

一株金黄色葡萄球菌小菌落突变株的分离鉴定

何娟梅¹, 朱军¹, 巢国祥², 朱晓芳³, 朱小平³, 董兰梅³, 杨伟霞³, 朱国强^{1*}

(¹扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

(²扬州市疾病预防控制中心, 扬州 225002)

(³苏北人民医院, 扬州 225001)

摘要 【目的】由于金黄色葡萄球菌(金葡菌)小菌落突变株(small colony variants, 简称 SCVs)可引起持续复发性感染, 且对氨基糖苷类有抗药性, 在临床诊断和治疗上造成很大的困扰。我国国内尚无金葡菌 SCVs 的报道, 本研究旨在分离鉴定出金葡菌 SCVs 菌株, 为国内进行 SCVs 的相关研究提供生物学材料。【方法】通过细菌的形态鉴定、种特异性基因(*nuc*)的 PCR 扩增鉴定以及系列生化实验, 从人源、动物源及环境源共 104 株金葡菌分离株中筛选得到金葡菌 SCVs, 并通过甲萘醌、硫酸素、胸腺嘧啶和血红素等补偿实验加以验证。【结果】获得一株来自环境源的金葡菌 SCVs 分离株, 命名为 CDC54, 该菌株含有金葡菌种特异性基因 *nuc*, 主要表现为菌落细小, 色素形成减少, 凝固酶活性下降, 对甘露醇的发酵作用减弱, 溶血活性降低及对氨基糖苷类抗生素有抗药性。【结论】成功分离鉴定出一株金葡菌 SCVs, 为国内开展 SCVs 相关疾病的防控和进一步研究 SCVs 的相关致病机理奠定基础。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 小菌落突变株; 分离鉴定

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)10-1397-06

细菌小菌落突变株(small colony variants, 简称 SCVs)于 1910 年首次被报道, 当时分离的一株 SCVs 被认为是一种异常的伤寒埃氏杆菌, 后来证实其属于肠伤寒沙门氏菌^[1-2]。SCVs 是一种具有独特的表型及致病特征且生长缓慢的细菌亚群。在表型上, 其表现为生长率低、菌落形态不规则以及生化特性异常。在临床上, SCVs 比相应的野生株更能持续存在于哺乳动物细胞中, 且对抗生素更不敏感, 当宿主细胞形成应急的保护性环境时, SCVs 会引起隐性或复发性感染。

在许多细菌种属中都发现有 SCVs, 但葡萄球菌 SCVs 研究得较广泛, 尤其是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。金葡菌 SCVs 的独特表型与

持续复发性感染之间的联系在 20 世纪 90 年代中期才被认知^[3-7]。一些非特异性吞噬细胞如内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞、造骨细胞、角质化细胞, 可有效摄取金葡菌, 细胞对正常金葡菌的这种内摄作用可迅速破坏细胞, 使细胞裂解^[8], 而金葡菌 SCVs 则可在细胞中持续存在, 这表明 SCVs 引起的复发性感染可能是由于该细菌在宿主细胞保护性环境中有一定的存活率^[9]。此外, 细胞对 SCVs 的内摄作用可能使 SCVs 免受宿主防御和抗菌剂作用^[6, 8-11]。总而言之, SCVs 表型可能是金葡菌进行细胞内摄作用和宿主细胞中生存的一种最佳策略。

SCVs 引起的亚急性感染具有抗药性、持续性及可复发性等特征^[6]。近年来的研究表明, 金葡菌

基金项目: 国家自然科学基金(30571374, 30771603); 江苏省属高校自然科学重大基础研究项目(08KJA230002)

* 通信作者。Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@hotmail.com, yzgzhu@yzu.edu.cn

