



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2024.03.004

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2024.03.004

· 综述与讲座 ·

细菌耐药水平的检测及监测

李胜男 倪文涛

【摘要】 细菌耐药是指细菌对抗菌药物的敏感性下降,从而导致抗菌药物对细菌的抗菌作用降低。抗菌药物的过度和不恰当使用加速了细菌耐药的发展,严重威胁着人类健康和公共卫生安全。准确、及时地检测细菌耐药水平对于尽早识别耐药菌株、防止耐药菌株的传播及制定合理治疗方案等具有重要意义。随着测序、质谱技术的发展,细菌耐药检测水平也逐步提高。医疗机构、生态环境中细菌耐药水平监测对抗菌药物合理应用有很重要的参考价值,也是管理部门制定相应政策的重要参考依据。全球、不同国家和地区相继建立了细菌耐药监测网络,为促进抗菌药物合理应用发挥了积极作用。

【关键词】 细菌耐药; 检测; 监测

【中图分类号】 R446.5

【文献标识码】 A

细菌耐药是指细菌对相应抗菌药物的敏感性下降,从而导致抗菌药物对细菌的作用降低。细菌耐药可大致分为固有性耐药和获得性耐药,固有性耐药又称为天然耐药,是由细菌染色体基因决定,如链球菌对氨基糖苷类的天然耐药、铜绿假单胞菌对四环素类天然耐药、大部分肠杆菌科细菌对青霉素 G 天然耐药等。获得性耐药是指细菌通过自身基因突变或表达调控变化、代谢途径发生改变或获得外源性耐药基因等方式,使其不易被杀灭或抑制,是细菌产生耐药的主要原因。WHO 在全球抗菌药物耐药监测报告中指出,细菌耐药已成为人类社会三大死亡原因之一,每年约 70 万人死

于耐药菌感染^[1-2]。抗菌药物的过度使用和滥用不仅加速了细菌耐药的产生和进化,也促进了耐药菌的传播。细菌耐药检测和监测可为临床抗菌药物的合理使用提供可靠的参考依据,避免出现抗菌药物的滥用。本文就目前细菌耐药检测技术及我国细菌耐药监测体系作简要综述。

一、传统的细菌耐药水平检测技术

1. 经典的抗菌素敏感性试验 (AST)

AST 简称药敏试验,是指在体外测定抗菌药物抑制或杀灭微生物的能力,是当前国内、外临床和实验室最常用的细菌耐药水平检测方法,按照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 或欧洲药敏试验联合委员会 (EUCAST) 颁布的《抗菌药物敏感性试验执行标准》执

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81903672)

作者单位:100044 北京,北京大学人民医院呼吸与危重症医学科

通讯作者:倪文涛, E-mail: wentao. qingdao@163. com

[6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. β 内酰胺类抗菌药物皮肤试验指导原则 (2021 年版) [EB/OL]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/202104/a33f49b8c4b5421c85a5649a28a0fce2.shtml>. (2021-04-16) [2024-01-25].

[7] Kimberlin DW, Barnett ED, Lynfield R, et al. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases [M]. 32nd ed. American Academy of Pediatrics; Itasca, IL, 2021.

[8] Todd SR, Dahlgren FS, Traeger MS, et al. No visible dental staining in children treated with doxycycline for suspected Rocky Mountain spotted fever [J]. J Pediatr, 2015, 166 (5): 1246-1251.

[9] 临床常用四环素类药物合理应用多学科专家共识编写组, 中华预防医学会医院感染控制分会, 中国药理学会临床药理分会. 临床常用四环素类药物合理应用多学科专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2023, 103 (30): 2281-2296.

[10] 中国研究型医院学会危重症医学专业委员会. 多黏菌素临床应用中国专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28 (10): 1218-1222.

[11] Rusu A, Munteanu AC, Arbănași EM, et al. Overview of Side-Effects of Antibacterial Fluoroquinolones: New Drugs versus Old Drugs, a Step Forward in the Safety Profile? [J]. Pharmaceutics, 2023, 15 (3): 804.

