

# 金黄色葡萄球菌耐药机制及其耐药性检测方法研究进展

黄嘉慧<sup>1,2</sup>, 吴诗<sup>2\*</sup>, 李滢<sup>2</sup>, 吴毓薇<sup>2</sup>, 吴清平<sup>2\*</sup>

(1. 陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710000)

(2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东广州, 510070)

**摘要:** 金黄色葡萄球菌是一种重要的食源性致病菌, 可产生多种肠毒素, 容易引起食物中毒事件。近年来, 随着抗生素广泛使用, 食品源金黄色葡萄球菌的耐药性问题十分严重, 耐药率持续升高, 多重耐药菌株出现(如MRSA), 尤其是在畜禽以及水产等养殖业中, 倍受全球关注。理清金黄色葡萄球菌耐药机制, 针对性开发相应的耐药性检测方法, 成为了科学研究中的“重中之重”。目前, 金黄色葡萄球菌的耐药机制研究较为深入, 大部分抗生素的耐药机制基本明确, 主要分为三大类: 抗生素灭活、抗生素外排作用及核糖体保护作用。为能快速准确获得其耐药表型及耐药性相关分子特征等, 更好地挖掘耐药新基因, 探索金黄色葡萄球菌耐药新机制, 开发了传统检测耐药表型、靶向检测相关基因及其表达水平以及基于生物信息学分析技术结合菌株的组学信息预测菌株耐药性等多种耐药性检测或预测方法。该综述将针对金黄色葡萄球菌现普遍存在的耐药机制及其耐药性检测方法等进行详细阐述。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; 耐药机制; 检测方法; 研究进展

文章编号: 1673-9078(2025)01-343-358

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1538

## Current Advances in Research on the Mechanisms and Detection of *Staphylococcus aureus* Drug Resistance

HUANG Jiahui<sup>1,2</sup>, WU Shi<sup>2\*</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, WU Yuwei<sup>2</sup>, WU Qingping<sup>2\*</sup>

(1. Shaanxi University of Science & Technology, School of Food Science and Engineering, Xi'an 710000, China)

(2. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* is an emerging foodborne pathogen implicated in a substantial number of cases of staphylococcal food poisoning (SFP), primarily due to its ability to produce staphylococcal enterotoxins. Recently, due to

引文格式:

黄嘉慧, 吴诗, 李滢, 等. 金黄色葡萄球菌耐药机制及其耐药性检测方法研究进展[J]. 现代食品科技, 2025, 41(1): 343-358.

HUANG Jiahui, WU Shi, LI Ying, et al. Current advances in research on the mechanisms and detection of *Staphylococcus aureus* drug resistance [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 343-358.

收稿日期: 2023-12-22

基金项目: 广东省重点研发计划项目(2022B1111040002); 广东省自然科学基金项目(2022A1515010059); 广东省科协青年科技人才培养计划(SKXRC202306)

作者简介: 黄嘉慧(1990-), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 食源性金黄色葡萄球菌检测与防控, E-mail: jiahui0418@163.com

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 微生物安全与健康, E-mail: wuqp203@163.com; 共同通讯

作者: 吴诗(1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食源性金黄色葡萄球菌检测与防控, E-mail: wushiloveyou@126.com

the rising use of antibiotics, there have been increases in the frequency and severity of foodborne *S. aureus* drug resistance. Furthermore, there has been a rise in the emergence of multidrug-resistant strains, particularly in livestock and poultry production, as well as in aquaculture; this has garnered considerable attention and raised widespread concern globally. Therefore, it is particularly important to elucidate the underlying drug resistance mechanisms and develop effective methods for detecting drug resistance in *S. aureus*. To date, extensive research has been conducted on the drug resistance mechanisms of *S. aureus*, with clear descriptions provided for most of these, which can be divided into three types, namely, the inactivation of antibiotics, efflux pumps, and ribosomal protection. To rapidly and accurately determine the drug resistance phenotypes and related molecular characteristics of *S. aureus*, as well as to enhance the identification of new resistance genes and examination of new resistance mechanisms, a range of methods for resistance detection or prediction have been developed. These include traditional methods for detecting resistance phenotypes, targeted detection of related genes and their expression levels, and bioinformatics-based approaches that use omics data from strains to predict resistance. In this review, several common mechanisms underlying *S. aureus* drug resistance are described, followed by an evaluation of existing approaches.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; drug resistance mechanism; detection method; research and development

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 为引起细菌性食物中毒的重要致病菌之一, 美国每年约发生 241 000 例由金黄色葡萄球菌引发的食物中毒事件<sup>[1]</sup>; 我国 20%~25% 的细菌性食物中毒病例均与金黄色葡萄球菌相关<sup>[2]</sup>。金黄色葡萄球菌可产生多种肠毒素, 其中, 肠毒素 A (*Staphylococcus* Enterotoxin A, SEA) 和肠毒素 D (*Staphylococcus* Enterotoxin D, SED) 最为常见, 其次为肠毒素 B (*Staphylococcus* Enterotoxin B, SEB)、

肠毒素 C (*Staphylococcus* Enterotoxin C, SEC)。肠毒素耐高温, 不易失活, 毒性大, 几微克便可致人食物中毒。此外, 金黄色葡萄球菌还可产生多种致病性毒素, 如  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  溶血毒素、杀白细胞素、血浆凝固酶、表皮剥落毒素、毒性休克综合征毒素-1, 可导致白细胞和巨噬细胞损坏、血纤维蛋白沉积, 严重甚至可引发中毒性休克综合征、骨髓炎、化脓性心内膜炎、菌血症及致死性肺炎等多种感染, 威胁人类健康<sup>[3-5]</sup>。

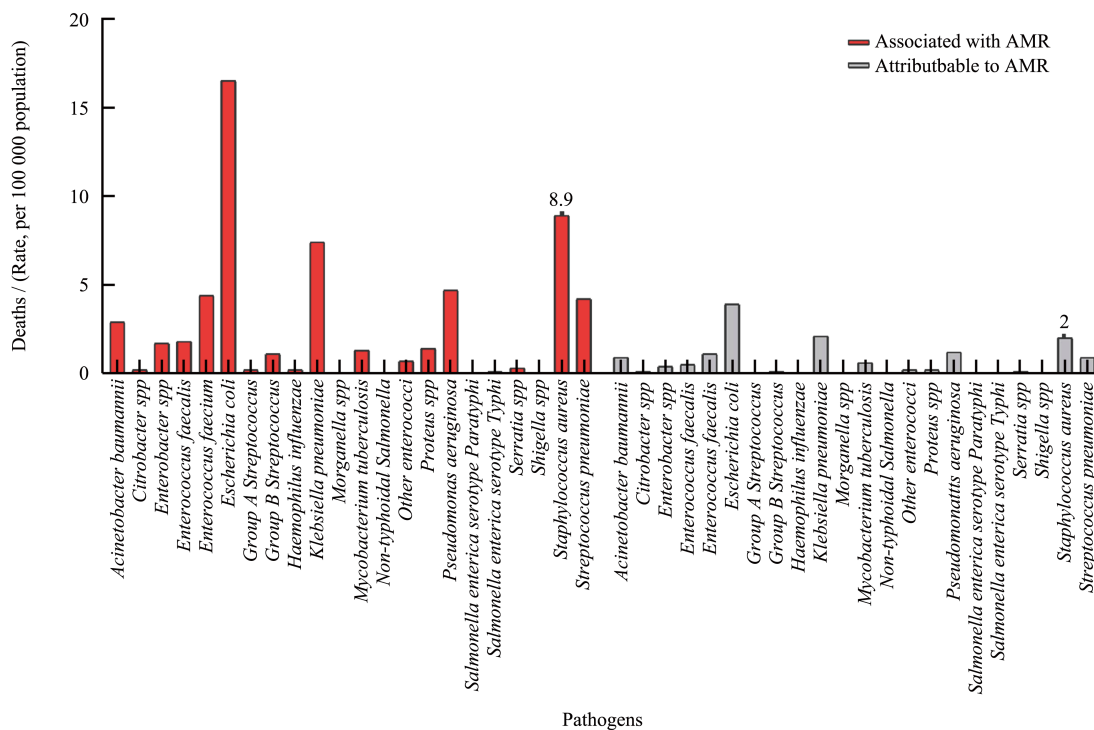


图 1 世界卫生组织统计的 2019 年致病菌在欧洲地区每 10 万人中的致死率  
Fig.1 Overall AMR burden by pathogen in the WHO European region in 2019

抗生素的广泛使用,细菌的耐药性问题日益突出,成为全球公共卫生体系面临的一个严峻挑战。多重耐药金黄色葡萄球菌为临床常见的多重耐药菌之一<sup>[6]</sup>。WHO 数据显示,2019 年全球约 54 万的死亡病例与细菌性抗生素耐药性 (Antimicrobial Multiply Resistance, AMR) 相关;其中,耐药金黄色葡萄球菌引发的致死病例高达为 83 325 例,仅次于耐药大肠杆菌 (图 1)<sup>[7]</sup>。目前,肉类、奶制品以及水产品等及其食品加工过程中均检出多重耐药金黄色葡萄球菌<sup>[8-10]</sup>。本团队前期研究显示,93% 以上的食品源金黄色葡萄球菌对三种或以上的抗生素产生耐药性<sup>[11-13]</sup>。此外,多重耐药金黄色葡萄球菌的分布与其金黄色葡萄球菌蛋白 A (Staphylococcal Protein A, SPA) 型别以及多位点序列分析 (Multi-Locus Sequence Typing, MLST) 型别密切相关<sup>[14]</sup>。本实验室研究发现,我国食源性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的主要优势型别为 ST59 型别及其相关型别<sup>[15]</sup>, ST9 型别分离株表现为多重耐药<sup>[16]</sup>。

