

DOI:10.13350/j.cjpb.230722

• 综述 •

## 多黏菌素耐药检测技术研究进展\*

丰俊<sup>1</sup>, 徐桢<sup>2</sup>, 庄源<sup>1</sup>, 刘明香<sup>3</sup>, 陈涌<sup>1</sup>, 罗嘉远<sup>1</sup>, 吴艺童<sup>1</sup>, 费加艺<sup>1</sup>, 陈敏<sup>1\*\*</sup>

(1. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2. 上海健康医学院; 3. 虹口区疾病预防控制中心)

**【摘要】** 多黏菌素是由芽孢杆菌产生的针对革兰阴性菌尤其是多重耐药菌(Multi-drug resistance, MDR)以及耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)的最后一道防线。我国目前已有3种注射用多黏菌素类药物用于临床,由于药物筛选压力,革兰阴性菌对多黏菌素耐药的风险增加。本文综述了目前多黏菌素耐药的检测技术,并分析了不同技术的应用场景、优势及其存在的挑战,为多黏菌素耐药的快速检测提供科学依据。

**【关键词】** 多黏菌素; 耐药; *mcr-1*; 快速; 检测; 综述

**【中图分类号】** R378

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)07-0854-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jul;18(7):854-859.]

### Research progress on detection technology of colistin resistance

FENG Jun<sup>1</sup>, XU Zhen<sup>2</sup>, ZHUANG Yuan<sup>1</sup>, LIU Mingxiang<sup>3</sup>, CHEN Yong<sup>1</sup>, LUO Jiayuan<sup>1</sup>, WU Yitong<sup>1</sup>, FEI Jiayi<sup>1</sup>, CHEN Min<sup>1</sup> (1. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2. Shanghai Institute of Health Sciences; 3. Hongkou District Center for Disease Control and Prevention)

**【Abstract】** Colistin, produced by *Bacillus* sp., is considered as the last line of defense against Gram-negative bacteria, especially for multidrug-resistant (MDR) bacteria and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). Currently, three injectable colistins are applied to in clinical use in China, which lead to an increased risk of resistance in Gram-negative bacteria due to the pressure of drug screening. This article reviews current techniques for the detection of resistance to colistin and analyzes the application scenarios, advantages, and challenges of different techniques to provide a scientific basis for the rapid detection of resistance to colistin.

**【Key words】** colistin; drug resistance; *mcr-1*; rapid; test; review

\*\*\*多黏菌素是一种多肽类抗生素,于1947年首次发现,主要成分为多黏菌素B和粘菌素(多黏菌素E),并于20世纪50年代开始广泛应用于临床和养殖业。由于其具有肾毒性和神经毒性,以及新一代广谱抗生素的研发和应用,限制了该类药物的临床使用。但最近二十年,随着以鲍氏不动杆菌和铜绿假单胞菌为主的多重耐药菌以及耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的出现<sup>[1]</sup>,多黏菌素重新受到重视,一度被认为是治疗MDR和CRE感染的最后一道防线,已成为棘手的全球性问题(图1)<sup>[2]</sup>。因此,要严格探寻多黏菌素的临床使用指征,合理规范使用多黏菌素,并加强多黏菌素耐药情况的监测,最大程度地遏制多黏菌素耐药菌株的传播。而快速、准确、灵敏的检测技术对于多黏菌素耐药的防控和治理、临床的规范治疗等至关重要<sup>[3]</sup>,本文综述了目前多黏菌素耐药的检测技术,并分析了不同技术的应用场景和利弊情况,为多黏菌素耐药的快速检测提供科学依据。

### 1 多黏菌素质粒介导的耐药机制

多黏菌素的主要靶器官是脂质A,对多粘菌素的耐药机制最常见的就是修饰脂质A相关的基因发生突变<sup>[4]</sup>。*mcr-1*基因是首次在人及生猪肉中发现的,可以让细菌对多黏菌素类药物产生耐药性的一种新基因<sup>[5]</sup>。该基因编码磷酸乙醇胺转移酶,使其自身外膜中的脂质A与磷酸乙醇胺基团共价连接形成一个静电网,降低多黏菌素与脂多糖的结合作用,从而产生耐

药性<sup>[6]</sup>。Suardiaz等<sup>[7]</sup>通过集群模型确定了该过程的反应机制将磷酸乙醇胺从膜磷脂供体转移到受体Thr285形成共价磷酸中间体,磷酸乙醇胺基团转移到脂质A上。