[12] 中华医学会结核病学分会. 利奈唑胺抗结核治疗专家共识 (2022 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45 (10): 988-995.

[13] 孔旭东, 王晓星, 陈玥, 等. 两性霉素 B 不同制剂的药学特性和临床应用 [J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20 (7): 7-12.

[14] 柴双, 展敬伦, 肇丽梅, 等. 5 种三唑类抗真菌药物的药物不良反应分析 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38 (17): 2079-2083.

[15] 刘敏, 王海学. 药物临床试验不良反应因果关系评价方法概述与存在问题的思考 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (8): 1206-1211.

[16] 国家药品监督管理局. 关于发布个例药品不良反应收集和报告指导原则的通告 (国家药监局 2018 年第 131 号) [EB/OL]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20181221172901438.html>. (2018-12-21) [2024-01-25].

[17] 国家药品监督管理局. 药品不良反应报告和监测管理办法 (卫生部第 81 号) [EB/OL]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypfgwj/ypfgbmghz/20110504162501325.html>. (2011-05-04) [2024-01-25].

(收稿日期: 2024-02-01)

(本文编辑: 周三凤)

行^[3-4]。经典 AST 包括纸片扩散法、琼脂稀释法、肉汤稀释法及浓度梯度法等。这些经典方法常用于临床耐药菌株的表型筛查,有助于指导临床医生合理选择抗生素,但无法检测耐药基因。

最低抑菌浓度(MIC)是指抗菌药物能够抑制微生物生长所需要的最低浓度,为测定抗菌药物敏感性的主要方法。主要原理是将含有特定数量细菌的溶液加入含有不同药物浓度梯度的琼脂或肉汤中,观察细菌在培养基内的生长情况,肉眼未见受试菌生长的最低药物浓度,即为该药物的 MIC。稀释法包括肉汤稀释法和琼脂稀释法,是药敏试验的标准方法,该方法不仅可以依据抗菌药物折点定性判断菌株的耐药情况,还可直接判读 MIC 的定量结果,临床使用较为广泛^[5]。

纸片扩散法也被称为 Kirby-Bauer(K-B)抗生素试验,是临床实验室最常用的传统定性法和确定细菌敏感性的标准,原理是将涂有抗菌物质的纸盘置于固体琼脂培养基上,形成一个无微生物生长的圆形区域,称为抑菌圈,通过测定抑菌圈的直径即可判定受试菌的药物敏感性,直径与 MIC 呈反比,使用预设的折点解读抑菌圈大小,这种定性方法将样本划分为敏感、中介和耐药。该方法不能测定 MIC 值,但可以比较菌株药物敏感性的强弱,一般仅用来定性判断菌株的药物敏感情况。

E-test 是一种结合了稀释法和扩散法的原理和特点测定微生物对抗菌药物敏感性的定量技术。其原理是浓度呈连续梯度的抗菌药物从标注有浓度刻度的塑料试条中向琼脂中扩散,在试条周围抑菌浓度范围内受试菌的生长被抑制,从而形成透明的抑菌圈,无明显细菌生长处的刻度值即为受试菌的 MIC。E-test 条带上的抗生素浓度梯度稳定,可直接量化抗菌药物敏感度。该方法类似于纸片扩散法,但可快速读取 MIC 值,检测简便,成本相对较高。

2. 自动化系统

经典的药敏试验操作繁琐,受人为因素影响较大。自动化系统的结果读取为自动化,减少了工作量和人为误差,从而提高了药敏检测质量。但目前临床使用的自动化系统配套的药敏检测板药物浓度梯度仍偏少,定制适合流行病学监测的药敏检测板是实现药敏检测自动标准化的有效方法。已获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准的自动化 AST 系统包括来自美国的 MicroScan WalkAway 205 系统、Phoenix Automated Microbiology 系统和 Sensititre ARIS 2X 系统及来自法国的 Vitek 2 系统等,这些系统配备了针对临床常见革兰阳性和革兰阴性菌量身定制的各种药敏检测板。Microscan WalkAway 205 系统可在 7~18 小时内获得 MIC

