

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.05.020

· 综述 ·

抗菌药物敏感性快速检测方法研究进展

Advances in rapid antimicrobial susceptibility testing methods

何渊慧(HE Yuan-hui)¹, 奕巧莲(YI Qiao-lian)^{2,3}, 杜文斌(DU Wen-bin)^{2,3}, 郑波(ZHENG Bo)¹

(1 北京大学第一医院 临床药理研究所, 北京 100034; 2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101; 3 中国科学院大学, 北京 100049)

(1 Institute of Clinical Pharmacology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[关键词] 抗菌药物; 敏感性; 快速检测; 研究进展

[中图分类号] R446.5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2018)05-0455-06

抗菌药物的发现是二十世纪巨大的医学成就。抗菌药物的使用大大降低了传染疾病的病死率,挽救了无数生命,也使以前的一些绝症,如结核病都有了治疗的方法。然而最近六十年,我们开始从抗菌药物的辉煌时代走向抗菌药物耐药性时代^[1]。2014年世界卫生组织发布了全球耐药报告^[2],指出抗菌药物耐药细菌正蔓延至全球各地。

细菌耐药严重威胁着人类健康,尤其是对于严重感染的患者,急需敏感度、特异度更高和更快速的检测方法,快速确定是哪种细菌感染,并分离病原微生物进行抗菌药物敏感试验(antimicrobial susceptibility testing, AST),以指导临床选择抗菌药物和相应剂量。传统检测药敏值的方法有肉汤稀释法(包括微量肉汤稀释法与宏量肉汤稀释法)、琼脂稀释法、E-test法及纸片扩散法等。宏量肉汤稀释法过程繁琐,在不同浓度抗菌药物溶液制备过程中易出差错;微量肉汤稀释法的主要缺点在标准化的商业平板中检测的药物种类较固定,药物浓度梯度少,在抗菌药物折点更新后可能无法覆盖折点;E-test方法缺点是抗菌药物品种有限,成本较高,且在检测

联合药敏时,由于系统误差, MIC 值会较高或较低^[3];此外,传统方法检测获得药敏结果常所需时间较长,易导致漏诊、误诊和延误治疗^[4-5]。因此,寻求新的快速、准确的病原菌耐药检测技术是实现临床耐药细菌感染快速和有效治疗的核心,也是突破当前抗菌药物滥用困境的关键。一些新型的药敏检测方法在不断涌现。本综述将近期基于分子生物学和适用于现场快速诊断的微型化、便携化抗菌药物敏感性快速检测方法的研究进展作系统阐述。

1 自动化检测仪器

微生物自动鉴定及药敏测试系统结合微量快速培养基和微量生化反应系统,实现了药敏检测的自动化和机械化,使得原来缓慢、繁琐的手工操作变得快速、简单。典型的产品有法国生物梅里埃公司(BioMérieux) VITEK 2 德灵公司(MicroScan)的 Walk Away SI 以及 BD 的 PHOENIX 等。不同自动化仪器价格昂贵,通常依赖数据库的更新与补足,方便有余,灵活不足。见表 1。

[收稿日期] 2017-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金面上基金资助项目(81171612);首都临床特色应用研究与推广项目(Z161100000516040)

[作者简介] 何渊慧(1990-),女(汉族),湖南省永州市人,硕士研究生,主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 郑波 E-mail:doctorzhengbo@163.com

表 1 市面常见的微生物自动鉴定及药敏测试系统

项目	VITEK 2 Compact (bioMérieux)	Walk Away SI (MicroScan)	Phoenix (BD)
测试卡设计	封闭式卡片	开放式卡片	开放式卡片
测试卡需额外加试剂	否	是	是
菌液配制	手工	手工	手工
鉴定菌悬液体积	3 mL	4.5~8 mL 专用肉汤	4.5~8 mL 专用肉汤
接种试卡与封口	全自动	全手工接种	全手工接种
药敏试验	动态比浊法	比浊法(2 倍稀释法)	显色法或比浊法
所需时间(革兰阴性杆菌, h)	5~7	15~18	6~18
所需时间(革兰阳性球菌, h)	5~7	15~18	5~10

