

## 新型抗菌药物敏感性检测方法研究进展

赵颖<sup>1,2</sup>, 徐英春<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中国医学科学院北京协和医院检验科 侵袭性真菌病机制研究与精准诊断北京市重点实验室, 北京 100730

<sup>2</sup> 中国医学科学院北京协和医学院研究生院, 北京 100005

通信作者: 徐英春, E-mail: xyepumch@139.com

**【摘要】** 抗菌药物敏感试验 (antimicrobial susceptibility testing, AST) 可指导临床合理选择抗菌药物, 使患者获得良好预后, 并减少耐药菌株产生。然而, 传统 AST 费时费力, 导致临床医生获取药敏结果不及时, 仅凭借菌种和流行病学数据等经验用药, 这可能是耐药菌株数量不断增加的原因之一。近年来, 研究者致力于研发快速简便的 AST 检测手段, 并取得相关研究进展。本文就基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、微流控芯片系统、分子生物学技术、免疫学检测、流式细胞术等新型 AST 技术展开综述, 以期为提高临床微生物实验室 AST 检测效率提供借鉴。

**【关键词】** 抗菌药物敏感试验; 细菌; 抗菌药物耐药; 快速检测

**【中图分类号】** R446.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2024)05-1137-09

**DOI:** 10.12290/xhyxzz.2024-0001

## Research Progress on Novel Antimicrobial Susceptibility Testing Methods

ZHAO Ying<sup>1,2</sup>, XU Yingchun<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Laboratory, Beijing Key Laboratory for Mechanisms Research and Precision Diagnosis of Invasive Fungal Diseases, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

<sup>2</sup> Graduate School, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 1000005, China

Corresponding author: XU Yingchun, E-mail: xyepumch@139.com

**【Abstract】** Antimicrobial susceptibility testing (AST) helps guide clinical rational selection of antibiotics, enabling patients to achieve better prognosis and reducing the development of drug resistance. However, traditional AST is time-consuming and labor-intensive, meaning that clinicians are not able to obtain susceptibility results in a timely manner, and have to rely on experience based on bacterial species and epidemiological data for empirical drug selection. This may be one of the reasons for the continuous increase in the number of drug-resistant strains. In recent years, researchers have focused on the development of rapid and simple AST assays and have made relevant research progress. This article reviews the new AST technologies based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), microfluidic chip systems, nucleic acid detection methods, immunological detection, and flow cytometry, in the hope of providing reference for improving the efficiency of AST testing in clinical microbiology laboratories.

**【Key words】** antimicrobial susceptibility testing; bacteria; antibiotic resistance; rapid detection

**Funding:** National High Level Hospital Clinical Research (2022-PUMCH-C-052)

*Med J PUMCH*, 2024, 15(5): 1137-1145

基金项目: 中央高水平医院临床科研专项 (2022-PUMCH-C-052)

引用本文: 赵颖, 徐英春. 新型抗菌药物敏感性检测方法研究进展 [J]. 协和医学杂志, 2024, 15 (5): 1137-1145. doi: 10.12290/xhyxzz.2024-0001.

抗菌药物耐药 (antimicrobial resistance, AMR) 增加成为人类健康的主要威胁之一, 至 2050 年可能造成全球超 1000 万人死亡和 100 万亿美元医疗相关经济损失<sup>[1]</sup>。病原菌耐药性增长的同时也影响食品安全、环境及全球发展, 是目前全球高度关注的问题<sup>[2]</sup>。控制 AMR 需通过准确的抗菌药物敏感试验 (antimicrobial susceptibility testing, AST) 检测病原菌对于某种药物的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 或抑菌圈直径, 从而基于折点判断敏感性或耐药性, 指导临床合理选择抗菌药物, 使患者获得良好预后。

目前, 传统 AST 如微量肉汤稀释法或纸片扩散法费时费力, 但仍为金标准。临床微生物实验室通常需待病原菌在平板上生长后才能进行鉴定和药敏试验, 导致临床医生获得药敏试验结果不及时, 仅凭借菌种和流行病学数据等经验用药, 这可能是耐药菌株数量增加而导致 AMR 发展的原因之一。因此, 亟需研发快速便捷的 AST 方法使临床医生更早获取药敏结果, 减少耐药发生。本文就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) 技术、微流控芯片系统、分子生物学技术、免疫学检测、流式细胞术等新型 AST 技术展开综述, 以期为提高临床微生物实验室 AST 检测效率提供借鉴。

## 1 基于 MALDI-TOF MS 技术的 AST 检测

MALDI-TOF MS 技术应用于细菌、真菌的鉴定已逾 10 年, 可将菌种鉴定所需时长从 1~3 d 缩短至几分钟以内。由于该方法简便快速, 近年来研究者尝试将其应用于不同菌种的敏感性检测中。

### 1.1 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌直接检测

有研究采用 MALDI-TOF MS 技术针对 38 株携带 pKpQIL 质粒 [含编码肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, KPC) 的  $bla_{KPC}$  基因] 的肺炎克雷伯菌分离株进行检测, 比较  $bla_{KPC}$  阳性菌株 (19 株) 和  $bla_{KPC}$  阴性菌株 (19 株) 谱图, 发现仅  $bla_{KPC}$  阳性菌株具有 11.109 m/z 特征峰<sup>[3]</sup>。Gaibani 等<sup>[4]</sup>应用 34 株 KPC 菌株进行验证, 其中 30 株 (88.2%) 具有 11.109 m/z 特征峰, 均为 Tn4401a 亚型, 而另外 4 株为 Tn4401 的其他亚型, 与 11.109 m/z 特征峰无关。此外, 有研究针对 140 株特征明确的肺炎克雷伯菌进行该特征峰检测