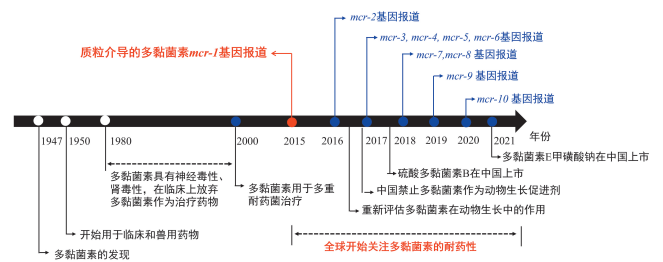


图1 多黏菌素的应用及耐药基因发现历程  
Fig. 1 Milestones of colistin application and its resistance gene emergence

\* **【基金项目】** 上海市加强公共卫生体系建设三年行动计划(2023-2025年)项目(No. GWVI-3)。

\*\* **【通讯作者】** 陈敏, E-mail: chenmin@scdc.sh.cn

**【作者简介】** 丰俊(1983-),男,浙江龙游人,博士,副研究员,从事病原体耐药快速检测及其机制研究。  
E-mail: fengjun@scdc.sh.cn  
丰俊和徐桢为共同第一作者。

## 2 多黏菌素耐药的检测方法

### 2.1 表型检测方法

#### 2.1.1 肉汤微量稀释法(Broth microdilution method, BMD)

由于多黏菌素颗粒较大导致其在琼脂中扩散性差,2016年起欧洲药敏试验联合委员会不再建议使用纸片扩散和梯度测试等进行多黏菌素药敏测试<sup>[8]</sup>。BMD是目前多黏菌素耐药表型检测的主要手段。美国临床和实验室标准协会和欧洲药敏试验联合委员会对多黏菌素药敏试验进行了评估,得出BMD应作为药敏试验参考方法的结论。但BMD必须使用多黏菌素的硫酸盐,带有阳离子的 Mueller-Hinton 肉汤,无添加剂和使用未经处理的聚乙烯材质<sup>[9]</sup>。因此,该方法不适用于大多数临床微生物实验室<sup>[10]</sup>。

因此,多家公司将基于BMD方法但更易于使用的药物敏感性实验方法及相关产品推向市场<sup>[11]</sup>。总体上这些方法都表现出了良好的检测能力(Category agreement, CA 和 Essential agreement, EA,两者均在90%左右)。但不同的品牌、相同品牌不同实验条件下的测试性能存在着较大差异。Matuschek等<sup>[12]</sup>对5种商业BMD产品进行测试,结果都与参考测试有良好的相关性。Sensitre、MICRONAUT-S以及MICRONAUT MIC-trip, EA分别为96%、96%以及99%, CA分别为95%、89%以及91%。SensiTest和UMIC的结果稍差, EA分别为88%和82%, CA为89%和92%。相较于Matuschek等的测试,在Carretto等<sup>[13]</sup>的测试中, SensiTest表现出了良好的相关性, EA为96.0%、CA为98.9%,且在稳定性及重现性方面也表现良好。而在Matuschek等测试中表现最好的Sensitre,在Yusuf等<sup>[11]</sup>的测试中表现稍差, EA为87%、CA为93%。造成这一现象的原因有较多,既与来自不同地域生产者的技术不同有关,也与测试者所用的菌株不同有着密切关联。

#### 2.1.2 NP(Nordmann/Poirel)测试法

快速多黏菌素 NP 测试基于在给定浓度的多黏菌素存在下检测与细菌生长相关的葡萄糖代谢,主要针对发酵菌。当菌株生长时,酸代谢会在不到2 h内形成,并通过红色苯酚的颜色变化(橙色到黄色)来显示<sup>[14]</sup>。与BMD相比,由Nordmann等<sup>[15]</sup>开发的快速多黏菌素 NP 测试最明显的优势就是快速,最多需要5 h,远少于BMD所需的24 h<sup>[16]</sup>。在价格方面, NP 测试费用0.49美元,适合于一些资源有限的实验室<sup>[17]</sup>。在检测非发酵菌如铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等, Nordmann等开发了一种快速检测铜绿假单胞菌/鲍曼不动杆菌 NP 测试。该方法的原理是,通过肉眼观察在含有确定浓度的多黏菌素培养基中生长的活细胞将 resazurin 试剂还原时的颜色变化(从蓝色到紫色或粉色)<sup>[18]</sup>。同时, Sadek等<sup>[19]</sup>还开发了一种快速多黏菌素/铜绿假单胞菌 NP 测试,主要考虑到铜绿假单胞菌生长过程中碱性物质的产生,通过溴甲酚颜色的变化进行检测,结果在3 h内呈现。与BMD对比,该试验的灵敏度和特异性分别为100%和95%。NP测试法具有快速、准确、灵敏且成本低等特点,结果可在24 h内获得,更加有利于多黏菌素耐药的早期检测,可以作为多黏菌素耐药监测的重要初筛工具。

