组序列。

1.2.6 系统发育树和环形进化树的构建 通过基因组预测获得 16S rRNA 序列,使用基于局部比对,将获得的 16S rRNA 序列与美国国家生物技术信息中心的 16S rRNA 数据库进行比对,设置参数 identify > 95,选取 identify 最高的前 30 条 16S rRNA 序列(不足则全取),并利用 mafft 软件(v7.505)进行序列多重比对并剪切处理,以此构建 4 株菌株的系统发育树和环形进化树。

1.2.7 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST) 选取 7 对管家基因^[11](*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkl*),将测序的序列与已知的等位基因序列进行比对,确定每个基因座的等位基因编号,进而组合成独特的序列型,从而对菌株进行 MLST 分型。

1.2.8 *cfb* 序列比对分析 参照 *cfb* 基因序列^[12],针对 4 株菌株拼接序列和原始数据进行深入分析,比较序列差异。

1.2.9 *cfb* 扩增检测 通过 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> 网站,设计靶向 *cfb* 全长序列的引物。引物序列如下:正向引物 5'-ATGAACGTTACACATATGATGTATCTA-3',反向引物 5'-TTATTTTAATGCTGTTTGAAGTGCTG-3',预期扩增产物大小为 768 bp。将 4 株待测菌株及 *S. agalactiae* ATCC 13813 分别接种于血平板,置于 35 $^{\circ}$ C 培养 24 h。收集适量新鲜菌落,置于聚丙烯液氮研磨专用管。采用液氮研磨法裂解细胞壁,使用酚氯提取并纯化细菌 DNA,获得模板 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。PCR 扩增完成后,扩增产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。通过凝胶成像系统对电泳后的凝胶进行显像,观察并分析扩增产物的条带情况。

2 结果

2.1 qPCR 检测结果 在荧光定量检测体系中,以循环数为横坐标,荧光强度为纵坐标绘制扩增曲线(图 1)。随着 PCR 扩增进行,阳性对照形成典型的“S”形荧光扩增曲线,而 4 株菌株荧光信号在整个扩增过程始终处于较低且平稳的水平,未见明显变化或增长,检测结果为阴性。

