

- [20] Freeman JV, Masoudi FA. Effectiveness of implantable cardioverter defibrillators and cardiac resynchronization therapy in heart failure[J]. Heart Fail Clin, 2013, 9(1): 59-77.
- [21] Anversa P, Kajstura J, Rota M, et al. Regenerating new heart with stem cells[J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 62-

70.

- [22] Hassan N, Tchao J, Tobita K. Concise review: skeletal muscle stem cells and cardiac lineage: potential for heart repair[J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(2): 183-193.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-26)

## • 综 述 •

## 细菌快速药敏试验方法研究进展

李 珍 综述, 李从荣<sup>△</sup> 审校(武汉大学人民医院检验科 430060)

【关键词】 细菌; 快速检测; 抗菌药物; 药敏试验

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 08. 056 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1142-03

抗菌药物的发现与使用, 是人类医学史上重要的里程碑。药敏试验是指在体外测定病原菌对某种抗菌药物的敏感或耐受程度, 以指导临床合理选用抗菌药物的微生物学试验。然而, 随着多重耐药菌在世界范围内的播散, 细菌耐药情况日趋严重, 准确且快速的抗菌药物敏感性试验结果对于指导治疗临床各种类型细菌感染显得更加重要<sup>[1]</sup>。目前, 在常规的临床微生物工作中, 药敏试验多采用稀释法、纸片法和 E-test 法等, 这些方法均需经过较长的孵育时间, 在这段时间内, 临床医生根据当地流行病学情况采用经验性用药治疗患者感染。因此, 快速抗菌药物敏感性试验是实验室快速提供科学、准确的抗菌药物活性信息的重要前提, 也是临床实施有效药物治疗的保障。现将近年来针对细菌性病原体兴起的快速药敏试验方法最新研究进展作如下综述。

## 1 分子生物学技术

**1.1 聚合酶链反应(PCR)技术** PCR 技术包括普通 PCR 和实时定量 PCR, 其根据 DNA 热变性原理, 通过控制温度来控制双链的解聚和结合。PCR 技术可灵活、快速、同时检测临床标本中多种病原菌和已确定病原菌中的耐药基因<sup>[2]</sup>。现在已有许多商品化仪器利用 PCR 技术通过检测 *mecA* 和(或)*mecC* 基因的存在来鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA), 如运用实时荧光定量 PCR 原理检测 *mecA* 和 *mecC* 基因的全自动检测分析系统 Xpert MRSA Gen 3。有研究表明, Xpert MRSA Gen 3 可以在非常短的时间内(58 min)完成 MRSA 分析, 灵敏度和特异度分别为 95.7% 和 100.0%<sup>[3]</sup>, 而 BD-Max MRSA XT assay 整个检测过程用时较长, 约 120 min, 灵敏度(87.5%)和特异度(97.1%)与 Xpert MRSA Gen 3 相比略显逊色。此外, PCR 技术也已用于万古霉素耐药相关的 *vanA* 和 *vanB* 基因的检测, 如肠球菌的耐药性检测<sup>[4-5]</sup>, 不同的研究其灵敏度和特异度不同。当然, 近几年检测革兰阴性菌耐药基因的方法研究也越来越多, 尤其是检测编码碳青霉烯酶<sup>[6]</sup>、Amp<sup>C</sup><sup>[7]</sup>、广谱  $\beta$ -内酰胺酶及超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)<sup>[6, 8]</sup> 等酶基因的方法。这些方法的主要优点在于它们可以在相对短的时间内, 有时甚至可以直接用临床标本即可完成检测。然而, 耐药基因的出现不总与耐药表型一致, PCR 技术检测耐药基因易产生假阴性结果, 故不能检测新的或不典型的耐药机制, 特别是在革兰阴性菌中存在的碳青霉烯酶, 因其不断出现

