文章编号：1001-8689(2019)04-0455-06

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 δ- 毒素的应用

郭庆昕[1,3] 杨滨[2,*] 强华[3,*]

(1 福建中医药大学附属泉州市正骨医院，泉州 362000；2 福建医科大学附属第一医院检验科，福州 350005；3 福建医科大学，福州 350122)

摘要：目的 本研究采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 检测 δ- 毒素，评估其在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的分型和毒力表达中的作用。**方法** 使用 Bruker microflex MALDI-TOF 仪器，采集 2000~20000Da 质量范围内，以正线性模式采集图谱，使用仪器配套的 MALDI Biotyper 2.0 软件分析 MRSA 菌株的原始图谱，产生的峰列表直接使用 flexAnalysis、clinProTools3.0 软件分析。**结果** 本研究中共检测 83 株 MRSA，共有 39(47.0%) 株 MRSA 检出 (3005±5)*m/z* 信号峰，其中 HA-MRSA 19(22.9%) 株，CA-MRSA 20(26.5%) 株，*P*=0.766，两者之间无显著性差异；33(39.8%) 株 MRSA 检出 (3035±5)*m/z* 信号峰，其中 HA-MRSA 9 (10.8%) 株，CA-MRSA 24(28.9%) 株，*P*=0.003，两者之间有显著性差异；11(13.%) 株 MRSA 既未检出 (3005±5)*m/z* 信号峰也未检出 (3035±5)*m/z* 信号峰，全部为 HA-MRSA 菌株。*spa* 分型中检出 (3005±5)*m/z* 信号峰，15(18.1%) 株为 t062 型，8 株为 t015(9.6%) 型，4 株为 t030(4.8%) 株，*P*=0，有显著性差异；检出 (3035±5)*m/z* 信号峰，31(37.3%) 株为 t437 型，2(2.4%) 株 t8660 型，*P*=0，有显著性差异；(3035±5)*m/z* 作为 *spa* t437 型特征信号 ROC 曲线下面积 0.89，*P*=0。11 株未检出 δ- 毒素，6 株分离自骨关节标本，3 株分离自呼吸道标本，1 株分离自慢性溃疡的分泌物标本，1 株分离自血液；在血平板的菌落特征，6 株 MRSA 菌落形态发生改变，5 株菌落形态正常。**结论** MALDI-TOF MS 使用常规方法即可快速检测 MRSA 的 δ- 毒素，其质谱峰为 (3005±5)*m/z* 和 (3035±5)*m/z* 两种；(3035±5)*m/z* 是 δ- 毒素的同基因变异体 (HldG10S) 的质谱峰，该峰可快速鉴别 *spa* t437 型；不产生 δ- 毒素的菌株是 *agr* 调控系统失调的表现，与慢性感染、小菌落形成、无明显 β- 溶血有关。

关键词：基质辅助激光解析电离飞行时间质谱；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌；δ- 毒素

中图分类号：R978.1 **文献标志码：**A

Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in the detection of MRSA δ-toxin

Guo Qing-xin[1,3], Yang Bin[2] and Qiang Hua[3]

(1 Quanzhou Orthopedic Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Quanzhou 362000; 2 First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005; 3 Fujian Medical University, Fuzhou 350122)

Abstract Objective In this study, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used to detect the δ-toxin, and to evaluate the role of δ-toxin production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) typing and virulence expression. **Methods** The Bruker microflex MALDI-TOF was used to analyze collected proteins with the relative molecular weight ranging from 2,000 to 20,000 Da in a positive linear mode, and the software MALDI Biotyper 2 was used to analyze the original map of the MRSA strain. The generated list of peaks were analyzed directly by flexAnalysis and clinProTools3.0. **Results** A total of 83 MRSA were analyzed, and 39 (47.0%) MRSA showed peaks of (3005±5)*m/z*, including19 (22.9%) HA-MRSA and