值。Phoenix Automated Microbiology System 可在 6~16 小时内测定多种致病菌的 MIC 值。Sensititre ARIS 2X 需 18~24 小时的孵育期来评估生长情况进行 MIC 测定。Vitek 2 系统是一种先进的自动化平台,可在 4~10 小时内同时进行 30~240 次检测,覆盖临床绝大部分常见革兰阴性、革兰阳性病原菌^[6-7]。

二、分子技术

1. 核酸扩增试验(NAATs)

(1)聚合酶链反应(PCR):PCR 是细菌耐药检测中最常用的分子技术,原理是通过引物的特异性识别,DNA 聚合酶快速扩增目标 DNA,从而检测出细菌中的耐药基因,如 *mecA* 基因(金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药)、*blaSHV* 基因(肠杆菌对 β -内酰胺类耐药)、*tetM* 基因(金黄色葡萄球菌对四环素耐药)及 *vanA* 基因(肠球菌属对万古霉素耐药)等^[8-10]。PCR 技术是一种简便、高特异性和敏感性的检测方法,但在检测未知或新的耐药基因方面作用有限^[11]。

(2)多重 PCR(mPCR):mPCR 能够在一次操作中检测和区分多种微生物,降低了同时扩增多个基因所需的时间和成本^[12]。当前用于检测耐药基因的多重 PCR 技术包括 RespiFinder SMART 22 检测、SuperBug ID 检测、AllplexTM 胃肠 Panel 检测和 BD MAXTM MDR-TB 检测等^[12-14]。

(3)逆转录 PCR(RT-PCR):RT-PCR 是基于 RNA 模板扩增的 PCR 技术,将 RNA 分子转录成互补的 DNA 分子(cDNA)并使用 PCR 扩增,与 DNA 分子相比,由原始 RNA 生成的 cDNA 分子纯度更高,由于没有蛋白质等物质影响,cDNA 更具有特异性,可用于检测耐药基因的转录本,衡量耐药菌株的基因表达水平,不足之处是检测耗时且费用高。Khan 等^[15]将 RT-PCR 法与免疫荧光染色试验进行比较,RT-PCR 法检测肺炎衣原体的 MIC 更高,准确性更高。Cangelosi 等^[16]针对结核分枝杆菌前体 rRNA 进行 RT-PCR 探针测定,结果准确预测了对利福平和环丙沙星的耐药性。

(4)定量 PCR(qPCR):qPCR 将实时定量荧光检测技术引入 PCR 中,实现了 PCR 扩增区域的实时检测,且检测结果可量化。在 PCR 扩增中使用荧光探针,有助于实时监测扩增过程,从而缩短反应时间,能够定量样品中微生物的相对和绝对数量。但 qPCR 设备和试剂较传统 PCR 昂贵。*blaCTX-M* 基因与超广谱 β -内酰胺类抗生素耐药相关,该基因常见于革兰阴性菌(如大肠杆菌等),研究证明 qPCR 可成功检测到该基因^[17]。qPCR 也可检测到 *mecA*、*tet* 及 *van* 等基因^[18]。

