

# Research Progress on Rapid Microbial Drug Sensitivity Detection Methods

Minhui Huang<sup>1,2</sup>

1. Jingmen Central Hospital Clinical, Jingmen, Hubei, 448000, China

2. Jingmen Central Hospital Affiliated of Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei, 448000, China

## Abstract

Antimicrobial Resistance (AMR) has become one of the important factors threatening global public health. At present, the traditional Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) commonly used in clinical practice is a key technology to guide the rational use of antibiotics and curb the spread of drug resistance. However, obtaining drug sensitivity results through the traditional AST method takes a long time and is difficult to meet the clinical demand for rapid and precise medication guidance. Therefore, the development of rapid, accurate and efficient AST technology has become an urgent need for clinical microbiology and precision medicine. Based on this current situation, this paper systematically reviews the new methods in the field of rapid drug sensitivity detection (RAST) in recent years, conducts in-depth analysis from aspects such as the principles, advantages, limitations and related clinical applications of various methods, and discusses the current challenges and future development directions of rapid drug sensitivity detection technology, aiming to provide corresponding technical references for clinical medical workers, researchers, etc. Promoting the clinical transformation and application of rapid drug sensitivity detection technology, enhancing the diagnosis and treatment techniques for infectious diseases, and ultimately alleviating the increasingly severe crisis of antibiotic resistance.

## Keywords

Antibiotic resistance ; Rapid drug sensitivity testing; Microfluidics ; Biosensor ; Single-cell analysis ;Molecular diagnosis

# 微生物药敏快速检测方法研究进展

黄敏慧<sup>1,2</sup>

1. 荆门市中心医院, 中国·湖北 荆门 448000

2. 荆楚理工学院附属荆门市中心医院, 中国·湖北 荆门 448000

## 摘要

抗生素耐药性 (Antimicrobial Resistance, AMR) 已成为威胁全球公共卫生的重要因素之一。目前, 临床常采用的抗菌药物敏感试验 (Antimicrobial Susceptibility Testing, AST) 是指导其合理使用抗生素、遏制耐药性蔓延的关键技术。然而, 通过传统 AST 方法获得药敏结果耗时长, 难以满足临床快速、精准用药指导的需求。因此, 发展快速、准确、高效的 AST 技术已成为临床微生物学和精准医学的迫切需求。基于此种现状, 本文系统性的回顾了近年来快速药敏检测 (Rapid drug susceptibility testing technology, RAST) 领域的新方法, 从各类方法的原理、优势、局限性及相关的临床应用等方面进行深入分析, 并探讨了快速药敏检测技术当前面临的挑战与未来发展方向, 旨在为临床医务工作者、研究人员等提供相应的技术参考, 促进快速药敏检测技术的临床转化与应用, 提升感染性疾病的诊疗技术, 最终能改善日益严峻的抗生素耐药危机。

## 关键词

抗生素耐药性; 快速药敏检测; 微流控; 生物传感器; 单细胞分析; 分子诊断

## 1 引言

自 1928 年, 苏格兰细菌学家亚历山大·弗莱明发现了世界上第一种抗生素—青霉素以来, 抗菌药物已成为治疗感染性疾病的核心手段, 为现代医学带来了革命性的改变<sup>[1]</sup>。然而, 随着抗菌药物的长期不合理使用使得微生物耐药性问题愈演愈烈。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计数据显示, 全球每年因耐药菌感染死亡的人数

已超过 70 万, 若不采取合理措施加以控制, 到 2050 年这一数字将突破 1000 万<sup>[2]</sup>。此外, 中国细菌耐药监测网 (China Antimicrobial Resistance Surveillance Network, CHINET) 在 2023 年发布的数据显示, 我国耐碳青霉烯肠杆菌科细菌 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) 的检出率已达 15.2%, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA) 的分离率在 30% 以上<sup>[3]</sup>。然而, 随着微生物耐药率的不断攀升, 将会引起感染性疾病治疗失败、患者住院时间延长、医疗费用增加, 高风险医疗操作后患者面临感染失控等一系列问题, 因此如何通过合理使用抗菌药物来降低微生物的耐药率是解决当前问题的关键