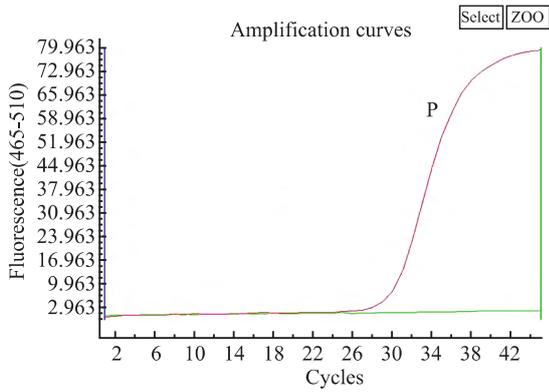


图1 4株菌株的 qPCR 扩增曲线
Fig.1 qPCR amplification curve of 4 strains

2.2 MALDI-TOF MS 的质谱峰图 在质谱分析中,以离子质荷比(m/z) 值为横坐标,离子流的强度

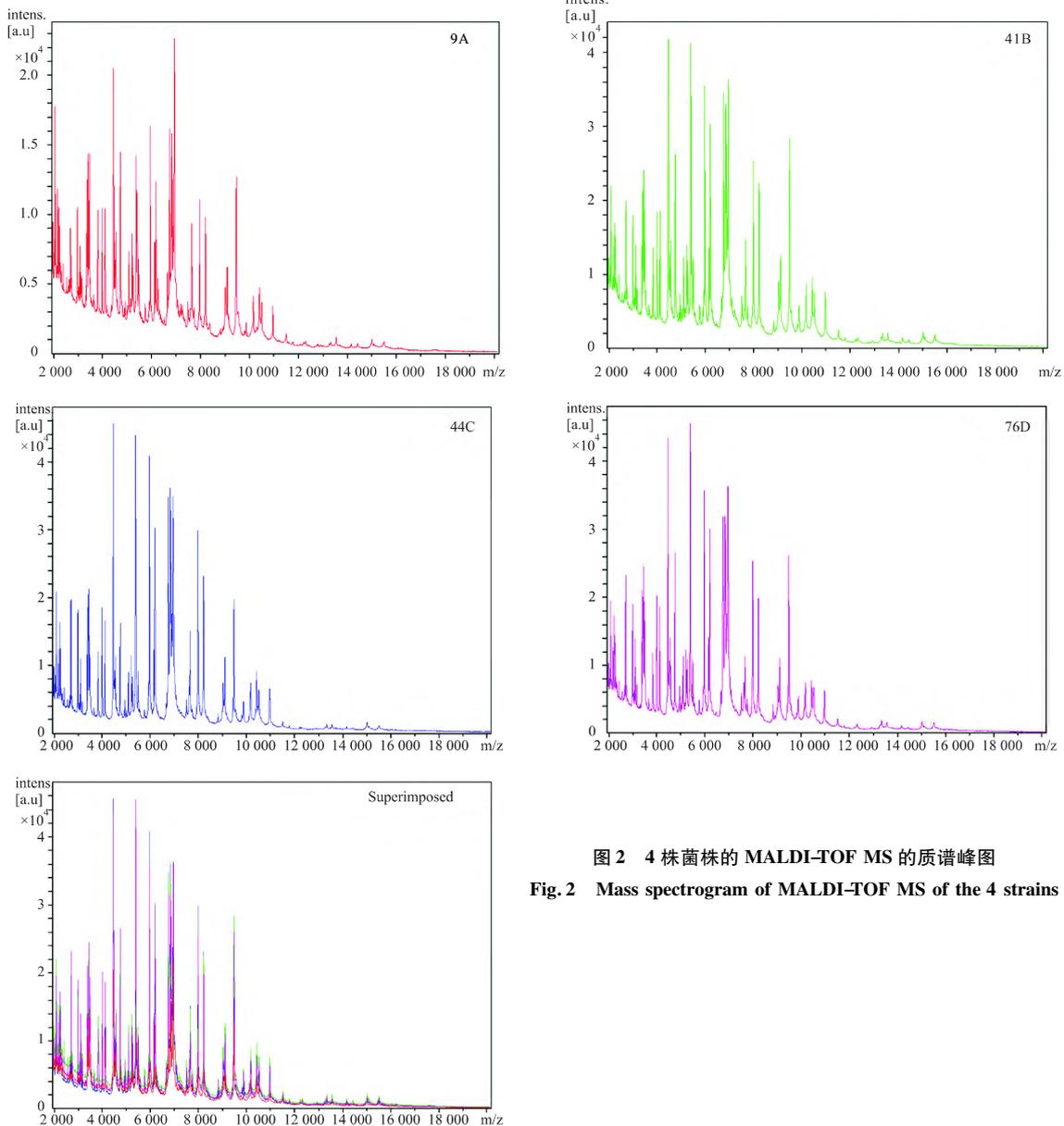


图2 4株菌株的 MALDI-TOF MS 的质谱峰图
Fig.2 Mass spectrogram of MALDI-TOF MS of the 4 strains

($intens$) 为纵坐标绘制质谱峰图(图 2)。对 4 株菌株进行质谱分析显示,其质谱峰均呈现清晰的峰型,峰间界限分明,无重叠或峰形拖尾的现象。通过与数据库中已知 *S. agalactiae* 的标准图谱比对,并依据严格的分析和匹配规则,判定 4 株菌株均为 *S. agalactiae*,且鉴定分值均 >2.200 (表 1),表明鉴定结果准确可靠。进一步将 4 株的质谱峰图进行图谱叠加处理分析,结果显示各菌株的特征峰高度一致。经分析确认,4 株菌株均为 *S. agalactiae* V29 CTL。

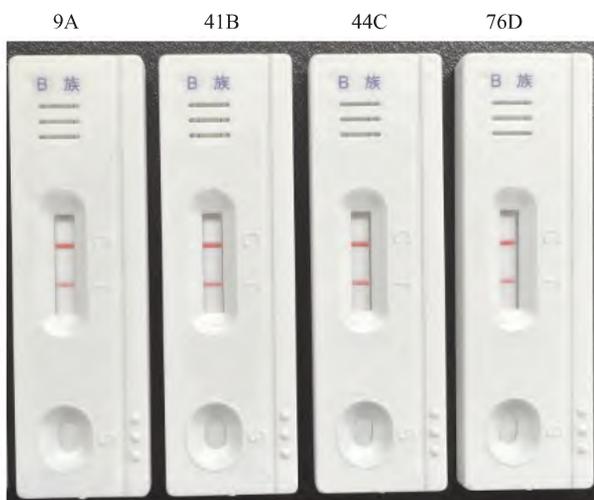
2.3 抗原检测结果 对上述 4 个样本进行预处理后,将样品滴加于检测卡的加样孔,10 ~ 20 min 内判读结果。结果显示(图 3),质控线(C 线)和检测线(T 线)均出现一条红色线条。根据检测原理,C 线显色表明检测结果可靠,T 线显色表明样本中存在