作者简介: 何娟梅(1984-), 女, 广东韶关人, 硕士研究生, 主要从事病原微生物及免疫机理研究。E-mail: jmhe@sibs.ac.cn

收稿日期: 2009-03-23; 修回日期: 2009-05-21

SCVs可致人和动物严重感染。国外已对金葡菌 SCVs 开展了较为广泛的研究,而国内在金葡菌 SCVs 方面尚无类似报道。本实验在金葡菌 SCVs 分离鉴定方面做了些探索性研究,对分离株进行表型观察、*nuc* 基因鉴定以及一系列生化实验,筛选出一株金葡菌 SCVs。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 59 株人源金葡菌分离株分别由扬州市疾病预防控制中心和江苏省苏北人民医院分离、鉴定和保存,33 株环境源金葡菌分离株由扬州市疾病预防控制中心分离、鉴定和保存,12 株动物源金葡菌分离株由扬州大学奶牛场分离、鉴定和保存,金葡菌野生株 Sta54 # 和质控金葡菌 ATCC25923 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:溶菌酶,蛋白酶 K,Ex-*Taq* 酶,dNTPs,DNA marker 购自 TaKaRa 公司,硫酸素,胸腺嘧啶,亚硫酸氢钠甲萘醌注射液购自 Sigma 公司,其它试剂均为进口分装或国产分析纯。Hybaid Px2 型 PCR 扩增仪购自美国 Thermo 公司,JD801 数码凝胶电泳图像分析系统购自江苏省捷达科技发展有限公司。

1.1.3 抗生素和培养基:抗生素药敏纸片,甘露醇生化发酵管,MH 培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司。含 5%~8% 无菌脱纤维羊鲜血平板,含 5%~8% 脱纤维兔鲜血裂解液巧克力平板,胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB),TSA(含 1.8% 琼脂 TSB)。

1.2 细菌形态鉴定

将 104 株临床金葡菌分离株分别划线于 TSA 平板上,37℃ 培养 18~36 h,观察菌落的生长速度、大小、色泽,结合革兰氏染色观察结果,挑选出菌落细小、颜色较浅的菌株即可初步推断为疑似金葡菌 SCVs 分离株。

1.3 *nuc* 基因鉴定

nuc 是金葡菌种特异性基因,大小约为 460 bp,编码耐热核酸酶,在不同菌株间具有较高的保守性,因此,可作为鉴定金葡菌的一个标志。

1.3.1 引物:设计金葡菌种特异性基因 *nuc* 的引物,上游引物(P1):5'-ATGAAGTCAAATAAATCGCT-TGCTA-3',下游引物(P2):5'-TTGCCATTTGGTGA-AAAATACT-3'。

1.3.2 模板制备:参照常规革兰氏阳性菌模板制备方法。

1.3.3 PCR 扩增:按常规 PCR 反应体系及相应循环

体系(引物 $T_m = 51^\circ\text{C}$)进行 *nuc* 基因的扩增,设野生株 Sta54 # 为阳性对照。

1.4 溶血试验

将 PCR 鉴定为含 *nuc* 基因的金葡菌分离株,挑取单菌落划线于绵羊鲜血平板,37℃ 培养 24 h,设野生株 Sta54 # 为阳性对照,观察溶血现象。

1.5 甘露醇试验

将 PCR 鉴定为含 *nuc* 基因的金葡菌分离株,挑取单菌落接种于甘露醇生化发酵管,37℃ 培养 24~48 h,设野生株 Sta54 # 为阳性对照,观察甘露醇利用情况。

1.6 血浆凝固酶试验

将 PCR 鉴定为含 *nuc* 基因的金葡菌分离株,挑取单菌落接种于 TSB 中,培养 18 h,取 1 mL 菌液于指形管中,离心去上清,用 0.1 mol/L PBS(pH7.2)洗 2 次,最后菌泥悬浮于适量 PBS 中,与兔血浆以 1:1 的比例滴在载玻片上混匀,设野生株 Sta54 # 为阳性对照,观察凝集情况。

1.7 药敏试验

将具有金葡菌 SCVs 表型的菌株进行纸片扩散实验,以检测细菌的抗药性。根据文献报道^[12],主要测试以下几种抗生素:磷霉素(50 μg/片)、甲氧苄啶/磺胺甲氧基异噁唑(25 μg/片)、庆大霉素(10 μg/片)、苯唑西林(1 μg/片)、氨苄西林(10 μg/片)、万古霉素(30 μg/片)、链霉素(10 μg/片)、卡那霉素(30 μg/片)、青霉素(10 μg/片)、头孢西丁(30 μg/片)。