发现, 总体准确率为 98%, 阳性和阴性预测值分别为 98%、97%<sup>[5]</sup>。

### 1.2 通过抗菌药物的变化间接检测碳青霉烯耐药性

Burckhardt 等<sup>[6]</sup>针对 47 株携带不同产碳青霉烯酶肠杆菌 (*carbapenemase producing Enterobacteriaceae*, CPE) (KPC 型、NDM 型、IMP 型、VIM 型) 和厄他培南耐药 (MIC  $\geq 4$  mg/L) 菌株以及 30 株携带其他耐药机制 (ESBL 型、K1 型) 但对碳青霉烯类不耐药的菌株, 通过读取 476 m/z、498 m/z、521 m/z 的厄他培南特征峰是否完全消失 (图 1), 可 100% 区分碳青霉烯酶产生和不产生的菌株。Hrabák 等<sup>[7]</sup>研究发现, 美罗培南具有 3 个特征峰: 383 m/z (不含钠美罗培南)、405 m/z 和 427 m/z (钠盐), 将细菌和美罗培南共同孵育 3 h 后发现, 383 m/z 和 405 m/z 中至少 1 个特征峰消失。有研究分别采用亚胺培南 (imipenem, IPM) 和美罗培南进行检测, 发现 IPM 检测铜绿假单胞菌碳青霉烯酶的灵敏度 (97%) 和特异度 (100%) 更高, 而美罗培南检测肠杆菌碳青霉烯酶的灵敏度 (99%) 和特异度 (100%) 更高<sup>[8]</sup>。Oho 等<sup>[9]</sup>基于 MALDI-TOF MS 建立了一种快速检测碳青霉烯酶的方法, 对 134 株产碳青霉烯酶菌株 (IMP 型、NDM 型、VIM 型、KPC 型、OXA-48 型和 GES 型) 和 107 株不产碳青霉烯酶菌株进行检测, 将 IPM 纸片和待测菌株混合, 即刻和 2 h 后分别进行 MALDI-TOF MS 检测, 基于在 489.45 m/z ( $\pm 500$  ppm) 附近是否存在 IPM 特异性波峰, 检测碳青霉烯酶的灵敏度和特异度分别为 94.8% 和 91.6%。由于金属  $\beta$ -内酰胺酶的活性位点需要锌, 该研究将假阴性菌株在硫酸锌溶液中培养并再次检测, 其中 IMP 型和 VIM 型呈碳青霉烯酶阳性, 总体检测灵敏度提高至 99.3%。

### 1.3 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

Josten 等<sup>[10]</sup>研究发现, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 菌株在 2415 m/z 处存在特殊峰且与肽-苯酚可溶性调节蛋白 (*phenol-soluble modulins-mec*, PSM-mec) 相关, PSM-mec 由 SCC-mec 基因盒编码且其表达与金黄色葡萄球菌的甲氧西林耐药表型相关。Burckhardt 等<sup>[11]</sup>采用原型软件自动检测识别金黄色葡萄球菌谱图中 2411~2415 m/z 峰值, 发现 49 株 (23.2%, 49/211) MRSA 菌株具有 2411~2415 m/z 特征峰, 1093 株对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (*methicillin sensitive Staphylococcus aureus*, MSSA) 菌株在 2411~2415 m/z 处无特征峰, 明确该特征峰

对 MRSA 具有特异性 (图 2)。目前, 已有通过 MALDI-TOF MS 技术检测与 SCC-mec 基因盒 II、III 和 VIII 型中 class A mec 基因关联的 PMS-mec 进一步检测 MRSA 的商品试剂盒。但一项多中心研究显示, 该方法的重复性较差, 在携带  $psm_{MEC}$  和  $psm_{\delta}$  基因分

别编码 PMS-mec 和  $\delta$ -毒素 (PSM 肽家族成员) 的菌株中进行检测, 该方法的灵敏度为 50%~90%, 未发现假阳性结果, 极大误差为 30%, 实验室间重复性差异为 0~100%<sup>[12]</sup>。因此, 该方法并不适用于常规实验室检测。