【作者简介】黄敏慧 (1997-), 女, 中国湖北荆门人, 硕士, 检验技师, 从事病原生物学研究。

一环。微生物 AST 作为指导临床抗菌药物选择的重要依据，其检测效率直接影响感染治疗效果。目前临床微生物实验室常采用的 AST 方法均需依赖细菌生长周期，通常需要一至两天甚至更长时间才能获取检测结果，难以满足急重症患者感染的快速诊疗需求。研究表明，全球约 35% 的耐药感染因检测延迟导致初始治疗方案失效，脓毒症患者每延迟 1 小时有效抗菌治疗，死亡率将增加 7.6%<sup>[4]</sup>。因此，开发高效、精准的 RAST 技术，缩短从样本采集到结果报告的时间窗口，对提高感染治愈率、减少广谱抗生素滥用、延缓耐药性传播具有重要的临床意义与公共卫生价值。

## 2 传统 AST 方法及其局限性

传统 AST 方法主要包括纸片扩散法、肉汤稀释法和自动化仪器法（如 VITEK、BD Phoenix 等）这三种，其工作原理均基于体外细菌培养，通过与相应的抗生素共同孵育 18 至 24 小时后观察其生长情况判断耐药性<sup>[6-7]</sup>。一份药敏结果从样本采集、病原体分离培养到最终检测终止实验室人员审核结果，通常需要 2-3 天的时间。在此期间，临床医生往往只能先经验性用药，可能因无法准确把握抗生素的使用剂量从而加剧其耐药性的产生与传播。因此，传统 AST 技术耗时长这一局限性已成为临床感染性疾病有效诊疗的瓶颈之一（表 1）。

表 1 传统 AST 方法的性能特征与局限性

检测方法	操作特点	检测周期	优势	局限性
纸片扩散法	定量抗生素纸片贴于琼脂平板，观察抑菌圈	18-24 小时	操作简便、成本低	主观性强，无 MIC 值，受培养基影响大
肉汤稀释法	梯度稀释抗生素与菌液混合，测最低抑菌浓度	18-24 小时	可定量 MIC，结果准确	操作繁琐，试剂消耗大，耗时长
自动化培养系统	比浊法 / 荧光法监测生长，自动判读最低抑菌浓度	4-15 小时	标准化高，效率提升	设备昂贵，对苛养菌检测能力有限

此外，传统方法对样本所含病原菌的纯度要求较高，必须使用纯培养物，对混合感染或病原体浓度较低的样本无法进行检测。因此，开发能够快速、准确的微生物快速药物敏感性检测技术，已成为临床迫切需求和科研热点。

## 3 微生物快速药物敏感性检测方法

近年来，微生物快速药物敏感性检测发展迅速。从 20 世纪末至 21 世纪初快速药物敏感性检测初步探索，通过聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）技术实现耐药基因快速扩增，将检测时间缩至数小时；到现在不断创新，质谱技术、微流控芯片、CRISPR 诊断、AI 优化、纳米材料联用等技术层出不穷，大幅提升了 AST 的检测效率与灵敏度，推动 AST 向快速化、精准化、便携化发展。

### 3.1 基于分子生物学检测的 RAST 方法

目前，该类技术是临床应用最成熟的快速检测技术之一。其优势在于不依赖于细菌的分离培养周期，通过直接检测复杂样本（血液、尿液、痰液等）中的耐药基因或突变位点，将检测时间缩短至 2 至 8 小时，且灵敏度高，特异性强，适用于已知耐药机制明确的病原菌<sup>[8]</sup>。

#### 3.1.1 核酸扩增技术

该技术可通过特异性放大耐药基因片段，使其数量呈指数级的增长，从而检出低丰度标志物，包括 PCR、实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time Quantitative PCR, qPCR）及数字聚合酶链式反应（Digital Polymerase Chain Reaction, dPCR）等，其中 qPCR 为目前临床常用的病原微生物耐药基因检测方法。qPCR 技术是通过设计特异性引物和探针，利用荧光信号积累实时监测整个扩增的进程，通过对扩增产物定量分析可靶向检测常见的耐药基因，如编

码  $\beta$ -内酰胺酶的 blaTEM、blaCTX-M、碳青霉烯耐药基因 blaKPC、blaNDM、blaOXA-48，以及甲氧西林耐药基因 mecA 等<sup>[9-12]</sup>。目前，针对临床常见的耐药基因的检测已经实现商业化并已在临床广泛开展使用，例如 MRSA 的 mecA 基因，其检测可在 1-2 小时内完成，显著缩短了诊断时间<sup>[13]</sup>。dPCR 技术是在传统的 PCR 技术基础之上逐渐发展起来的新型 AST 技术。与传统 PCR 技术不同的是 dPCR 技术先对检测样品进行微滴化处理，在经过 PCR 扩增之后，分析每一个微滴的荧光信号，根据泊松分布原理以及阳性微滴的个数与比例，就可以得出靶分子即时拷贝数或者浓度，实现单分子绝对定量，具有高灵敏度、特异性及精确度的特点<sup>[14]</sup>。