新的突变, 此法可能不能准确检测耐药性而导致一个耐药菌株被不恰当地分类为敏感株。此外, 这些方法不能提供对于指导临床治疗有用的最低抑菌浓度(MIC)值。

除了用 PCR 技术检测与耐药相关的基因以外, 最近又有一种利用实时定量 PCR 法可准确定量标本中特殊核酸的拷贝数的特点来测量细菌生长量的方法, 以此来判断药敏结果, 这给临床微生物药敏试验提供了新的思路。这种方法通过在非常短的时间内(约 6 h)监测分离菌株在抗菌药物存在情况下细菌基因组 DNA 拷贝数变化, 可以区分耐药株与敏感株。如 2013 年西班牙学者针对鲍曼不动杆菌中高度保守序列 *ompA* 基因, 用实时定量 PCR 法检测临床分离的鲍曼不动杆菌对亚胺培南、环丙沙星和多粘菌素的耐药性<sup>[9]</sup>。这种方法也被用于血培养阳性标本病原菌及其药敏的快速检测<sup>[10]</sup>。相对于上文描述的检测耐药基因的方法, 此法有一个优势, 即不依赖于细菌耐药机制, 且可以通过检测在抗菌药物存在情况下细菌的生长情况间接测量耐药表型。但这种方法也存在缺陷: 即它需要先培养分纯, 不能直接检测临床标本。

**1.2 基因芯片法** 基因芯片技术是同时将大量的探针分子固定到固相支持物上, 借助核酸分子特异性杂交配对的特性对 DNA 样品的序列信息进行高效的解读和分析。从 20 世纪 90 年代开始, 国外就有利用基因芯片技术鉴定细菌的报道, 现今已经有大量研究报道用这种方法检测细菌菌株中大量耐药基因, 如革兰阴性菌中的  $\beta$ -内酰胺酶基因<sup>[11]</sup>。利用这种快速、特异、高通量技术检测细菌耐药性, 可以在 1 个工作日内提供报告。Naas 等<sup>[12]</sup> 报道运用基因芯片技术在一次试验中可以检测大量不同的耐药基因, 这一点与只能检测少量基因的 PCR 技术不同。因此, 基因芯片非常适于检测有大量明确的耐药机制或同一机制的多种变体的细菌(如在革兰阴性菌中的  $\beta$ -内酰胺酶)的耐药性。然而, 同上文描述的方法类似, 从基因芯片上获得的数据可能不总与表型耐药一致, 且此方法不能提供 MIC 值。除此之外, 这种方法在检测含有新的或非特异性耐药基因的菌株的耐药性时具有局限性。

**1.3 全基因组测序法** 全基因组测序是对未知基因组序列的物种进行个体的基因组测序。随着 DNA 测序技术的进步, 人们可以极快的速度完成整个细菌基因组的测序, 再加上生物信息学工具快速地收集和分析这些测序得到的海量数据, 全基因

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: cong rongli33@hotmail.com。

组测序技术已可检测细菌对抗菌药物的耐药性。现在已有许多研究报道利用全基因组测序技术描述抗菌药物耐药性决定基因特点<sup>[13]</sup>。这些研究多为描述目的耐药表型的概况,如 Zankari 等<sup>[14]</sup>用全基因组测序技术描述 4 种细菌(共 200 株分离株)对多种抗菌药物的耐药情况,所得结果与用表型敏感性试验相比有高度一致性(99.74%)。但全基因组测序所需的前处理繁琐,成本高,实用性较低,不适用于临床应用。同上文所述,全基因组测序技术依赖于耐药性的基因决定子的确定,不能检测新的或非特异性耐药机制,也不能提供 MIC 值。

分子生物学方法在药敏试验快速检测方面的应用渐渐地从学术研究转向实验诊断和床边检测,是目前研究最多、应用最广泛的快速药敏方法。这些方法在检测抗菌药物耐药性方面的优势主要有以下两方面:一是与表型方法相比,分子生物学方法可以在较短时间内得出结果;二是有些方法可以直接从临床标本中检测抗菌药物耐药性,不需花费不必要的培养时间<sup>[15]</sup>。这有利于临床医生在适当的时间用适当的抗菌药物治疗患者,也有助于抗菌药物的使用管理。