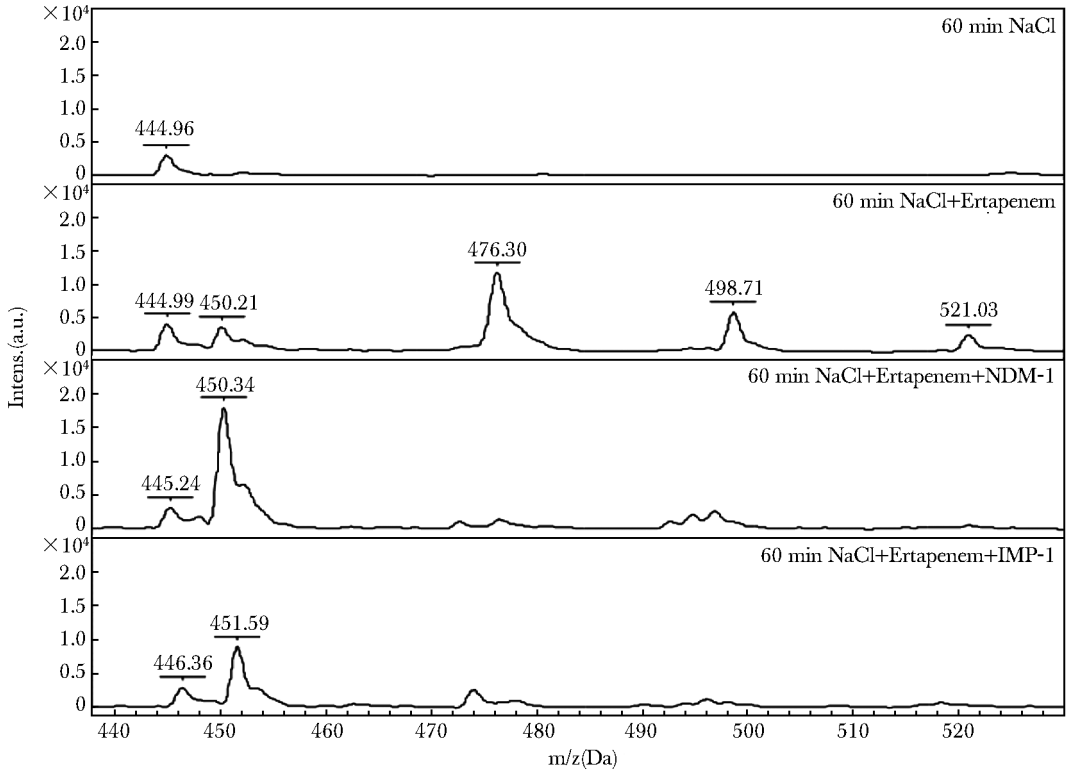


图 1 携带 NDM-1 的肺炎克雷伯菌、携带 IMP-1 的铜绿假单胞菌与厄他培南共孵育 60 min 后, 厄他培南特征峰消失

Fig. 1 After 60 minutes of incubation with *Klebsiella pneumoniae* carrying NDM-1 and *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP-1, the characteristic peak of ertapenem disappeared

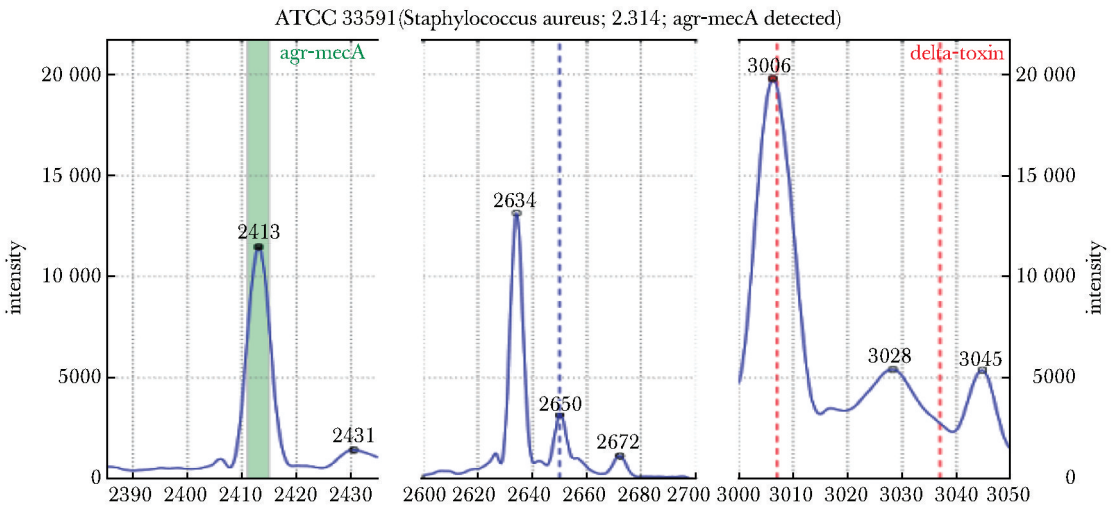


图 2 ATCC33591 MRSA 的 MALDI-TOF MS 谱图显示在 2411~2415 m/z 检测到 PSM-mec 相关特征峰

Fig. 2 MALDI-TOF MS of ATCC33591 MRSA shows the PSM-mec related peak in the range of 2411-2415 m/z

## 1.4 检测耐万古霉素肠球菌

Griffin 等<sup>[13]</sup>对 2009 年 1 月—2010 年 6 月收集的 67 株连续分离的耐万古霉素肠球菌 (vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE) (vanB 基因阳性) 采用 MALDI-TOF MS 进行检测, 将 5 个特征峰 (2211 m/z、717 m/z、5095 m/z、5946 m/z、8328 m/z) 作为 vanB 阳性和阴性菌株的参考谱图添加至数据库中, 并在 2012 年 1—2 月收集的临床分离株中进行验证, 正确识别率 97.5%, 错误识别率 2.5%, 假阳性 1.1%, 假阴性 1.4%。Candela 等<sup>[14]</sup>对 178 株粪肠球菌独特临床分离株的 MALDI-TOF MS 谱图进行研究, 发现应用 SVM、RF 和 PLS-DA 模型区分万古霉素敏感肠球菌 (vancomycin sensitive *Enterococcus*, VSE) 与 VRE 的分辨率分别为 80.9%、79.2% 和 77.5%, 提示 MALDI-TOF MS 峰图分析可作为一种快速有效的 VRE 筛查工具, 但未来仍需进一步改进以提高准确性。