2 基于分子生物学的药敏检测方法

2.1 以实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative PCR, qPCR)为基础的检测方法 qPCR 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团(染料或探针),利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[6]。qPCR 应用于 AST,主要通过扩增产物的定量检测,反映不同药物浓度下细菌的生长情况,以实现快速检测。

目的基因的恰当选择对检测技术的灵敏度至关重要,并在一定程度上影响实验结果^[7]。Harris 等^[8]同时扩增 *pbp2b* 与 *lytA* 基因,快速诊断肺炎链球菌感染,发现其检测细菌灵敏性高于同研究中以管家基因 16S rRNA 为目的基因的 qPCR 的 100 倍以上;*pbp2b* 的检测结果反映肺炎链球菌对青霉素的药敏。Peuchant 等^[9]以沙眼衣原体功能不同的 *omp1*、*omp2*、16S rRNA,以及 Hsp60 编码基因 *groEL1* 四种基因作为目的基因监测菌体的生长,最终选择灵敏度高特异性好的 *omp1* 作为目的基因,检测沙眼衣原体对氧氟沙星、莫西沙星、阿奇霉素、多西环素的药敏。

在不同的耐药性检测中,相同细菌选择的的目的基因以管家基因 16S rRNA 居多^[7, 10-13],但也有选择其他作为目的基因者,如结核分枝杆菌以特有基因 *rpoB* 作为目的基因^[13]。检测不同药物对幽门螺杆菌的药敏时,以 23S rRNA、*gyrA* 为目的基因^[12, 14],有研究先用管家基因 16S rRNA 鉴定细菌种属,再以 23S rRNA 为目的基因检测幽门螺杆菌对克拉霉素的药敏^[12]。与检测耐药基因反映细菌的耐药性不同,Kearns 等以青霉素敏感基因 *pbp2b* 作为目的基因,反映肺炎链球菌对青霉素的 AST^[15]。

2.2 分子生物学法定义最低抑菌浓度(MIC)以及

检测 MIC 的最佳时间点 不同的研究对 MIC 的定义不同,检测 MIC 的最佳时间也不同。处于发展阶段的分子生物学检测技术目前无统一指南,需研究者继续探索。

Hamasuna 等^[16]每周一次体外试验检测尿道支原体,连续 4 周监测其生长, MIC 定义为引起 99%抑制率的最低药物浓度,抑制率(%) = [(质控组中 DNA 量 - 测试组中 DNA 量) / 质控组中 DNA 量] × 100%。由于第四周与第三周的 MIC 值相同,最终选择第三周作为检测 MIC 值的最佳时间点; Aloni-Grinstein 等^[17]检测细菌 1 次/h,连续 48 h 监测细菌在不同浓度药物下的生长,最终选择细菌与药物混合培养的 24 h 作为 MIC 值检测的最佳时间, MIC 定义为无肉眼可见的细菌,且能降低细菌浓度至低于质控菌 OD630 的 10%时的最低药物浓度。Peuchant 等^[9]在细菌与药物共同培养后的 0、3、6、12、16、21、25、29、36、45 和 53 h 分别进行检测,由于检测细菌的 4 种基因在 30 h 后均处于静止状态,因此,以 30 h 作为读取 MIC 值的最佳时间点, MIC 定义为与最初细菌 DNA 浓度有相同值的最低药物浓度。