(5)数字 PCR(dPCR):dPCR 是基于传统 PCR、实

时荧光定量 PCR 基础上发展起来的第 3 代 PCR 技术,原理是将样本中的目标分子均匀地分割成许多微小反应单元,在每个反应单元中进行 PCR 扩增,通过对反应单元的阳性和阴性结果进行数字计数,可以确定目标分子的存在与否,从而实现精确定量^[19]。目前已成功应用于商业化的 dPCR 系统根据分散方式的不同可分为 3 种主要类型:基于微流控技术的微流控芯片式数字 PCR(mcdPCR)、基于油包水微滴生成技术的微滴式数字 PCR(ddPCR)和基于微孔芯片的微孔板数字 PCR(mdPCR),分别通过微流体通道、微液滴或微流体芯片实现分液,分隔开的每个微小区域都可进行单独的 PCR 反应。与传统 PCR 方法相比具有独特的优势,无需标准曲线和参照,对影响效率的抑制物不敏感,大大提高了检测敏感性、精确度和可重复性,实现了真正意义上的绝对定量。因此该方法在低载量病原体的绝对定量检测和罕见突变检测中的应用逐渐凸显。然而该方法也存在一定的缺陷:不能扩增所有的 DNA 片段,不适合扩增大的片段,成本高,需要复杂的仪器,易产生假阳性结果。

(6)环介导等温扩增技术(LAMP):LAMP 是 Notomi 等在 2000 年发明的一种等温扩增技术,其原理是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异的引物,在 DNA 聚合酶的作用下,在恒温条件下进行的核酸扩增。由于其不需要模板热变性、长时间的温度循环、繁琐的凝胶电泳及紫外观察等过程,在等温条件下,进行核酸扩增 1 小时,即能达到检测耐药基因的目的,克服了普通 PCR 在仪器设备和操作上的限制和缺点,具有简单、快速、特异性高等特点。此外,研究人员基于 LAMP 还开发出 SMART-LAMP、RT-LAMP 等技术和产品^[20-21]。LAMP 技术也存在自身局限性:对设计的引物要求高,需同时设计多对引物,要求扩增的靶序列长度在 300bp 以上,电泳阳性反应出现梯度条带,不易鉴别非特异性扩增。但总体而言,LAMP 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. 高通量测序技术

二代测序(NGS)采用的是短序列平行测序的方法,可同时实现对数十亿条短序列的深度测序,是目前应用广泛的高通量测序方法。三代测序又称为纳米孔测序,可将单核苷酸分子精确地定位到纳米尺寸的孔隙中,不同的碱基在孔隙中通过时产生不同的电流,根据电流信号以此来明确每个核苷酸的碱基序列,从而实现准确的测序。与二代测序相比,三代测序具有碱基序列读长更长、速度快和可边测序边分析等特点。Schmidt 等^[22]的一项研究表明,纳米孔测序在 4 小时内能有效检测尿液中的获得性耐药基因,也强调了纳

米孔测序对选择抗菌药物的意义。总体而言,纳米孔测序在识别细菌性肺炎病原菌及耐药基因上有极大的优势。NGS 技术在微生物检测中的应用主要包括:全基因组测序(WGS)、宏基因组测序(mNGS)和靶向测序(tNGS):

(1)WGS:WGS 是指对某种病原体全部基因组进行测序。在细菌耐药检测领域,WGS 可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,从而为临床用药提供依据。缺点是需要进行分离培养出目标菌株后再进行测序,故目前更多应用于科学研究。虽然 WGS 检测能够准确检测已知耐药基因和新发突变,但新发突变对表型的影响仍需要进一步研究确定。

(2)mNGS:mNGS 能够直接检测特定环境标本中的所有遗传物质,包括样本中多种类型的病原体。与传统方法相比,mNGS 可无偏倚地检出样本中的病原体,敏感性、特异性高,检测速度较快,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,对临床发现致病原有很大帮助,且目前在临床应用中越来越广泛,但在耐药基因检测方面,该技术尚缺乏标准化和自动化的分析流程,且部分受限于样本基因提取,对细菌耐药基因的大规模筛查较为困难。

(3)tNGS:tNGS 可检测特定病原体及特定基因组区域,其优点是特异性和敏感性高、周转时间短,缺点是检测范围有限,无法识别新的病原体或耐药位点,但随着技术进步,tNGS 在耐药检测方面仍具有巨大可靠性与前景。如相关研究表明,tNGS 检测结核分枝杆菌异烟肼、利福平、莫西沙星及乙胺丁醇耐药性的敏感度均大于 95%,未来有望成为耐药结核的常规诊断手段^[23]。