表 1 4 株菌株 MALDI-TOF MS 的鉴定结果

Tab. 1 Identification results of MALDI-TOF MS of the 4 strains

Strain numbers	Matched pattern	Score value
9A	<i>S. agalactiae</i> V29 CTL	2.276
41B	<i>S. agalactiae</i> V29 CTL	2.359
44C	<i>S. agalactiae</i> V29 CTL	2.417
76D	<i>S. agalactiae</i> V29 CTL	2.445

2.300 – 3.000: Highly reliable species-level identification; 2.000 – 2.299: Reliable species-level identification.

图 3 4 株菌株的 *S. agalactiae* 抗原检测结果Fig. 3 *S. agalactiae* antigen detection results of the 4 strains

S. agalactiae 抗原。因此,该结果表明这 4 个样本为 *S. agalactiae* 抗原阳性。

2.4 CAMP 试验结果 将 4 株菌株与金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)在 35 °C、5% CO₂ 恒温箱共培养 24 h。结果如图 4 显示,两菌交界区均未出现溶血

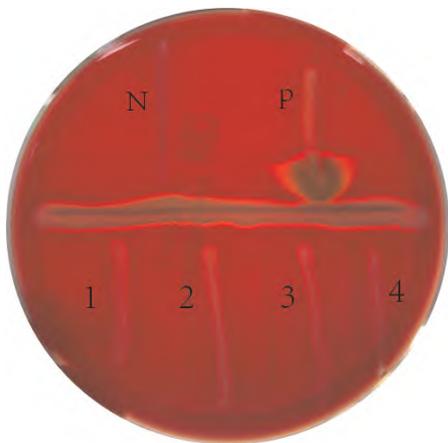


图 4 4 株菌株的 CAMP 反应

Fig. 4 CAMP response of the 4 strains

1 – 4: 4 strains; N (negative control): *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); P (positive control): *S. agalactiae* (ATCC 13813).

加强区。根据 CAMP 试验的判定标准,该结果表明 4 株菌株 CAMP 试验均为阴性。

2.5 系统发育树和环形进化树 完成菌株的 16S rRNA 基因序列提取后,利用 mafft 软件进行序列多重比对并进行剪切处理。基于该序列构建的系统发育树见图 5,系统发育树节点支持率(bootstrap percentage, BP)均高于 70,表明结果可信。4 株菌株均被鉴定为 *S. agalactiae*。进一步分析菌株间系统发育关系(图 6),表明 9A 与 76D 亲缘关系较近,41B 和 44C 亦呈现密切亲缘关系。

2.6 MLST 分型 使用 MLST 平台(<https://github.com/tseemann/mlst>)进行基于 7 对管家基因(*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkt*)的 MLST 分型,确认 4 株菌株 MLST 分型均为 ST862(*adhP* = 16, *pheS* = 1, *atr* = 4, *glnA* = 70, *sdhA* = 9, *glcK* = 3, *tkt* = 2)。

2.7 *cfb* 序列比对结果 以全长 *cfb* 序列作为参照标准,对 4 株菌株的拼接序列及原始测序数据进行查找比对(表 2、3)。分析表明:4 株菌株均未检出与参照 *cfb* 序列相似的片段,证实这 4 株菌株存在 *cfb* 完全缺失。

表 2 参照 *cfb* 的序列比对结果Tab. 2 The sequence alignment results according to the *cfb*

Strain numbers	9A	41B	44C	76D
Total reads	9 279 482 (100%)	11 314 170 (100%)	9 487 536 (100.00%)	9 848 644 (100%)
Total mapped	0	0	0	0
Multiple mapped	0	0	0	0
Uniquely mapped	0	0	0	0
Read-1 mapped	0	0	0	0
Read-2 mapped	0	0	0	0
Reads map to '+'	0	0	0	0
Reads map to '-'	0	0	0	0
Reads mapped in proper pairs	0	0	0	0