在 TSA 平板上挑取新鲜培养的单菌落,悬浮于 1 mL 生理盐水中,菌液调至 0.5 麦氏浊度,用灭菌棉签均匀涂布于 MH 平板,贴上药敏纸片,置于 35℃ 培养,质控金葡菌 ATCC25923 为阳性对照。由于分离株生长缓慢,故在培养 24 h 和 36 h 两个时间点各测一次抑菌圈的直径,以保证实验结果的准确性。对照纸片扩散法解释标准,判断细菌的抗药性。每个菌株都要做两次重复药敏实验,综合分析 2 次实验的结果,以尽量减少误差。

1.8 补偿试验

分别配制以下 4 种化合物的浓度梯度 MH 平板:

(1)MH - 胸腺嘧啶平板浓度梯度:10、1、0.1、0.01、0.001 mg/mL。由于胸腺嘧啶易溶于热水,微溶于冷水,且熔点为 335℃~337℃,故将其直接加入 MH 中,配成以上各浓度,115℃ 高压 30 min 后倒入平板。

(2)MH - 硫酸素平板浓度梯度:1、0.1、0.01、

0.001 mg/mL。先配制 10 mg/mL 的硫胺素原液, 0.22 μ m 过滤除菌后再按以上浓度涂布于 MH 平板上。

(3) MH - 甲萘醌平板浓度梯度: 0.1、0.01、0.001、0.0001 mg/mL。亚硫酸氢钠甲萘醌注射液 (4 mg/mL) 按以上浓度涂布于 MH 平板上。储存和培养细菌时应注意避光以防甲萘醌分解。

(4) MH - 兔血巧克力平板浓度梯度: 含兔血量 1%、10%、20%、25%。待高压灭菌好的 MH 培养基冷却至 90°C 时, 与无菌兔全血按以上比例混和, 分别倒入平板。

细菌接种于 TSB, 培养 5 h, 倍比稀释成 10^{-1} ~ 10^{-8} 共 8 个稀释度, 取 10^{-5} ~ 10^{-8} 稀释度的菌液, 分区滴加于以上各平板。设菌液滴在 MH 平板上作为对照组, 37°C 培养 24 h, 比较实验组与对照组细菌菌落大小。

2 结果

2.1 培养及染色特性

培养 18 h 后, 野生株 Sta54 # 菌落大小为

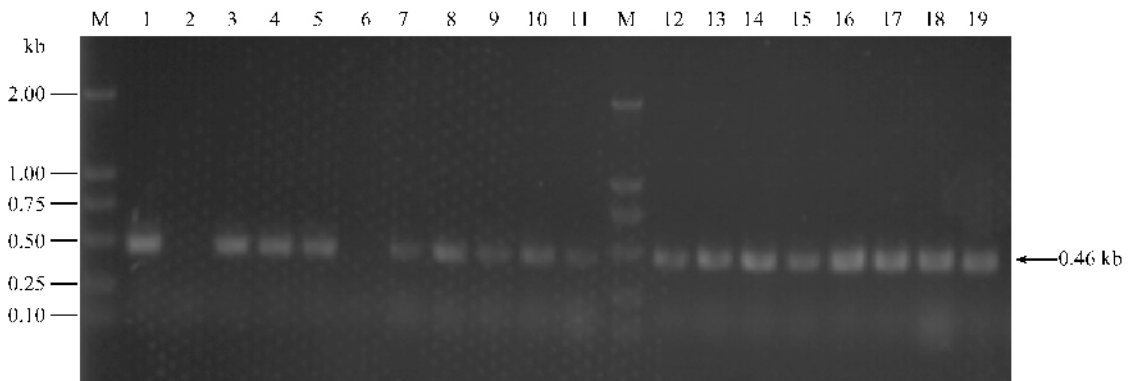


图 1 疑似金葡菌 SCVs *nuc* 基因的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR product of the suspected *S. aureus* SCVs isolates for *nuc* gene. M. Marker DL2000; 1. Sta54 #; 2. CDC32; 3. CDC37; 4. CDC40; 5. CDC41; 6. CDC49; 7. CDC54; 8. CDC55; 9. CDC57; 10. CDC61; 11. CDC63; 12. CDC66; 13. ZDF5; 14. ZDF10; 15. ZDF16; 16. ZDF18; 17. ZDF22; 18. B45; 19. B46.