(4)单细胞转录组测序(scRNA-seq):scRNA-seq 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^[24]。我们团队也在尝试将 scRNA-seq 应用于单个微生物,如细菌细胞的转录组测序中。但该技术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及 mRNA 无多聚腺苷酸化等原因,技术壁垒高,仍需进一步探索。

3. 基因芯片技术

基因芯片又称为 DNA 微阵列,是一种基于杂交原理,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。基因芯片技术具有高通量、高效、快速、准确的特点,不仅可反映样本携带某种

耐药基因的情况,还可同时检测多种耐药基因的携带情况,对包括未知病原体鉴定、疾病因子筛查、细菌耐药基因检测等方面具有重要意义。国内、外众多研究均显示了基因芯片技术在细菌耐药检测领域中的重大优势和潜在应用价值。该技术也存在局限性:如无法获得精确的 MIC 值、设备和配套芯片价格昂贵、耗时长等,这些都会制约该技术大规模推广应用。

4. 荧光原位杂交(FISH)

FISH 是一种以定量方式可视化目标 DNA 的高度特异性方法,其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,再通过荧光显微镜直接观察目标 DNA 的所在位置。这种经典的 FISH 方法既快速又易于标准化,因此可用于分子快速检测。目前基于 FISH 技术已经开发的检测包括 XpressFISH、QuickFISH、RASER-FISH、DVC-FISH 等^[25-27]。理论上,FISH 探针可与细胞内 RNA 杂交,在参与蛋白质合成的细胞中有丰富的核糖体,可放大荧光强度。研究人员针对存活的细菌开发了 rRNA 探针检测,rRNA 探针技术可更好地检测活跃细胞的代谢、生长和耐药性转录表达。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。

三、新技术

1. 质谱检测

质谱仪是用来进行质量分析的仪器,具有灵敏度高、分析速度快、测量范围广和色谱联用等特点。常用于细菌耐药性检测的质谱仪有基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)和轨道阱组合质谱。其中 MALDI-TOF MS 技术是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱,其原理是先将生物分子电离,离子在电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同形成蛋白质指纹谱,然后经软件与数据库中标准指纹图谱进行对比,从而达到鉴别的目的。该检测技术主要是通过检测抗菌药物的修饰和水解情况来检测细菌耐药相关酶,或检测耐药株、敏感株指纹图谱的改变来判断耐药株和敏感株,从而达到检测细菌耐药性的目的。与传统药敏试验相比,该技术只能区分敏感株和耐药株,无法获得准确的 MIC 值。LC-MS/MS 通常用来检测小分子的耐药生物标志物并可对其进行定量,适用于部分耐药机制清楚的细菌,轨道阱组合质谱因其高分辨率常用来识别耐药细菌的特征肽段。未来可用质谱对耐药细菌进行基因测序来鉴定耐药基因。由

于该技术设备和配套试剂昂贵、检测耐药种类有限,制约了其在临床和基层大范围推广应用,主要用于细菌耐药的科学研究领域。

2. 微流控和生物传感器技术

微流控技术通过控制流体的流动,将样品处理、反应、分离和检测整合到微流控芯片上,并可与 PCR、LAMP、质谱、荧光、电化学等检测技术联用。该技术对操作人员技术要求不高、样本量少、敏感性高,可提供自动化和高通量分析,适用于各种复杂环境下病原微生物的精准、快速检测。

生物传感器可利用一系列物理、化学和生物测量来识别特定微生物或生物标志物的存在。其中具有代表性和研究最多的是拉曼光谱技术。拉曼光谱是基于拉曼散射效应的分子振动光谱,能够提供关于分子结构和构型的“指纹”信息,其谱峰窄、分辨率高,可显示致病菌间的细微差别。当样品与某些金属如银、金等表面接触时,其拉曼散射信号会急剧增强,最高可达 10 个数量级以上,这种现象称为表面增强拉曼散射,相应的光谱称为表面增强拉曼光谱(SERS)。SERS 具有快速、灵敏、无损伤等优点,可直接获取分子指纹信息,但该技术的基础研究和临床应用之间仍存在差异。