目前,金黄色葡萄球菌的耐药性问题已然成为食品安全中亟待攻克的一大难题。耐药性检测技术作为耐药性问题研究的重要手段,利于研究者及时了解细菌耐药性发展及新型耐药机制出现。然而,传统耐药性检测方法从菌株分离到获得表型结果至少需要 3~4 d,效率低,耗时长<sup>[17]</sup>。因此,保证诊断效率及准确性的同时,开发可快速获得耐药性结果的检测技术尤为重要。本综述就金黄色葡萄球菌主要耐药机制及现有耐药性 (表型或分子) 检测方法进行系统阐述,比较其优缺点,同时将呈现最新研究进展。

## 1 金黄色葡萄球菌的主要耐药机制

目前,治疗金黄色葡萄球菌感染的常用抗生素包括: $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、林可霉素类、糖肽类、氟喹诺酮类等。不同抗生素,其药物作用靶点不同,导致细菌耐药机制多样。金黄色葡萄球菌主要对 $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类以及氟喹诺酮类等抗生素产生耐药性,并逐渐出现糖肽类 (如万古霉素) 等抗生素耐药金黄色葡萄球菌<sup>[12,18]</sup>。因此,金黄色葡萄球菌的耐药机制主要包括 (图 2): 抗生素灭活 (如 $\beta$ -内酰胺类抗生素)、抗生素外排作用 (如四环素类、

氟喹诺酮类抗生素)、核糖体保护作用 (如氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类、糖肽类抗生素及 $\beta$ -内酰胺类) 等<sup>[19,20]</sup>。

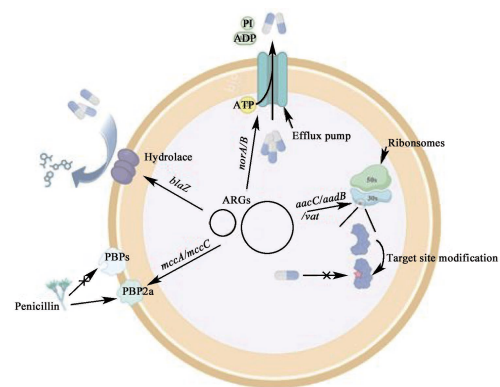


图 2 葡萄球菌抗生素耐药机制  
Fig.2 The mechanisms of drug resistance of *Staphylococcus* species

### 1.1 抗生素灭活

抗生素灭活是通过细菌产生水解酶,并作用于抗生素,使其从大分子物质水解为小分子,如 $\beta$ -内酰胺酶。它通过水解抗生素的 $\beta$ -内酰胺双环,以催化抗生素发生水解,破坏抗生素的杀菌活性,降低抗生素对细菌的伤害,从而获得对抗生素的耐受性<sup>[21]</sup>。 $\beta$ -内酰胺类抗生素分为四类,分别为青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类以及在单环上的单巴塔姆类抗生素。因此, $\beta$ -内酰胺酶主要分为 A、B、C、D 四种<sup>[22,23]</sup>。除 B 类 $\beta$ -内酰胺酶属于金属酶<sup>[24]</sup>外,其余三种酶均为丝氨酸反应性水解酶家族成员<sup>[25]</sup>。BlaZ,为一种其中的青霉素水解酶,由 *blaZ* 基因编码,介导金黄色葡萄球菌对青霉素类抗生素 (如氨苄西林) 产生耐药。金黄色葡萄球菌耐药程度越严重, BlaZ 水解抗生素能力随之增强<sup>[26]</sup>。此外,研究发现,金黄色葡萄球菌可通过产生胞外囊泡,以释放 BlaZ<sup>[27]</sup>。此类胞外囊泡对 BlaZ 具有保护作用,使其免受蛋白酶消化。BlaZ 虽可水解 $\beta$ -内酰胺类抗生素,但却对苯唑西林的水解活性较低;其次, *blaI-blaRI-blaZ* 系统的表达,可使 *mecA* 基因表达受阻,从而导致金黄色葡萄球菌出现苯唑西林敏感 MRSA (Oxacillin Susceptible MRSA, OS-MRSA) 或苯唑西林中度耐药表型 (Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, BORSA) 出现<sup>[28,29]</sup>。OS-MRSA 表型菌株一旦暴露于一定浓度的头孢西丁,即可恢复其原来的耐药性<sup>[30]</sup>。由此可得, *blaZ* 基因不仅可通过编码水解酶直接作用于

抗生素,还可参与基因表达调控系统,介导金黄色葡萄球菌对 $\beta$ -内酰胺类抗生素产生异质性耐药表型,导致治疗失败。我们前期调查结果表明,食品中的金黄色葡萄球菌耐药性十分严重,尤其是在 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药方面,93%以上的分离株对氨苄西林和青霉素G耐药<sup>[11]</sup>。除 $\beta$ -内酰胺酶外,金黄色葡萄球菌还可通过Lnu蛋白可修饰林可酰胺类抗生素的羟基,介导对林可酰胺类抗生素耐药<sup>[31]</sup>;亦或通过氯霉素抗性基因*cat*编码的氯霉素乙酰基转移酶CAT(Chloramphenicol Acetyltransferase, CAT),可将氯霉素的羟基乙酰化,使其失去活性,导致氯霉素抗性<sup>[32]</sup>。

## 1.2 抗生素外排作用

抗生素外排作用是指,将细菌暴露于一定浓度的抗生素时,其外排泵系统被激活,通过外排泵基因过表达、分裂期的不对称积累或部分能量依赖的编码基因突变等,将高浓度的抗生素排出体外,降低细胞内的抗生素浓度,以适应周围环境。抗生素外排作用的发生至少依赖两个系统作用,一是抗生素受体、外排或转运系统,其次为相关耐药基因的表达调控系统。

金黄色葡萄球菌相关的外排泵蛋白家族主要有(表1):主要易化超级家族(Major Facilitator Superfamily, MFS)、多重耐药小蛋白家族(Small Multidrug Resistance, SMR)、ATP结合盒超级家族(ATP-Binding Cassette Superfamily, ABC)(如MsrA)以及多重耐药及毒素外排家族(Multidrug And Toxic Compound Extrusion, MATE)(如MepA)<sup>[33]</sup>,介导和调控氟喹诺酮类、大环内酯类、氯霉素类、四环素类以及链阳菌素等抗生素的耐药<sup>[34,35]</sup>。MFS超级家族主要为膜转运蛋白,主要包括NorABC<sup>[36]</sup>、Tet(K)、Tet(L)、Tet(38)/(63)。其中,NorA介导疏水性氟喹诺酮类抗生素耐药,如诺氟沙星和环丙沙星;与之不同的是,NorB和NorC同属于MFS超级家族,不仅介导亲水性氟喹诺酮类抗生素耐药,还介导疏水性(如莫西沙星等)的氟喹诺酮类抗生素耐药<sup>[37,38]</sup>。Tet(K)、Tet(L)均可介导金黄色葡萄球菌对四环素类抗生素耐药。以往研究显示,*tetA(K)*基因通常与可移动遗传元件(MGEs)进行整合,如质粒pT181,插入SCCmecIII元件中<sup>[39]</sup>,实现基因在菌株间发生水平传播<sup>[40,41]</sup>,促使MRSA出现多重抗生素耐药表型。Tet(38)与Tet(K)具有46%相似性,Tet(38)过表达,同样可导致菌株对四环素产生耐药

性<sup>[42]</sup>。与MFS超级家族类似,SMR家族蛋白除了介导菌株对季铵盐等产生耐受性外,也可介导金黄色葡萄球菌对氟喹诺酮类抗生素产生耐药性<sup>[43]</sup>。外排蛋白MsrA为ABC超级家族蛋白中的一员,在ATP水解产生能量的参与下,转运蛋白将抗生素从细胞中移除,阻止它们到达核糖体上的靶位点<sup>[44]</sup>,从而介导金黄色葡萄球菌对大环内酯类抗生素产生耐药性。MepA则是通过蛋白突变后过表达介导金黄色葡萄球菌分别对四环素、替加环素的敏感性的降低;同时,MepA的过表达往往伴随着的表达调控基因*mepR*的点突变<sup>[45-47]</sup>。

早前已出现关于金黄色葡萄球菌中NorABC、Tet(38)以及MepA蛋白相关基因的表达调控系统的相关报道。其中,MgrA为研究者关注较多的一个多重耐药基因表达调控系统。Luong等<sup>[48]</sup>从金黄色葡萄球菌的一个突变位点中发现多基因调控因子*mgrA*,翻译后的MgrA蛋白与大肠杆菌MarR蛋白具有显著同源性。它可调控8型荚膜多糖、 $\alpha$ -毒素,核酸酶和蛋白A等多个基因的转录,严重影响细胞外蛋白的产生。继而相关研究发现<sup>[36,42,49]</sup>,MgrA还可调控外排泵相关基因的表达,如*norA*、*norB*、*tet(38)*,然而其他家族相关调控系统尚未研究透彻。综合以上研究结果可得,现今多数研究者主要聚焦于抗生素受体、外排或转运系统,但表达调控系统等相关研究相对较少。