表 3 4 株菌株及 *S. agalactiae* ATCC 13813 的 *cfb* 检出情况Tab. 3 Detection of CAMP factor and *cfb* gene of the 4 strains and *S. agalactiae* ATCC 13813

Strain numbers	CAMP factor	<i>cfb</i>
9A	Negative	Negative
41B	Negative	Negative
44C	Negative	Negative
76D	Negative	Negative
ATCC 13813	Positive	Positive

2.8 琼脂糖凝胶电泳图 针对 *cfb* 设计特异性引物进行全长扩增,预期产物大小为 768 bp。PCR 扩增完成后,采用琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物并成

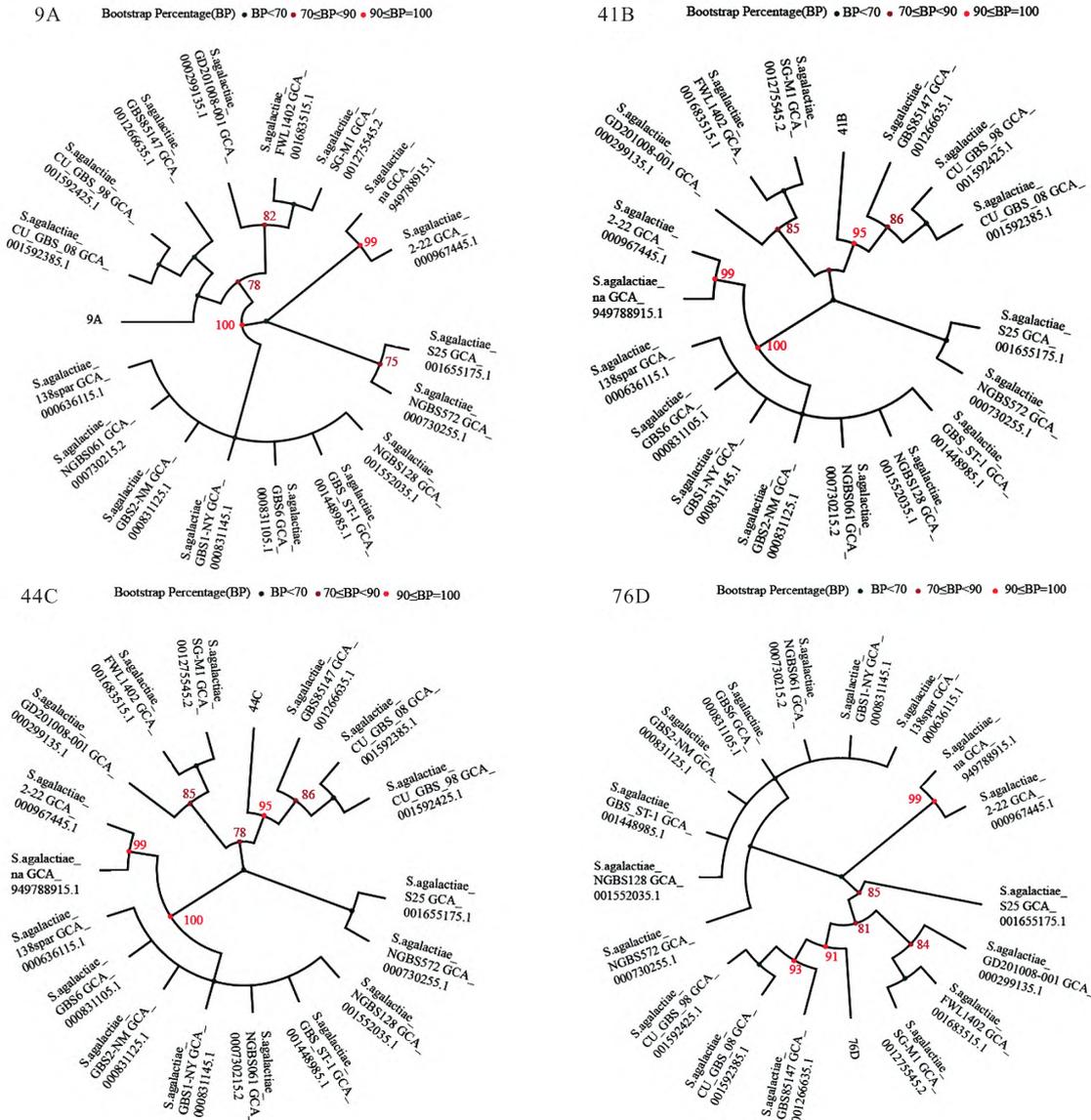


图5 4株菌株的环形进化树
Fig. 5 Circular evolutionary tree of the 4 strains

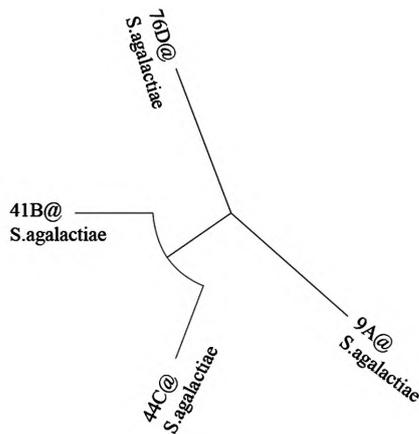


图6 4株菌株间的环形进化树
Fig. 6 Circular evolutionary tree among the 4 strains

像记录。结果显示(图7):阳性对照 *S. agalactiae* ATCC 13813 在分子量标记 700 ~ 800 bp 条带之间的目标区域出现单一清晰条带,大小与预期 768 bp 一致,证实扩增体系有效;然而 4 株菌株在对应位置均未检测到目的条带,根据试验判定标准确认为 *cfb* 扩增阴性。

3 讨论