2.3 反转录 PCR 法 用反转录 PCR 检测细菌的耐药性^[18],相比于以提取的 DNA 直接作为反应模板的荧光定量 PCR 法,反转录 PCR 花费时间长,检测成本高。Peuchant 等^[9]用反转录 PCR 对 mRNA 进行定量检测,验证研究中目的基因是否转录,将 MIC 定义为能抑制基因转录的最低药物浓度 qPCR 法能快速准确获取药敏结果,但需更多样本进行验证;部分 PCR 或以 PCR 为基础的分子生物学方法通过检测耐药基因反映细菌药敏有一定的局限性,毕竟与细菌表型耐药有关又确定的基因有限,而细菌对氟喹诺酮类、氨基糖苷类、大环内酯类等抗菌药物的耐药又涉及成百上千的基因突变与多种耐药机制的表达,难以通过简单的基因检测确定。

3 基于微流控芯片的药敏检测新方法

微流控芯片将生化领域中的样品前处理、检测等操作,经由微纳米通道集成到一块厘米级别的芯片上应用于临床诊断,相对传统方法更快、更灵敏。在药敏检测领域,利用微流控检测细菌耐药性主要有单细胞检测,以及与药敏相关的生化物质检测。见表 2。

表 2 基于微流控芯片的药敏检测方法

检测内容	检测方法	检测物质
单细胞检测	液滴微流控	细胞分裂
	显微成像	单细胞分裂形态
	微悬臂	细胞膜
物质检测	显色反应	活死细胞指示、pH 指示
	电化学	16S rRNA、代谢产物
	质谱	抗性蛋白

3.1 基于药敏相关的生化物质检测 药敏 耐药菌与敏感菌在抗菌药物作用下会表现出不同的生化指标,利用这些指标的不同可区分耐药菌与敏感菌。Besant 等^[19]利用活细胞和死细胞指示剂的氧化还原反应检测细菌的代谢活动,并通过电化学信号读取表征细菌的耐药情况,减少了预培养富集环节,1 h 内即可获得耐药表型结果。Mach 等^[20]将泌尿道感染采集的尿样品直接与含抗菌药物培养基培养 2.5 h 后,利用电化学定量检测细菌 16S rRNA 水平可得到细菌耐药表型,从收集尿样本到获得检测结果仅需 3.5 h。Burckhardt 等^[21]直接利用 MALDI-TOF 鉴定菌种并检测 NDM-1、VIM-1、VIM-2、KPC-2 和不同种类的 IMP 酶获得细菌对碳青霉烯类药物的耐药情况,较之传统的利用光密度检测方法,质谱检测更精准并快捷,在 1~2.5 h 内即可获得检测结果。MALTI-TOF 还不能检测所有与耐药相关的蛋白,以上这些方法依赖复杂的仪器,芯片的制作复杂,不利于推广。

3.2 微流控 pH 感应器检测法 监测代谢产物可应用于细菌的功能测定^[22-23]。在细菌培养过程中,生长培养基由于葡萄糖或糖代谢产物有机酸的积累变得酸化,监测培养基 pH 值的变化已成为细菌功能分析常用方法之一。抗菌药物可抑制细菌的生长,降低葡萄糖代谢率。检测固定在纳升孔道中快速积累的细菌代谢产物,避免了耗时的预孵育,从而减少检测时间。有效光学厚度^[24]作为光学信号,可

反映由 pH 值变化引起的壳聚糖水凝胶的溶胀,通过监测 EOT 增加率,确定抗菌药物对细菌的抑制作用。

实验中,每 20 min 检测了一次,监测时长约 3 h。依据抑制率定义抗菌活性,抑制率的公式: $I = (\Delta EOT_{\text{blank}} - \Delta EOT_{\text{antibiotic}}) / \Delta EOT_{\text{blank}}$; 公式中 $\Delta EOT_{\text{blank}}$ 和 $\Delta EOT_{\text{antibiotic}}$ 分别代表在该时期无抗菌药物样本和有抗菌药物样本 EOT 的变化。

