

细菌耐药性及耐药基因检测技术和方法的研究进展

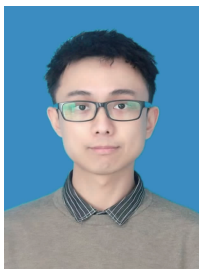
姜桂来, 郁舒阳, 俞莞茜, 周宇轩, 周哲敏, 李 恒

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号:82202465)

作者单位: 215123 江苏, 苏州大学苏州医学院巴斯德学院

作者简介: 姜桂来, 在读硕士研究生, 研究方向: 病原生物学。E-mail: gjjiang.suda@gmail.com

通信作者: 李 恒, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 研究方向: 病原微生物抗生素耐药性及生物信息学研究。E-mail: hli@suda.edu.cn



李 恒, 讲师, 哲学博士(细菌感染与免疫方向), 博士毕业于丹麦哥本哈根大学医学院。硕士研究生导师, 苏州大学优秀青年学者, 苏州市青年科技人才托举工程培养对象。长期从事病原微生物抗生素耐药性及生物信息学研究, 重点研究临床耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的传播和进化。主要学术贡献: 构建了华东地区 MRSA 的核心基因组分型(core genome multilocus sequence typing, cgMLST)及爆发溯源体系; 通过病理学和生物信息学交叉研究, 解析 MRSA 生物被膜的三维立体模型和空间结构; 应用宏基因组测序技术和全基因组测序技术, 构建苏州地区医源性 MRSA 的基因组数据集, 解

析苏州地区 MRSA 基因组和医源性感染的关系。担任 *Frontiers in Microbiology*、*Microorganism*、*Frontiers in Public Health* 等 SCI 期刊匿名审稿人。主持国家自然科学基金项目 1 项, 江苏省级基金项目 1 项, 苏州市基金项目 1 项。

[摘要] 抗生素过度使用加速了细菌耐药性的发生发展。当前, 细菌耐药性已成为威胁全球公共卫生健康的重要因素之一。细菌耐药性检测技术包括以经典方法为主的肉汤稀释法、琼脂稀释法、纸片扩散法和浓度梯度法等。随后出现了一系列物理、化学方法和分子生物学检测技术, 包括微流控图像检测、飞行时间质谱等。随着高通量测序技术的发展, 各类细菌耐药基因数据库的开发和完善, 全基因组测序、宏基因组测序和微生物单细胞转录组测序等新技术已逐步应用于细菌耐药性检测领域。该文将细菌耐药性检测方法分为传统经典方法、分子生物学技术和高通量测序技术三大类, 阐述各类技术方法的原理、优点和局限性。回顾和反思当前细菌耐药性检测的技术和方法, 对于规范抗生素的使用至关重要, 也为临床超级耐药菌的预防和监测提供新的技术支持。

[关键词] 细菌耐药性; 经典方法; 分子生物学技术; 高通量测序

[中图分类号] R 446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)10-0907-07

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.10.04

Research progress in the detection techniques and methods of bacterial drug resistance and drug-resistant genes

JIANG Gui-lai, YU Shu-yang, YU Wan-qian, et al. Pasteurien College, Suzhou Medical College of Soochow University, Jiangsu 215123, China

[Abstract] The overuse of antibiotics accelerates the development of bacterial drug resistance. At present, bacterial drug resistance has become one of the important factors threatening global public health. The detection techniques of bacterial drug resistance include classical methods of broth dilution, agar dilution, disk diffusion and concentration gradient. Subsequently, a series of physical-chemical methods and molecular biology detection techniques emerge, including microfluidic image detection, time-of-flight mass spectrometry and other techniques. With the update of high-throughput sequencing technology, and the development and improvement of various bacterial drug-resistant genes databases, new technologies have been gradually applied in the field of bacterial drug resistance detection such as whole genome sequencing, metagenomic sequencing and microbial single-cell transcriptome sequencing. In this paper, the detection methods of bacterial drug resistance are divided into three categories: traditional classical methods, molecular biology techniques

and high-throughput sequencing techniques, and the principles, advantages, and limitations of the technologies mentioned above are described. Reviewing and reflecting on the current techniques and methods of bacterial drug resistance detection is essential for standardizing the use of antibiotics and also for providing new technical support for the prevention and monitoring of clinical super-resistant bacteria.