2.3 生化反应

2.3.1 溶血实验: CDC54、CDC55、CDC57、CDC61、CDC63 溶血不明显, 其余菌株与 Sta54 # 一致, 都有明显溶血。

2.3.2 甘露醇实验: Sta54 # 在培养 24 h 后, 甘露醇由原来的紫色完全变成黄色, 结果为阳性, 而疑似 SCVs 菌株中, 有 31.3% (5/16) 的菌株利用甘露醇的速度缓慢, 在培养 24 h 后, 发酵管中的甘露醇开始由紫色慢慢变黄, 48 h 后才完全变黄, CDC57 不利用甘露醇。

2.3.3 血浆凝固酶实验: CDC63 不凝集, B45、B46、

1.0 mm, 而在测试的 104 株金葡菌临床分离株中, 共有 18 株表现为生长缓慢, 大小仅为 0.2 ~ 0.5 mm, 继续培养至 36 h, 菌落大小才达到 0.4 ~ 0.8 mm, 而野生株 Sta54 # 菌落大小达到 2.5 mm。色泽上, 上述 18 株生长缓慢疑似金葡菌 SCVs 中, CDC40、CDC57、CDC61 和 CDC66 为黄色, CDC32、CDC49 和 CDC54 为土黄偏白色, 其余 11 株分离株 (B45、B46、ZDF5、ZDF10、ZDF16、ZDF18、ZDF22、CDC37、CDC41、CDC55、CDC63) 呈土黄色, 与野生株 Sta54 # 的橘黄色相比, 颜色均较浅, 说明色素形成减少。革兰氏染色镜检, 都为革兰氏阳性菌, 呈葡萄串状球菌。上述 18 株临床分离株初步疑似 SCVs。

2.2 疑似 SCVs *nuc* 基因的 PCR 检测

PCR 检测结果表明 (图 1), 除 CDC32 和 CDC49 外, 其它所有菌株都在 460 bp 处出现一条特异性目的条带, 与预期扩增的 *nuc* 基因大小完全一致。因此, CDC32 和 CDC49 排除为金葡菌, 其余 16 株分离株都可确定为金葡菌种。

CDC41、CDC54、CDC55、CDC57、CDC61 在 2 min 后才出现略微凝集, 其余 10 株疑似 SCVs 分离株与 Sta54 # 一样, 在几秒内就出现很明显的凝集, 为阳性。

2.3.4 细菌形态观察、PCR 鉴定、溶血试验、甘露醇试验和凝固酶试验等结果: 18 株可疑 SCVs 分离株中, B45 菌落大小虽与野生型差不多, 但颜色较浅 (土黄色), 发酵甘露醇速度缓慢, 凝固酶实验中凝集不明显; CDC54 菌落大小仅为 0.5 mm, 呈土黄偏白色, 溶血活性和凝固酶活性均较低; CDC57 菌落大小为 0.4 mm, 呈黄色, 溶血不明显, 不利用甘露醇; CDC63 大小为 0.6 mm, 呈土黄色, 溶血不明显, 发酵

甘露醇速度缓慢,凝固酶阴性(表1)。与金葡菌 SCVs 典型表型特征相比,此四株细菌都呈现出部分

SCVs 表型,在上述试验结果的基础上,对该4株分离株作进一步鉴定。

表1 野生株 Sta54 # 和四株疑似金葡菌 SCVs 分离株的表型及生化特性

Table 1 Phenotypic and biochemical characteristics of the wild-type Sta54 # and the four suspected *S. aureus* SCV isolates