## 1.3 核糖体保护作用

绝大多数抗生素作用于细菌的蛋白质合成的结构——肽基转移酶活性中心PTC(Peptidyl Transferase Center, PTC)及新生肽链出口通道NPET(Nascent Polypeptide Exit Tunnel, NPET)<sup>[58,59]</sup>。核糖体是细菌蛋白质合成的主要场所,同时也是抗生素主要作用靶位点。核糖体保护作用主要包括酶修饰作用、阻断作用、靶位点替代等。

金黄色葡萄球菌的酶修饰作用方式多样,酶修饰作用的策略包括产生灭活酶(大环内酯类抗生素等)、基团转移(氨基糖苷类等)以及氧化还原反应。其中,基团转移包括酰基转移、磷酸化、糖基化、核苷酸化、核糖基化以及硫醇转移等<sup>[60]</sup>。最后,通过修饰作用诱导产生新的酶突变体或是改变蛋白结构,减弱抗生素与其结合的能力或使其失活,从而导致细菌产生抗生素耐药。大环内酯类抗生素通过靶向细菌核糖体抑制蛋白质合成<sup>[61]</sup>。金黄色葡萄球菌通过甲基化酶*erm*基因编码,使23S rRNA结构

域 V 的肽基转移酶区域腺嘌呤残基 A2058/2059 甲基化的蛋白, 介导菌株对大环内酯类、林可酰胺类以及链阳菌素 B 类抗生素 (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B, MLSB) 耐药<sup>[62,63]</sup>。研究报道<sup>[15,64]</sup>, 80% 以上的 MRSA 对大环内酯类抗生素产生耐药性, 且不同谱系的 MRSA 所携带 *erm* 基因具有相似性, 并可通过质粒进行传播。*erm* 基因介导菌株产生耐药性可产生两种耐药表型: 组合型耐药表型 (Constitutive MLSB, cMLSB) 和诱导型耐药表型 (Inducible MLSB, iMLSB)。但关于 MRSA 对大环内酯类抗生素产生诱导型耐药的研究较少。氨基糖苷类抗生素 (Aminoglycosides, AGs) 则是靶向核糖体 RNA, 通过修饰胺或羟基, 产生不作用的失活酶——乙酰转移酶 (AACs)、

核苷酸转移酶 (ANTs) 和磷酸转移酶 (APHs) 的底物两亲性氨基糖苷类抗生素 (Amphiphilic Aminoglycosides, AAGs), 产生的 AAGs 抑制细菌耐药酶的表达<sup>[65]</sup>。其相关的耐药机制是通过氨基糖苷修饰酶催化 2-脱氧霉链胺核的 -OH 或 -NH<sub>2</sub> 基团或者糖部分的修饰, 也可催化 *aacC* 基因编码的 AACs, *aadA1* 和 *aadB* 基因编码的 ANTs, 或 *aphA6* 基因编码的 APHs 的修饰, 降低抗生素与酶的结合能力。链霉素为氨基糖苷类抗生素的一种, 其耐药机制则是通过 *vat* 基因编码的链霉素乙酰转移酶通过游离羟基的乙酰化使 A 型链霉素失活。在众多已知的氨基糖苷类抗生素耐药机制中, 酶修饰相关的耐药机制在临床金黄色葡萄球菌分离株分布最广<sup>[66]</sup>。

表 1 葡萄球菌属的外排泵相关转运蛋白家族及其编码基因

Table 1 The transporter family and encoding genes of efflux pump in *Staphylococcus* species

| 种类      | 转运蛋白家族 | 外排泵                             | 反应底物            | 相关基因                                       | 生物学功能                        | 参考文献          |               |
|---------|--------|---------------------------------|-----------------|--|------------------------------|---------------|---------------|
| 金黄色葡萄球菌 | MFS    | NorA                            | NOR、CIP         | <i>norA</i> 、 <i>norAI</i> 、 <i>norAII</i> | 编码转运元件                       | [37]          |               |
|         |        | NorB/C                          | NOR、CIP、SPX     | <i>norB/C</i>                              | 编码外排转运蛋白                     | [38,50]       |               |
|         |        | MgrA                            | /               | <i>magrA</i>                               | NorABC 的调控因子                 | [51]          |               |
|         |        | MdeA                            | 大环内酯类           | <i>mdeA</i>                                | 编码 A 类多重耐药外排泵                | [52]          |               |
|         |        | LmrS                            | 甲氧苄啶; 氯霉素; 红霉素等 | <i>lmrS</i>                                | 多重耐药外排泵                      | [53]          |               |
|         |        | Tet (38) / (63) / A (K) / A (L) | 四环素类、夫西地酸、强力霉素  | <i>tet (38) / tet (63) / tetK/tetA</i>     | 编码外排转运蛋白                     | [40,41,45,54] |               |
|         |        | MATE                            | MepA            | FQ、甘氨酸类                                    | <i>mepA</i>                  | 多重耐药外排泵       | [55]          |
|         |        | SMR                             | Smr             | 氯己定和季铵化合物                                  | <i>smr (qacC)</i>            | 多重耐药外排泵       | [56]          |
|         |        |                                 | QacABb/III      | 氯己定和季铵化合物、氟喹诺酮类                            | <i>qacAB</i> 、 <i>qacIII</i> | 编码耐防腐剂蛋白      | [43]          |
|         |        | 其他葡萄球菌                          | MFS             | MdeA                                       | 大环内酯类、林可酰胺类及链阳菌素 A 类         | <i>mdeA</i>   | 编码 A 类多重耐药外排泵 |
| Mef (A) | 大环内酯类  |                                 |                 | <i>mefA</i>                                | 编码跨膜蛋白                       | [57]          |               |
| ABC     | MsrA   |                                 | 大环内酯类、链阳菌素 B 类  | <i>msrA</i>                                | 编码 ABC-F 蛋白                  | [57]          |               |

注: NOR: 诺氟沙星; CIP: 环丙沙星; SPX: 司帕沙星; FQ: 磺胺。

四环素类抗生素靶向核糖体 16S rRNA 的 A 位点, 通过阻止氨酰基-tRNA 与 mRNA-核糖体复合物的结合, 抑制肽链增长, 影响细菌蛋白质合成<sup>[67]</sup>。目前, 四环素耐药机制基本确定, 除外排泵作用机制外, 核糖体保护作用被公认为另一个普遍存在于临床研究中的主要耐药机制。细菌通过核糖体保护蛋白 (Ribosomal Protection Proteins, RPPs) 与 GTP 组成复合体后, 继而与核糖体结合, 阻断

四环素与核糖体结合, 从而介导细菌产生耐药性。11 个核糖体保护蛋白中, Tet (O) 和 Tet (M) 最为常见<sup>[68]</sup>。编码基因 *tetO/M* 具有 GTP 酶活性的蛋白, 在易位后的状态下, 与核糖体上的 EF-G 结合点结合, 阻断四环素与 A 位点结合, 将四环素从 A 位点释放, GTP 酶随后脱落水解, 核糖体进而继续进行蛋白质合成<sup>[40]</sup>。*tetO/M* 基因起初定位猪葡萄球菌的质粒 pSTE1 上<sup>[69]</sup>, 而后转移至金黄色葡萄球菌及

其他的种属菌株, 导致多数分离株产生四环素耐药性, 并在“畜禽动物-养殖环境-市售肉”传播链中进行跨区跨物种流行<sup>[70-72]</sup>。其中, 金黄色葡萄球菌的 *tetO/M* 基因检出率高, 耐药性尤其严重 (MIC 90=64  $\mu\text{g/mL}$ )。当下, 金黄色葡萄球菌的核糖体保护蛋白机制研究通常聚焦于某一特定地区或物种, 缺乏分离株在跨区跨物种流行传播时, 其耐药机制是否存在变化的相关数据。

抗生素的靶位点替代是指细菌通过产生亲和性更低的替代物质, 与抗生素结合, 使得细胞壁合成顺利进行。 $\beta$ -内酰胺类抗生素 (如甲氧西林) 以及糖肽类抗生素 (如万古霉素) 的作用机理类似, 均是通过阻止细菌细胞壁的合成, 从而达到杀灭细菌的目的。不同的是: 甲氧西林是通过与青霉素结合蛋白 (Penicillin Binding Proteins, PBPs) 结合形成稳定复合物, 阻止细胞膜结合的转肽酶与细胞壁交联, 阻止细胞壁生物合成的末端反应以阻止细胞壁的合成; 万古霉素则是通过与肽聚糖前体末端的 D-丙氨酰-D-丙氨酸形成复合物, 以干扰肽聚糖组装的转糖基化步骤, 破坏细胞壁合成继而杀灭细菌。金黄色葡萄球菌对以上两种抗生素产生耐药性的共性机制在于, 菌株通过 *mec* 系列基因 (如 *mecA*、*mecC*、*mecD*、*mecB*)<sup>[73,74]</sup> 和 *vanA* 基因编码分别产生亲和性更低的细胞外膜锚定的转肽酶 PBP2a 以及 Van-A 酶, 使其优先与抗生素结合, 使得菌株顺利完成细胞壁的合成, 降低细胞膜的通透性, 从而减弱了抗生素对金黄色葡萄球菌的杀灭作用<sup>[75,76]</sup>。由此, 使得在抗生素存在的情况下, 金黄色葡萄球菌得以繁殖。而金黄色葡萄球菌获得以上两种抗生素耐药性后, 却呈现不一样的耐药表型。甲氧西林敏感性降低的金黄色葡萄球菌可直接呈现为甲氧西林完全耐药 (MRSA); 然而万古霉素敏感性降低的金黄色葡萄球菌呈现为三种表型<sup>[77]</sup>: 万古霉素完全耐药金黄色葡萄球菌 (VRSA, MIC  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ )、万古霉素中度耐药金黄色葡萄球菌 (VISA,  $4 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ )、万古霉素异质性耐药金黄色葡萄球菌 (Heteroresistance VISA, h-VISA, MIC  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ , 子代的 MIC  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ) 等。与 MRSA 的耐药机制不同, VISA 和 h-VISA 的耐药机制尚未完全明确。首先, 相比于 MRSA, VRSA、VISA 以及 h-VISA 分离株更难获得; 其次, 部分研究显示, MRSA 产生万古霉素耐药性是 h-VISA 形成的原因之一<sup>[78]</sup>。