#### 2.1.3 其他表型筛查方法

BMD方法衍生的商业自动化AST系统也已经普及,大多数实验室都将这些自动化系统作为首选方法。但这些系统的性能差异主要取决于制造商,如

Chung等<sup>[20]</sup>试验发现VITEK2系统极重大误差率较高(9.9%);Anantharajah等<sup>[21]</sup>发现BD Phoenix和MicroScan自动化AST系统可为肠杆菌中多黏菌素的检测提供准确且可重复的分类结果,但结果与Pfennigwerth等<sup>[22]</sup>的结果相差较大。与BMD相比,虽然自动化方法可以评估多黏菌素的药物敏感性,但由于多黏菌素浓度梯度较少,因此MIC的确定并不太准确,特别是在折点附近时<sup>[23]</sup>。同时,由于自动化系统的一次性耗材成本较为昂贵,对于资源有限的实验室而言较为困难<sup>[24]</sup>。

### 2.2 分子检测方法

表型检测在成本上往往较低,但由于药物与试剂或材料的特定相互作用以及其特定的分子结构,导致大多数表型检测方法较为繁琐或结果并不完全可靠<sup>[24]</sup>,且无法准确甄别耐药基因,因此针对耐药基因的分子检测技术就显得尤为重要。

#### 2.2.1 常规PCR技术

一般认为,PCR检测是评估其他核酸扩增技术的金标准,但常规PCR每次检测时间较长(需要2~3 h)、操作繁琐且成本高<sup>[25]</sup>。荧光实时定量PCR不需要后放大步骤、凝胶运行、染色和拍照,因此与传统PCR相比,出错率更低,检测时间更短(54 min左右)<sup>[26]</sup>。Dona等<sup>[27]</sup>利用qPCR方法对38名志愿者的88份粪便样本,分别进行原始粪便以及肉汤富集培养两种方式检测。结果发现,在原始粪便中只检测到两个阳性样本(66.7%, 2/3)。但在含有多黏菌素的LB肉汤中富集培养后,所有*mcr-1*阳性样本均能检测到,检测限达10个拷贝/反应,灵敏度和特异性均为100%。

#### 2.2.2 多重PCR技术(Multi-PCR)

随着*mcr-2*、*mcr-3*等新的*mcr*基因变体不断被发现,多重PCR是一种很好的应对手段。它可以同时扩增多个不同的DNA序列,节省了时间、试剂和耗材,且单次检测时间少于2 h<sup>[28]</sup>。Rebello等<sup>[29]</sup>利用多重PCR对欧洲49个动物源分离株同时检测*mcr-1*~*mcr-5* 5种基因,结果显示100%的特异性和敏感性。Hu等<sup>[30]</sup>通过多重PCR对33株粪便中分离菌株的*mcr-1*、3、8、10四种基因型进行同时检测,检测限为1 pg/反应,检测结果与全基因组序列结果完全一致。Liu等<sup>[31]</sup>设计的多重PCR可以同时检测8个*mcr*基因型进行检测,通过60株多黏菌素耐药菌进行验证,检测限为10 pg/反应。Multi-PCR采用多路复用方式减少了单个反应的数量,但可能会受到引物相互作用的影响以及设计相同效率扩增的引物难度大等问题,从而影响特异性和灵敏度<sup>[32-33]</sup>。

#### 2.2.3 等温扩增技术

PCR及qPCR虽然灵敏度和特异性较高,但程序复杂、耗时、检测成本高且依赖专业化的实验室。等温扩增的出现避免了热循环仪的需要(使用低成本的水浴),从而有助于集成到用于实时检测的小型 and 低成本设备中<sup>[34-35]</sup>;在恒温条件下进行,减少了升降温的过程,从而缩短了检测时间<sup>[36]</sup>。目前针对*mcr-1*基因检测的等温扩增技术主要有以下3种方法:环介等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)以及重组酶辅助扩增(Recombinase-aid amplification, RAA)。

LAMP扩增产物可以使用各种方法如琼脂糖凝胶电泳、比色法以及实时荧光计等来判别<sup>[25,37]</sup>。Zhong等<sup>[38]</sup>用LAMP对58个广州医院的临床样本进行检测,结果与PCR相同,其中*mcr-1*检出限为10<sup>5</sup>拷贝/μL;Liu等<sup>[39]</sup>用LAMP对13株临床菌株和11株从动物分离的菌株进行*mcr-3*检测,检出限为