[Key words] Bacterial drug resistance; Classical method; Molecular biological technology; High-throughput sequencing

抗生素的过度使用加速了细菌耐药性的发展。2017年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布对人类健康最具威胁的12种“超级细菌”,表明细菌抗生素耐药性已成为全球公共卫生问题^[1]。2022年Lancet发布的最新研究指出,2019年全球有127万例患者死亡和抗生素耐药直接相关;约495万例因耐药菌感染病逝^[2]。细菌耐药性的出现和蔓延,是当今人类社会三大死亡原因之一^[3]。因此,对于细菌耐药性的监测刻不容缓。最近研究表明,在中国爆发的多重耐药细菌中,以沙门菌为代表的肠杆菌广泛携带blaOXA-1、blaTEM-1和 β -内酰胺酶等细菌耐药性基因^[4]。此外,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、产生超广谱 β -内酰胺酶的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌以及鲍曼不动杆菌的多重耐药性也是社区和医院获得性感染的最重要原因之一^[5-8]。根据我国2014至2019年及2022上半年的细菌耐药性监测报告(www.chinets.com)显示,耐药性大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌为我国临床主要耐药菌^[9]。其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检出率虽有下降趋势,但仍然在30%或以上;碳青霉烯类耐药革兰阴性菌的检出率仍保持高位,监测显示第三代头孢菌素耐药肠杆菌目细菌已流行传播。多重耐药细菌的出现和快速扩散正在将人类逐步推向“后抗生素时代”。鉴于此,细菌的耐药性检测、新型细菌耐药性检测技术的开发和应用迫在眉睫。临床上多重耐药细菌的检测中,抗生素敏感性试验(antimicrobial susceptibility testing, AST)是目前较常使用的方法,包括纸片扩散法、琼脂稀释法、肉汤稀释法、浓度梯度法等经典方法。随后出现了物理、化学和分子生物学检测技术,如应用流式细胞仪、质谱仪和拉曼光谱仪等方法推算细菌的耐药性;以及免疫杂交技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术等检测细菌的耐药基因。如今,随着测序技术的迭代更新和生物信息学的发展,高通量测序技术已经广泛应用于细菌耐药检测领域,包括全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)、宏基因组测序(metagenomics sequencing, mNGS)和微生物单细胞转录组测序(microbial-single-cell RNA sequencing, MscRNA-seq)等技术。基于上述检测技术和方

法,本文阐述了各类细菌耐药性及耐药基因检测的原理、优点和局限性,并对经典技术和新技术的关联性及应用场景进行分析,为我国细菌耐药性的预防和监测提供相关技术支持。

1 基于经典方法的细菌耐药性检测

临床对于细菌AST多采用表型检测的方法,按照美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)或者欧洲药敏试验联合委员会(European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing, EUCAST)颁布的《抗菌药物敏感性试验执行标准》执行。国内外临床和实验室常使用的AST包括纸片扩散法、琼脂稀释法、肉汤稀释法、浓度梯度法等经典方法。此类经典方法检测时间在18~24h,常用于临床耐药菌株的表型筛查。其优点在于便捷、灵敏、可重复、成本低。但此类方法仅限于细菌耐药性的表型检测,无法检测耐药基因。

1.1 肉汤稀释法 肉汤稀释法是细菌耐药性检测的传统方法。肉汤稀释法一般包括肉汤微量稀释法和肉汤宏量稀释法,前者96孔微量板中抗菌药物稀释液体积通常是每孔0.1ml,后者每个含不同浓度抗菌药物的测试管中肉汤体积为 ≥ 1 ml(通常为2ml)。微量肉汤稀释法是目前已视为药敏试验的国际参考方法(CLSI),其主要优点在于抗菌药物敏感性试验的全球标准化,接种和判读的过程简单,且可同时单株菌株进行多种抗菌药物的测试。但其缺点在于最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值的误差较大,存在一定的技术可变性,对操作者实验技能和无菌意识要求较高。而肉汤宏量稀释法是一种易于标准化、可靠的标准参考方法,对以研究为目的或测试一种药物对一株细菌的MIC值的判读具有较大的价值和意义。