## 2 葡萄球菌耐药性相关检测方法

### 2.1 传统检测方法

圆盘扩散法 (Kirby-Bauer, KB) 和最低抑菌浓度法 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 是临床与实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)<sup>[79]</sup> 以及欧洲抗微生物敏感试验委员会 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)<sup>[80]</sup> 推荐使用的检测细菌对现有的抗生素耐药的“金标准方法”。它们无需特别的条件设备, 可操作性强, 目前被广泛用于食源性致病菌 (如金黄色葡萄球菌) 的抗生素的耐药谱系确定或耐药性流行情况调查。

广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (Extended Spectrum  $\beta$  Lactamase, ESBLs) 检测方法<sup>[81]</sup> 是基于 KB 法或 MIC 法确定菌株是否产生  $\beta$ -内酰胺酶, 以判断菌株是否对  $\beta$ -内酰胺类抗生素产生耐药性的表型检测方法。革兰氏阴性菌的  $\beta$ -内酰胺酶检测方法主要是参考 CLSI 标准, 首先检测头孢菌素类抗生素敏感性; 进而采用双纸片协同法或抑制剂增强 KB 法等对初步实验结果进行验证<sup>[82]</sup>。与之不同的是, 革兰氏阳性菌, 如金黄色葡萄球菌, 则是根据 CLSI 或 EUCAST 标准进行 KB 法检测, 硝基羟、三叶草试验以及抑菌区域边缘判读等实验, 才可确定菌株是否产生  $\beta$ -内酰胺酶。然而, 三叶草试验需要 5% 羊血培养基, 成本高且操作较为繁琐, 并不适用于常规实验。因此, Skov 等<sup>[83]</sup> 建议, 可直接采用 KB 法结合 MIC 法检测青霉素 G 敏感性, 以确定金黄色葡萄球菌是否产生  $\beta$ -内酰胺酶。

KB 法和 MIC 法虽为检测“金标准” (表 2), 但也具有一定局限性: 只针对可培养分离的致病菌; 整个实验时间超过 24 h, 周转时间较长; 少部分新型抗生素的 KB 法的结果需要 MIC 值验证; 在耐药临界点的菌株的结果受人为因素影响较大, 尤其是 KB 法。尽管随后出现了可替换了 KB 法和 MIC 法得 E-test 商业试纸条, 简化了操作步骤, 但依然存在投入成本大等问题。为弥补传统检测方法的不足, 多种耐药性检测方法被开发。本综述基于葡萄球菌不同耐药机制, 从基因组水平、转录组水平、蛋白组水平以及基于组学的耐药性预测等四个方面, 对现有的葡萄球菌耐药性的检测方法进行综述。

## 2.2 基因组水平的耐药性检测方法

耐药基因 (Antibiotics Resistance Genes, ARGs), 是指细菌抗生素耐药机制相关的基因, 在细菌产生耐药性方面起着关键作用。耐药基因通常定位于染色体或整合到可移动遗传元件上 (如特定的插入序列、转座子、质粒), 介导细菌获得相应抗生素的耐药性。构建靶向检测 ARGs 的 PCR 方法, 可快速准确获得菌株耐药分子特征。因其具有操作简单、便捷、灵敏度高、特异性强等优点, 已被广泛应用于高通量检测致病菌流行病学调查及耐药机制研究中。我们实验室通过对耐药基因 *cfr*、*lsa (E)* 的检测, 发现一株对 18 种以上抗生素耐药的金黄色葡萄球菌 2868B2, 该菌株除携带上述耐药基因外, 同时携带 9 个抗生素耐药相关基因, 与其耐药表型结果一致<sup>[84]</sup>。同样地, Dong 等<sup>[85-87]</sup>通过 PCR 方法检测 ESBLs 编码基因 *bla<sub>TEM-1a</sub>*、*mecA* 基因, 以确定金黄色葡萄球菌是否对  $\beta$ -内酰胺类抗生素产生耐药性。研究发现约 90% 分离株的 PCR 结果与传统培养法的结果基本与保持一致。Ferreira 等<sup>[37]</sup>采用 PCR 检测 52 株金黄色葡萄球菌的外排泵相关耐药基因 *norA* 及其等位基因的分布, 揭示 *norAI* 与 *norAII* 的致病率不同, 作者推断这可能与金黄色葡萄球菌特定克隆谱系有关。由此说明, PCR 检测耐药基因在确定菌株耐药表型结果上具有一定的参考价值, 简化耐药性检测步骤。此外, 本团队前期基于泛基因组分析, 挖掘了多个可有效快速检测某一个型别的金黄色葡萄球菌特异性靶标基因 (如 ST398)<sup>[88]</sup>。耐药基因可与此类靶标基因构建多重 PCR 检测体系, 实现同时获得金黄色葡萄球菌多个分子特征等。

基于 PCR 方法相较于 KB 和 MIC 方法 (表 2), 具备以下优点: 无需对细菌进行分离培养, 即可初步判断是否具有耐药性, 从而缩短实验时间; 分子方法的重现性较好; 成本低、效率高等特点, 可增加抗生素检测的灵活性。但 PCR 依然存在一定的局限性: 只能通过携带基因推测其可能存在的耐药表型; 只能靶向检测已知耐药基因<sup>[89]</sup>; 依赖于仪器, 无法应用于床边检测 (Point-Of-Care Testing, POCT) 等。针对其局限性, 可参考本团队前期构建的快速检测不同类型的食源性分离株的方法, 将耐药基因与 RAA 重组酶<sup>[90]</sup>、Cas12a<sup>[91,92]</sup>等技术结合, 开发更多更便捷的类似 POCT 的检测方法等耐药性新型快速检测技术。

## 2.3 转录组水平的耐药性检测方法

多数细菌耐药表型的产生源于耐药基因的表达变化<sup>[93,94]</sup>。然而, 常规 PCR 并不具备检测基因表达量的能力; 加之研究表明, 细菌的基因型与耐药表型之间的匹配度并不高<sup>[35]</sup>, 因此, 无法通过检测耐药基因的携带率确定其耐药表型。目前除了转录组测序外, 实时荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative PCR, RT-qPCR) 是用于检测基因在转录水平上的表达量的首选检测方法<sup>[95,96]</sup>, 其工作原理是, 通过检测目的基因相对于内参基因的表达变化来实现相对定量的 (表 2)。通过测定耐药基因表达水平, 以判断该基因能否介导菌株对某类抗生素产生耐药性。以外排泵相关耐药基因为例<sup>[97]</sup>, 通过检测外排泵相关基因的表达量, 可以了解菌株某种抗生素的耐药表型与外排泵机制的关系; 发现外排泵基因突变体, 研究点突变引起的相关的新耐药机制; 挖掘新型耐药基因; 筛选新型外排泵抑制的抗生素。Li 等<sup>[98]</sup>设计未知多重耐药外排泵 (SA09310) 基因 *sa09310* 在氨基糖甙类、四环素类、大环内酯类以及路霉素等不同类型的抗生素下, 分别进行诱导表达, 采用 RT-qPCR 检测其表达量; 其研究结果显示, 该未知基因负责编码四环素外排泵, 介导金黄色葡萄球菌对四环素类抗生素产生抗性。但关于 *sa09310* 与其他四环素耐药相关的基因的遗传关系并未进行详细阐述。Xu 等<sup>[99]</sup>为探讨磷霉素耐药机制, 在磷霉素选择压力下, 采用 RT-qPCR 检测磷霉素耐药金黄色葡萄球菌的 *murA* 和 *tet (38)* 基因的表达量, 并确定 *tet (38)* 基因过表达, 为金黄色葡萄球菌磷霉素耐药的主要原因。

因 RT-qPCR 只能检测耐药基因的转录水平, 但无法确定该基因是否成功翻译为蛋白质, 并介导菌株产生相应的耐药表型。基于 RNA 检测的基因型和表型双定位抗生素敏感测试技术 (Combined Genotypic and Phenotypic AST Through RNA Detection, GoPhAST-R)<sup>[100]</sup>弥补了 RT-qPCR 的不足。其工作原理是: 根据 mRNA 序列既有基因编码区可呈现细菌的遗传信息, 通过其表达丰度正面反映蛋白质的表达水平以确定菌株的耐药表型。在短暂的抗生素暴露后, 即使其耐药机制不同, 对抗生素表现为敏感和耐药的菌株在转录水平上均存在表达差异。因此, 可通过检测细菌中的特定 mRNA 的表达量以实现其耐药表型的判断。GoPhAST-R 可同时