## 2 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术

MALDI-TOF MS 是近年来发展起来的一种新型的软电离物质谱,其基本原理是根据样品与共结晶经过激光照射后形成的分子通过真空管所需的飞行时间来鉴别分子。与 PCR 技术类似,MALDI-TOF MS 最初用于临床微生物实验室鉴定病原体,但最近已有研究报道用 MALDI-TOF MS 检测细菌耐药性。使用 MALDI-TOF MS 检测耐药性最常见的是用全细胞或粗提物区分耐药和敏感株的光谱。如对万古霉素耐药(vanB 基因阳性)与敏感(vanB 基因阴性)的屎肠球菌之间指纹差异<sup>[16]</sup>。但是到目前为止还没有发现任何可信模式可以鉴定大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌临床分离株 β-内酰胺酶耐药性<sup>[17]</sup>。有一些研究者认为 MRSA 与甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌之间光谱的区别是由于耐药株与敏感株之间克隆的不同造成的<sup>[18]</sup>。使用 MALDI-TOF MS 鉴定耐药菌株最大的优势在于这种方法相当快速并高度自动化。然而,与分子生物学技术类似,用这种方法得到的结果可能不总是直接与表型耐药相关,且菌株间与耐药性不相关的差别可使结果的解释复杂化。因此,也有一些研究用 MALDI-TOF MS 检测抗菌药物的水解产物,即检测与细菌共同孵育时,抗菌药物的水解作用。现在已有大量研究报道描述用这种方法检测多种细菌 β-内酰胺酶活性,Lasserre 等<sup>[19]</sup>研究表明,MALDI-TOF MS 法检测 β-内酰胺酶活性的灵敏度和特异度均可达 100.0%,且每个测试的花费低于 0.10 美元。这种方法简单、快速、准度高,可高度标准化,检测活性时无需考虑酶的种类,适于临床开展,但此法尚不能提供 MIC 值。

## 3 微流控技术

微流控技术又称“芯片上的实验室”,是根据不同原理,如电化学、磁场和光学等,运用极小的反应和分析体积(皮升),将多种功能(包括细菌培养、核酸杂交与扩增及细胞裂解等)合并到 1 个芯片上的技术。近年来有研究运用微流控设备快速检测抗菌药物耐药性。Choi 等<sup>[20]</sup>用显微镜追踪在抗菌药物存在情况下,细菌在由微流体琼脂糖组成的通道中单个细胞的生长情况,这种方法用仅仅 3~4 h 即可得到近似 MIC 值。也有研究报道,在 16S rRNA 水平定量测量细菌在抗菌药物存在时的生长情况<sup>[21]</sup>,此方法可以在 3.5 h 内直接用患者尿液检测并

得出结果,这与标准的抗菌药物敏感性试验方法的一致性达 94%。我国唐艳等<sup>[22]</sup>开发了一种微流控 pH 传感器,它可用于检测在抗菌药物存在情况下由于细菌生长代谢物的积累导致培养基 pH 的改变,用这种方法,细菌在纳升规模的培养基内的生长曲线可以在短短 2 h 内产生。微流控技术检测分析所需的分析体积非常小,测试中所用的芯片可以被并入便携式设备,用于床边药敏试验开展;它可以高度自动化、标准化,可以非常快速地提供药敏结果;此外,许多情况下,微流体设备直接测量细菌在抗菌药物存在时的生长情况,这使得所得的结果可能与耐药表型相关,适于检测耐药机制尚不明确的细菌耐药性。但目前该技术对于 MIC 值的判定还未建立相关标准。

## 4 其他

除了上文提到的目前研究较多的方法外,液态芯片技术法<sup>[23]</sup>、荧光原位杂交技术<sup>[24]</sup>、流式细胞荧光法<sup>[25]</sup>、及以溶解细胞为基础的方法<sup>[26]</sup>等,这些方法从不同角度,利用形态学或生物学等技术原理等,旨在缩短药敏试验时间,这里便不再赘述。