Isolates	Cultivation time/h	Colony size/mm	Colony color	Hemolysis test	Mannitol test	Coagulase test	<i>nuc</i> gene identification
Sta54 #	36	2.5	Saffron-yellow	++	++	++	++
B45	36	1.0	Buff	++	+	+	++
CDC54	36	0.5	Buff-blanc	+	++	+	++
CDC57	36	0.4	Yellow	+	-	++	++
CDC63	36	0.6	Buff	+	+	-	++

++ . Positive ; + . Moderate Positive ; - . Negative

2.4 药敏实验

在 24 h 和 36 h 测得的抑菌圈大小并无差异,说明细菌生长 24 h 后,其生长速度对药敏实验的结果无影响,两次重复实验的结果一致。从表 2 可知,四株疑似金葡菌 SCVs 分离株均对甲氧苄啶/磺胺甲基异噁唑(SXT)敏感,而据文献报道^[5,13-14],囊性纤维化(CF)患者长期服用 SXT,会产生胸腺嘧啶依赖性 SCVs,即胸腺嘧啶依赖性 SCVs 对 SXT 具有抗性,由此可以初步排除它们是胸腺嘧啶依赖性 SCVs 的可能性;且此四株分离株均对苯唑西林和头孢西丁敏感,表明它们不是耐甲氧西林金葡菌(MRSA)SCVs。CDC54 对氨基糖苷类(庆大霉素和卡那霉素)和青霉素类不敏感,而 CDC57 只对青霉素类抗性(表 2)。

表 2 ATCC 25923 和四株疑似金葡菌 SCVs 分离株药敏实验结果

Table 2 Susceptibility test of ATCC 25923 and the four suspected *S. aureus* SCV isolates

Antibiotic	ATCC 25923	B45	CDC54	CDC57	CDC63
Fosfomycin	S	S	S	S	S
SXT	S	S	S	S	S
Gentamicin	S	S	R	S	S
Oxacillin	S	S	S	S	S
Ampicillin	S	S	R	R	S
Vancomycin	S	S	S	S	S
Streptomycin	S	S	R	S	S
Kanamycin	S	S	R	S	S
Penicillin	S	S	R	R	S
Cefoxitin	S	S	S	S	S

S. Sensitive ; R. Resistant.

2.5 补偿试验

实验发现,在含上述四种化合物各稀释度平板上的细菌生长都有一个规律:即在某个稀释度平板上生长的菌落直径最大,小于或大于这个稀释度的平板上菌落都比较小,因此,将能使菌落生长至直径最大的化合物稀释度确定为细菌最适生长浓度,分别是:胸腺嘧啶(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、硫酸素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、甲萘

醌(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、兔全血(20%)。

基于上述结论,在此四种化合物细菌最适生长浓度的平板上培养 CDC54,观察到其菌落大小比对照组(MH 平板上)要大 0.5 mm,且与野生株 Sta54 # 的菌落大小(1.3 mm)接近。

3 讨论

金葡菌 SCVs 的典型特征是:固体琼脂培养为细小菌落,液体培养则生长缓慢,色素形成减少,溶血活性降低(0.25%,野生型金葡菌则为 89%),凝固酶活性降低,对氨基糖苷类的抗性增强,非典型的生化反应,如对乳糖、松二糖和甘露醇的发酵作用减弱,不还原硝酸盐,对 N-乙酰葡萄糖胺的利用减少^[11]等。

本实验通过观察 104 株临床分离株在 TSA 上的生长情况,发现有 18 株疑似金葡菌 SCVs 分离株生长速度缓慢,菌落大小接近于野生株的 1/10 ~ 1/5,菌落颜色比野生株浅,即色素形成减少,尤其是 CDC54 菌落为土黄偏白色,与金葡菌 SCVs 典型表型相似。

这些菌株都是按常规方法从临床样本中分离,不能百分百确定其为金葡菌,且金葡菌 SCVs 的生化特性与野生型金葡菌有很大差别,若直接进行生化实验,容易出现假阴性结果。据文献报道,疑似金葡菌 SCVs 分离株在凝固酶实验中可能为假阴性。因此需测试其种特异性基因 *nuc* 或 *coa* 以确定其为金葡菌,或者对凝固酶阴性金葡菌 SCVs 的 16S rRNA 序列进行诊断测序^[15]。因此,本实验设计了金葡菌种特异性基因 *nuc*(编码耐热核酸酶)的引物,对 18 株疑似 SCVs 分离株进行 PCR 扩增,发现除 CDC32 和 CDC49 外,其余 16 株细菌在 460 bp 处均有目的条带,可确定为金葡菌。