五种不同的致病菌的三类抗生素（氟喹诺酮类、氨基糖苷类以及β-内酰胺类）耐药相关的10个基因进行mRNA表达量变化检测。相比于传统的耐药表型检测方法，该检测技术缩短了24~36h的实验周转时间<sup>[101]</sup>。此外，RT-qPCR只局限于检测已知特定耐药基因的表达水平，但不能用于挖掘未知耐药基因。GoPhAST-R将机器学习分析菌株早期抗生素诱导的转录变化与同时检测关键耐药基因相结合，以94%~99%的准确率对菌株进行分类，以提高耐药性检测的准确性，促进分子流行病学，便于探索耐药研究新机制<sup>[101]</sup>。

### 2.4 蛋白质组水平的耐药性检测方法

基因水平和转录水平的耐药性检测方法主要靶向检测基因及其表达水平，蛋白质水平方法则是检测耐药基因编码产生的蛋白质（如β-内酰胺酶、PBP2a等），直接判断细菌的耐药表型。根据葡萄球菌的耐药机制不同，分为PBP2a乳胶凝集法以及基于MALDI-TOF MS的检测方法等。

### 2.4.1 PBP2a乳胶凝集法

为快速简便检测葡萄球菌中的PBP2a，基于单克隆抗体的乳胶凝集检测方法被开发，其作用原理是抗原抗体的特异性结合，基于免疫印迹法，通过检测PBP2a与抗PBP2a单克隆抗体结合，确定金黄色葡萄球菌中是否产生PBP2a。Nakatomi等<sup>[104]</sup>从232株MRSA临床分离株中，发现231株呈现为PBP2a乳胶凝集阳性，灵敏度高达99.57%。Van Leeuwen等<sup>[105]</sup>将该方法用于同时检测MSSA、微球菌属、肠杆菌属、肺炎链球菌以及肠球菌属等分离株，均显示乳胶凝集反应阴性。由此说明，乳胶凝集检测方法对MRSA具有高度特异性。鉴于它具有操作简便、快速获得结果、高度特异性及灵敏度等优点（表2），随后被发展为商用试剂盒并应用于实验室研究及临床检测中<sup>[107]</sup>。但它也存在一定的局限性：首先，无法区别不同种的葡萄球菌<sup>[105]</sup>；其次，商业化后的试剂盒的检测灵敏度有所下降，需经苯唑西林诱导后重新检测才可保持较高的灵敏度。

表2 金黄色葡萄球菌耐药性相关检测方法统计

Table 2 Overview of the phenotypic methods for antimicrobial resistance detection in *S. aureus*

| 分类        | 耐药性检测方法        | 是否需要经过培养 | 检测项目               | 实验时长/h | 结果判断依据                        | 优点  | 缺点              | 参考文献      |
|-----------|----------------|----------|--------------------|--------|-------------------------------|---|-----------------|-----------|
| 传统检测方法    | KB法            | 需要       | 抗生素纸片              | ≤24    | 抑菌圈大小                         | 获得耐药表型；可同时检测同一菌株的多种抗生素                            | 部分抗生素判断不准确      | [79]      |
|           | MIC法           | 需要       | 液体抗生素              | ≤24    | 培养物的生长量                       | 获得耐药表型，可同时检测多个菌株不同抗生素                             | 可能存在稀释度不准确      | [80]      |
| 基因水平检测方法  | PCR            | 不需要      | 耐药基因               | ≤4     | 是否携带耐药基因                      | 成本较低，操作简便，获得耐药基因型                                 | 不能获得耐药表型        | [102]     |
|           | Real-Time qPCR | 不需要      | 耐药基因               | ≤3     | 基因的过表达情况                      | 操作简便，获得耐药基因型                                      | 不能获得耐药表型，成本高    | [103]     |
| 转录水平检测方法  | GoPhAST-R      | 不需要      | mRNA               | ≤3     | mRNA表达情况                      | 可同时对多个致病菌的不同耐药相关的多个耐药基因的mRNA表达量进行检测；可获得表型结果；周转时间短 | 需要专业操作          | [100]     |
| 蛋白质水平检测方法 | β-内酰胺酶检测法      | 短暂孵育     | 硝基羟实验；三叶草试验；区域边缘判读 | ≤1     | 1) 判断抑菌圈边缘；2) MIC值 ≥0.25 mg/L | 三叶草试验操作相对繁琐                                       | 三叶草试验操作相对繁琐     | [83]      |
|           | PBP2a 乳胶凝集法    | 不需要      | 单克隆抗体与PBP2a反应      | ≤0.5   | 凝集反应                          | 操作简便、准确快速、耗时短                                     | 无法区别MRSA与其他葡萄球菌 | [104,105] |
|           | MALDI-TOF MS   | 需要       | 蛋白质                | ≤18    | 分值 ≥1.7: 耐药；分值 <1.7: 敏感       | 可快速鉴定菌株及其耐药表型                                     | 成本高             | [106]     |



#### 2.4.2 基于MALDI-TOF MS的耐药性检测方法

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) 通过分析核糖体蛋白质, 提供一种独特的微生物指纹图谱, 其特异性高、鉴定结果准确, 被广泛应用于微生物鉴定、细菌耐药表型检测 (MRSA 等) 以及耐药机制研究<sup>[108]</sup>。根据不同的检测目的, 结合葡萄球菌的不同的耐药机制, 构建了基于 MALDI-TOF MS 的检测耐药表型方法被构建, 主要分为三大类: 细菌与抗生素共培养后的生物量检测, 分析其质量峰谱; 根据水解酶活性变化或分析酶修饰后的片段变化; 根据质量峰模式, 筛选特异性峰, 区别抗生素敏感株和抗生素耐药株 (如区分 MRSA 与 MSSA)。

直接对靶微滴生长法 (MALDI-TOF MS-based Direct-On-Target Microdroplet Growth Assay, DOT-MGA)<sup>[109]</sup> 是将其微生物鉴定功能与抗生素抑菌作用等特点结合, 参考 CLSI<sup>[79]</sup> 及 EUCAST<sup>[80]</sup> 等国际标准, 对与抗生素共孵育后的微液滴的生物量进行鉴定, 最后根据其鉴定的分值确定菌株的耐药表型 (分值  $\geq 1.7$  为耐药;  $< 1.7$  为敏感)。DOT-MGA 不仅可以检测菌株的耐药表型, 还可精确抗生素的浓度。Idelevich 等<sup>[110]</sup> 采用 DOT-MGA 方法对肠杆菌目的菌株同时检测了 24 种抗生素的耐药情况。结果显示在的孵育时间在 6~8 h 的时候, 其分析效果最好。Nix 等<sup>[111]</sup> 首次采用 DOT-MGA 检测 MRSA 与 MSSA, 结果显示, 该方法的检出率高达 96.4%, 灵敏度和特异性均为 100%。除了 DOT-MGA 方法外, Gao 等<sup>[112]</sup> 基于 MALDI-TOF MS 构建了以 (E)-丙基  $\alpha$ - 氰基 -4- 羟基肉桂酸酯 (CHCA-C3) 为基质, 区分 MRSA 和 MSSA 的检测方法。该方法结果对检测蛋白质或多肽, 尤其是疏水性蛋白质表现出良好的性能。相比于传统基质  $\alpha$ - 氰基 -4 羟基肉桂酸 (CHCA), CHCA-C3 的重现性更好, 受培养基的影响小。此外, 该方法还可应用于血液样本中的病原菌的多种抗生素的耐药 (如 MRSA) 以及多种致病菌的多种耐药表型的鉴定, 实现临床微生物耐药性的快速检测<sup>[106,113]</sup>。但由于 MALDI-TOF MS 的固定配件问题——靶板上的位置有限, 暂时难以实现上百个样品同时检测。

近年来, 部分研究者<sup>[114]</sup> 试图通过比较 MALDI-

TOF MS 的质量峰差异, 筛选特异性峰, 以区分 MRSA 与 MSSA, 如 Paskova 等<sup>[115]</sup> 在  $m/z$  2415 处发现一个小肽峰, 对应酚溶性调节素 (PSM-*mec*), 与甲氧西林耐药相关。因此, MALDI-TOF MS 可用于预测金黄色葡萄球菌对甲氧西林的耐药性<sup>[108,116]</sup>。尽管从质量峰图上观察到了 MRSA 的特异性峰, 但依然不能用于区分 MRSA 与 MSSA。随后, 在 2022 年, Yu 等<sup>[117]</sup> 提出了一个基于 MALDI-TOF MS 的机器学习模型: 通过前瞻性试验和的四个临床站点评估, 确定 UPF0337 蛋白 SACOL1680 为快速区分 MRSA 和 MSSA 的特异性标志物。但对于 UPF0337 蛋白 SACOL1680 为何种蛋白并没有详细阐明, 同时, 该研究揭露了一个 MRSA 可能存在的耐药机制——甲氧西林不与 UPF0337 蛋白 SACOL1680 结合, 以此介导金黄色葡萄球菌对甲氧西林产生耐药。

除抗生素敏感实验 (Antimicrobial Susceptibility Testing, AST), MALDI-TOF MS 还可用于检测水解酶活性。Hrabák 等<sup>[118]</sup> 构建基于 MALDI-TOF MS 直接检测美罗培南及其降解物的方法, 以判断  $\beta$ - 内酰胺酶的水解活性, 确定菌株的耐药表型; 该方法的灵敏度为 96.67%, 特异性为 97.87%。随后, 该方法被修改验证, 并发展为一种有效检测水解酶活性的可靠方法<sup>[119]</sup>, 如金黄色葡萄球菌的 ESBLs 的检测<sup>[120]</sup>、乙酰转移酶的活性检测<sup>[121]</sup> 等。MALDI-TOF MS 除了可用于检测酶活性外, 还可应用于分析目标位点的修饰。Kirpekar 等<sup>[122]</sup> 首先构建了基于 MALDI-TOF MS 筛选 RNA 转录后修饰的方法。在 RNA 核苷酸特异性 RNA 酶消化完成后, 使用 MALDI-TOF MS 进行片段分析。经分析后, 观察到的质量数据与基因序列预测数据保持一致。Savic 等<sup>[123]</sup> 在此基础上, 构建检测 Kgm 家族的甲基转移酶的核苷甲基化位点方法, 并用于区别对氨基糖甙类抗生素 (如新霉素、卡那霉素和阿帕霉素) 敏感和耐药的菌株。同样的方法也被用于分析 *cfr* 基因介导的 23S rRNA 的甲基化, 该基因主要定位于金黄色葡萄球菌以及大肠杆菌质粒, 对氯霉素、氟苯尼考和克林霉素耐药中起着关键作用<sup>[124]</sup>。