近年来,*S. agalactiae* 逃避分子诊断检测的报道日益增多。文献^[8]报道,在美国与爱尔兰地区共收集到 31 株逃避 Xpert 检测的 *S. agalactiae*,其突变率存在地区差异(0% ~ 7.1%)。通过 MLST 和脉冲凝胶电泳分析,这 31 株 *S. agalactiae* 可分为 4 个克隆

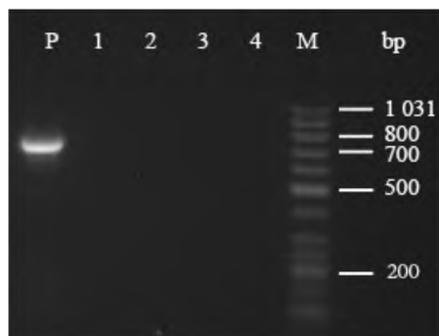


图7 4株菌株的电泳图

Fig.7 Electropherograms of the 4 strains

M: Marker (1 031 bp); 1-4: 4 strains; P: *S. agalactiae* ATCC 13813.

群。对其中15株的全基因组测序结果显示,10株呈小片段缺失(未累及 cfb):7株ST-860缺失181 bp,2株ST-23和1株ST-19缺失522 bp,缺失位置位于Xpert引物和探针设计区域,所有菌株CAMP试验阳性;然而,另外5株呈大片段缺失:1株ST-22和1株未知分型缺失7 kb,3株ST-19缺失49 kb,所有菌株CAMP阴性。德国研究^[5]亦发现6株分子检测漏检株,通过全基因组测序揭示其存在7~33 kb不等的新缺失片段,其中仅1株缺失大小与Tickler et al报道^[8]的ST-22菌株相似;该6株菌株中5株CAMP试验阴性,1株呈弱阳性;值得注意的是,即使血清型与MLST分型相同,菌株间缺失大小、位置仍存在异质性。国内对 cfb 缺失的研究较少。深圳地区曾报道^[12]15株 cfb 片段缺失的*S. agalactiae*,其MLST分型及CAMP反应与本研究菌株一致。但仅通过两段 cfb 片段扩增阴性确认,未进行全基因组测序。本研究通过全基因组测序联合全长 cfb 扩增证实4株逃避qPCR的*S. agalactiae*均存在 cfb 完全缺失。综上所述表明, cfb 缺失是*S. agalactiae*逃避分子检测的跨区域共性机制,传统认为“ cfb 存在于所有的*S. agalactiae*^[2]”的观念需修正,且菌株的突变情况可能被严重低估。