## 1.5 直接靶板微滴生长测定法检测抗菌药物敏感性

Idelevich 等<sup>[15]</sup>开发了基于 MALDI-TOF MS 技术的直接靶板微滴生长测定法, 可在数小时内完成抗菌药物耐药性检测, 该方法将微生物培养在有/无美罗培南的营养肉汤中并以微滴形式直接在靶板上孵育, 随后使微滴与吸收性材料接触, 将肉汤与微生物细胞分离, 在抗菌药物存在时采用 MALDI-TOF MS 技术检测微生物的生长情况。该团队评估了 24 株肺炎克雷伯菌和 24 株铜绿假单胞菌分离株对美罗培南的耐药性, 分为 2  $\mu\text{L}$ 、4  $\mu\text{L}$ 、6  $\mu\text{L}$ 、8  $\mu\text{L}$  和 10  $\mu\text{L}$  微滴组进行检测, 发现 6  $\mu\text{L}$  微滴组获得最佳性能, 所有分离株在培养 18 h 后被正确区分为敏感株与非敏感株。对于肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌均采用 6  $\mu\text{L}$  微滴体积进行检测, 前者在孵育 4 h 后, 有效检测率、灵敏度和特异度均达 100%, 而后者在孵育 5 h 后有效检测率为 83.3%, 灵敏度和特异度均为 100%。

Barth 等<sup>[16]</sup>对上述方法进一步改进, 开发了从固

体琼脂上生长的菌落或直接从阳性血培养瓶的培养物中快速评估多粘菌素敏感性的 DOT-MGA 法, 并对从巴西南部三级医院患者中分离出的耐碳青霉烯类肠杆菌和非发酵革兰阴性杆菌菌株进行测试, 显示 2 种方法所得药敏结果与微量肉汤稀释法的分类一致性分别为 95% 和 100%。

## 1.6 基于靶板微滴培养氘标记法区分耐药菌株和易感菌株

Larson 等<sup>[17]</sup>利用氘标记膜脂追踪细菌生长情况, 当 2 株大肠埃希菌菌株在氧化氘存在下生长时, 可在 30 min~2 h 内检测出氘标记 (图 3)。标记效率能够提示细菌生长速率, 由于耐药菌株在未处理和处理的培养物中均保持  $\leq 50\%$  的标记效率, 而易感菌株在未处理和处理的培养物中标记效率分别为 50% 和 10%, 因此, 可通过标记效率区分耐药菌株和易感菌株。该方法可用于测量靶板微滴培养物中菌株 MIC, 首个氘丰度显著下降的抗菌药物浓度与微量肉汤稀释法获得的 MIC 相关性很高。

## 2 基于微流控芯片技术的 AST 检测

微流控芯片技术是将生物、化学、医学分析过程中的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上, 再基于电学、磁学和光学技术将芯片结合到微流体设备中, 从而实现快速识别和检测, 因此可提高实验效率, 最大限度减少人工操作, 降低错误率。其优势主要包括: (1) 提供动态和细菌单细胞水平分析, 集成实时监测技术 (如荧光或光学传感器), 实时监测微生物生长情况或细胞代谢产物释放, 及时提供数据反馈, 有助于了解药物效果; (2) 能够有效处理极小体积的样本和试剂, 降低实验成本, 减少对昂贵试剂的需求; (3) 可实现精确的液体操控, 确保药物和微生物混合均匀, 提

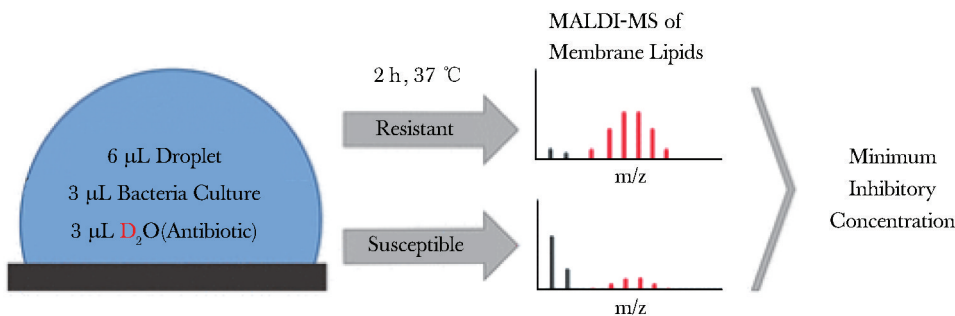


图 3 基于靶板微滴培养氘标记法区分耐药菌株和易感菌株流程图

Fig. 3 Flowchart for differentiation of resistant and susceptible strains based on deuterium labelling in microdroplet culture of target plate

高实验可靠性；(4) 可进行抗菌药物的高通量和高分辨率筛选；(5) 可在较短时间内提供检测结果<sup>[18]</sup>。因此，与传统 AST 相比，基于该技术的 AST 更快速、精准且成本低，展现出了巨大的应用潜力，可为药物研发和微生物学研究提供创新、高效的实验平台。

Nguyen 等<sup>[19]</sup>采用对流混合微流体设计(图4)，以生成较广的抗菌药物浓度梯度，该方法操作时间短，10 min 内即可完成，通过刃天青显色检测细菌代谢产物引起的化学信号变化，4~5 h 即可获得 MIC 值，且与微量肉汤稀释法的一致性较高。Li 等<sup>[20]</sup>研发了 handyfuge-AST 技术，可在 5 min 内生成细菌与精确浓度梯度的抗菌药物混合物，并在 5 h 内获得大肠埃希菌对单个抗菌药物的 MIC 值，进一步改良上述方法，使检测者可通过肉眼或智能手机软件读取结果，并对 10 份临床样本进行了 6 种常见抗菌药物检测，结果与传统 AST 的一致性达 100%。

血流感染时需快速、早期确定合适的抗菌药物，因此对快速获得 AST 检测结果的需求更高。Mizoguchi 等<sup>[21]</sup>研发了一种采用药物敏感性测试微流体(drug susceptibility testing microfluidic, DSTM)检测阳性血培养物评估抗菌药物敏感性的新方法，该团队针对 50 份革兰阴性杆菌的阳性血培养物进行评估，结果与传统 AST 的一致性超过 90%，且该方法可对超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBL)和 AmpC- $\beta$ -内酰胺酶产生菌株，3 h 内即可从阳性血培养物中评估抗菌药物敏感性。