1.2 琼脂稀释法 标准化的琼脂稀释法是将一种抗菌药物与琼脂培养基混合,每块平板中含有不同浓度的药物,再将接种物单独或者同时点种在琼脂表面,培养48h后计数菌落形成单位(colony forming unit, CFU)。此外还可以接种到显色琼脂培养基,针对敏感菌株在18~24h内出现的颜色反应,更快地检测和筛查相关耐药细菌。此类方法适用于多细菌的培养物,

可用来区分菌株和物种^[10]。琼脂稀释法的优点是操作简单、成本低,其测定的 MIC 值稳定、可靠。

1.3 纸片扩散法 纸片扩散法也称为 Kirby-Bauer(K-B) 抗生素试验。药敏片中的抗生素在琼脂中呈放射状扩散,药物浓度随离培养基距离的增加呈对数下降,并在培养基周围形成圆形生长抑制区,其直径与 MIC 呈反比。区域的直径显示了分离物的敏感性和药物通过琼脂培养基的扩散速率^[11]。这种方法只能定性检测细菌对抗生素的敏感性,无法得到 MIC 值。但是该方法简便、可重复,无需昂贵的设备支持。

1.4 浓度梯度法 Epsilometer testing 即 E-test,是检测细菌对于某种抗生素的耐药性的浓度梯度方法。E-test 法使用一面是固定有一系列预先制备的、浓度呈连续指数增长稀释的抗菌药物;另一面是有浓度刻度的 MIC 值的塑料条。将条带放置在预先接种的琼脂平板上,过夜培养,即可出现椭圆形抑制区,其抑制区与条带边缘之间的交点就是 MIC。由于 E-test 条带上的抗生素浓度梯度稳定,所以该方法简单、灵敏、准确,可以读取具体的 MIC 值,但此方法较上述传统方法使用较少^[12]。

2 基于理化性质及分子生物学技术的细菌耐药性及耐药基因检测

随着物理、化学和分子生物学技术的发展,出现了各类新型细菌耐药性检测技术,如流式细胞仪、质谱仪和拉曼光谱仪等技术手段检测细菌的耐药性;或应用免疫杂交技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术等检测细菌的耐药基因。此类基于细菌理化性质和分子生物学技术的检测方法,检测时间在 2~10 h,其省时快速、特异性强、灵敏度高的特点,适用于病原体临床现场快速诊断。但相较于传统方法,无法提供 MIC 值。部分技术如拉曼光谱尚未在临床环境中得到充分探索,基础研究和临床应用存在一定差距。

2.1 基于培养的微流控图像检测技术 微流控技术是一种以在微米尺度空间对流体进行样品处理、反应、检测等复杂操作为主要特征的科学技术。在微流控检测方面,Choi 等^[13] 研究人员用琼脂糖构建了一个微流体琼脂糖通道,通过显微镜观察和追踪通道内单细菌在抗生素作用下的生长情况和表型,经图像对比确定细菌耐药性和 MIC 值。微流控图像检测技术在单细胞水平上将细菌限制在很小的体积中,可以最大限度地减少交叉污染,潜在地加速生化反应并使分离条件下标志物的浓度迅速增加。该技术的优点在于所需样本量少、灵敏度高,并提供自动化和高通量分析^[14]。