#### 3.1.2 高通量基因测序技术

近年来下一代测序（Next-Generation Sequencing, NGS）技术在检测细菌耐药领域迅猛发展并已在临床广泛开展应用，其中包括宏基因组测序技术（Whole Genome Sequencing, WGS）、靶向基因测序技术（Targeted Genomic Sequencing, tNGS）以及牛津纳米孔技术（Oxford Nanopore Technologies, ONT）。WGS 是通过获取病原体的全部基因序列，全面解析其基因组中的耐药基因与突变位点，实现耐药表型的精准预测<sup>[15]</sup>。基于 WGS 检测原理的特性，能无偏倚地检测出各类临床样本中所有潜在病原体，因此具有检测范围广、灵敏度高的优势，但是同时也存在数据分析复杂需配备专业数据分析人员，成本高，且需持续更新数据库以保持结果的准确性，因此限制了其临床应用<sup>[16]</sup>。tNGS 是一种基于超多重 PCR 扩增（或靶向捕获）与高通量测序技术相结合的新一代测序技术。tNGS 可实现直接对靶向基因进行测序，所需测序数据量较小，因此所需检测成本更低，周转时间也大幅缩短，且已在临床广泛开展应用<sup>[17-18]</sup>。

ONT是目前新兴地三代测序技术,该检测方法通过实时碱基识别和耐药基因比对,可在样本处理后数小时内完成测序,实现微生物的 RAST<sup>[19]</sup>。Chan<sup>[20]</sup> 等人为解决结核分枝杆菌检测时间成本高得问题,设计了一个检测结核病耐药性的纳米孔靶向测序平台,其特点是无需细菌分离培养,直接从临床所采集的样本中检测分析,整个过程仅需6~9小时,而传统的结核菌药敏试验通常需要2到8周,大大节约患者的时间成本。

### 3.2 基于质谱技术的 RAST 技术

基质辅助激光解析串联飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)是目前临床微生物室常见的一种质谱检测技术,它可通过检测病原体的蛋白指纹图谱实现菌种鉴定与耐药性分析。目前MALDI-TOF MS检测细菌的耐药性有三种方式,一是直接检测细菌水解特定抗生素的质谱峰。细菌耐药时产生某种特定酶(如 $\beta$ -内酰胺酶水解青霉素)来水解抗生素,其本质是切断抗生素分子的特定化学键,产生分子质量更小的水解产物,此时通过MALDI-TOF MS检测质谱捕捉抗生素被水解前后的分子质量变化,以此判断细菌是否具备水解该抗生素的能力<sup>[21]</sup>;二是鉴定与耐药性相关特定蛋白质谱峰。耐药菌株通常会特征性地表达某种耐药相关的特定蛋白质(如耐药酶、耐药基因编码蛋白),通过质谱检测菌株是否同样也存在特征质谱峰来判断细菌的耐药性<sup>[22]</sup>;三是通过分析抗生素作用前后细菌蛋白质谱的差异来推断药敏结果。这种检测方式采用的是直接直接靶板微滴生长法(direct-on-target microdroplet growth assay, DOT-MGA),将菌株与抗菌药物共同孵育数小时后将混合液滴于微孔板上,待干燥后MALDI-TOF MS进行鉴定<sup>[23]</sup>。Idelevich<sup>[24]</sup>等研究发现使用DOT-MGA检测方法可快速地检测铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌对美罗培南的耐药性。宋迪静<sup>[25]</sup>等采用DOT-MGA检测肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物敏感性发现,该方法在4-5小时就内得到到特定细菌对碳青霉烯类药物的表型结果,且与传统的微量肉汤稀释法的一致性较高。

### 3.3 基于光学成像与生物传感器的 RAST 技术

#### 3.3.1 拉曼光谱技术

拉曼散射是光与物质分子相互作用时,少数光子因与分子交换能量而改变传播方向和频率的现象,拉曼光谱技术是在此原理基础上通过检测光与分子相互作用后的频率变化来反向推导物质的分子信息,目前被广泛应用于生物化学、安防安检、微生物检验以及考古等多个领域<sup>[26-28]</sup>。将拉曼光谱技术应用于微生物药敏检测研究发现,当抗菌药物作用与细菌后,其代谢发生变化导致拉曼光谱特征峰的位移与强度改变,可以在1-4小时内实现快速区分敏感株与耐药株<sup>[29]</sup>。重水标记拉曼光谱也是目前拉曼光谱技术中的一个研究热点。在这项技术中将细菌培养在含有重水(D<sub>2</sub>O)的培养基中,活菌在代谢过程中会将氘中的氢原子掺入到新合成的生物分子(如蛋白质、脂质)中,导致C-D键的拉曼