收稿日期：2017-12-01

作者简介：郭庆昕，男，生于 1981 年，主管检验师，主要从于细菌致病性研究，E-mail: 51699688@qq.com

* 通讯作者，杨滨，E-mail: yangbin2864@163.com；强华，E-mail: qianghua66@sina.com

20 (26.5%) CA-MRSA, showing no significant difference (*P*=0.766); 33 (39.8%)MRSA were detected with peaks at (3035±5)*m/z* , including 9 (10.8%) HA-MRSA and 24 (28.9%) CA-MRSA, showing the statistically significant difference between the two (*P*=0.003);11 (13%) MRSA were not detected with any peak at (3005±5)*m/z* or (3035±5)*m/z*, and thus all strains were HA-MRSA. As to *spa* typing, peaks at (3005±5)*m/z* were detected, 15 (18.1%) belonged to t062, 8 (9.6%) were t015, and 4 (4.8%) were t030, showing statistically significant difference (*P*=0); peaks at (3035±5) *m/z* were also found, 31 (37.3%) were t437 , 2 (2.4%) were t8660, showing statistically significant difference (*P*=0); the peak at (3035±5)*m/z* was the characteristic for *spa* type t437, and its area under the ROC curve was 0.89 (*P*=0). The δ- toxin was not detected in 11 strains, among which 6 were isolated from bone and joint specimens, 3 were isolated from the respiratory tract specimens, one from the secretions of chronic ulcer specimens, one isolated from the blood. In the blood plate colonies, 6 strains of MRSA colony morphology changed, while 5 colonies were normal. **Conclusions**　MALDI-TOF MS can be used to quickly detect the δ- toxin of MRSA, and their mass spectrum peaks were at (3005±5)*m/z* and (3035±5)*m/z*. The peak at (3035±5)*m/z* is the mass spectrum of the δ-toxin homologous variant (HldG10S), which can quickly identify *spa* t437. The absence of δ-toxin is a manifestation of the dysregulation of the *agr* regulatory system, which is associated with chronic infections, small colony formation, and no obvious beta hemolysis.

Key words　Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; δ-toxin

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 技术可用于蛋白质、核酸、多糖等多种生物分子的分子量和结构分析，其基本原理是：在基质辅助激光解析的离子源部分，基质与样本形成共晶体后，从激光中吸收能量使样本解吸，基质与样本间发生电荷转移使得样本分子电离；在飞行时间质谱分析器部分，离子在电场作用下加速飞过管道，飞行时间与离子的质荷比成正比，根据到达检测器的飞行时间可测出质荷比，通过软件处理得到特征性的指纹图谱 [1]。Holland 等 [2] 应用 MALDI-TOF MS 在无前处理的前提下获得全菌的蛋白指纹图谱，与数据库中细菌质谱进行比较，鉴定细菌至属、种，乃至亚种的水平，使得细菌鉴定变得更加快速准确。蛋白质约占细菌干重的 50%，其表达由遗传性状决定，受外界环境影响较小，具有多样性、丰富性、易于提取和分离且不需要扩增的特点，因此成为 MALDI-TOF MS 技术鉴定细菌的最主要生物标志 [3]。

随着金黄色葡萄球菌 MALDI-TOF MS 图谱中不同的蛋白和多肽的本质逐渐被揭示，发现许多小分子多肽的实质为金黄色葡萄球菌产生的毒力因子，如酚可溶性调节肽 (PSM) 家族中的 $PSMa_1$、$PSMa_2$、$PSMa_3$[4]、$PSMa_4$[5] 和 δ- 毒素 [6] 等。其中 δ- 毒素是最早被认识的 PSM 家族成员，含 26 个氨基酸的多肽，最初被描述成一种蛋白质，但它实际上更倾向于寡聚化的多肽 [7]，由辅助基因调节子 (*agr*) 群体感应系统的调控分子 RNAIII 编码 [8]。研究人员发现 δ- 毒素还有一个同基因变异体，是由于 *hld* 基因中的非同义突变 (从甘氨酸密码子 GGT 到丝氨酸密码子 AGT)，导致在 10 位由丝氨酸取代甘氨酸的 δ- 毒素 (HldG10S)[9]。Gagnaire 等 [6] 使用 MALDI-TOF MS 检测 δ- 毒素，并证实 (3005±5)*m/z* 对应野生型的 δ- 毒素 (分子量 3005.3Th)，(3035±5)*m/z* 峰对应 δ- 毒素 G10S 变异体 (分子量 3035.8Th)。