基于 MALDI-TOF MS 的耐药性检测方法集合了 KB 法操作简便以及微量肉汤稀释可获得精确的 MIC 值等优点, 同时, MALDI-TOF MS 拥有丰富的菌种资源信息<sup>[125]</sup>, 实现短时快速获得多种菌株的耐药表型信息, 有助于临床微生物的耐药表型鉴定, 优化治疗方案。

## 2.5 基于生物信息学分析技术结合组学数据的耐药性预测方法

### 2.5.1 蛋白质组学相关的耐药性预测

MALDI-TOF MS 是一种在空间代谢组学中广泛应用的技术,除可应用于菌种鉴定、耐药性检测外,还可在此基础上,通过收集各类耐药菌株的图谱,构建蛋白指纹图谱库,构架机器学习模型,进行菌株耐药性筛选和预测。目前,多种基于 MALDI-TOF MS 区分 MRSA 与 MSSA 的方法以及关于其他病原菌耐药性预测方法已有相关报道。例如,Feucherolles 等<sup>[126]</sup>通过研究 MALDI-TOF MS 蛋白质谱,结合预测方法作为相关食源性病原菌(如大肠弯曲杆菌和空肠弯曲杆菌)的抗生素耐药筛查工具。一个由 224 株空肠梭菌和 116 株大肠杆菌组成的 One Health 小组对七种抗生素耐药性进行了表型测试,使用 MALDI Biotyper 分析在板内和外提取的蛋白质,其产生每个分离物和提取类型的一个平均光谱。总体而言,该分类器可高效地检测到敏感以及环丙沙星和四环素耐药菌株,其最高灵敏度和精密度分别达到 92.3% 和 81.2%;在靶板内外两类的蛋白质提取物之间没有显著的预测性能差异。此外,在该研究中确定了氟喹诺酮类、四环素类和氨基糖苷类的三种抗生素耐药生物标志物<sup>[126]</sup>。MALDI-TOF MS 和机器学习的结合,有助于快速筛选食源性病原菌中的某些抗生素耐药菌,让精确、靶向的抗生素治疗成为可能。

### 2.5.2 全基因组学相关的耐药性预测

与 MALDI-TOF MS 的预测原理不同,全基因组测序从基因层面出发,与 Resfinder 等耐药基因分析数据库结合<sup>[127]</sup>,分析菌株是否携带特定抗性基因,预测菌株是否存在对某种抗生素产生抗性的潜能<sup>[127]</sup>。因其需要生物信息背景的专业人员操作,甚少用于日常检测中,常用于病原菌的流行病学分析或分子监测中。全基因组数据几乎包含整个病原菌的全部遗传信息,通过其基因组信息可全方位了解病原菌的流行特征和种群的耐药性分布情况。此外,全基因组测序是分辨率最高的方法,它可检测细菌基因组中的单核苷酸多态性(SNP)以及耐药性相关基因及其突变体等。Ackers 等<sup>[128]</sup>在调查病原菌的耐药性分布的同时,对所分离的菌株进行了全基因组测序;其研究数据表明,经数据分析所得抗性基因可解释抗性表型的存在。

全基因组测序的另一个优势在于:必要时可对全基因组数据进行储存和再分析,如新耐药机制的发现或新耐药基因的功能验证等<sup>[129]</sup>。鉴于全基因组测序的耐药性预测方法不断发展,独立研究的生物信息学方法已不能满足研究者的需求。Kumar 等<sup>[130]</sup>基于全基因组数据分析,利用自动化生物信息学分析工具 Next Gen Diagnostics 预测 MRSA 的表型耐药性,其预测结果与传统圆盘扩散法等表型检测结果有 99.69% 的一致性;与基于独立研究的信息学方法生成的预测结果有 99.97% 的一致性。Cunningham 等<sup>[131]</sup>使用同样的方法分析了 102 个独特的金黄色葡萄球菌的血培养分离株的全基因组序列数据,以预测抗生素敏感性,并将结果与表型敏感性测试结果进行了比较。其研究表明,苯唑西林、万古霉素和莫匹罗星等的表型结果与耐药性的基因型预测完全一致。将基因组信息与机器学习等生物信息学分析手段结合,可高效快速获得金黄色葡萄球菌耐药性相关分子特征信息,利于新耐药基因、耐药机制的挖掘。

## 3 展望

金黄色葡萄球菌广泛分布于临床、社区及环境中,其耐药性十分严重。耐药机制相关的基因在金黄色葡萄球菌产生耐药性中起着关键作用。它可通过传代进行垂直传播或通过移动元件进行不同种属菌株间的水平吸收,介导金黄色葡萄球菌出现产生多重耐药表型。此外,移动元件中可能同时携带或插入了其他特征性基因(如生物膜基因、毒力基因等),增强金黄色葡萄球菌的危害性。

组学技术的发展,使得金黄色葡萄球菌的耐药机制研究取得较大的进展。大部分临床常用于治疗金黄色葡萄球菌感染的抗生素的耐药机制已基本研究透彻,但关于少部分抗生素的异质性耐药机制以及调控多重耐药等机制的相关研究较少,如苯唑西林、万古霉素等。现有的金黄色葡萄球菌耐药性检测方法各有优势,但依然缺乏一类可同时确定金黄色葡萄球菌耐药表型和耐药基因型的方法。综合来说,还有以下几点有待探究:(1)调控金黄色葡萄球菌出现异质性耐药以及多重耐药表型的关键因素,需要进一步探究;(2)多重耐药金黄色葡萄球菌与菌株特定的 *spa* 型别或 ST 型别是否具有相关性,有待进一步探究;(3)如何快速识别并检测环

境、社区以及临床上的多重耐药金黄色葡萄球菌。虽然葡萄球菌的耐药性无法消除,但我们通过全面了解其耐药性传播规律,从源头上控制耐药葡萄球菌的传播。针对以上现状,对未来发展提出以下建议:(1)以整个生态系统作为一个整体,多方联动,规范各类抗生素使用管理;(2)结合多种组学技术,深入研究更多关于多重耐药菌株的耐药调控机制,全面了解多重耐药菌株相关影响因素;(3)基于全基因组测序技术,结合分离株的耐药表型,挖掘更多耐药调控机制相关的耐药基因,以此开发快速同时检测细菌多种抗生素耐药性的检测方法;(4)加强在肉类产品生产、加工以及运输等环节的检测与控制,做到及时切断食源性致病菌耐药性的传播,有效控制多重耐药菌引发的疾病的发生与流行,为动物及鱼类等养殖业、临床用药以及食源性致病菌对人与动物健康风险评估提供了数据支撑。

### 参考文献

- [1] KADARIYA J, SMITH T C, THAPALIYA D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health [J]. Biomed Research International, 2014, 2014: 827965.
- [2] 徐振波,刘晓晨,李琳,等.金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展[J].现代食品科技,2013,29(9): 2317-2324.
- [3] LINDSAY J A, HOLDEN M T G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? [J]. Trends in Microbiology, 2004, 12(8): 378-385.
- [4] GRUMANN D, NÜBEL U, BRÖKER B M. *Staphylococcus aureus* toxins-their functions and genetics [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2014, 21: 583-592.
- [5] HENNEKINNE J A, DE BUYSER M L, DRAGACCI S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(4): 815-836.
- [6] SALMANOV A, SHCHEHLOV D, SVYRYDIUK O, et al. Epidemiology of healthcare-associated infections and mechanisms of antimicrobial resistance of responsible pathogens in Ukraine: a multicentre study [J]. The Journal of Hospital Infection, 2023, 131: 129-138.
- [7] MESTROVIC T, AGUILAR G R, SWETSCHINSKI L R, et al. The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis [J]. Lancet Public Health, 2022, 7(11): E897-E913.
- [8] PEREIRA V, LOPES C, CASTRO A, et al. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal [J]. Food Microbiology, 2009, 26(3): 278-282.
- [9] PALUDI D, VERGARA A, FESTINO A R, et al. Antimicrobial resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food industry [J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2011, 25(4): 671-677.
- [10] BELENEVA I A. Incidence and characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from the Japan and south China seas [J]. Marine Pollution Bulletin, 2011, 62(2): 382-387.
- [11] WU S, HUANG J, WU Q, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from retail vegetables in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1263.
- [12] WU S, HUANG J, WU Q, et al. *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: incidence, antibiotic resistance and genetic diversity [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2767.
- [13] DAI J, WU S, HUANG J, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 641.
- [14] SCHINDLER B D, JACINTO P L, BUENSALIDO J A, et al. Clonal relatedness is a predictor of spontaneous multidrug efflux pump gene overexpression in *Staphylococcus aureus* [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2015, 45(5): 464-470.
- [15] WU S, HUANG J, ZHANG F, et al. Prevalence and characterization of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 304.
- [16] WU S, HUANG J, ZHANG F, et al. Emergence of extensive multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* carrying novel *Sa-MRRIsa(E)* in retail food [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2022, 30: 205-213.
- [17] TAREEN A R, ZAHRA R. Community acquired methicillin resistant *Staphylococci* (CA-MRS) in fecal matter of wild birds -a 'one health' point of concern [J]. Journal of Infection and Public Health, 2023, 16(6): 877-883.
- [18] SABER T, SAMIR M, EL-MEKKAWY R M, et al. Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from humans and ready-to-eat meat: characterization of antimicrobial resistance and biofilm formation ability [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 735494.
- [19] VESTERGAARD M, FREES D, INGEMER H. Antibiotic resistance and the MRSA problem [J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(2): 1-23.