### 3 基于分子生物学技术的 AST 检测

目前，分子生物学技术被广泛用于检测微生物的耐药性，如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和基因测序技术可用于检测细菌是否

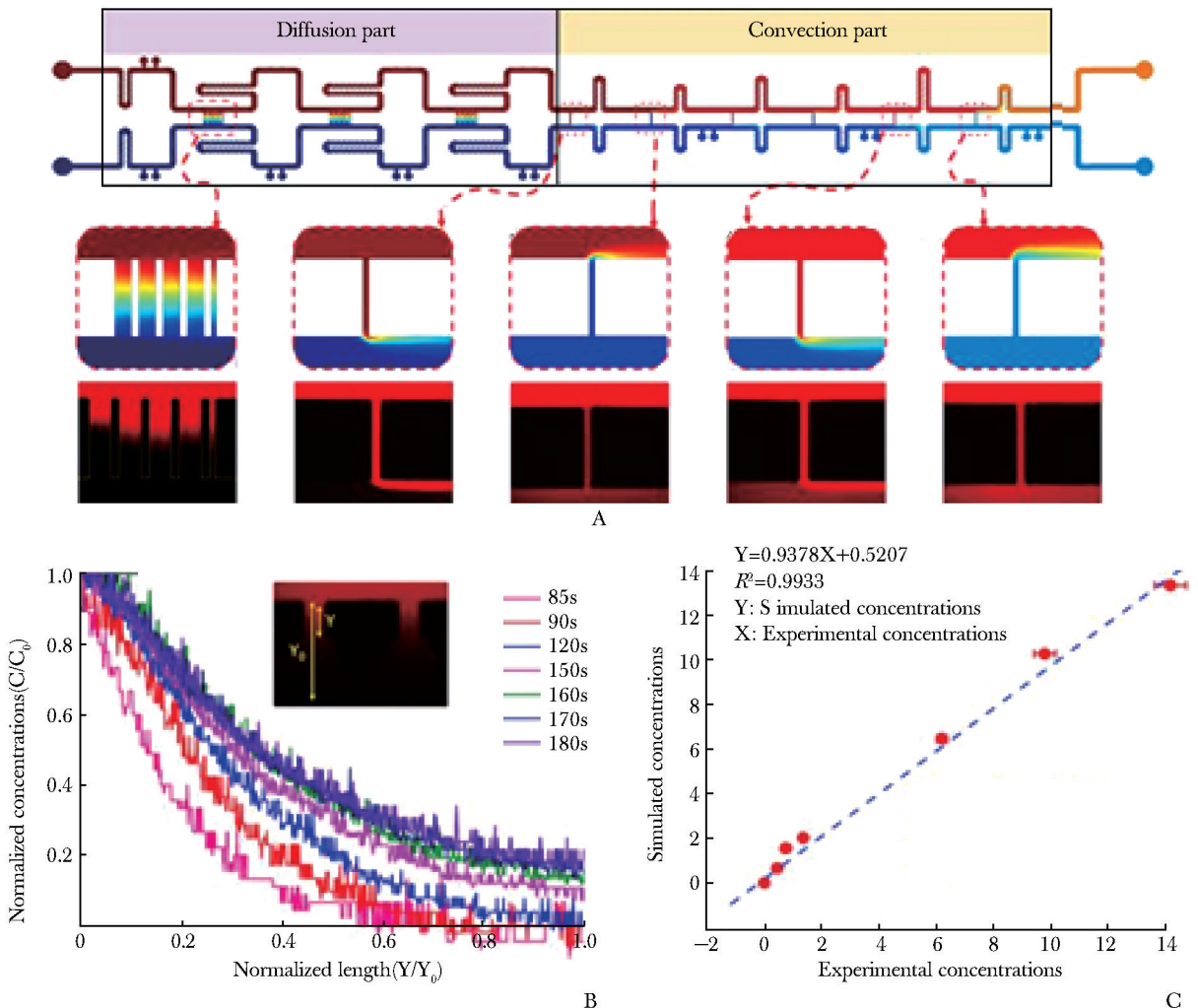


图4 对流混合微流体设计示意图  
 Fig. 4 Schematic diagram of convective mixing microfluidic design

携带特定的耐药基因。核酸扩增技术 (nucleic acid amplification technology, NAAT) 可针对部分难培养或无法通过常规方法进行 AST 检测的病原体 (如博德特菌、军团菌、支原体、衣原体、淋病奈瑟菌等), 检测特定的耐药基因, 但无法提供 MIC 值和应使用的抗菌药物。

定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 可辅助评估暴露于不同抗菌药物后耐药基因的表达水平, 但成本远高于传统 AST。Nguyen 等<sup>[22]</sup>研发的测试板卡可直接检测血液中革兰阳性及革兰阴性病原体的 13 个耐药基因, 扩增产物与超顺磁性粒子结合的 DNA 探针杂交后可通过磁共振进行检测。实时 qPCR 或数字 PCR 熔解曲线分析可用于细菌培养, 通过机器学习算法在约 6.5 h 内获得大肠埃希菌、粪肠球菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌鉴定结果和抗菌药物敏感谱<sup>[23]</sup>。