0.035 ng/mL; Zou 等<sup>[40]</sup>利用 LAMP 对 20 株不含 *mcr-1* 基因的多重耐药细菌和 2 株携带 *mcr-1* 基因的菌株进行检测, 检出限为 0.2 pg/ $\mu$ L。表明 LAMP 的灵敏度是传统 PCR 的 10 倍且特异性相同这一结论, 检测时间也都控制在 1 h 以内。但 LAMP 也存在一些缺点, 首先结果测量需要精密设备, 且比色指示剂无法检测较低的样品浓度等<sup>[41]</sup>; 其次, 对温控设备具有依赖性<sup>[42]</sup>; 最后, LAMP 至少需要两对引物来识别目标 DNA 的六个区域, 引物浓度高于传统 PCR, 可能会导致引物二聚体诱导非特异性扩增, 且在引物设计上比 PCR 复杂<sup>[43-44]</sup>。

RPA 最初使用的是琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进行检测, 但需要额外的纯化步骤以防止条带被污染<sup>[45]</sup>。探针 RPA 灵敏度和特异性都较普通 RPA 高, 但需要荧光 PCR 仪<sup>[46]</sup>。侧流层析试纸条 RPA, 无需纯 DNA 分离, 灵敏度和特异性也较普通 RPA 高<sup>[47]</sup>。Xu 等<sup>[48]</sup>利用这两种 RPA 技术检测了 20 个 *mcr-1* 阳性样本和 3 个阴性样本, 结果均在 30 min 内完成, 侧流层析试纸条 RPA 甚至只需 5~10 min。两种 RPA 都显示与 qPCR 一致的高特异性, 检测下限为 100 fg, 远远优于 qPCR。同时相较于其他等温扩增方法, RPA 对抑制剂有着更好的耐受性<sup>[47]</sup>。然而, 与具有温度循环的 PCR 和 qPCR 不同, RPA 存在引物二聚体的假阳性这一重要风险, 在 RPA 反应中相互错配的引物没有机会解离<sup>[49]</sup>。

RAA 与 PRA 反应原理相似, 主要区别在于 PRA 用的是噬菌体的酶和蛋白, 而 RAA 用的是细菌或真菌的酶和蛋白, 更容易获取<sup>[50]</sup>。Fan 等<sup>[51]</sup>使用荧光 RAA 对来自北京一家儿科医院的 672 份临床样本进行检测, 20 min 即可得到结果, 检测限为 20 个拷贝/反应, 且与 PCR 检测结果一致。车勇良等<sup>[52]</sup>通过 RAA 方法对 4 株临床分离大肠埃希菌进行检测, 只需 21 min 就能出结果, 检测限为  $10^2$  拷贝/ $\mu$ L。相较于 LAMP 来说, RAA 的单次检测成本更低<sup>[53]</sup>。但 RAA 和 PRA 存在一些亟待解决的问题, 如引物及探针制备难度大、靶标大小限制、样本和扩增产物纯化难度大等<sup>[42]</sup>。

**2.2.4 CRISPR-Cas 技术** CRISPR-Cas 是多种生物体和细胞类型的基因组编辑和调控的关键技术。在检测方面, CRISPR-Cas 系统表现出了对病原体、SNPs、基因组 DNA 等 xxx 的巨大潜力<sup>[54]</sup>。Gong 等<sup>[55]</sup>将 RPA 与 CRISPR-Cas12a 体系结合, 建立了 *mcr-1* 基因的快速 (60 min 以内) 检测技术, 通过 15 个 *mcr-1* 阳性株、55 个非 *mcr-1* 分离株以及添加了一系列 *mcr-1* 阳性菌株稀释液的临床样本进行验证。结果显示了较高的灵敏度 (纯 *mcr-1* 阳性分离株中, 灵敏度为 420 fg/反应; 临床样品中, 灵敏度为 1.6 ~ 6.2 cfu/反应) 和 100% 的特异性。此外, CRISPR-Cas 系统重新编程的简单性, 使它们易为各种应用程序进行配置, 且不依赖于专业人员及其他仪器设备。