在生化实验中发现,B45、CDC54、CDC57、CDC63

这4个分离株具有金葡菌 SCVs 的部分表型特征,包括凝固酶实验中凝集现象不明显、甘露醇利用速度缓慢、溶血不明显,即可表述为细菌的凝固酶活性下降,对甘露醇的发酵作用减弱、溶血活性降低。但在药敏实验中发现,只有 CDC54 对氨基糖苷类有抗药性。综合所有实验结果,可初步确定来自环境源的 CDC54 为金葡菌 SCVs。

金葡菌 SCVs 最初研究的焦点是解释 SCVs 的低生长率,以及检测菌株以确定恢复至野生型生长率所需要的特定物质。用诸如甲萘醌、氯化血红素、硫胺素、不饱和脂肪酸和 CO₂ 之类的化合物刺激 SCVs 的生长^[6],对大量分离株进行检测表明,前3种化合物是可以刺激菌株生长的^[16]。

进一步研究发现,临床上常见的金葡菌 SCVs 主要有电子传递缺陷型和胸腺嘧啶依赖型(TD),前者表现为甲萘醌或氯化血红素缺陷,这两种物质分别参与电子传递链中醌(维生素 K₂)和细胞色素类的生物合成^[11]。由于甲萘醌的生物合成需要硫胺素,故硫胺素缺陷型 SCVs 属于甲萘醌缺陷型 SCVs 的一个亚型。实践证明,通过临床分离株确定金葡菌 SCVs 精确的遗传损伤是很难的,但利用补偿实验恢复菌株表型有助于研究甲萘醌和氯化血红素生物合成途径中的缺陷^[9]。据相关研究报道,在囊性纤维化(CF)病例中 21% 的患者分离出 TD 金葡菌^[14]。TD 金葡菌 SCVs 具有与电子传递缺陷型 SCVs 相似的表型,其原理尚未知晓。有学者认为胸腺嘧啶缺陷型 SCVs 是双重突变株,因为它们能从脓汁中分离到,而这些脓汁富含金葡菌 DNA 酶作用后所释放的胸腺嘧啶^[17-18]。胸腺嘧啶依赖性 SCVs 为了抵抗 SXT 而吸收胞外胸腺嘧啶,最终绕过 SXT 抑制途径,因此,胸腺嘧啶依赖性 SCVs 可依靠外源性胸腺嘧啶存活。若有大量胸腺嘧啶存在,则 SCVs 的生长类似野生型金葡菌^[5]。

为验证 CDC54 的金葡菌 SCVs 身份,根据上述资料,设计了 SCVs 形态恢复实验。由于血液中的红细胞高温裂解后可释放出大量的血红素,故用兔血巧克力平板代替血红素。在分别补加了胸腺嘧啶(1 μg/mL)、硫胺素(100 μg/mL)、甲萘醌(1 μg/mL)、兔血(20%)的 MH 平板上培养时发现,CDC54 生长速度加快,菌落变大,且大小接近于野生型金葡菌,表明这四种化合物可以刺激菌株的生长,可能在 SCVs 恢复野生株表型上起了一定作用,由此可作为确定 CDC54 为金葡菌 SCVs 的一个依据。因此,可确定 CDC54 为金葡菌 SCVs。

致谢 本项目得到加拿大麦基尔大学 X. Zhao 教授的大力资助!