本研究使用 MALDI-TOF MS 采集 83 株临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 蛋白指纹图谱，使用仪器配套软件分析 δ- 毒素产生在 MRSA 的分型和毒力表达的作用。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌株来源

83 株实验菌株来自于某综合三甲医院临床分离的非重复菌株，按美国疾病预防控制中心的社区获得性 MRSA(CA-MRSA) 定义：患者在门诊或入院 48h 内分离到 MRSA 菌株，1 年内无住院或与医疗机构接触史，没有留置各种导管及其他穿透皮肤的医用装置，将实验菌株分成医院获得性 MRSA(HA-MRSA) 组与 CA-MRSA 组。SCC*mec* 分型标准菌株为同济大学附属上海肺科医院余方友教授馈赠。

1.1.2　主要试剂

血琼脂平板、革兰阳性菌 GP 鉴定卡、革兰阳性菌 GP67 药敏卡 (均购于法国 Bio-Mérieux 公

司），甲酸、乙腈、α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (均购于 BrukerDaltonique)，实验引物 (上海生工生物工程有限公司合成)，PCR 反应试剂包 (购于大连宝生 TaKaRa 有限公司)。

1.1.3 主要设备

Vitek-2 全自动细菌检测系统 (购于法国 Bio Mérieux 公司)，microflex 型基质辅助激光解析电离飞行时间质谱、MALDI Biotype2.0 软件、clinProTools 3.0 软件、flexAnalysis 软件 (均购于 BrukerDaltonique)，PCR 扩增仪 (购于 Eppendorf 有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 δ- 毒素 (*hld*) 基因

扩增引物和实验方法参照文献 [10]，选取部分扩增产物送上海生工生物工程有限公司进行测序确认。

1.2.2 基因分型

SCC*mec* 分型扩增引物和实验方法参照文献 [11]，结果判读以 Marker 为基准，结合 SCC*mec* 标准菌株在相应位置出现荧光条带为阳性。*spa* 分型扩增引物和实验方法参照官方网站推荐方案，将扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序，登陆官方网站 http://spa.ridom.de/spatypes，查询各菌株的 *spa* 分型。

1.2.3 MRSA 蛋白指纹图谱的采集

样本前处理按照仪器说明书进行，采用甲酸萃取法提取全菌蛋白，吸取 1μL 提取液于 96 孔靶板上，每个样品检测 3 孔，室温下干燥。每个样品用 1μL 用 α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸 -50% 乙腈 -2.5% 三氟乙酸 (HCCA) 中的饱和溶液覆盖，并在室温下干燥。使用 Bruker microflex MALDI-TOF 仪器采集在 2000~20000Da 的质量范围内的正线性模式图谱，记录每一图谱的使用 500 个激光照射。从测量到鉴定的整个过程中保证仪器在没有任何外界因素干扰的情况下自动进行。

1.2.4 数据分析

使用仪器配套的 MALDI Biotyper 2.0、flexAnalysis 软件分析 MRSA 菌株的蛋白指纹图谱，ROC 曲线使用 clinProTools 3.0 软件分析；χ^2 检验采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，$P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 MRSA 基因检测结果