基于抑制率的 MIC 检测方法尚未确定,不同时期检测的 MIC 值大不相同,检测 MIC 值的最佳时间仍在探索中,但最多需要 2 h。反应中菌液最初浓度与微量肉汤稀释法的最初浓度 5×10^5 CFU/mL 一致,而药物的浓度范围为包括由美国临床实验室标准化协会(CLSI)指南推荐的用于临床分离菌中检测 MIC 抗菌药物浓度内的连续 5 个 2 倍稀释梯度浓度^[25]。

微流控 pH 感应器检测法获得 AST 检测结果所需时间短,能在细菌的代谢水平上检测细菌的药敏值,培养时间不同, MIC 值明显不同,对 MIC 值检测的最佳时间的确定将是该研究的另一探索。

3.3 微流控检测细胞膜机械压力 机械压力和酶的联合作用破坏细菌的生物膜,药物能干扰敏感菌修复生物膜系统,却不能干扰耐药菌,荧光标记的生物膜以呈现的颜色不同被分为活细菌与死细菌,利用该装置收集的不同荧光信号,以细菌死亡的速度确定细菌的表型(易感与抗性),反映细菌的药敏,分别用甲氧西林耐药、敏感的质控菌作为模型,建立检测体系后,用 16 株临床分离金黄色葡萄球菌进行验证。

研究中每 2 min 检测一次,连续监测 60 min,该监测提供了定量信息,不需 MIC 检测,即可提供一个客观的药敏评价标准。由于药液菌液混合培养 60 min 为细菌死亡率最高的时期,该研究以此作为 AST 检测的最佳时间点。经验性的以模型细菌死亡率的 0.5%、1% 分别作为敏感与中介、中介与耐药的交界点,以此建立敏感、中介、耐药的检测标准,对细菌的耐药敏感与否进行定性分析。同时对苯唑西林 10、50 mg/L 检测浓度进行摸索,由于 50 mg/L 的检测结果更接近以纸片扩散法作为对照方法的检测结果,被选择作为细菌耐药性的检测浓度^[26]。该方法从表型分析细菌耐药性,快速获得 AST 检测结果。研究着重于机械力和酶的破坏力^[27-28],经验性建立的耐药、中介、敏感的交界标准,也需进一步验证,且不能检测细菌对抑菌剂的药敏状况。

3.4 单细胞检测药敏 单细胞检测可有效避免传统方法中生长富集的过程。Liu 等^[29]将待检菌与含有抗菌药物的培养基一起包裹在皮升级液滴中共培养,利用耐药菌增殖改变光学性质,从而筛选出耐药菌得到药敏结果,但该方法存在的问题是每次只能进行一种条件的筛选。Choi 等^[30]在显微镜下追踪单细菌在抗菌药物作用下发生的形态变化,通过研究细菌的分裂行为,得到细菌的耐药表型,高分辨显微识别分析图像需要相应的仪器支持,限制了其检测通量。Baltekin 等采用微流控芯片捕获临床分离样本中的细菌,用显微镜观察多个单细菌在不同浓度下的生物反应状况,30 min 即可获得细菌对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、美西林、多利培南、环丙沙星、左氧氟沙星、磷霉素、呋喃妥因、磺胺等临床治疗泌尿系感染常用的 9 种药物的药敏结果^[31],但该研究检测对象只有大肠埃希菌,并未涉及肠球菌属细菌等其他种类细菌。Longo 等^[32]提出了一种基于原子力显微镜的检测方法,在该方法中,悬臂可以在细菌低浓度的情况下表征细菌的代谢活动,通过检测细胞膜的变化,在十分钟内读取细菌对抗菌药物的敏感性,该方法只能得到粗略的耐药结果,且所需仪器操作要求高,不利于推广。