2.2 基于飞行时间质谱技术的检测方法 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)是当下物种鉴定较流行的方法。而 MALDI Biotyper(MBT)是一种基于 MALDI-TOF MS 的微生物快速鉴定系统,可在几分钟内对微生物进行无偏鉴定。MBT 耐药性检测包括抗菌药物耐药性的选择性检测(MBT-STAR)、 β -内酰胺酶试验(MBT-STAR-BL)、抗菌药物敏感性快速检测(MBT-ASTRA)和耐药性检测(MBT-RESIST)等方法。其中,MBT-STAR-BL 原理是通过检测 β -内酰胺类抗生素被产酶菌株水解而引起的分子量变化从而确定菌株耐药情况。配备 MBT-STAR-BL 模块的 MBT 系统能够同时快速鉴定细菌种类以及血液培养菌株的 β -内酰胺酶介导的耐药性^[15];而 MBT-ASTRA 通过计算和生长在含有抗生素或不含抗生素的细菌光谱曲线下面积(area under the curve, AUC)并比较 AUC 大小以评估细菌生长,可在几个小时内检测到敏感菌株和耐药菌株之间的差异。最近一项研究优化了 MBT-ASTRA,已成功应用于白念珠菌和光滑念珠菌等酵母菌的敏感性检测^[16]。MBT-RESIST 基于非放射性同位素标记介质,使细菌在含有¹²C或者¹³C碳组分的培养基中平行生长,并将含抗生素同位素标记的培养基中生长的细菌与在无抗生素标记的培养液中生长的细菌质谱结果进行比较。耐药细菌可以在含有¹³C的抗生素中生长,导致质谱中峰向更高的 m/z 移动,进而通过峰位的移动来判定耐药性。Sparbier 等^[17-18] 通过¹³C标记的赖氨酸培养基来测试金黄色葡萄球菌对苯唑西林和头孢西丁的耐药性。MBT-RESIST 和 MBT-ASTRA 理论上应用于所有种类的抗生素和微生物,但仍存在微生物培养时间较长、需要摸索抗生素使用条件等缺点,需要进一步优化。

2.3 其他光谱学图像检测法 其他光谱学检测方法包括了表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)、拉曼光谱等物理化学技术方法。其中拉曼光谱通过特定的光谱模式识别,可以快速、高效地识别细菌细胞和抗生素耐药性。但通常临床样品中细菌浓度低,所以对临床细菌病原体进行拉曼光谱的研究需要在琼脂平板中培养^[19]。相反的,表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)可以促进细菌病原体的无培养鉴定。最近一项研究中将 SERS 作为一种无创且无标记的方法,通过分析将碳青霉烯类敏感肺炎克雷伯菌(carbapenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae*, CSKP)菌株与碳青霉

烯类耐药性肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)菌株区分开来,并成功地预测肺炎克雷伯菌的碳青霉烯类敏感性和耐药性^[20]。虽然拉曼光谱具有低成本、无标记和无损的特性,且具有区分细菌潜在感染的潜力,但是该技术尚未在临床环境中得到充分探索,基础研究和临床应用之间仍然存在差距。

2.4 其他物理、化学检测法 主要包括流式细胞仪、耐药菌微量动量(micromotion)和微量热法(microcalorimetry)等检测方法。其中流式细胞仪是一种革命性的工具,可以从单个细菌细胞角度提供相关抗生素的耐药性的检测。最近一项研究将定量流式细胞仪和荧光插层仪相结合,在1 h内可以检测到临床上重要的肺炎链球菌耐药性,为进行快速AST提供了一种新途径^[21]。但是此类方法的局限性在于:基于流式细胞仪的AST研究集中于光散射特性、膜电位和膜渗透性的变化,这些参数是细菌活力的关键指标,但此类参数数据复杂、暂无临床标准参考值,也缺乏系统的临床研究来论证准确性^[22]。

2.5 基于荧光探针技术的检测方法 此类方法基于DNA和RNA探针杂交技术,通过探针携带的荧光标签检测耐药基因,包括经典的荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)。FISH是一种以定量方式可视化目标DNA的高度特异性方法,它根据碱基互补配对原则,通过特殊手段使带有荧光物质的探针与目标DNA接合,通过荧光显微镜直接观察目标DNA所在位置。目前基于FISH技术已经开发的检测包括XpressFish、QuickFish、RASER-FISH、DVC-FISH等^[23-25]。此外,研究人员针对活细菌细胞开发了rRNA探针检测,rRNA探针技术可以更好地检测活跃细胞的代谢、生长和耐药性转录表达。美国Broad研究所开发的GoPhAST-R技术,通过RNA检测以94%~99%的准确率对基因型和表型耐药的细菌菌株进行分类,并且在数小时内确定关键抗生素耐药标记^[26]。上述基于荧光探针技术检测耐药基因具有可视化、特异性强等优点,但是此类探针无法检出新的耐药基因,对于具有突变位点的耐药基因的检测准确率也显著降低。