### 3 全基因组测序 (Whole genome sequence, WGS)

常规的 PCR 只能检测已知的 *mcr* 基因且检测的基因数量有限, 而 WGS 可以提供全部与多黏菌素耐药相关的基因序列<sup>[24]</sup>。Duggett 等<sup>[56]</sup>应用 WGS 技术对英国猪源 *mcr-1* 阳性质粒进行分析, 发现携带 *mcr-1* 基因的阳性质粒序列与英国、中国和南非人源分离株以及丹麦、法国等动物分离株序列相似性为 90%~99%。Fayad 等<sup>[57]</sup>从黎巴嫩不同家禽养殖场收集的粪便中分离到 18 株大肠埃希菌, 利用 WGS 测序后发现 3 株 ST2705 的大肠埃希菌和 2017 年从贝鲁特法兰西医院住院患

者粪便样本中分离的大肠埃希菌的 ST 序列高度同源。可见, WGS 的测序信息可以提供全面的基因序列, 便于溯源和进化分析。与其他方法相比, WGS 准确性更高, 但仍存在成本高、周转周期长以及复杂的生物学信息分析问题<sup>[58]</sup>。

### 4 免疫法

酶联免疫吸附测定和侧流免疫试验等免疫分析具有检测灵敏度高、通量大和周转时间快等优点, 适合快速检测<sup>[59]</sup>。He 等<sup>[60]</sup>使用多克隆抗体作为捕获剂和单克隆抗体 *mcr-1*~*mcr-7* 作为检测器, 研发了一种基于酶联免疫吸附技术的检测方法, 检测限为 0.01 ng/mL。Volland 等<sup>[61]</sup>研发了一种侧流免疫技术, 检测在 15 min 内完成, 灵敏度和特异性分别达到 100% 和 98%。但免疫法检测严重依赖于高亲和力和特异性识别 *mcr* 基因的抗体, 不同抗体敏感性相差较大, 因此一定程度地限制了商业化应用。

### 5 LC-MS/MS (液相色谱串联质谱) 和 MALDI-TOF MS (基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱)

Wang 等<sup>[62]</sup>选用了一种胰蛋白酶用于 *mcr-1* 蛋白的快速 LC-MS/MS 分析, 在检测 99 个盲样中灵敏度和特异性均为 100%, 且检测时间少于 90 min。Dortet 等<sup>[63-64]</sup>研发了一种基于 MALDI-TOF MS 的方法——MALDIxin, 成功在 15 min 内从 87 株大肠埃希菌分离株中检测出所有携带 *mcr-1* 基因的菌株。但 MALDIxin 也存在 2 个主要问题。首先, 检测是在反射模式的质谱仪上进行的, 这在临床微生物学实验室中并不常见。其次, 样品是在质谱仪的负离子模式下进行分析的, 该模式目前并未在常规质谱仪上应用<sup>[64-65]</sup>。基于此, Li 等<sup>[65]</sup>研发了一种基于 MALDI-TOF MS 的半定量方法, 可以快速鉴定细菌对于多黏菌素的敏感性, 灵敏度和特异性分别可达 97.4% 和 88%。Smith 等<sup>[66]</sup>研发了一种新型的基于脂质的 MALDI-TOF MS 技术, 可以直接从尿液中鉴定出携带 *mcr-1* 的大肠埃希菌, 结果在 1 h 内完成, 但该方法尚缺乏大规模的样品测试。同时, 无论是 LC-MS/MS 还是 MALDI-TOF MS, 都严重依赖于仪器 (质谱仪), 这在一定程度上限制了该方法的应用。

本文各类检测方法的性能、优势及存在的挑战汇总详见表 1。

### 6 小结

多黏菌素被认为是对抗耐碳青霉烯类革兰阴性菌最后的一道防线。本文综述了目前针对多黏菌素耐药的多种技术和方法, 分析了各种技术的应用场景、成本效益、特异性及准确性等, 以期为之后不同场景检测方法的选择提供参考, 同时也为多黏菌素耐药的防控和治理、临床的规范治疗等提供科学依据。

#### 【参考文献】

- [1] Stefaniuk EM, Tyski S. Colistin resistance in enterobacterales strains - a current view[J]. Pol J Microbiol, 2019, 68(4): 417-427.
- [2] Anyanwu MU, Jaja IF, Oguttu JW, et al. Is Africa ready for mobile colistin resistance threat? [J]. Infect Ecol Epidemiol, 2021, 11(1): 1962781.
- [3] 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.