此外, 宏基因组测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 技术可用于感染性疾病的病原体检测, 所获序列也可用于比对检出抗菌药物耐药基因并预测 AMR。该技术可全面分析经培养所获菌株的耐药基因, 而对于未经培养的临床标本 (如呼吸道、无菌体液) 而言, 由于病原菌数量不足, 无法采用该技术进行检测。为解决上述不足, Serpa 等<sup>[24]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术靶向富集改良 mNGS 技术, 并将其用于下呼吸道样本检测和筛选病原体可能的耐药基因, 结果发现, 与传统 AST 相比, 改良 mNGS 技术预测 AMR 的性能取决于病原体、抗菌药物和测序的核酸类型, RNA+DNA mNGS 技术检测革兰阳性菌和革兰阴性菌的灵敏度分别为 70%、100%, 特异度分别为 95%、64%。另有研究表明, 在下呼吸道感染中采用 mNGS 预测 AMR 的结果与传统 AST 基本一致, 但仅检出与细菌对  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物产生耐药性相关的基因<sup>[25]</sup>。由于 mNGS 技术直接用于样本耐药检测的成本较高, 因此相关研究结果较少, 未来仍有待进一步研究。

#### 4 基于免疫学方法的 AST 检测

目前少数免疫学相关技术可用于抗菌药物耐药蛋白检测, 如采用侧向免疫层析法检测 CPE。Mendez-Sotelo 等<sup>[26]</sup>对 4 家医院的 84 株耐碳青霉烯类肠杆菌和铜绿假单胞菌的临床分离株采用微量肉汤稀释法确定抗菌药物耐药性, 并比较 NG Test CARBA 5 对上述 2 种菌株的检测情况, 结果显示 NG Test CARBA 5 仅对耐碳青霉烯类肠杆菌显示出高灵敏度

(98%)、高特异度 (100%) 和高阳性预测值 (100%), 而对铜绿假单胞菌则缺乏灵敏度和特异度。该方法快速且易于使用, 可作为常规检测的补充。Vasilakopoulou 等<sup>[27]</sup>分别采用常规培养、PCR 和 NG Test CARBA 5 对 30 份直肠拭子进行检测, 发现 NG Test CARBA 5 和 PCR 检测结果一致, 均检测出相同的 25 种 CPE (11 种 KPC 型、8 种 VIM 型和 6 种 NDM 型)。与 PCR 相比, NG Test CARBA 5 在不孵育的情况下检测 KPC 型、VIM 型和 NDM 型的灵敏度为 80%, 孵育 1 h、2 h、3 h 后检测灵敏度分别为 88%、92%、100%, 而不孵育和孵育情况下的检测特异度均为 100%。提示 NG Test CARBA 5 可用于直肠拭子中 CPE 的快速检测。目前国内也有可用于检测不同酶型 CPE 的免疫层析法试剂, 但由于很多地区无相关收费标准, 该方法仅用于科研而较少应用于临床。

#### 5 基于流式细胞术的 AST 检测

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是一种定量单细胞技术, 具有高精度、快速和多参数测量能力, 该技术可准确、快速、直接检测临床样本中病原体的抗菌药物耐药谱<sup>[28-31]</sup>。近年来, 研究者们致力于开发 FCM 相关产品用于直接检测临床样本以及环境样本 (土壤、水、空气) 中的耐药细菌, 并研究在受人类活动影响的环境中耐药细菌的存在和传播情况。

大部分 FCM 通过使用非特异性荧光染料, 包括核酸染料 (如碘化丙啶、YO-PRO-1、吖啶橙、噻唑橙和 SYTO-9)、膜电位敏感染料 [DiBAC4 (3)] 和酯酶底物 (二乙酸荧光素), 对不同结构和/或功能特征 (如膜完整性、代谢活性和膜电位) 进行分析以评估微生物细胞活力。通过结合荧光染料, 该方法可检测出活细胞和死细胞之间的中间生理状态, 突出微生物种群的固有异质性。诸多基于 FCM 的 AST 检测方法均使用荧光染料评估微孔中暴露于抗菌药物后的病原体生长情况, 此类技术的发展受细菌和抗菌药物之间的相互作用、荧光染料的非特异性结合以及检测异质群体内变化的计算能力限制<sup>[32]</sup>。Silva-Dias 等<sup>[33]</sup>研发出用于阳性血培养物 AST 检测的 FCM 试剂盒, 使用 FCM 和荧光染料可在 2 h 内检测到暴露于一系列抗菌药物后的细菌代谢变化。为避免非特异性染料与细菌的相互作用, Filbrun 等<sup>[30]</sup>开发了一种无标记 FCM 检测方法, 可直接从阳性血培养物中快速评估细菌对抗菌药物敏感性, 在血培养阳性后 5 h 内可确定 90% 的抗菌药物敏感性。Mulrone 等<sup>[31]</sup>报道

了一种基于声学增强流式细胞术 (acoustic-enhanced flow cytometry, AFC) 快速检测严重感染的方法, 在腹膜透析相关腹膜炎患者中对其有效性进行验证, 通过进一步评估暴露于抗菌药物后的颗粒大小和结构变化, 有效检测抗菌药物敏感性, 检测结果与传统 AST 一致, 在样本到达后数小时内即可获得结果。

Milobedzka 等<sup>[34]</sup> 研究发现, 用于监测废水环境中耐药基因的不同 FCM 方法对耐药基因多样性和丰度的评估不足, 无法提供与人类健康直接或间接相关的风险信息。另有研究显示, 与平板计数相比, FCM 检测的优点是快速检测活的非培养细胞, 但并未发现二者对接合子丰度的检测结果存在差异<sup>[35]</sup>。

FCM 可与其他技术 (如透射电子显微镜、RT-qPCR 和 RNA-seq 技术) 联用监测抗菌药物耐药性, 用于评估杀菌剂暴露对 AMR 传播的影响。研究显示, 接合转移的频率与百菌清、噬菌酯和多菌灵暴露浓度增加相关<sup>[36]</sup>, 这表明农药对 AMR 传播发挥潜在影响。