83 株 MRSA 中 HA-MRSA39 株，CA-MRSA44 株。SCC*mec* 分型检出 4 个分型，SCC*mec* Ⅰ 1 株 (1.2%)SCC*mec* Ⅱ 3 株 (3.6%)SCC*mec* Ⅲ 54 株 (65.1%)SCC*mec* Ⅳ a 24 株 (28.9%)；39 株 HA-MRSA 中 SCC*mec* Ⅰ 1 株 (2.6%)SCC*mec* Ⅱ 3 株 (2.7%) SCC*mec* Ⅲ 32 株 (82.1%)SCC*mec* Ⅳ a 2 株 (5.1%) 未知分型 1 株 (2.6%)；44 株 CA-MRSA 中 SCC*mec* Ⅲ 22 株 (50.0%)SCC*mec* Ⅳ a 22 株 (50.0%)。*spa* 分型中 83 株 MRSA 共检出 15 个型，主要分型为 t437 共 33(39.8%) 株，t062 共 18(21.7%) 株，t015 共 9(10.8%) 株；HA-MRSA 的主要 *spa* 分型 t437 为 11(28.2%) 株，t062 为 9(23.1%) 株，t015 为 4(10.3%) 株，t030 为 4(10.3%) 株；CA-MRSA 中 t437 为 22(50.0%) 株，t062 为 9(20.5%) 株，t015 为 5(11.4%) 株。所有菌株均检出 *hld*。

2.2 MRSA δ- 毒素产生情况

本研究中共有 39(47.0%) 株 MRSA 检出 (3005±5) *m/z* 信号峰 (图 1)，其中 HA-MRSA 19(22.9%) 株，CA-MRSA 20(26.5%) 株，P=0.766，两者之间无显著

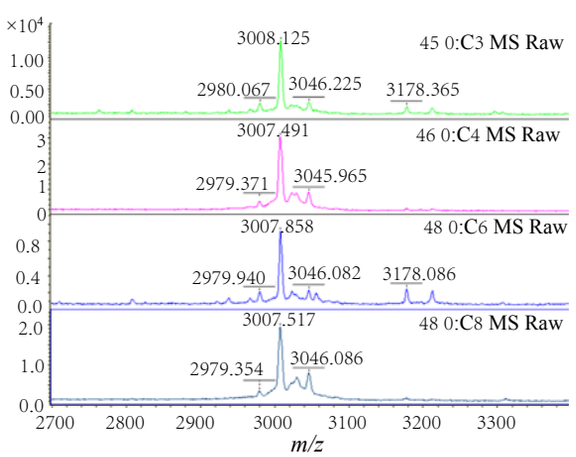


图 1 δ- 毒素野生型质谱峰 (3005±5)*m/z*

Fig. 1 The spectrum of the δ-toxin wild-type (3005±5*m/z*)

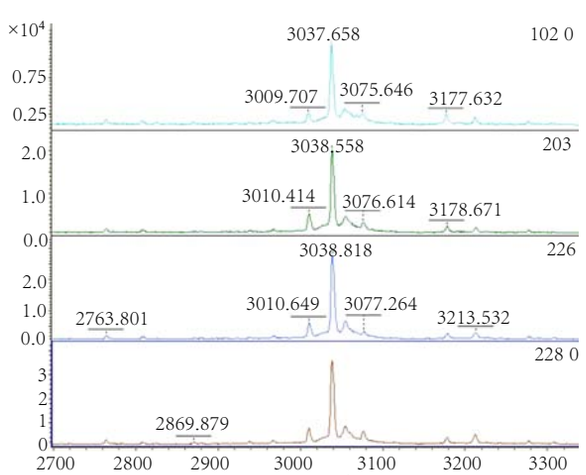


图 2 δ- 毒素 G10S 变异体质谱峰 (3035±5)*m/z*

Fig. 2 The spectrum of the δ-toxin G10S variant (3035±5)*m/z*

性差异；另外共有 33(39.8%) 株 MRSA 检出 (3035±5) *m/z* 信号峰 (图 2)，其中 HA-MRSA 9(10.8%) 株，CA-MRSA 24(28.9%) 株，*P*=0.003，两者之间有显著性差异；有 11 株 MRSA 即未检出 (3005±5)*m/z* 信号峰，也未检出 (3035±5)*m/z* 信号峰 (图 3)，全部为 HA-MRSA(表 1)。

在 *spa* 分型中检出 (3005±5)*m/z* 信号峰的 15(18.1%) 株为 t062 型，8 株为 t015(9.6%) 型，4 株为 t030(4.8%) 株，2 株为 t071(2.4%) 株，2 株为 t091(2.4%) 株，另外 8 株其他 *spa* 分型；检出 (3035±5)*m/z* 信号峰的 31(37.3%) 株