2.6 基于核酸扩增技术的检测方法 基于核酸扩增技术的检测方法包括聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)和环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等方法。其中以LAMP最为简洁且应用广泛^[27]。与常规PCR相比,LAMP

无需模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。在等温(60~65℃)条件下,进行核酸扩增1 h,即能达到检测耐药基因的目的。最近研究表明,LAMP已成功用于黏菌素耐药基因 $mcr-3$ 、 β -内酰胺酶基因 bla_{AFM-1} 等检测^[28-29]。此外,研究人员基于LAMP还开发出smaRT-LAMP、RT-LAMP等技术和产品^[30-31]。综上所述,基于核酸扩增的检测技术步骤简单、省时且经济,适用于临床细菌耐药基因的快速诊断和筛查。

2.7 基因芯片技术检测 基因芯片又称为DNA微阵列,是一种同时将大量探针固定于固相表面,核酸样本经荧光标记或扩增后,利用核酸杂交的特异性对大批量未知样品进行检测、分析的方法。2000年Perreten团队开发出一种可以在1 h内同时检测革兰阳性菌中90多种耐药基因的基因芯片^[32]。目前,基因芯片技术发展较为成熟,基于此类技术方法可以快速筛查临床环境中病原菌及耐药菌,从而为抗生素的选择和使用提供参考。基因芯片技术具有高通量筛选耐药基因的潜力,具有同时检测数千个基因的特征优势,但其局限性在于表型和基因型标记之间的相关性差、无MIC值、无法检测新的或非特征性的耐药基因等。

3 基于高通量测序技术的细菌耐药基因检测

随着测序技术的迭代更新和生物信息学的发展,高通量测序技术已经广泛应用于细菌耐药检测领域,包括WGS、mNGS和MscRNA-seq等技术。此类技术检测时间通常在14~20 h,能够提供细菌的耐药基因型,发现新的耐药基因,以及获得单个细菌细胞的耐药基因转录情况。但此类技术实验周期长,成本高,步骤复杂,缺乏标准化和自动化的分析流程,目前仅局限于临床复杂疾病的病原体诊断筛查。

3.1 WGS WGS是指获得一个物种全基因序列的过程。在细菌耐药性检测领域,WGS可以提供细菌全面的耐药基因谱,并通过耐药基因预测其耐药表型,揭示相关耐药机制^[33]。多项研究对WGS和表型AST检测细菌耐药性进行对比,结果呈高度一致性^[34-35],证明了通过WGS预测细菌耐药性的准确性。此外,通过WGS鉴定耐药细菌基因组中染色体和质粒编码的抗生素耐药基因,有助于了解耐药基因的移动和传播背后的机制^[30],还可以对耐药菌株的爆发流行进行监控^[36]。但是此类技术检测周期较长,价格较贵,且样本需要纯细菌培养物,对临床细菌的鉴定分离要求较高。