- [20] PENCE M A, HASTE N M, MEHARENA H S, et al. Beta-lactamase repressor BlaI modulates *Staphylococcus aureus* cathelicidin antimicrobial peptide resistance and virulence [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136605.
- [21] DE ANGELIS G, DEL GIACOMO P, POSTERARO B, et al. Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(14): 5090.
- [22] AMBLER R P. The structure of beta-lactamases [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 1980, 289(1036): 321-331.
- [23] TOOKE C L, HINCHLIFFE P, BRAGGINTON E C, et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors in the 21st century [J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(18): 3472-3500.
- [24] CRICCO J A, VILA A J. Class b beta-lactamases: the importance of being metallic [J]. Current Pharmaceutical Design, 1999, 5(11): 915-927.
- [25] RAWLINGS N D, BARRETT A J, BATEMAN A. Merops: the peptidase database [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(Database issue): D227-233.
- [26] NOMURA R, NAKAMINAMI H, TAKASAO K, et al. A class A  $\beta$ -lactamase produced by borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* hydrolyses oxacillin [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 22: 244-247.
- [27] LEE J, LEE E Y, KIM S H, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active  $\beta$ -Lactamase [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(6): 2589-2595.
- [28] HRYNIEWICZ M M, GARBACZ K. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA)-a more common problem than expected? [J]. Journal of Medical Microbiology, 2017, 66(10): 1367-1373.
- [29] SABAT A J, POURNARAS S, AKKERBOOM V, et al. Whole-genome analysis of an oxacillin-susceptible CC80 *meaA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolate: insights into the mechanisms of cryptic methicillin resistance [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(11): 2956-2964.
- [30] HOSOSAKA Y, HANAKI H, ENDO H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *meaA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA [J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2007, 13(2): 79-86.
- [31] MORAR M, BHULLAR K, HUGHES D W, et al. Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB [J]. Structure, 2009, 17(12): 1649-1659.
- [32] GOODALE A, MICHAILEDIS F, WATTS R, et al. Characterization of permissive and non-permissive peptide insertion sites in chloramphenicol acetyltransferase [J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 149: 104395.
- [33] HANDZLIK J, MATYS A, KIEC-KONONOWICZ K. Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of gram-positive bacteria *S. aureus* [J]. Antibiotics (Basel), 2013, 2(1): 28-45.
- [34] DU D, XUAN W, NEUBERGER A, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(9): 523-539.
- [35] UDDIN M J, AHN J. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(6): 462-468.
- [36] PHILLIPS-JONES M K, HARDING S E. Antimicrobial resistance (AMR) nanomachines-mechanisms for fluoroquinolone and glycopeptide recognition, efflux and/or deactivation [J]. Biophysical Reviews, 2018, 10(2): 347-362.
- [37] FERREIRA C, ABRANTES P, COSTA S S, et al. Occurrence and variability of the efflux pump gene *norA* across the *Staphylococcus* genus [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15306.
- [38] COSTA S S, VIVEIROS M, AMARAL L, et al. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update [J]. The Open Microbiology Journal, 2013, 7: 59-71.
- [39] JENSEN S O, LYON B R. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Future Microbiology, 2009, 4(5): 565-582.
- [40] FOSTER T J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. current status and future prospects [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(3): 430-449.
- [41] ZHU Y, WANG C, SCHWARZ S, et al. Identification of a novel tetracycline resistance gene, *tet(63)*, located on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2021, 76(3): 576-581.
- [42] TRUONG-BOLDUC Q C, DUNMAN P M, STRAHILEVITZ J, et al. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(7): 2395-2405.
- [43] NOGUCHI N. Antimicrobial resistance and infection control for gram-positive bacteria [J]. Yakugaku Zasshi, 2021, 141(2): 235-244.
- [44] MIKLASIŃSKA-MAJDANIK M. Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus* [J]. Antibiotics, 2021, 10(11): 1406.
- [45] TRUONG-BOLDUC Q C, WANG Y, HOOPER D C. Tet38 efflux pump contributes to fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(8): e00927-00918.
- [46] ZENG W L, ZHANG X T, LIU Y, et al. *In vitro* antimicrobial activity and resistance mechanisms of the new generation

- tetracycline agents, eravacycline, omadacycline, and tigecycline against clinical *Staphylococcus aureus* isolates [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1043736.
- [47] FANG R, SUN Y, DAI W, et al. Mutations in the MepRAB efflux system contribute to the in vitro development of tigecycline resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 22: 631-636.
- [48] LUONG T T, NEWELL S W, LEE C Y. Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(13): 3703-3710.
- [49] TRUONG-BOLDUC Q C, BOLDUC G R, MEDEIROS H, et al. Role of the Tet38 efflux pump in *Staphylococcus aureus* internalization and survival in epithelial cells [J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(11): 4362-4372.
- [50] DEMARCO CARMEN E, CUSHING LAUREL A, FREMPONG-MANSO E, et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(9): 3235-3239.
- [51] TRUONG-BOLDUC Q C, DUNMAN P M, STRAHILEVITZ J, et al. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(7): 2395-2405.
- [52] HUANG J, O'TOOLE PAUL W, SHEN W, et al. Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(3): 909-917.
- [53] TRUONG-BOLDUC Q C, WANG Y, CHEN C, et al. Transcriptional regulator TetR21 controls the expression of the *Staphylococcus aureus* LmrS efflux pump [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(8): e00649-00617.
- [54] TRUONG-BOLDUC Q C, WANG Y, HOOPER D C. *Staphylococcus aureus* Tet38 efflux pump structural modeling and roles of essential residues in drug efflux and host cell internalization [J]. *Infection and Immunity*, 2021, 89(5): e00811-00820.
- [55] HUANG H, WAN P, LUO X, et al. Tigecycline resistance-associated mutations in the MepA efflux pump in *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e00634-00623.
- [56] CHAN M K L, KOO S H, QUEK Q, et al. Development of a real-time assay to determine the frequency of *qac* genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 153: 133-138.
- [57] FEBLER A T, WANG Y, WU C, et al. Mobile macrolide resistance genes in *Staphylococci* [J]. *Plasmid*, 2018, 99: 2-10.
- [58] ERO R, KUMAR V, WEIXIN S, et al. Ribosome protection by ABC-F proteins-molecular mechanism and potential drug design [J]. *Protein Science*, 2019, 28(4): 684-693.
- [59] 寇秀颖,张峰,吴诗,等.致病性葡萄球菌*cfi*基因介导的多重耐药机制研究进展[J].*微生物学报*,2022,62(11):4305-4323.
- [60] WRIGHT G D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(10): 1451-1470.
- [61] VÁZQUEZ-LASLOP N, MANKIN A S. How macrolide antibiotics work [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2018, 43(9): 668-684.
- [62] WEISBLUM B. Erythromycin resistance by ribosome modification [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(3): 577-585.
- [63] SCHWARZ S, FESSLER A T, LONCARIC I, et al. Antimicrobial resistance among *Staphylococci* of animal origin [J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(4): ARBA-0010-2017.
- [64] WANG H, ZHUANG H, JI S, et al. Distribution of *erm* genes among MRSA isolates with resistance to clindamycin in a Chinese teaching hospital [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2021, 96: 105127.
- [65] DEZANET C, KEMPF J, MINGEOT-LECLERCQ M-P, et al. Amphiphilic aminoglycosides as medicinal agents [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19):741.
- [66] RAMIREZ M S, TOLMASKY M E. Aminoglycoside modifying enzymes [J]. *Drug Resistance Updates*, 2010, 13(6): 151-171.
- [67] CHUKWUDI CHINWE U. rRNA binding sites and the molecular mechanism of action of the tetracyclines [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(8): 4433-4441.
- [68] THAKER M, SPANOGIANNOPOULOS P, WRIGHT G D. The tetracycline resistome [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(3): 419-431.
- [69] SCHWARZ S, CARDOSO M, WEGENER H C. Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, 36(3): 580-588.
- [70] OSEI SEKYERE J, MENSAH E. Molecular epidemiology and mechanisms of antibiotic resistance in *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. in Africa: a systematic review from a one health perspective [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2020, 1465(1): 29-58.
- [71] LEE G Y, LEE H H, YANG S J. Antimicrobial resistance profiles and clonal diversity of *Staphylococcus epidermidis* isolates from pig farms, slaughterhouses, and retail pork [J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 282: 109753.
- [72] BRITO M A V P, LANGE C C, MARTINI C L, et al. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in