基于单细胞的药敏检测虽然缩短了单次检测时间,但增加了检测总量,实际并没有提高检测效率。

4 其他快速药敏检测方法

4.1 Micromax 试剂盒 原理:研究者利用 Micromax 试剂盒,检测细菌在含不同浓度药物的培养基中生长时 DNA 的状况,判断细菌对药物的敏感、中介及耐药情况。依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)指南,Bou 等^[33]选择细菌敏感、中介、耐药等 4 个药物折点浓度,将试验菌株分别与不同浓度的药物在培养基中共同培养 60 min,并对试验细菌的 DNA 进行染色。细菌在 CLSI 定义为敏感浓度的药物中孵育 60 min,DNA 出现扩散的现象,则该细菌对该药物敏感;细菌在 CLSI 定义为中介浓度的药物中孵育 60 min,DNA 才出现扩散的现象,则该细菌对该药物为中介;细菌在 CLSI 定义为耐药浓度的药物中保持完整或者在比耐药浓度更高浓度的药物中孵育 60 min 后 DNA 才出现扩散的现象,则该细菌对该药物耐药。

Bou 等先用该方法分别检测标准菌株对美罗培南、环丙沙星的药敏情况,再用 322 株临床分离菌株

进一步验证,以微量肉汤稀释法和 E-test 法的检测结果作为对照,新方法 60 min 即可获得与对照方法完全一致的检测结果。虽然在检测过程中,检测背景里会出现多余的 DNA 片段,但由于检测背景可变,这些片段的量较少,而且只是在与抗菌药物共同孵育前的培养基中出现,并不会影响检测结果的判断^[33]。

该方法准确快速获取定性药敏检测结果,未涉及细菌对抑菌剂的药敏检测,但还需要更多种类的抗菌药物和更多种类的细菌进一步验证。

4.2 SERS-AST 法 该技术监测细菌的活性,赋予其光谱特异性。当细菌与不同浓度药物混合后,由细菌表面特异性标志物减少引起的拉曼散射(surface-enhanced Raman spectroscopic, SERS)光谱强度 2 h 内下降,依据下降的比例反映细菌的 AST 结果。

研究者分别在细菌与药物混合后培养的 0、1、2、4、6 h 进行检测,并监测细菌的生长,取 2 h 作为检测 MIC 值的最佳检测时间,革兰阳性菌: $r730 < 0.5$; 革兰阴性菌: $r654 < 0.5$ 或 $r724 < 0.5$ ($r730/r654/r724$ 为分别在 730/cm、654/cm、724/cm 处拉曼散射峰的信号率),作为判断抗菌药物发挥活性的标准。MIC 值检测时间点定为混合培养后 2 h,这是综合药物治疗效果之后的经验性选择。药物浓度设置为包含标准浓度在内的由低至高的 4 个浓度,并探索性的设置最初检测细菌浓度为 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 CFU/mL 三个等次,最终选择与微量肉汤稀释法药敏结果最接近的 1×10^6 CFU/mL 作为检测细菌的最初浓度^[29]。

SERS-AST 法所得 AST 检测结果与微量肉汤稀释法结果基本一致,传统方法需过夜培养,而该方法只需菌液与药物共同培养 2 h。研究者经验性的选择革兰阳性菌 $r730 < 0.5$,革兰阴性菌 $r654 < 0.5$ 或者 $r724 < 0.5$ 作为有抗菌活性的评判标准,仍需进一步验证;值得一提的是该仪器的最低检测限为 1×10^5 CFU/mL,在一定程度上限制了 MIC 值的检测;SERS-AST 法检测成本亦不容忽视;另外,其只检测了细菌对苯唑西林与亚胺培南的药敏,对于抑菌剂等其他种类的药物需要更多验证。