3.2 mNGS mNGS是通过高通量测序技术检测特定环境样品中微生物群体的基因组信息。通过生物

信息学分析方法进行病原体鉴定、微生物组分析、宿主相互作用分析和细菌耐药性预测。在临床细菌耐药基因检测中, mNGS 能诊断未知病原体的感染, 并挖掘其耐药基因, 为临床合理使用抗生素提供参考。基于 mNGS 技术, Wang 等^[37] 在 1 例免疫功能低下的重症肺炎患者的培养阴性肺组织样本中鉴定出肺炎克雷伯菌, 并进一步鉴定出 *bla*_{SHV-12}、*bla*_{KPC-2}、*bla*_{TEM-1}、*bla*_{CTX-M-65} 等抗性基因。此外, mNGS 还可用于新型耐药基因的检测。Torres-Cortés 等^[38] 通过 mNGS 技术, 从土壤样本中确定了 11 种新的抗生素耐药基因, 包括新型氨基西林耐药基因、庆大霉素耐药基因、氯霉素耐药基因和甲氧苄啶耐药基因等。mNGS 的优点在于直接从原始样本进行无偏检测, 在对现有耐药基因筛查的基础上挖掘新型耐药基因。但是该技术成本高, 步骤复杂, 缺乏标准化和自动化的分析流程, 对细菌耐药基因的大规模筛查较为困难。

3.3 MscRNA-seq 单细胞转录组测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 是指对单个细胞的转录组进行测序, 从而获得转录组学信息, 揭示细胞群差异和细胞进化关系^[39]。MscRNA-seq 是近年最新的检测技术, 其原理是将 scRNA-seq 应用于单个微生物, 如细菌细胞的转录组测序中。但是 MscRNA-seq 的发展受限于微生物 mRNA 含量低、部分细菌独特的细胞壁和细胞膜以及 mRNA 无多聚腺苷酸化等原因, 技术壁垒高, 发展较为困难。美国华盛顿大学 Georg Seelig 研究团队利用基于分割池连接的转录组测序 (split-pool

ligation-based transcriptome sequencing, SPLiT-seq) 技术对细菌进行了微生物单细胞转录组 microSPLiT 测序 (microbial split-pool ligation transcriptomics), 首次通过低成本、高通量的方法成功进行细菌单细胞的转录组测序分析工作^[40]。microSPLiT 通过组合条形码标记 RNA 的细菌细胞来源, 一次实验可分析数以万计的细菌细胞。随着科学技术的发展, MscRNA-seq 技术克服了 mRNA 含量低、细胞多样性和细胞壁结构复杂等困难, 通过此类技术挖掘临床超级细菌中耐药基因的转录组, 理解耐药基因的表达、转移等问题, 对进一步检测和筛查临床多重耐药性具有重要的应用价值。

4 小结

本文总结了基于传统经典方法、分子生物学技术和高通量测序技术的细菌耐药性检测方法, 三种检测方法的比较见表 1。传统细菌耐药性检测方法能提供细菌耐药的表型信息, 但需要长时间的培养和鉴定, 且无法检测耐药基因。以物理、化学和分子生物学方法为基础的新技术, 其细菌耐药性检测周期短、灵敏度高, 但是无法检测未知耐药基因及突变基因。而基于高通量测序的检测技术对经典方法的表型检测进行补充, 可以准确鉴定细菌的耐药基因, 发现新的耐药基因及突变位点。笔者认为在未来细菌耐药性的表型和基因型的综合检测, 对于控制耐药细菌感染及流行至关重要, 也为相关感染性疾病的预防和监测提供新的技术支持。

表 1 细菌耐药性及耐药基因检测技术的比较

检测方法	检测技术	检测时间	表型检测	基因型检测	能否测得 MIC 值	多重耐药性检测	耐药基因突变检测	经济性
传统经典方法	纸片扩散法、琼脂稀释法、肉汤稀释法、浓度梯度法	18 ~ 24 h	√	×	能 (K-B 除外)	否	否	成本较低
分子生物学技术	微流控图像检测技术	4 ~ 10 h	√	×	能	否	否	设备昂贵
	飞行时间质谱技术	2 ~ 4 h	×	×	部分否 (MBT-ASTRA 除外)	否	否	设备昂贵
	光谱学检测法 (SPR、拉曼光谱)	2 ~ 4 h	×	×	否	否	否	设备昂贵
	物理化学检测法 (流式细胞仪等)	2 ~ 4 h	×	×	否	否	否	设备昂贵
	荧光探针技术	2 ~ 4 h	×	√	否	较好	否	成本一般
	核酸扩增技术	2 ~ 4 h	×	√	否	较好	否	成本较低
	基因芯片技术	2 ~ 6 h	×	√	否	较好	否	成本一般
高通量测序技术	WGS	14 ~ 20 h	×	√	否	较好	是	价格较贵
	mNGS	14 ~ 20 h	×	√	否	较好	是	价格昂贵
	MscRNA-seq	14 ~ 20 h	×	√	否	较好	是	价格昂贵