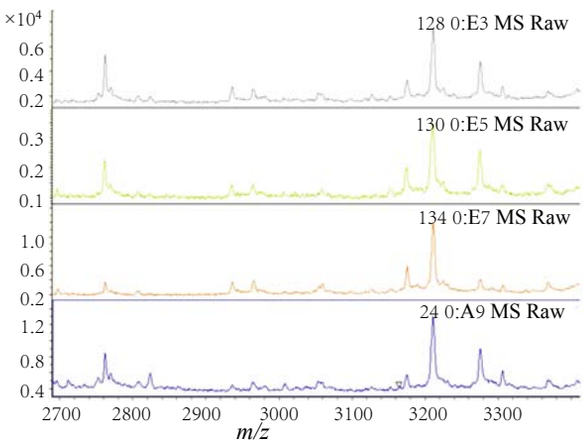


图 3　未检出 δ- 毒素质谱图

Fig. 3　The spectrum of the δ-toxin negative

表 1　HA-MRSA 与 CA-MRSA δ- 毒素质谱峰差异

Tab. 1　Differences in mass spectrometry between HA-MRSA and CA-MRSA δ-toxin

质谱峰	MRSA *n*=83(%)	HA-MRSA *n*=39(%)	CA-MRSA *n*=44(%)	*P*
检出 (3005±5)*m/z*	39(47.0)	19(22.9)	20(26.5)	0.766
检出 (3035±5)*m/z*	33(39.8)	9(10.8)	24(28.9)	0.003
未检出 (3005±5)*m/z* 和 (3035±5)*m/z*	11(13.2)	11(13.2)	0(0.0)	0

表 2　主要 *spa* 分型 δ- 毒素质谱峰差异

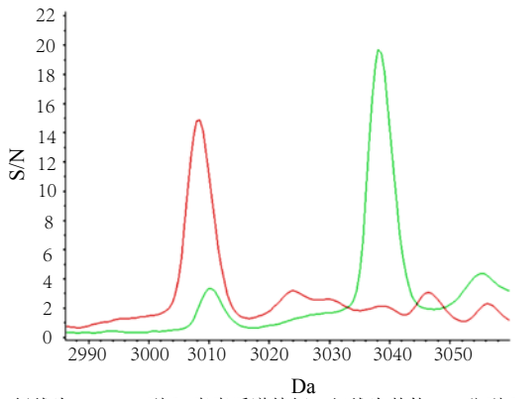
Tab. 2　Differences in the mass spectrum of δ-toxin from the main *spa* type

质谱峰	MRSA *n*=83(%)	*spa* t437 *n*=33(%)	*spa* t062 *n*=18(%)	*spa* t015 *n*=9(%)	*P*
检出 (3005±5)*m/z*	39(47.0)	0(0.0)	15(18.1)	8(9.6)	0
检出 (3035±5)*m/z*	33(39.8)	31(37.3)	0(0.0)	0(0.0)	0
未检出 (3005±5)*m/z* 和 (3035±5)*m/z*	11(13.2)	2(2.4)	3(3.6)	1(1.2)	0.479

为 t437 型、2(2.4%) 株 t8660 型 (表 2)。有 11(113.%) 株 MRSA 既未检出 (3005±5)*m/z* 信号峰也未检出 (3035±5) *m/z* 信号峰，*spa* 分型中 t062、t437、t899、t015、t071 和 t8660、未知分型分别为 3 株、2 株、2 株、其他各 1 株。