表 1 本综述列举的各种检测方法的性能、优势及存在的挑战分析  
Table 1 The effectiveness, advantage and challenge of different detection technologies against colistin resistance in this review

检测类型 Detection methods	具体技术 Technologies	性能比较 Effectiveness Comparison				优势 Advantages	存在的挑战 Challenges
		需要时间 Time required	人员技能要求 Relative skill required	成本 Relative cost	特异性或灵敏度 Specificity or sensitivity		
表型检测	BMD 商业 BMD	16~24 h	高低	便宜 便宜	好 较好	CLSI 和 EUCAST 推荐的 AST 的参考方法 基于 BMD 方法但更易于使用	费时费力,对操作员的要求高 大多数品牌都显示出可接受的性能,但不同测试间存在较大差异
	NP	<5 h	低	便宜	较好	AST 方法中较为快速的方法	/
	自动化法	16~24 h	低	昂贵	较差	自动化	MIC 值的确定并不准确;不同测试间存在较大差异且一次性耗材成本昂贵
	BMD+螯合剂	16~24 h	高	便宜	较好	可以检测 <i>mcr-1</i> 基因	操作复杂
	PCR	2~3 h	高	便宜	较高	通常是评估其他核酸扩增技术的金标准	流程繁琐且只能检测单靶标基因
分子检测	qPCR	54 min 左右	高	便宜	高	比传统 PCR 出错率更低,检测时间更短	难以同时检测多耐药基因
	Multi-PCR	<2 h	高	昂贵	高	同时扩增多个不同的 DNA 序列,节省了时间、试剂和耗材	引物相互作用(副产物二聚体的形成)及设计相同效率扩增的引物难度大
	LAMP RPA RAA	<1 h <30 min, LF-RPA 只需 5~10 min 20 min 左右	高	昂贵	高	避免了热循环仪的需要,从而缩短了检测时间	引物设计难度大;相互错配的引物没有机会解离;靶标大小限制;样本和扩增产物纯化难度大
	CRISPR-Cas+ RPA	<60 min	高	昂贵	高	准确性较高且 CRISPR- Cas 系统重新编程的简单性,很容易为各种应用程序进行配置	目前用于 <i>mcr</i> 基因检测方面的研究较少
全基因组 测序技术	二代或三代测序	>48 h	极高	非常昂贵	极高	可以提供全部与多黏菌素耐药相关的质粒序列,更高的精度和准确性	成本高、周转周期长,复杂的生物学信息分析等问题
免疫学 检测	ELISA 和 LFIA	15 min	较低	较低	高	无需特殊仪器,成本较低	严重依赖于高亲和力和特异性识别 <i>mcr</i> 基因的抗体,但制备难度大周期长
质谱检测	LC-MS/MS MALDI-TOF MS	<1.5 h <1 h	高	昂贵	高	可以对脂质 A 进行分析	严重依赖于仪器(质谱仪)

- [4] Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of polymyxin resistance[J]. Adv Exp Med Biol, 2019(1145):55-71.
- [5] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study [J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(2):161-168.
- [6] Li J, Beuerman R, Verma C S. Dissecting the molecular mechanism of colistin resistance in *mcr-1* bacteria[J]. J Chem Inf Model, 2020, 60(10):4975-4984.
- [7] Suardiaz R, Lythell E, Hinchliffe P, et al. Catalytic mechanism of the colistin resistance protein MCR-1 [J]. Org Biomol Chem, 2021, 19(17):3813-3819.
- [8] Eucast EC OA. Rapid AST directly from blood culture bottles [EB/OL]. [2022. 12. 2]. <https://www.eucast.org/search>.
- [9] Jayol A, Nordmann P, Lehours P, et al. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24(2):175-179.
- [10] Wang Y, Berglund B, Zhu Y, et al. Performance of different methods for testing polymyxin B: comparison of broth microdilution, agar dilution and MIC test strip in *mcr-1* positive and negative *Escherichia coli* [J]. Lett Appl Microbiol, 2021, 73(2):197-205.
- [11] Yusuf E, van Westreenen M, Goessens W, et al. The accuracy of four commercial broth microdilution tests in the determination of the minimum inhibitory concentration of colistin [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2020, 19(1):42.
- [12] Matuschek E, Ahman J, Webster C, et al. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp* [J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24(8):865-