参考文献

- [1] Hofer U. Rise in global antibiotic use[J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(2):63.
- [2] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. Lancet, 2022, 399(10325):629-655.
- [3] Davtyan H, Grigoryan R, Niazyan L, et al. Antimicrobial resistance in a tertiary care hospital in Armenia; 2016-2019[J]. Trop Med Infect Dis, 2021, 6(1):31.
- [4] Xiang Y, Li F, Dong N, et al. Investigation of a salmonellosis outbreak caused by multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium in China [J]. Front Microbiol, 2020, 11:801.
- [5] 周薇, 许世林, 董梅花, 等. 2010-2019年我院血液科细菌感染患者病原菌分布及耐药性的单中心研究[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(11):1106-1111.
- [6] 黎日海, 刘建瑜, 吴甲文. 某院多重耐药菌检出率及耐药性分析[J]. 中国临床新医学, 2016, 9(7):640-644.
- [7] Fanaei V, Validi M, Zamanzad B, et al. Isolation and identification of specific bacteriophages against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli*, extended-spectrum beta-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae*, and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro [J]. FEMS Microbiol Lett, 2021, 368(19):fnab139.
- [8] 黄聪, 王玉沐. 某院 2017~2019 年大肠埃希菌医院感染与社区感染分布及其耐药性分析[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(5):488-492.
- [9] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014-2019 年细菌耐药性监测报告 [J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1):15-30.
- [10] Schumacher A, Vranken T, Malhotra A, et al. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(2):187-208.
- [11] Yalaw ST. Review on antibiotic resistance: resistance mechanisms, methods of detection and its controlling strategies[J]. Biomed J Sci Tech Res, 2020, 24(5):18651-18657.
- [12] Rebrošová K, Šiler M, Samek O, et al. Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):14846.
- [13] Choi J, Jung YG, Kim J, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system [J]. Lab Chip, 2013, 13(2):280-287.
- [14] Zhang K, Qin S, Wu S, et al. Microfluidic systems for rapid antibiotic susceptibility tests (ASTs) at the single-cell level[J]. Chem Sci, 2020, 11(25):6352-6361.
- [15] Lee AWT, Lam JKS, Lam RKW, et al. Comprehensive evaluation of the MBT STAR-BL module for simultaneous bacterial identification and β -lactamase-mediated resistance detection in Gram-negative rods from cultured isolates and positive blood cultures[J]. Front Microbiol, 2018, 9:334.
- [16] Vatanshenassan M, Boekhout T, Lass-Flörl C, et al. Proof of concept for MBT ASTRA, a rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based method to detect caspofungin resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata* [J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9):e00420-18.
- [17] Sparbier K, Lange C, Jung J, et al. MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11):3741-3748.
- [18] Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, et al. Detection of antibiotic-resistance by MALDI-TOF mass spectrometry: an expanding area[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:572909.
- [19] de Siqueira E Oliveira FS, da Silva AM, Pacheco MTT, et al. Biochemical characterization of pathogenic bacterial species using Raman spectroscopy and discrimination model based on selected spectral features[J]. Lasers Med Sci, 2021, 36(2):289-302.
- [20] Zhang P, Fu Y, Zhao H, et al. Dynamic insights into increasing antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* by label-free SERS using a portable Raman spectrometer[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2022, 273:121070.
- [21] Sawada T, Katayama M, Takatani S, et al. Early detection of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by quantitative flow cytometry[J]. Sci Rep, 2021, 11(1):2873.
- [22] Kállai A, Kelemen M, Molnár N, et al. MICy: a novel flow cytometric method for rapid determination of minimal inhibitory concentration [J]. Microbiol Spectr, 2021, 9(3):e0090121.
- [23] Brown JM, De Ornellas S, Parisi E, et al. RASER-FISH: non-denaturing fluorescence in situ hybridization for preservation of three-dimensional interphase chromatin structure[J]. Nat Protoc, 2022, 17(5):1306-1331.
- [24] García-Hernández J, Hernández M, Moreno Y. Combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization (DVC-FISH) as a potential method for identifying viable *Vibrio parahaemolyticus* in oysters and mussels [J]. Foods, 2021, 10(7):1502.
- [25] Salimnia H, Fairfax MR, Lephart P, et al. An international, prospective, multicenter evaluation of the combination of AdvanDx *Staphylococcus* QuickFISH BC with mecA XpressFISH for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from positive blood cultures [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(11):3928-3932.
- [26] Bhattacharyya RP, Bandyopadhyay N, Ma P, et al. Simultaneous detection of genotype and phenotype enables rapid and accurate antibiotic susceptibility determination[J]. Nat Med, 2019, 25(12):1858-1864.
- [27] 顾锦, 郭会, 周围, 等. 环介导等温扩增技术在下呼吸道感染常见病原体检测中的应用[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(1):12-16.
- [28] Liu Z, Guo C, Zhang Y, et al. Rapid and sensitive detection of the colistin resistance gene *mcr-3* by loop-mediated isothermal amplification and visual inspection[J]. Microb Drug Resist, 2021, 27(10):1328-1335.
- [29] Qin Y, Duan X, Peng Y, et al. Rapid detection of a novel B1- β -lactamase gene, blaAFM-1 using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2021, 20(1):80.
- [30] Barnes L, Heithoff DM, Mahan SP, et al. Smartphone-based pathogen diagnosis in urinary sepsis patients[J]. EBioMedicine, 2018, 36:73-82.
- [31] Hewadikaram M, Perera K, Dissanayake K, et al. Development of duplex and multiplex reverse transcription loop mediated isothermal