3. 机器学习和预测分析

近年来人工智能在医学领域的研究中占据越来越重要的地位,成为肺炎的流行病学、影像学及治疗药物筛选等方面重要的辅助工具。研究表明即使在未明确耐药机制的情况下,对数据集进行训练,机器学习模型也有较高的预测能力,临床医师甚至可利用来自当地抗菌药物敏感性数据模型来指导经验性治疗选择,可达到 75.8% 的准确性^[28]。预测的准确性取决于使用的数据质量和数量、机器学习算法的选择及选择用于分析的特征。值得注意的是,这些研究是在特定的数据集上进行的,不能推广到其他数据集。因此,在依赖机器学习模型进行临床决策之前,有必要对其在新数据集上的有效性进行全面评估。

四、细菌耐药水平监测

通过细菌耐药监测研究可获得全球、不同国家和地区等不同范围致病菌感染发生率和耐药动态,了解细菌耐药性产生与抗菌药物应用关系,预测细菌耐药发展变化趋势,明确耐药机制,指导临床医生采取合适的防控措施和治疗方法,评价治疗有效性,进而延缓细菌耐药的产生或发展,此外还可引导研究出新的、更有效的抗菌药物。

细菌耐药监测可由政府、企业、学会及专家等发起,规模可是国际、全国、地区及医院等范围。监测对

象可选择不同人群、致病菌和抗菌药物。监测内容包括细菌耐药趋势及其与耐药机制和抗菌药物使用的关系、抗菌药物处方和感染转归等。

国际已建立一些具有代表性的、不同规模的监测网或监测项目,如 SENTRY 抗菌药物监测项目、重症监护细菌耐药流行病学研究项目、美国医院感染监测系统(NNIS)和欧洲耐药性监测网(EARS-Net)等。国内具有代表性的监测网包括全国细菌耐药监测网(CARSS)、国家抗生素细菌耐药性监测中心和中国细菌耐药监测(CHINET)等。此外,许多地区和单位在当地建立了不同级别的细菌耐药监测网点,旨在通过监测不同地区、不同级别医院的细菌耐药情况,进一步了解我国不同地区和不同级别医院细菌分离株耐药性特点。如 2023 年上半年 CHINET 中排名前 5 的分离菌分别为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌,鲍曼不动杆菌从第 5 位上升至第 4 位,碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌的检出率仍保持高位,甲氧西林耐药葡萄球菌检出率为 31.7%,较前出现上升趋势^[29]。这些对临床用药指导及抗菌药物合理应用具有重要意义。

五、总结

细菌耐药是在全球范围内危害人类生命健康的重大公共卫生问题。抗菌新药研发的速度已追赶不上细菌耐药的进化速度。本文总结了检测细菌耐药的经典方法、各种分子技术以及新型技术。细菌耐药监测也是未来需要密切关注的发展方向,在现有被动监测的基础上,加大主动监测力度,开展耐药菌流行病学调查及新机制研究,以期临床合理应用抗菌药物,进一步控制细菌耐药水平提供指导。

参 考 文 献

- [1] Davtyan H, Grigoryan R, Niazian L, et al. Antimicrobial Resistance in a Tertiary Care Hospital in Armenia: 2016-2019 [J]. Trop Med Infect Dis, 2021, 6(1): 31.
- [2] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. Lancet, 2022, 399(10325): 629-655.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. 31st ed, Pennsylvania: CLSI supplement M100, 2021.
- [4] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EB/OL]. <https://www.eucast.org/>. (2024-01-01) [2024-01-26].
- [5] Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. Nat Protoc, 2008, 3(2): 163-175.
- [6] Vasala A, Hytönen VP, Laitinen OH. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 308.
- [7] Shanmugakani RK, Srinivasan B, Glesby MJ, et al. Current state of the art in rapid diagnostics for antimicrobial resistance [J]. Lab Chip, 2020, 20(15): 2607-2625.
- [8] Nair D, Shashindran N, Kumar A, et al. Comparison of Phenotypic MR-