5 总结

多种检测技术的兴起为临床提供快速的 AST 检测结果,qPCR 法 3 h 即可获得结果^[17],敏感度

高,污染低,操作容易且结果准确^[34],其他方法检测时间更短^[26,29,33],能够获得传统药敏检测方法难以得到的药敏值,特别适用于传统培养皿中不能生长或生长缓慢的病原微生物^[16],为治疗效果提供重要信息^[8],使患者从昂贵的广谱抗菌药物转向更精准实惠的药物,有利于减少耐药细菌的产生。

mRNA 水平的基因表达分析结果仅能提示蛋白水平或功能学的改变,而非确证^[35]。目前,有限的证据说明突变类型和抗菌药物耐药性水平有关,但不可能十分准确地从分子水平预测其耐药水平^[36]。而 SERS-AST 法通过监测细菌表面特异性标志物的光谱强度在不同药物浓度中下降的比例,反映细菌的 AST 结果;微流控 pH 感应器检测法通过监测细菌在不同浓度药物中代谢产物引起培养基 pH 值的变化,获得 AST 结果;微流控平台检测法利用耐药或者敏感细菌能否在药物干扰下修复生物膜系统,反映细菌的耐药与否。

依据细菌谱进行传统法培养对监测细菌生长意义重大,研究者在实验设计中应根据自己的研究目的选择最适宜的检测方法^[7]。Lehours 等^[37]建议,实验者在标准微生物培养失败后,方考虑分子生物学方法。

庆大霉素处于高浓度方有抑菌作用^[38],药物处理至少 32 h 后才有对抗胞内生长菌作用^[17],处理 5 d 后才完全发挥作用^[39]。由此看来,检测慢性细胞膜渗透药物对微生物的药敏时,分子生物学检测技术尚待考虑。

上述研究均有不足,大多强调需要更大样本量的验证,并未提及检测成本^[29,40-41]。AST 检测新技术仍在发展中,并未取代传统方法^[29],检测成本是 qPCR 检测技术广泛应用于临床细菌 AST 检测的主要障碍^[16]。

[参 考 文 献]

[1] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance[J]. Science, 1992, 257(5073): 1064 - 1073.

[2] WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [R]. WHO, 2014.

[3] Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(11): 1749 - 1755.

[4] Kontopidou F, Galani I, Panagea T, et al. Comparison of direct antimicrobial susceptibility testing methods for rapid analysis of bronchial secretion samples in ventilator-associated pneumonia[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(2): 130 - 134.

[5] Boyer A, Medrano J, Mzali F, et al. Direct testing of bronchoalveolar lavages from ventilator-associated pneumonia patients[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(2): 107 - 110.

[6] 蒋春燕, 王泰健, 王琴, 等. 实时荧光定量 PCR 技术[J]. 动物医学进展, 2005, 26(12): 97 - 101.

[7] Schmalz G, Tsigaras S, Rinke S, et al. Detection of five potentially periodontal pathogenic bacteria in peri-implant disease: A comparison of PCR and real-time PCR[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(3): 289 - 294.

[8] Harris KA, Turner P, Green EA, et al. Duplex real-time PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples and determination of penicillin susceptibility[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2751 - 2758.

[9] Peuchant O, Duvert JP, Clerc M, et al. Effects of antibiotics on *Chlamydia trachomatis* viability as determined by real-time quantitative PCR[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 4): 508 - 514.

[10] Pholwat S, Ehdaie B, Foongladda S, et al. Real-time PCR using mycobacteriophage DNA for rapid phenotypic drug susceptibility results for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 754 - 761.

[11] Eick S, Ramseier CA, Rothenberger K, et al. Microbiota at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study[J]. Clin Oral Implants Res, 2016, 27(2): 218 - 225.

[12] Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, et al. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* quantification and detection of clarithromycin resistance in gastric tissue from patients with gastrointestinal disorders[J]. Res Microbiol, 2012, 163(2): 109 - 113.

[13] Rolain JM, Mallet MN, Fournier PE, et al. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(2): 538 - 541.

[14] Yamada M, Sugimoto M, Uotani T, et al. Resistance of *Helicobacter pylori* to quinolones and clarithromycin assessed by genetic testing in Japan[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(9): 1457 - 1461.

[15] Kearns AM, Graham C, Burdess D, et al. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 682 - 684.

[16] Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by TaqMan 5' nuclease real-time PCR[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(12): 4993 - 4998.