- Minas Gerais, Brazil [J]. *Journal of Dairy Research*, 2017, 84(2): 202-205.
- [73] SCHWENDENER S, COTTING K, PERRETEN V. Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43797.
- [74] BECKER K, VAN ALEN S, IDELEVICH E A, et al. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(2): 242-248.
- [75] UTSUI Y, YOKOTA T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, 28(3): 397-403.
- [76] ZENG D, DEBABOV D, HARTSELL T L, et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*, 2016, 6(12): a026989.
- [77] GARDETE S, TOMASZ A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(7): 2836-2840.
- [78] SIERADZKI K, TOMASZ A. Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(2): 527-533.
- [79] JAMES S. LEWIS II P, FIDSA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement m100 (ISBN 1-56238-838-X [Print]; ISBN 1-56238-839-8 [Electronic]) [S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2018.
- [80] KAHLMETER G. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (version 8.0) [S]. Sweden: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2018.
- [81] UPRETI N, RAYAMAJHEE B, SHERCHAN S P, et al. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug resistant and extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal [J]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2018, 7: 121.
- [82] IVANOVIC I, BOSS R, ROMANÒ A, et al. Penicillin resistance in bovine *Staphylococcus aureus*: genomic evaluation of the discrepancy between phenotypic and molecular test methods [J]. *Journal of Dairy Science*, 2023, 106(1): 462-475.
- [83] SKOV R, LONSWAY D R, LARSEN J, et al. Evaluation of methods for detection of  $\beta$ -lactamase production in MSSA [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, 76(6): 1487-1494.
- [84] ZHANG F, WU S, LEI T, et al. Presence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* co-carrying the multidrug resistance genes *cfp* and *lsa(E)* in retail food in China [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 363: 109512.
- [85] DONG Q S, WANG Q, ZHANG Y, et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and staphylococcal toxin genes of *bla<sub>TEM-1a</sub>*-producing *Staphylococcus aureus* isolated from animals in Chongqing, China [J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2023, 9(1): 513-522.
- [86] ZHAO X, HU M, ZHAO C, et al. Whole-Genome epidemiology and characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 from retail pork and bulk tank milk in Shandong, China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 764105.
- [87] AHMADI E, KHOJASTEH M, MORTAZAVI S M, et al. Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the west of Iran: a population-based cross-sectional study [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 899.
- [88] ZHOU B Q, CHEN M T, WANG C F, et al. A label-free AuNP bioprobe-assisted CRISPR/Cas12a colorimetric platform for high-throughput detection of *Staphylococcus aureus* ST398 [J]. *Food Control*, 2023, 145: 130906.
- [89] PANCHOLI P, CARROLL K C, BUCHAN B W, et al. Multicenter evaluation of the accelerate phenotest BC kit for rapid identification and phenotypic antimicrobial susceptibility testing using morphokinetic cellular analysis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(4): e01329-01317.
- [90] LI F, YE Q, CHEN M, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 179: 113073.
- [91] LI F, YE Q, CHEN M, et al. Cas12aFDet: a CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1151: 338248.
- [92] ZHOU B, YE Q, LI F, et al. CRISPR/Cas12a based fluorescence-enhanced lateral flow biosensor for detection of *Staphylococcus aureus* [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 351: 130906.
- [93] DUMAS J L, VAN DELDEN C, PERRON K, et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 254(2): 217-225.
- [94] ROSATO A E, CRAIG W A, ARCHER G L. Quantitation of *mecA* transcription in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(11): 3566-3571.

- 3446-3452.
- [95] LUONG T T, DUNMAN P M, MURPHY E, et al. Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(5): 1899-1910.
- [96] MADDEN DANIELLE E, OLAGOKE O, BAIRD T, et al. Express yourself: quantitative real-time PCR assays for rapid chromosomal antimicrobial resistance detection in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2022, 66(5): e00204-00222.
- [97] COSTA S S, VIVEIROS M, POMBA C, et al. Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018, 73(2): 320-324.
- [98] DAIYU L, YAN G, NING W, et al. Identification and characterization of a novel major facilitator superfamily efflux pump, SA09310, mediating tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2023, 67(4): e0169622.
- [99] XU W, CHEN T, WANG H, et al. Molecular mechanisms and epidemiology of fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from patients at a teaching hospital in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1290.
- [100] BHATTACHARYYA R P, BANDYOPADHYAY N, MA P, et al. Simultaneous detection of genotype and phenotype enables rapid and accurate antibiotic susceptibility determination [J]. Nature Medicine, 2019, 25(12): 1858-1864.
- [101] MARTINSEN M A, JARAMILLO CARTAGENA A, BHATTACHARYYA R P. Core antibiotic-induced transcriptional signatures reflect susceptibility to all members of an antibiotic class [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2021, 65(6): e02296-02220.
- [102] SONG Y, CUI L, LV Y, et al. Characterisation of clinical isolates of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* in China from 2009 to 2014 [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2017, 11: 1-3.
- [103] ANDINI N, HU A, ZHOU L, et al. A “culture” shift: broad bacterial detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing directly from whole blood [J]. Clinical Chemistry, 2018, 64(10): 1453-1462.
- [104] NAKATOMI Y, SUGIYAMA J. A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2' [J]. Microbiology and Immunology, 1998, 42(11): 739-743.
- [105] WILLEM B. VAN LEEUWEN, CINDY VAN PELT, AD LUIJENDIJK, et al. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(9): 3029-3030.
- [106] NIX I D, IDELEVICH E A, STORCK L M, et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from agar cultures and directly from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry-based direct-on-target microdroplet growth assay [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 232.
- [107] PENN C, MODDRELL C, TICKLER I A, et al. Wound infections caused by inducible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2013, 1(2): 79-83.
- [108] JOSTEN M, DISCHINGER J, SZEKAT C, et al. Identification of *agr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A *mec* complex by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2014, 304(8): 1018-1023.
- [109] IDELEVICH E A, SPARBIER K, KOSTRZEWA M, et al. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2018, 24(7): 738-743.
- [110] IDELEVICH E A, NIX I D, BUSCH J A, et al. Rapid simultaneous testing of multiple antibiotics by the MALDI-TOF MS direct-on-target microdroplet growth assay [J]. Diagnostics (Basel), 2021, 11(10): 1803.
- [111] NIX I D, IDELEVICH E A, STORCK L M, et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from agar cultures and directly from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry-based direct-on-target microdroplet growth assay [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 232.
- [112] GAO W, LI B, LING L, et al. MALDI-TOF MS method for differentiation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using (E)-propyl  $\alpha$ -cyano-4-hydroxyl cinnamylate [J]. Talanta, 2022, 244: 123405.
- [113] LI R, TANG H, XU H, et al. Direct-on-target microdroplet growth assay applications for clinical antimicrobial susceptibility testing [J]. Infection and Drug Resistance, 2021, 14: 1423-1425.
- [114] SOGAWA K, WATANABE M, ISHIGE T, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Biocontrol Science, 2017, 22(3): 163-169.
- [115] PASKOVA V, CHUDEJOVA K, SRAMKOVA A, et al. Insufficient repeatability and reproducibility of MALDI-TOF MS-based identification of MRSA [J]. Folia Microbiologica, 2020, 65(5): 895-900.
- [116] RHOADS D D, WANG H, KARICHU J, et al. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in *Staphylococci* [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2016, 86(3): 257-261.

- [117] YU J, TIEN N, LIU Y C, et al. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF MS and machine learning from over 20,000 clinical isolates [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0048322.
- [118] HRABÁK J, WALKOVÁ R, ŠTUDENTOVÁ V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 49(9): 3222-3227.
- [119] SPARBIER K, SCHUBERT S, WELLER U, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(3): 927-937.
- [120] NIRWAN A, KHAN S, VYAS J, et al. Sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* isolates from different sources for methicillin, vancomycin,  $\beta$ -lactamase and ESBL production [J]. *Indian Journal of Animal Research*, 2022, B-4944: 1-4.
- [121] OVIAÑO M, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J M, PASCUAL Á, et al. Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant AAC(6)-Ib-cr in *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS analysis [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(4.0): 1074-1080.
- [122] KIRPEKAR F, DOUTHWAITE S, ROEPSTORFF P. Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry [J]. *RNA*, 2000, 6(2): 296-306.
- [123] SAVIC M, LOVRIC J, TOMIC T I, et al. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(16): 5420-5431.
- [124] KEHRENBURG C, SCHWARZ S, JACOBSEN L, et al. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503 [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(4): 1064-1073.
- [125] ANTONY C, GUY P h, GILBERT G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(2): 380-407.
- [126] FEUCHEROLLES M, NENNIG M, BECKER S L, et al. Combination of MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning for rapid antimicrobial resistance screening: the case of *Campylobacter* spp [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 804484.
- [127] BORTOLAIA V, KAAS R S, RUPPE E, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(12): 3491-3500.
- [128] ACKERS-JOHNSON G, KIBOMBO D, KUSIIMA B, et al. Antibiotic resistance profiles and population structure of disease-associated *Staphylococcus aureus* infecting patients in fort portal regional referral hospital, western Uganda [J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2021, 167(5): 1203.
- [129] SANCHINI A. Recent developments in phenotypic and molecular diagnostic methods for antimicrobial resistance detection in *Staphylococcus aureus*: a narrative review [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12(1): 208.
- [130] KUMAR N, RAVEN K E, BLANE B, et al. Evaluation of a fully automated bioinformatics tool to predict antibiotic resistance from MRSA genomes [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(5): 1117-1122.
- [131] CUNNINGHAM S A, JERALDO P R, SCHUETZ A N, et al. *Staphylococcus aureus* whole genome sequence-based susceptibility and resistance prediction using a clinically amenable workflow [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2020, 97(3): 115060.