- SA Detection Methods with PCR for mecA Gene in the Background of Emergence of Oxacillin-Susceptible MRSA [J]. Microb Drug Resist, 2021, 27(9): 1190-1194.
- [9] Zorbozan H, Kimiran A. Detection of beta-lactam antibiotic resistance in aquatic Enterobacteriaceae isolates [J]. Water Supply, 2022, 22(12): 8557-8571.
- [10] Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4089-4094.
- [11] Ghidón Á, Jeney C, Maródi CL, et al. PCR detection of the vanA gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Hungary [J]. Antimicrob Chemother, 2000, 46(2): 325-327.
- [12] Sağröglü P, Atalay MA. Evaluation of the performance of the BD MAX MDR-TB test in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* complex in extrapulmonary and pulmonary samples [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2021, 21(12): 1361-1367.
- [13] Gray J, Coupland L. The increasing application of multiplex nucleic acid detection tests to the diagnosis of syndromic infections [J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(1): 1-11.
- [14] Anjum MF, Zankari E, Hasman H. Molecular methods for detection of antimicrobial resistance [J]. Microbiol Spectr, 2017, 5(6): 33-50.
- [15] Khan MA, Potter CW, Sharrard RM. A reverse transcriptase-PCR based assay for in-vitro antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia pneumoniae* [J]. Antimicrob Chemother, 1996, 37(4): 677-685.
- [16] Cangelosi GA, Brabant WH, Britschgi TB. Detection of rifampin- and ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by using species-specific assays for precursor rRNA [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(8): 1790-1795.
- [17] Singh P, Pfeifer Y, Mustapha A. Multiplex real-time PCR assay for the detection of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase genes using melting curve analysis [J]. J Microbiol Methods, 2016, 124: 72-78.
- [18] He YH, Ruan GJ, Hao H, et al. Real-time PCR for the rapid detection of vanA, vanB and vanM genes [J]. Microbiol Immunol Infect, 2020, 53(5): 746-750.
- [19] Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology [J]. Clin Microbiol, 2017, 55(6): 1621-1628.
- [20] Barnes L, Heithoff DM, Mahan SP, et al. Smartphone-based pathogen diagnosis in urinary sepsis patients [J]. EBioMedicine, 2018, 36: 73-82.
- [21] 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.
- [22] Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, et al. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing [J]. Antimicrob Chemother, 2017, 72(1): 104-114.
- [23] World Health Organization. Use of targeted next generation sequencing to detect drug resistant tuberculosis [EB/OL]. <https://who.int/publications/i/item/9789240076372>. (2023-07-23) [2024-01-26].
- [24] Tang X, Huang Y, Lei J, et al. The single-cell sequencing: new developments and medical applications [J]. Cell Biosci, 2019, 9: 53.
- [25] Brown JM, de Omellas 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.
- [26] 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.
- [27] 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]. Clin Microbiol, 2014, 52(11): 3928-3932.
- [28] Feretzakis G, Loupelis E, Sakagianni A, et al. Using Machine Learning Techniques to Aid Empirical Antibiotic Therapy Decisions in the Intensive Care Unit of a General Hospital in Greece [J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(2): 50.
- [29] 胡付品, 丁丽, 郭燕, 等. CHINET 2023 年上半年细菌耐药监测结果(2023 年 1-6 月) [EB/OL]. www.chinets.com. (2023-08-28) [2024-01-26].

(收稿日期: 2024-02-03)

(本文编辑: 周三凤)