[17] Aloni-Grinstein R, Shifman O, Lazar S, et al. A rapid real-time quantitative PCR assay to determine the minimal inhibitory extracellular concentration of antibiotics against an intracellular *Francisella tularensis* live vaccine strain[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1213.

[18] Cross NA, Kellock DJ, Kinghorn GR, et al. Antimicrobial

- susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis* using a reverse transcriptase PCR-based method[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(9): 2311 - 2313.
- [19] Besant JD, Sargent EH, Kelley SO. Rapid electrochemical phenotypic profiling of antibiotic-resistant bacteria [J]. Lab Chip, 2015, 15(13): 2799 - 2807.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Cira NJ, Ho JY, Dueck ME, et al. A self-loading microfluidic device for determining the minimum inhibitory concentration of antibiotics[J]. Lab Chip, 2012, 12(6): 1052 - 1059.
- [23] Huang Y, Sudibya HG, Chen P. Detecting metabolic activities of bacteria using a simple carbon nanotube device for high-throughput screening of anti-bacterial drugs[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(10): 4257 - 4561.
- [24] Pittet D, Allegranzi B, Storr J, et al. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries[J]. J Hosp Infect, 2008, 68(4): 285 - 292.
- [25] 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.
- [26] Kalashnikov M, Lee JC, Campbell J, et al. A microfluidic platform for rapid, stress-induced antibiotic susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* [J]. Lab Chip, 2012, 12(21): 4523 - 4532.
- [27] Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics[J]. Cell, 2007, 130(5): 797 - 810.
- [28] Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(6): 423 - 435.
- [29] Liu CY, Han YY, Shih PH, et al. Rapid bacterial antibiotic susceptibility test based on simple surface-enhanced Raman spectroscopic biomarkers[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23375.
- [30] Choi J, Yoo J, Lee M, et al. A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(267): 267ra174.
- [31] Baltekin O, Boucharin A, Tano E, et al. Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(34): 9170 - 9175.
- [32] Longo G, Alonso-Sarduy L, Rio LM, et al. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors[J]. Nat Nanotechnol, 2013, 8(7): 522 - 526.
- [33] 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.
- [34] Scaletsky IC, Aranda KR, Garcia GT, et al. Application of real-time PCR stool assay for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in Brazilian children [J]. Helicobacter, 2011, 16(4): 311 - 315.
- [35] Patel BK, Banerjee DK, Butcher PD, et al. Determination of *Mycobacterium leprae* viability by polymerase chain reaction amplification of 71-kDa heat-shock protein mRNA[J]. J Infect Dis, 1993, 168(3): 799-800.
- [36] Elviss NC, Lawson AJ, Owen RJ. Application of 3'-mismatched reverse primer PCR compared with real-time PCR and PCR-RFLP for the rapid detection of 23S rDNA mutations associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 23(4): 349 - 355.
- [37] Lehours P, Siffré E, Mégraud F. DPO multiplex PCR as an alternative to culture and susceptibility testing to detect *Helicobacter pylori* and its resistance to clarithromycin [J]. BMC Gastroenterol, 2011, 11: 112.
- [38] Fenollar F, Maurin M, Raoult D. *Wolbachia pipientis* growth kinetics and susceptibilities to 13 antibiotics determined by immunofluorescence staining and real-time PCR [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(5): 1665 - 1671.
- [39] Sutera V, Caspar Y, Boisset S, et al. A new dye uptake assay to test the activity of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2014, 4: 36.
- [40] Huang TH, Ning X, Wang X, et al. Rapid cytometric antibiotic susceptibility testing utilizing adaptive multidimensional statistical metrics [J]. Anal Chem, 2015, 87(3): 1941 - 1949.
- [41] Hombach M, Somoskövi A, Hömke R, et al. Drug susceptibility distributions in slowly growing non-tuberculous mycobacteria using MGIT 960 TB eXiST [J]. Int J Med Microbiol, 2013, 303(5): 270 - 276.