- 870.
- [13] Carretto E, Brovarone F, Russello G, et al. Clinical validation of sensitest colistin, a broth microdilution-based method to evaluate colistin MICs[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(4): e01523-17.
- [14] Poirel L, Larpin Y, Dobias J, et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the mcr-1/mcr-2 genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 90(1): 7-10.
- [15] Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of polymyxin resistance in enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(6): 1038-1043.
- [16] Germ J, Seme K, Cerar T, et al. Evaluation of two rapid phenotypic tests—Alifax rapid AST colistin test and Rapid Polymyxin NP test—for detection of colistin resistance in Enterobacterales [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(8): 1749-1753.
- [17] Mitton B, Kingsburgh C, Kock M M, et al. Evaluation of an in-house colistin NP test for use in resource-limited settings[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(10): e00501-19.
- [18] Lescat M, Poirel L, Tinguely C, et al. A Resazurin reduction-based assay for rapid detection of polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(3): e01563-18.
- [19] Sadek M, Tinguely C, Poirel L, et al. Rapid Polymyxin/Pseudomonas NP test for rapid detection of polymyxin susceptibility/resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020, 39(9): 1657-1662.
- [20] Chung H S, Kim S K, Hahm C, et al. Performance evaluation of the VITEK2 and sensititre systems to determine colistin resistance and MIC for *Acinetobacter baumannii* [J]. Diagnostics (Basel), 2022, 12(6): 1487.
- [21] Anantharajah A, Glupczynski Y, Hoebcke M, et al. Multicenter study of automated systems for colistin susceptibility testing [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(3): 575-579.
- [22] Pfennigwerth N, Kaminski A, Korte-Berwanger M, et al. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in Enterobacterales [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(11): 1385-1389.
- [23] Depka D, Mikucka A, Bogiel T, et al. Comparison of the recommended colistin susceptibility testing methods with colistin gradient strips and semi-automated method for antimicrobial-resistant non-fermenting rods[J]. J Microbiol Methods, 2020, 172: 105905.
- [24] Osei S J. Mcr colistin resistance gene; a systematic review of current diagnostics and detection methods [J]. Microbiolopen, 2019, 8(4): e682.
- [25] Shinozawa S, Moriyama Y. Three SARS-CoV-2 PCR-negative cases of COVID-19 diagnosed using isothermal amplification methods[J]. J Infect Chemother, 2022, 28(7): 1005-1007.
- [26] Abou-Jawdah Y, Aknadibossian V, Jawhari M, et al. Real-time PCR protocol for phytoplasma detection and quantification[J]. Methods Mol Biol, 2019(1875): 117-130.
- [27] Dona V, Bernasconi OJ, Kasraian S, et al. A SYBR((R)) Green-based real-time PCR method for improved detection of mcr-1-mediated colistin resistance in human stool samples[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017(9): 57-60.
- [28] Lescat M, Poirel L, Nordmann P. Rapid multiplex polymerase chain reaction for detection of mcr-1 to mcr-5 genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 92(4): 267-269.
- [29] Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes [J]. Euro Surveill, 2018, 23(6): 17-00672.
- [30] Hu S, Lv Z, Wang Y, et al. Rapid detection of human origin colistin-resistance genes mcr-1, mcr-3, mcr-8, mcr-10 in clinical fecal samples[J]. Arch Microbiol, 2021, 203(7): 4405-4417.
- [31] Liu J, Zhang Z, Feng Y, et al. Molecular Detection of the mcr Genes by Multiplex PCR[J]. Infect Drug Resist, 2020(13): 3463-3468.
- [32] Bhanothu V, Venkatesan V. Conventional polymerase chain reaction and amplification refractory mutation system-multi-gene/multi-primer PCR in the diagnosis of female genital tuberculosis [J]. Arch Microbiol, 2019, 201(3): 267-281.
- [33] Wolff N, Geiss A F, Barisic I. Crosslinking of PCR primers reduces unspecific amplification products in multiplex PCR[J]. J Microbiol Methods, 2020(178): 106051.
- [34] Fan X, Li L, Zhao Y, et al. Clinical validation of two recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of African Swine Fever Virus[J]. Front Microbiol, 2020(11): 1696.
- [35] Leonardo S, Toldra A, Campas M. Biosensors based on isothermal DNA amplification for bacterial detection in food safety and environmental monitoring[J]. Sensors (Basel), 2021, 21(2): 602.
- [36] 涂芸萍, 杨殿龙, 张中平, 等. 基于微流控芯片的等温扩增技术 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 943-960.
- [37] Park JW. Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests [J]. Biosensors (Basel), 2022, 12(10): 857.
- [38] Zhong LL, Zhou Q, Tan CY, et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (multi-LAMP) assay for rapid detection of mcr-1 to mcr-5 in colistin-resistant bacteria[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 1877-1887.
- [39] 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.
- [40] Zou D, Huang S, Lei H, et al. Sensitive and rapid detection of the plasmid-encoded colistin-resistance gene mcr-1 in enterobacteriaceae isolates by loop-mediated isothermal amplification [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2356.
- [41] Gong L, Tang F, Liu E, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid detection of plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1[J]. PLoS One, 2021, 16(4): e249582.
- [42] 史贇学, 王鑫, 王峻, 等. 重组酶恒温扩增技术在动植物源成分分析中的应用与研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, : 1-15.
- [43] Wang DG, Brewster JD, Paul M, et al. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification[J]. Molecules, 2015, 20(4): 6048-6059.
- [44] Eboigbodin KE. Application of loop-mediated isothermal ampli-