2.3　(3035±5)*m/z* 信号峰与 *spa* t437 型的关系

(3035±5)*m/z* 为 HldG10S 的信号峰，本研究 33 株



绿线为 *spa* t437 型 δ- 毒素质谱特征；红线为其他 *spa* 分型 δ- 毒素质谱特征

图 4　*spa* t437 与其他分型 δ- 毒素比较

Fig. 4　The differences in δ-toxin between *spa* t437

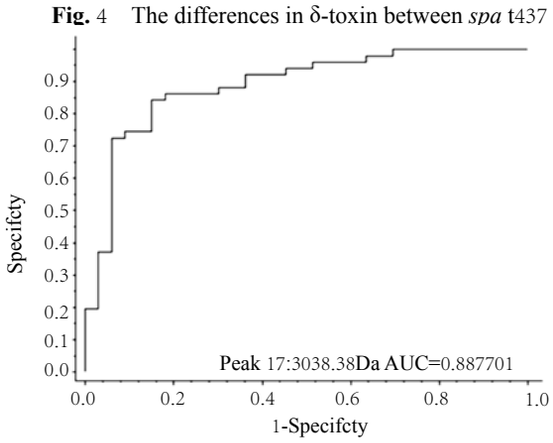


图 5　*spa* t437 特异性质谱峰 (3035±5)*m/z* ROC 曲线图

Fig. 5　The ROC curve of *spa* t437 specific MS peak (3035±5)*m/z*

spa t437 型共 31 株检出 (3035±5)*m/z*(图 4)，50 株其他 *spa* 分型中，只有两株检出 *spa* t8660，检出 (3035±5) *m/z*，使用仪器配套的做 clinProTools 3.0 软件做 ROC 曲线，曲线下面积 0.89，*P*=0(图 5)。

2.4　未产生 δ- 毒素的菌株特征

MALDI-TOF MS 检测共有 11 株 MRSA 未检出 δ- 毒素，均为 HA-MRSA，SCC*mec* 分型Ⅰ型 1 株，Ⅱ型 2 株，Ⅲ型 8 株；临床标本类型，有 6 株分离自骨关节标本，3 株分离自呼吸道标本，1 株分离自慢性溃疡的分泌物标本，1 株分离自血液 (表 3)。

在血琼脂平板上生长特点，5 株为正常的菌落形态及溶血特征，3 株分离菌在血琼脂平板上为小菌落、溶血正常，2 株分离菌在血琼脂平板上为小菌落且 48h 无明显溶血环，1 株菌落大小正常但 48h 无明显溶血环。

3　讨论

MALDI-TOF MS 技术通过分析待检菌蛋白质指纹图谱并与数据库中的质谱比较，对细菌进行分类鉴定，是目前为此最为有效的细菌鉴定方法 [12]，同

表 3　MALDI-TOF 未检出 δ- 毒素的菌株特征

Tab. 3　Characteristics of MALDI-TOF δ- toxin negative strains

样本号	科室	诊断	标本类型	分组	SCC*mec* 分型	*spa* 分型	菌落特点
20	神经外科	脑动脉瘤	痰	HA-MRSA	Ⅲ	t8660	正常形态
24	血管外科	下肢慢性溃疡	分泌物	HA-MRSA	Ⅲ	t437	正常形态
37	骨科	慢性骨髓炎	分泌物	HA-MRSA	Ⅲ	t437	不溶血
54	骨科	类风湿性关节炎	新鲜组织	HA-MRSA	Ⅲ	t015	正常形态
107	胃肠外科	直肠癌切除史	血液	HA-MRSA	Ⅲ	t062	正常形态
120	骨科	骨折术后	分泌物	HA-MRSA	Ⅲ	t899	小菌落
128	重症医学科	慢性阻塞性肺病伴急性加重	痰	HA-MRSA	Ⅱ	t071	小菌落
130	骨科	骨髓炎	血液	HA-MRSA	Ⅲ	t899	小菌落
134	呼吸内科	肺炎	肺泡灌洗液	HA-MRSA	Ⅱ	t062	小菌落、不溶血
172	骨科	骨盆骨折	分泌物	HA-MRSA	Ⅰ	NT	小菌落、不溶血
219	骨科	骶骨骨折术后	脓液	HA-MRSA	Ⅲ	t062	正常形态