- amplification(RT-LAMP) assays for clinical diagnosis of SARS-COV-2 in Sri Lanka[J]. *Int J Infect Dis*, 2022,116:S39 – S40.
- [32] Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, et al. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram-positive bacteria[J]. *J Clin Microbiol*, 2005,43(5):2291 – 2302.
- [33] 韩林,蒋玲玉,黄璐,等.高通量测序对脓毒症病原学诊断及病原菌耐药性预测的应用价值[J]. *中国临床新医学*,2020,13(6):642 – 646.
- [34] Kamolwat P, Nonghanphithak D, Chaiprasert A, et al. Diagnostic performance of whole-genome sequencing for identifying drug-resistant TB in Thailand[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2021,25(9):754 – 760.
- [35] Billard-Pomares T, Marin J, Quagliaro P, et al. Use of whole-genome sequencing to explore *Mycobacterium tuberculosis complex* circulating in a hotspot department in France[J]. *Microorganisms*, 2022,10(8):1586.
- [36] Wareth G,Brandt C,Sprague LD,et al. WGS based analysis of acquired antimicrobial resistance in human and non-human *Acinetobacter baumannii* isolates from a German perspective[J]. *BMC Microbiol*, 2021,21(1):210.
- [37] Wang K, Li P, Lin Y, et al. Metagenomic diagnosis for a culture-negative sample from a patient with severe pneumonia by nanopore and next-generation sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020,10:182.
- [38] Torres-Cortés G, Millán V, Ramírez-Saad HC, et al. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples[J]. *Environ Microbiol*, 2011,13(4):1101 – 1114.
- [39] Tang X, Huang Y, Lei J, et al. The single-cell sequencing: new developments and medical applications[J]. *Cell Biosci*, 2019,9:53.
- [40] Kuchina A, Brettner LM, Paleologu L, et al. Microbial single-cell RNA sequencing by split-pool barcoding[J]. *Science*, 2021,371(6531):eaba5257.

[收稿日期 2022 – 10 – 04][本文编辑 吕文娟 余军]

本文引用格式

姜桂来,郁舒阳,俞莞茜,等.细菌耐药性及耐药基因检测技术和方法的研究进展[J]. *中国临床新医学*,2022,15(10):907 – 913.