参考文献

- [1] Proctor RA, Bates DM, McNamara PJ. In *Emerging Infections*. 5th eds. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2001.
- [2] Jacobsen KA. Mitteilungen über einen variablen Typhusstamm (*Bacterium typhi mutabile*), sowie über eine eigentümliche hemmende Wirkung des gewöhnlichen Agar, verursacht durch Autoklavierung. *Zentralbl. Bakteriol*, 1910, 56: 208-216.
- [3] Seifert H, von Eiff C, Fätkenheuer G. Fatal case due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5: 450-453.
- [4] von Eiff C, Bettin D, Proctor R, et al. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, 25(5): 1250-1251.
- [5] Kahl B, Herrmann M, Everding A, et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 1998, 177(4): 1023-1029.
- [6] Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, et al. Persistent and relapsing infections associated with small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 1995, 20(1): 95-102.
- [7] Spearman P, Lakey D, Jotte S, et al. Sternoclavicular joint septic arthritis with small-colony variant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 1996, 26(1): 13-15.
- [8] Vann JM, Proctor RA. Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* α-hemolysin. *Microbial Pathogenesis*, 1988, 4(6): 443-453.
- [9] Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, et al. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 1994, 170(4): 1033-1037.
- [10] Sadowska B, Bonar A, von Eiff C, et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2002, 33(3): 191-197.
- [11] von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, et al. A site directed *Staphylococcus aureus* hemB mutant is a small colony variant which persists intracellularly. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(15): 4706-4712.

- [12] Besier S , Smaczny C , Mallinckrodt CV , et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Clinical Microbiology* , 2007 , 45(1) : 168 – 172 .
- [13] Kahl BC , Duebbers A , Lubritz G , et al. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *Journal of Clinical Microbiology* , 2003 , 41(9) : 4424 – 4427 .
- [14] Gilligan Ph , Gage PA , Welch DF , et al. Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* , 1987 , 25(7) : 1258 – 1261 .
- [15] Becker K , harmsen D , Mellmann A , et al. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* , 2004 , 42(11) : 4988 – 4995 .
- [16] Proctor RA , Balwit JM , Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infectious Agents and Disease* , 1994 , 3(6) : 302 – 312 .
- [17] Saxild HH , Andersen LN , Hammer K. *dra-nupC-pdp* operon of *Bacillus subtilis* : nucleotide sequence , induction by deoxyribonucleosides , and transcriptional regulation by the *deoR*-encoded DeoR repressor protein. *Journal of Bacteriology* , 1996 , 178(2) : 424 – 434 .
- [18] Smith KM , Slugoskim D , Loewen SK , et al. The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *The Journal of Biological Chemistry* , 2005 , 280(27) : 25436 – 25449 .

Isolation and identification of a *Staphylococcus aureus* small colony variants

Juanmei He¹ , Jun Zhu¹ , Guoxiang Chao² , Xiaofang Zhu³ , Xiaoping Zhu³ , Lanmei Dong³ , Weixia Yang³ , Guoqiang Zhu^{1*}

(¹ College of Veterinarymedicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

(² Center of Disease Control of Yangzhou , Yangzhou 225002 , China)

(³ Northern People 's Hospital of Jiangsu , Yangzhou 225001 , China)

Abstract [Objective] *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCVs) could lead to persistent , recurrent infection with the characteristics of aminoglycosides antibiotics resistance , making them a big challenge for clinical diagnosis and therapy . We aimed at isolating and identifying isolates of *S. aureus* SCVs and providing the biological material of SCVs study in China . **[Methods]** The combination assays of observing colony phenotype , identification of the species-specific gene *nuc* of *S. aureus* by PCR amplification and a series of biochemical tests were conducted on 104 clinical isolates originally isolated from human , cow and environment . The suspected isolates were confirmed as *S. aureus* SCVs by complementation assay with supplementation of menadione , thiamine , thymine and haemin . **[Results]** One of the isolates from environment was identified as SCVs , named CDC54 with the species-specific gene *nuc* of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) confirmed by PCR amplification , whose major phenotypes included smaller colony , decreased pigmentation , decreased coagulase , reduced fermentation of lactose , decreased haemolytic activity , increased resistance to aminoglycosides . **[Conclusion]** The CDC54 will play an important role in studying prevention , control and pathogenesis for *S. aureus* SCVs infection .

Keywords : *Staphylococcus aureus* ; small colony variants ; isolation and identification

(本文责编 : 王晋芳)