注：NT 为未知分型

时还能解决毒力因子测定、耐药标志物及菌种分型等临床相关问题 [13]。

Gagnaire 研究显示 MALDI-TOF MS 使用常规方法即可以快速检测金黄色葡萄球菌的 δ- 毒素，其质谱峰为 (3005±5)*m/z* 和 (3035±5)*m/z* 两种 [6]。该毒力因子属于金黄色葡萄球菌核心基因组编码的毒力，对中性粒细胞和红细胞有溶解能力，但不如 a- 毒素和 PSM-a_3，动物感染实验显示其对疾病进展的作用比 PSMα_1-PSMα_4 低 [14]，但它可以触发肥大细胞脱颗粒，因些对皮肤感染和特应性皮炎的发展起显著作用 [15]。而 δ- 毒素的同基因变异体 (HldG10S) 的致病性，表现为对细胞溶解作用和趋化作用下降，不引起肥大细胞脱颗粒。但是该变异体的出现有基因型特异性 [9]，本研究收集一家医院 6 个月分离的 83 株非重复 MRSA，其中 33 株 *spa* t437 型的 MRSA 中共 31 株检出 HldG10S，ROC 曲线下面积为 0.89，而 *spa* t437 型是我国健康人群中携带率最高的 MRSA 克隆 [16]，研究发现 *spa* t437 型的克隆绝大部分属于 ST59 型 [17-18]，该克隆是我国南方和邻近亚洲国家的 CA-MRSA 最常见的菌株。临床上 CA-MRSA 感染多见于无 HA-MRSA 危险因素的患者，如健康儿童、运动员、监狱犯人等，常引起皮肤软组织感染、骨关节感染和败血症等；其更容易携带重要毒力杀白细胞素 (PVL)[19]，同时也能促进核心基因组编码的毒力基因的表达，如 PSMα、hla 等 [20]，动物试验显示 CA-MRSA 具有相当大的逃避中性粒细胞吞噬的能力。近年来国内外相关研究发现有 10%~80% 的院内感染的患者感染的菌株具有 CA-MRSA 的分子特征 [21-22]，CA-MRSA 的菌株已经播散到医院的环境中引起医院获得性相关感染。从流行病学角度 HA-MRSA 和 CA-MRSA 虽可采用美国疾病预防控制中心的 CA-MRSA 定义来初步区分，但在我国，患者的既往就医史往往不够完善，为了更精确地调查 MRSA 的流行特征，基于分子手段的基因分型法 (如 SCC*mec* 分型、*spa* 分型、MLST 分型) 使用更为普遍，但这些方法存在操作繁琐、成本昂贵等不足。本研究采用 MALDI-TOF MS 检测 MRSA 一次性获得蛋白指纹图谱，只要通过仪器配套软件查看是否检测出 (3035±5)*m/z* 这一信号峰，便可快速分辩出毒力更高的 CA-MRSA，为及时有效的控制感染，改善患者预后提供病原学依据，这对以 *spa* t437 型为主要 CA-MRSA 流行克隆的地区有重要的流行病学意义。

agr 调控系统是金黄色葡萄球菌最重要的调节系统，调控多种毒力因子的表达，RNA Ⅲ是 *agr* 调控系统的主要效应，同时也是 δ- 毒素的信使 RNA。δ- 毒素的产生可作为是金黄色葡萄球菌中 *agr* 调控系统在营养转运，氨基酸代谢和其他过程的功能替代标记 [20]。通常认为在急性感染中需要的完整性的 *agr* 系统功能，而慢性感染 *agr* 功能障碍有关 [21-22]，使得部分毒力因子的表达量减少或消失。本研究共分析 83 株临床分离的 MRSA，有 11(13.3%) 株 δ- 毒素阴性，而这些菌株均为 HA-MRSA，SCC*mec* 分型以Ⅲ型为主，主要为骨关节慢性感染分离菌。这些菌株在体内常形成生物被膜，且对多种抗生素耐药，在体外培养常表现为小菌落、β- 溶血环变小或消失等特性。