信号在特定波数出现并增强,而受抗生素抑制的敏感菌代谢停滞,C-D信号不增强,通过对比加药组与不加药组的C-D键拉曼信号,即可判断细菌对药物的敏感性,实现抗菌药物MIC的快速检测。

#### 3.3.2 荧光成像技术

荧光成像技术是通过荧光探针可以与细菌的特定结构相结合,区分不同状态下的细菌,以达到可视化抗生素作用效果,实现耐药性的快速判定。例如活性荧光染料如钙黄绿素-AM具有渗透性,可通过细胞膜完整性进入细菌细胞,被酯酶水解后产生荧光,敏感菌株在抗生素作用下细胞膜破坏,荧光染料外溢荧光强度降低,而耐药菌株由于细胞膜的完整性因此任然保持强荧光,此荧光强度可利用时差成像显微镜进行观察,可动态监测细菌分裂速率,从而快速推断出抗菌药物的最低抑菌浓度。

## 4 挑战与展望

随着对RAST技术研究的不断的深入,其取得的成果在多重感染临床诊疗以及遏制多种耐药菌发生发展速度等方面具有重要的应用价值。然而关于RAST技术的所有研究最终的目的都将是走向临床并服务于临床,因此RAST技术除需具备快速、准确和稳定检测的特点外,还应具备低成本、标准化以及便于临床操作的优势。目前大部分RAST技术在推广临床方面仍然面临着许多挑战。首先是成本限制普及,WGS单次检测费用大概在500-2000元不等,试剂成本也较高;多重qPCR试剂盒200-500元/次,远远高于传统检测方法成本;且大部分所配备的设备价格昂贵,超出了基层医院所能承担的价格范围。其次,大部分RAST技术由于正处于临床开发中或推广初期,缺乏统一的性能评价标准,不同平台间结果难以比较,且大多缺乏大规模多中心临床验证数据。此外,其大部分结果解读复杂,例如WGS等产生大量数据需专业生物信息学知识支撑,因此实验室需配备专门的工作人员,对于人才培养的成本投入增加。

## 5 结语

微量肉汤稀释法、纸片法以及自动化技术等常规的AST方法因其具有易于使用,成本低以及临床普适度较高的优势,目前仍然大部分临床微生物实验室AST检测的主流方法。然而,随着多重耐药菌感染率与耐药率的逐年增高,为遏制抗菌药物耐药问题,提高抗菌药物合理利用的程度,RAST将是未来临床实验室病原微生物药敏检测的必然趋势。未来,希望通过多技术联用、智能化集成、便携化开发及标准化完善,使得RAST技术能实现从实验室到临床的全面渗透,从常见细菌到苛养菌、真菌的全面覆盖,从定性检测到定量分析、动态监测的全面升级。这不仅将彻底改变感染性疾病的诊疗模式,更将为遏制全球微生物耐药危机提供关键技术支撑,为保障人类健康作出重要贡献。