## 6 其他 AST 快速检测方法

赖丽莎等<sup>[37]</sup> 利用 AIE 荧光探针 6PD-DPAN 结合细菌聚集发光, 荧光强度可体现细菌数量这一原理, 成功构建了一种基于 AIE 技术的细菌 AST 检测方法, 可在 5 h 内取得满意结果, 该方法与微量肉汤稀释法相比, 基本一致性为 100%, 分类一致性为 96.7%, 未出现极重大误差和重大误差。

另可根据三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 存在与否, 检测样品中活细胞或死细胞数量。具有充足 ATP 的活细胞中荧光素与荧光素酶间的化学反应会产生生物发光, 而在非活细胞或死细胞中则不存在这一现象。耐药菌株在抗菌药物存在下生长时, 可产生生物发光, 而易感菌株则不存在这一现象, 因此可使用光度计对释放的光子进行测量, 通过 ATP 水平反映细菌生长情况, 较微量肉汤稀释法通过浊度反映更具优势。Ishimaru 等<sup>[38]</sup> 开发了一种基于 ATP 生物发光原理的微生物检测系统, 可在 1 h 内定量检测微生物 ATP, 结果与传统 AST 一致。

此外, 微生物学自动化系统也取得相应进展, 可加速和简化 AST 检测。机器学习可将患者入院相关信息与抗菌药物处方和细菌分离株的药物敏感性试验结果相关联, 通过大数据分析和模型训练, 从抗菌药物使用和培养结果、入院情况和患者特征方面, 准确预测药物耐药性, 从而减少不合理的抗菌药物使

用<sup>[39]</sup>, 为个体化治疗提供新思路。正确选择敏感性匹配的抗菌药物治疗可降低感染复发率, 但可能增加另一种耐药细菌感染的发生率。有研究发现, 采用机器学习模型结合全人群的统计学数据和患者的个人病史提出抗菌药物使用建议, 可降低因治疗某种病原体而引起其他耐药病原体感染的风险<sup>[40]</sup>。

## 7 小结与展望

基于 MALDI-TOF MS 检测抗菌药物降解产物、基于分子生物学技术检测耐药基因、通过细菌基因组测序检测特定耐药基因等方法均存在检测耐药相关基因并不一定与表型耐药相关的问题, 这可能会导致检测结果假阳性或 ME, 且无法提供 MIC 值, 而这对于个体化治疗非常重要。基于 FCM 的 AST 检测获得的结果与传统 AST 较一致, 但仍处于研究阶段, 尚不适用于微生物实验室的常规检测。而 NG Test CARBA 5 可用于常规实验室检测, 帮助危重患者更早筛查是否存在耐碳青霉烯类肠杆菌感染。此外, 微流控芯片技术可实现快速检测, 且与微量肉汤稀释法的检测结果有较高一致性, 未来可进一步改进标准化算法和降低成本, 或可成为最有潜力的替代方法。

尽管新型 AST 方法取得了诸多研究进展, 但仍面临一些挑战, 如标准化、实验复杂性和成本等问题。未来仍需进一步优化, 使其操作更快速、简便, 实现自动化、智能化, 以便在临床常规实验室中推广。

**作者贡献:** 赵颖负责文献检索和论文撰写; 徐英春负责论文选题设计和论文修订。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Baquero F. Threats of antibiotic resistance: an obliged reappraisal [J]. *Int Microbiol*, 2021, 24 (4): 499-506.
- [2] Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence [J]. *J Mol Evol*, 2020, 88 (1): 26-40.
- [3] Lau A F, Wang H H, Weingarten R A, et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52 (8): 2804-2812.
- [4] Gaibani P, Galea A, Fagioni M, et al. Evaluation of matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54 (10): 2609-2613.
- [5] Gaibani P, Ambretti S, Tamburini M V, et al. Clinical application of Bruker Biotyper MALDI-TOF/MS system for real-time identification of KPC production in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018, 12: 169-170.
- [6] Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49 (9): 3321-3324.
- [7] Hrabák J, Walková R, Studentová V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49 (9): 3222-3227.
- [8] Rotova V, Papagiannitsis C C, Skalova A, et al. Comparison of imipenem and meropenem antibiotics for the MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity [J]. *J Microbiol Methods*, 2017, 137: 30-33.
- [9] Oho M, Funashima Y, Nagasawa Z, et al. Rapid detection method of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS with imipenem/cilastatin (KB) disc and zinc sulfate solution [J]. *J Infect Chemother*, 2021, 27 (2): 205-210.
- [10] 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]. *Int J Med Microbiol*, 2014, 304 (8): 1018-1023.
- [11] Burckhardt I, Zimmermann S. Susceptibility testing of bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1744.
- [12] Paskova V, Chudejova K, Sramkova A, et al. Insufficient repeatability and reproducibility of MALDI-TOF MS-based identification of MRSA [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2020, 65 (5): 895-900.
- [13] Griffin P M, Price G R, Schooneveldt J M, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50 (9): 2918-2931.
- [14] Candela A, Arroyo M J, Sánchez-Molleda Á, et al. Rapid and reproducible MALDI-TOF-based method for the detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* using classifying algorithms [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12 (2): 328.
- [15] 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]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24 (7): 738-743.
- [16] Barth P O, Volpato F C Z, Moreira N K, et al. Evaluation of a rapid susceptibility test of polymyxin B by MALDI-TOF [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1075650.
- [17] Larson E A, Rensner J J, Larsen K R, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing by deuterium labeling of bacterial lipids in on-target microdroplet cultures [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2022, 33 (7): 1221-1228.
- [18] Qin N, Zhao P, Ho E A, et al. Microfluidic technology for antibacterial resistance study and antibiotic susceptibility testing: review and perspective [J]. *ACS Sens*, 2021, 6 (1): 3-21.
- [19] Nguyen AV, Azizi M, Yaghoobi M, et al. Diffusion-convection hybrid microfluidic platform for rapid antibiotic susceptibility testing [J]. *Anal Chem*, 2021, 93 (14): 5789-5796.
- [20] Li S J, Wan C, Wang B F, et al. Handfuge microfluidic for on-site antibiotic susceptibility testing [J]. *Anal Chem*, 2023, 95 (14): 6145-6155.
- [21] Mizoguchi M, Matsumoto Y, Saito R, et al. Direct antibiotic susceptibility testing of blood cultures of gram-negative bacilli using the Drug Susceptibility Testing Microfluidic (DSTM) device [J]. *J Infect Chemother*, 2020, 26 (6): 554-562.
- [22] Nguyen M H, Clancy C J, Pasculle A W, et al. Performance of the T2Bacteria panel for diagnosing bloodstream infections: a diagnostic accuracy study [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170 (12): 845-852.
- [23] Athamanolap P, Hsieh K, Chen L B, et al. Integrated bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing using PCR and high-resolution melt [J]. *Anal Chem*, 2017, 89 (21): 11529-11536.
- [24] Serpa P H, Deng X D, Abdelghany M, et al. Metagenomic prediction of antimicrobial resistance in critically ill patients with lower respiratory tract infections [J]. *Genome Med*, 2022, 14 (1): 74.
- [25] Liu H B, Zhang Y, Yang J, et al. Application of mNGS in the etiological analysis of lower respiratory tract infections and the prediction of drug resistance [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10 (1): e0250221.
- [26] Mendez-Sotelo B J, López-Jácome L E, Colín-Castro C A, et al. Comparison of lateral flow immunochromatography and phenotypic assays to PCR for the detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria, a multicenter experience in Mexico [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12 (1): 96.