综上所述，MALDI-TOF MS 使用常规方法即可快速检测 MRSA 的 δ- 毒素，其质谱峰为 (3005±5)*m/z* 和 (3035±5)*m/z* 两种；(3035±5)*m/z* 是 δ- 毒素的同基

因变异体 (HldG10S) 的质谱峰，使用该信号峰可快速分辩出毒力更高的 CA-MRSA，从而为及时有效的控制感染，改善患者预后提供病原学依据；未检出 (3005±5)*m/z* 和 (3035±5)*m/z* 两种质谱峰的菌株是 *agr* 调控系统失调的表现，这些菌株不表达 δ- 毒素，在临床上与慢性感染有关，体外培养可见小菌落形成、无明显 β- 溶血。

参 考 文 献

[1] Heller D N, Murphy C M, Cotter R J, *et al*. Constant neutral loss scanning for the characterization of bacterial phospholipids desorbed by fast atom bombardment[J]. *Anal Chem*, 1988, 60(24): 2787-2791.

[2] Holland R D, Wilkes J G, Rafii F, *et al*. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spect*, 1996, 10(10): 1227-1232.

[3] De C E, Vella A, Vaccaro L, *et al*. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2014, 8(9): 1081-1088.

[4] Josten M, Reif M, Szekat C, *et al*. Analysis of the MALDI-TOF mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations which allow differentiation of the main clonal lineages[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1809-1817.

[5] Gonzalez D J, Okumura C Y, Hollands A, *et al*. Novel phenol-soluble modulin derivatives in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identified through imaging mass spectrometry[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(17): 13889-13898.

[6] Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, *et al*. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40660.

[7] Fitton J E, Dell A, Shaw W V. The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*[J]. *FEBS Lett*, 1980, 115(2): 209-212.

[8] Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, *et al*. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar[J]. *Mol Gen Genet*, 1986, 202(1): 58-61.

[9] Cheung G Y C, Yeh A J, Kretschmer D, *et al*. Functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* δ-toxin allelic variant G10S[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18023.

[10] Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, *et a1*. Relationships between *Staphylococcos aureus* genetic background virulence factors, agr groups (alleles), and human disease[J]. *Infect lmmun*, 2002, 70(2): 631-641.

[11] Zhang K, Mcclure J A, Elsayed S, *et al*. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 5026-5033.

[12] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, *et al*. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 49(4): 543-551.

[13] Belkum A V, Welker M, Erhard M, *et al*. Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratories[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(5): 1513-1517.

[14] Verdon J, Girardin N, Lacombe C, *et al*. Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide[J]. *Peptides*, 2009, 30(4): 817-823.

[15] Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease K B, *et al*. *Staphylococcus* δ-toxin promotes mouse allergic skin disease by inducing mast cell degranulation[J]. *Nature*, 2013, 503(7476): 397-401.

[16] 朱怡青 . 健康成年人携带耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子生物学和抗生素耐性研究 [D]. 济南 : 山东大学 , 2016.

[17] Lee T M, Yang M C, Yang T F, *et al*. Molecular characterization of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Southern Taiwan[J]. *Microbiol Drug Resist*, 2015, 21(6): 610-621.

[18] Glasner C, Pluister G, Westh H, *et al*. *Staphylococcus aureus spa* type t437: Identification of the most dominant community-associated clone from Asia across Europe[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(2): 163.e1-8.

[19] Vandenesch F, Naimi T, Enright M C, *et al*. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin genes: Worldwide emergence[J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(8): 978-984.

[20] Li M, Krause R M. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(14): 5883-5888.

[21] Alvarez C A, Yomayusa N, Leal A L, *et al*. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, in Colombia[J]. *Am J Infect Control*, 2010, 38(4): 315-318.

[22] Strandén A M, Frei R, Adler H, *et al*. Emergence of SCC*mec* type IV as the most common type of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital[J]. *Infection*, 2009, 37(1): 44-48.

[23] Thoendel M, Kavanaugh J S, Flack C E, *et al*. Peptide signaling in the staphylococci[J]. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 117-151.

[24] Traber K E, Lee E, Benson S, *et al*. *agr* function in clinical