## 参考文献

- [1] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium,

- with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):780-90.
- [2] Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol.* 2020 Jan;88(1):26-40.
- [3] 2021年全国细菌耐药监测网感染性疾病科细菌耐药监测报告[J].*中华医院感染学杂志*,2023,33(22):3361-3369.DOI:CNKI:SU N:ZHYY.0.2023-22-001..
- [4] Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006 Jun;34(6):1589-96.
- [5] McCarley A, Becerra CA. Cultural incorporation of the Kirby-Bauer method in introductory microbiology lab. *J Microbiol Biol Educ.* 2025 Apr 24;26(1):e0001425.
- [6] 蔡爱斌, 吴文平. VITEK 2全自动细菌鉴定仪在临床微生物学中的应用与优势评估[J].*中国医疗器械信息*,2024,30(14):76-78+86.
- [7] Gordon, N. C., Poulter, M. D., Simner, P. J., Tamma, P. D., & Walker, A. S. . Rapid diagnostics for antimicrobial resistance. *The Lancet Microbe.* 2021;2(1), e10–e11.
- [8] Dung TTN, Phat VV, Vinh C, et al. Development and validation of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of six bacterial pathogens causing lower respiratory tract infections and antimicrobial resistance genes. *BMC Infect Dis.* 2024 Feb 7;24(1):164.
- [9] Rapid Identification of Bacterial Antibiotic Resistance by qPCR in Infants with Gram-Negative Septicaemia: A Proof-of-Concept Study. *Hong Kong J Paediatr.* 2023, 28 (3): 175-182.
- [10] 方咏梅,章燕,徐雪莹,等.金黄色葡萄球菌耐药性与耐药基因和毒力基因的相关性[J].*检验医学*,2023,38(04):357-361.DOI:CNKI:S UN:SHYY.0.2023-04-007.
- [11] Karlin-Neumann G, Bizouarn F. Entering the Pantheon of 21st Century Molecular Biology Tools: A Perspective on Digital PCR. *Methods Mol Biol.* 2018;1768:3-10.
- [12] Pan F, Han P, Wu Q, et al. Rapid prediction of antibiotic resistance in *Enterobacter cloacae* complex using whole-genome and metagenomic sequencing. *mSystems.* 2025, e00584-25.
- [13] Yin Y, Zhu P, Guo Y, et al. Enhancing lower respiratory tract infection diagnosis: implementation and clinical assessment of multiplex PCR-based and hybrid capture-based targeted next-generation sequencing. *EBio Medicine.* 2024 Sep;107:105307.
- [14] 曾泽霞,钟国权,赵亮,等.靶向二代测序在下呼吸道感染病原体检测中的应用价值[J].*医药前沿*,2025,15(26):133-137. DOI:10.20235/j.issn.2095-1752.2025.26.033.
- [15] Zhang P, Liu B, Zhang S, et al. Clinical application of targeted next-generation sequencing in severe pneumonia: a retrospective review. *Crit Care.* 2024 Jul 8;28(1):225.
- [16] Harris P N A. Rapid nanopore sequencing and predictive susceptibility testing of positive blood cultures from intensive care patients with sepsis[J]. *mSphere.* 2024, 9(1): e03065-23.
- [17] Chan WS, Au CH, Chung Y, et al. Rapid and economical drug resistance profiling with Nanopore MinION for clinical specimens with low bacillary burden of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Res Notes*,2020,13(1): 444.
- [18] Hleba L, Hlebova M, Kovaci Kova E, et al. MALDI-TOF MS Indirect Beta-Lactamase Detection in Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae*. *PubMed*,2024.
- [19] Cordovana M, et al. MALDI-TOF bacterial subtyping to detect antibiotic resistance[J]. *Clin Mass Spectrom.* 2021.
- [20] Tang H, Li R, Xu H, Lu G, Liu Z, Yang W, Xia Z, Zhu Y, Shen J. Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay for Detection of Bacterial Resistance in Positive Blood Cultures. *Infect Drug Resist.* 2021 Nov 6;14:4611-4617.
- [21] Idelevich E A, Spärbier K, Kostrzewa M, et al. Direct - on - target microdroplet growth assay for rapid detection of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using MALDI - TOF mass spectrometry. *Open Forum Infectious Diseases.* 2017, 4 (suppl\_1): S598.
- [22] 宋迪静,王瑶,李子健,等.数字微流控基因分析技术快速检测肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌碳青霉烯类耐药性的评价[J].*中华检验医学杂志*, 2022, 45(10): 1085-1090.
- [23] Wu Y, Wang Y, Mo T, Liu Q. Surface-enhanced Raman scattering-based strategies for tumor markers detection: A review. *Talanta.* 2024 Dec 1;280:126717.
- [24] Hassan M, Zhao Y, Zughair SM. Recent Advances in Bacterial Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosensors (Basel).* 2024 Aug 1;14(8):375.
- [25] 王凤婵,牛璐,叶海燕,等.基于重水标记拉曼光谱技术的铜绿假单胞菌快速药敏鉴定方法研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2025, 45 (8): 2253-2258.
- [26] Novikov A, Sayfutdinova A, Botchkova E, et al. Antibiotic Susceptibility Testing with Raman Biosensing. *Antibiotics (Basel).* 2022 Dec 14;11(12):1812.
- [27] 夏晓华,陆淼泉.流式细胞术应用于金黄色葡萄球菌体外药敏试验的初步研究[J].*中国人兽共患病杂志*,2003,(04):50-53.
- [28] Ferraro MJ. Potential impact of rapid microbiology tests in the prospective payment era. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1985 Nov;3(6 Suppl):65S-71S.
- [29] Resznetnik G, Hammond K, Mahshid S, et al. Next-generation rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Nat Commun.* 2024 Nov 9;15(1):9719. doi: 10.1038/s41467-024-53930-x. Erratum in: *Nat Commun.* 2025 Mar 21;16(1):2805.