## 5 展望与未来

近年来,大量研究报道表明,多重耐药菌感染率与耐药率逐年增高,为了控制多重耐药菌株的产生与传播,减少细菌病原体耐药性分析所必需的时间,快速药敏试验方法是未来微生物实验研究的趋势。而近几年分子诊断和人类基因组计划极大地推动了分子生物学技术的革新与发展,MALDI-TOF MS 技术作为常规细菌鉴定系统已渐渐投入临床使用,微流控技术的兴起更是为快速药敏试验方法的研究提供更广泛的研究思路,快速、灵敏、准确、高度自动化等是未来微生物检验发展的方向。这里描述的所有方法都旨在减少检测细菌病原体耐药性所必需的时间;然而,许多情况下这些方法是否有足够的敏感性和特异性仍待确定。除此之外,对于上述所提的多数方法必须解决的问题是必须符合 FDA 或其他相关组织所要求的标准,以及如何检测未知或非特异的耐药机制。

## 参考文献

- [1] Viale P, Giannella M, Tedeschi S, et al. Treatment of MDR-Gram negative infections in the 21st century; a never ending threat for clinicians[J]. Curr Opin Pharmacol, 2015, 24: 30-37.
- [2] Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(7): 731-754.
- [3] Lepointeur M, Delattre S, Cozza S, et al. Comparative evaluation of two PCR-based methods for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Xpert MRSA Gen 3 and BD-Max MRSA XT[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(6): 1955-1958.
- [4] Gazin M, Lammens C, Goossens H, et al. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert vanA/vanB molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(3): 273-276.
- [5] Cekin Y, Erman DA, Ogunc D, et al. Evaluation of vancomycin resistance 3 multiplexed PCR assay for detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs[J]. Ann Lab Med, 2013, 33(5): 326-330.

- [6] Trung NT, Hien TT, Huyen TT, et al. Simple multiplex PCR assays to detect common pathogens and associated genes encoding for acquired extended spectrum betalactamases (ESBL) or carbapenemases from surgical site specimens in Vietnam[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2015, 14: 23.
- [7] Geyer CN, Hanson ND. Multiplex high-resolution melting analysis as a diagnostic tool for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(4): 1262-1265.
- [8] Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, et al. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo-beta-lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum beta-lactamases[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 42(4): 352-356.
- [9] Martin-Pena R, Dominguez-Herrera J, Pachon J, et al. Rapid detection of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* using quantitative real-time PCR[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(7): 1572-1575.
- [10] Beuving J, Verbon A, Gronthoud FA, et al. Antibiotic susceptibility testing of grown blood cultures by combining culture and real-time polymerase chain reaction is rapid and effective[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e27689.
- [11] Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, et al. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM)[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(8): 1865-1869.
- [12] Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, et al. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4): 1608-1613.
- [13] Koser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance[J]. *Trends Genet*, 2014, 30(9): 401-407.
- [14] Zankari E, Hasman H, Kaas RS, et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(4): 771-777.
- [15] Frickmann H, Masanta WO, Zautner AE. Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 375681.
- [16] Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, 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.
- [17] Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, et al. A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(9): T71-T77.
- [18] Wolters M, Rohde H, Maier T, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages[J]. *Int J Med Microbiol*, 2011, 301(1): 64-68.
- [19] Lasserre C, De Saint ML, Cuzon G, et al. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(7): 2163-2171.
- [20] 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.
- [21] Mach KE, Mohan R, Baron EJ, et al. A biosensor platform for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from clinical samples[J]. *J Urol*, 2011, 185(1): 148-153.
- [22] Tang Y, Zhen L, Liu J, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(5): 2787-2794.
- [23] Bai X, Liu Z, Ji S, et al. Simultaneous detection of 33 *Streptococcus suis* serotypes using the luminex xTAG (R) assay[J]. *J Microbiol Methods*, 2015, 117: 95-99.
- [24] 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.
- [25] 付亮, 龙军, 袁小澎. 流式细胞术快速检测产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶细菌的研究[J]. *广东医学*, 2011, 32(4): 416-418.
- [26] Bou G, Otero FM, Santiso R, et al. Fast assessment of resistance to carbapenems and ciprofloxacin of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(11): 3609-3613.

(收稿日期: 2015-11-11 修回日期: 2016-01-15)