- fication assay for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*[J]. *Methods Mol Biol*,2019(2042):19-25.
- [45] Li Z, Pinto TJ, Goossens J, et al. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow assay for the detection of active *Trypanosoma evansi* infections[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14(2):e8044.
- [46] 岳苑, 张建中, 张茂俊. NASBA 和 RPA 两种等温扩增技术在病原菌检测中的应用研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(8): 1018-1022.
- [47] Ahmed FA, Larrea-Sarmiento A, Alvarez A M, et al. Genome-informed diagnostics for specific and rapid detection of *Pectobacterium* species using recombinase polymerase amplification coupled with a lateral flow device[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):15972.
- [48] Xu J, Wang X, Yang L, et al. Rapid detection of *mcr-1* by recombinase polymerase amplification[J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(12):1682-1688.
- [49] Wang L, Zhao P, Si X, et al. Rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes* with an isothermal amplification and lateral flow strip combined method that eliminates false-positive signals from primer-dimers[J]. *Front Microbiol*, 2019(10):2959.
- [50] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. RPA, RAA 及 ERA 技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. *食品科学*, 2022:1-11.
- [51] Fan Z, Feng Y, Xu W, et al. Rapid detection of multi-resistance strains carrying *mcr-1* gene using recombinase-aided amplification directly on clinical samples[J]. *Front Microbiol*, 2022(13): 852488.
- [52] 车勇良, 陈秋勇, 陈如敬, 等. 多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 重组酶介导扩增方法的建立及应用[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(8):46-49.
- [53] Shen XX, Qiu FZ, Shen LP, et al. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1):229.
- [54] Hamel M, Rolain JM, Baron SA. The history of colistin resistance mechanisms in bacteria; progress and challenges[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2):442.
- [55] Gong L, Jin Z, Liu E, et al. Highly sensitive and specific detection of mobilized colistin resistance gene *mcr-1* by CRISPR-based platform[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(5):e188422.
- [56] Duggett NA, Sayers E, AbuOun M, et al. Occurrence and characterization of *mcr-1*-harbouring *Escherichia coli* isolated from pigs in Great Britain from 2013 to 2015[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(3):691-695.
- [57] Abou FA, El AM, Sleiman A, et al. Acquired resistome and plasmid sequencing of *mcr-1* carrying MDR Enterobacteriaceae from poultry and their relationship to STs associated with humans [J]. *JAC Antimicrob Resist*, 2022, 4(1):b198.
- [58] Kamboj M, McMillen T, Syed M, et al. evaluation of a combined multilocus sequence typing and whole-genome sequencing two-step algorithm for routine typing of *Clostridioides difficile*[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(2):e01955-20.
- [59] Wang J, Zhou J, Chen Y, et al. Rapid one-step enzyme immunoassay and lateral flow immunochromatographic assay for colistin in animal feed and food[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2019(10): 82.
- [60] He X, Mavrici D, Patfield S, et al. Development of novel antibodies for detection of mobile colistin-resistant bacteria contaminated in meats[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):16744.
- [61] Volland H, Dortet L, Bernabeu S, et al. Development and multicentric validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of MCR-1-producing enterobacteriaceae[J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(5):e01454-18.
- [62] Wang H, Chen Y, Strich JR, et al. Rapid detection of colistin resistance protein MCR-1 by LC-MS/MS[J]. *Clin Proteomics*, 2019(16):8.
- [63] Dortet L, Bonnini R A, Pennisi I, et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(12): 3359-3367.
- [64] Dortet L, Broda A, Bernabeu S, et al. Optimization of the MALDIxin test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(1):110-116.
- [65] Li J, Huang Y, Hu Y, et al. A rapid MALDI-TOF mass spectrometry-based method for colistin susceptibility testing in *Escherichia coli*[J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(2):528-534.
- [66] Smith RD, Izac JR, Ha M, et al. Rapid identification of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from patient urine using a novel lipid-based MALDI-TOF-MS assay[J]. *Access Microbiol*, 2021, 3(12):309.

【收稿日期】 2023-01-16 【修回日期】 2023-04-01