- [27] Vasilakopoulou A, Karakosta P, Vourli S, et al. Detection of KPC, NDM and VIM-producing organisms directly from rectal swabs by a multiplex lateral flow immunoassay [J]. *Microorganisms*, 2021, 9 (5): 942.
- [28] Inglis T J J, Paton T F, Koczyk M K, et al. Same-day antimicrobial susceptibility test using acoustic-enhanced flow cytometry visualized with supervised machine learning [J]. *J Med Microbiol*, 2020, 69 (5): 657-669.
- [29] Jindal S, Thampy H, Day P J R, et al. Very rapid flow cytometric assessment of antimicrobial susceptibility during the apparent lag phase of microbial (re) growth [J]. *Microbiology (Reading)*, 2019, 165 (4): 439-454.
- [30] Filbrun A B, Richardson J C, Khanal P C, et al. Rapid, label-free antibiotic susceptibility determined directly from positive blood culture [J]. *Cytometry A*, 2022, 101 (7): 564-576.
- [31] Mulrone K, Koczyk M, Carson C, et al. Same-day confirmation of infection and antimicrobial susceptibility profiling using flow cytometry [J]. *EBioMedicine*, 2022, 82: 104145.
- [32] Waagsbø B, Stuve N, Afset J E, et al. High levels of discordant antimicrobial therapy in hospital-acquired bloodstream infections is associated with increased mortality in an intensive care, low antimicrobial resistance setting [J]. *Infect Dis (Lond)*, 2022, 54 (10): 738-747.
- [33] Silva-Dias A, Pérez-Viso B, Martins-Oliveira I, et al. Evaluation of FASTinov ultrarapid flow cytometry antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures [J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59 (10): e0054421.
- [34] Miłobedzka A, Ferreira C, Vaz-Moreira I, et al. Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater environments; the challenges of filling a gap in the one-health cycle [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 424 (Pt C): 127407.
- [35] Macedo G, Olesen A K, Maccario L, et al. Horizontal gene transfer of an IncP1 plasmid to soil bacterial community introduced by *Escherichia coli* through manure amendment in soil microcosms [J]. *Environ Sci Technol*, 2022, 56 (16): 11398-11408.
- [36] Zhang H P, Song J J, Zheng Z R, et al. Fungicide exposure accelerated horizontal transfer of antibiotic resistance genes via plasmid-mediated conjugation [J]. *Water Res*, 2023, 233: 119789.
- [37] 赖丽莎, 邓任堂, 张露, 等. 基于 AIE 技术构建快速细菌药物敏感性试验新方法 [J]. *中华检验医学杂志*, 2023, 46 (11): 1186-1192.
- Lai L S, Deng R T, Zhang L, et al. Rapid detection of the bacterial drug susceptibility testing based on AIE technology [J]. *Chin J Lab Med*, 2023, 46 (11): 1186-1192.
- [38] Ishimaru M, Noda H, Matsumoto E, et al. Comparative study of rapid ATP bioluminescence assay and conventional plate count method for development of rapid disinfecting activity test [J]. *Luminescence*, 2021, 36 (3): 826-833.
- [39] Cavallaro M, Moran E, Collyer B, et al. Informing antimicrobial stewardship with explainable AI [J]. *PLoS Digit Health*, 2023, 2 (1): e0000162.
- [40] Lugagne J B, Dunlop M J. Anticipating antibiotic resistance [J]. *Science*, 2022, 375 (6583): 818-819.

(收稿: 2024-01-02 录用: 2024-02-06)

(本文编辑: 李慧文)