当前, cfb 保守序列仍是*S. agalactiae*分子检测的关键靶标。基于该靶标开发的qPCR法能够快速筛查孕产妇*S. agalactiae*定植状态,从而指导预防性抗生素使用。然而,仅依赖单一 cfb 靶标的qPCR检测存在一定的漏检风险,可能影响临床决策的准确性。需特别指出: cfb 缺失^[6-7,12-14]或转录缺陷^[15]可导致CAMP试验阴性。因此,仅依赖CAMP试验且无补充检测策略的实验室,可能同样面临与qPCR检测技术类似的漏检风险。

综上所述, cfb 的完全缺失致使*S. agalactiae*逃避靶向该基因的qPCR检测,导致假阴性结果。临床应加强对*S. agalactiae*的分子流行病学监测,并通过多靶标联合检测策略优化现行方案以降低漏检风险。

参考文献

- [1] Buchan B W, Faron M L, Fuller D, et al. Multicenter clinical evaluation of the Xpert GBS LB assay for detection of group B *Streptococcus* in prenatal screening specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2): 443-8. doi: 10.1128/JCM.02598-14.
- [2] 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.
- [3] Christie K, Atkins N, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci [J]. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1944, 22(3): 197-200. doi: 10.1038/icb.1944.26.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 周杰, 张莉, 杨书才, 等. 荧光PCR法在围生期孕妇B族链球菌筛查中的应用及CAMP试验阴性B族链球菌分子特征分析 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2022, 47(10): 1412-5, 1420. doi: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.10.018.
- [6] Zhou J, Zhang L, Yang S C, et al. Application of fluorescent PCR in screening of group B *Streptococcus* in perinatal pregnant women and analysis of molecular characteristics of group B *Streptococcus* with negative CAMP test [J]. *J Bengbu Med Coll*, 2022, 47(10): 1412-5, 1420. doi: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.10.018.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Lai X, Chen M, Wang J, et al. CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* strains exhibited complete or partial chromosomal deletions of the CAMP-factor encoding gene cfb [J]. *Microbiol Spectr*, 2025, 13(5): e0325724. doi: 10.1128/spectrum.03257-24.
- [10] 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.
- [10] Hu J H, Ma X L, Wang H, et al. The expert consensus of standard operation in identification of clinical microorganism by MALDI-TOF MS [J]. , 2019, 42(4): 241–9. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.04.004.
- [11] 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.
- [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] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.

Complete *cfb* gene deletion in *Streptococcus agalactiae*: molecular mechanism of qPCR false negatives

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

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

Abstract Objective To investigate the causes of false negative results in the detection of *Streptococcus agalactiae* using fluorescent quantitative PCR (qPCR) targeting the CAMP factor gene (*cfb*), and to perform a comprehensive analysis of the associated molecular mechanisms. **Methods** A total of 76 vaginal secretion samples were evaluated using both qPCR based on *cfb* gene and bacterial culture methods. Four suspicious strains exhibiting negative qPCR results but positive culture findings were identified using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), latex agglutination antigen detection, and the CAMP test. Whole genome analysis was conducted utilizing the MGI DNBSEQ-T7 and Nanopore-PromethION 48 sequencing platforms. Phylogenetic and circular evolutionary trees were constructed using the 16S rRNA gene for strain verification. Multilocus sequence typing (MLST) was conducted, and *cfb* sequences were aligned and analyzed based on spliced sequences and original data. Specific primers targeting the *cfb* gene were designed for full-length amplification, followed by verification through agarose gel electrophoresis. **Results** The four strains identified as suspicious were classified as *S. agalactiae* through MALDI-TOF MS, antigen detection, and 16S rRNA gene analysis, with MLST typing indicating ST-862. Phenotypic analysis revealed a negative CAMP test. Whole genome sequence alignment failed to detect the *cfb* gene or any homologous sequences, and molecular testing confirmed the absence of *cfb* gene PCR amplification products, thereby confirming its complete deletion. **Conclusion** This deletion is identified as the molecular mechanism responsible for the false negative qPCR detection of *S. agalactiae* when targeting this specific gene. It is recommended that the qPCR detection targeting a single *cfb* gene has limitation, and this may impact clinical diagnosis and treatment decisions. This limitation warrants careful consideration.

Key words *S. agalactiae*; fluorescence quantitative PCR; matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; *cfb*; whole genome sequencing; multilocus sequence typing

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

Corresponding author Yao Jie, E-mail: cele1028@163.com