

基于刃天青的电化学方波伏安法快速鉴别大肠杆菌的耐药性

Rapid identification of drug resistance of *Escherichia coli* based on electrochemical square wave voltammetry of resazurin

戚楚楚^{1,2} 卢礼生³ 任佳丽^{1,2} 周 凯^{1,2}

QI Chuchu^{1,2} LU Lisheng³ REN Jiali^{1,2} ZHOU Kai^{1,2}

张馨方^{1,2} 张紫莺²

ZHANG Xinfang^{1,2} ZHANG Ziying²

(1. 林产可食资源安全与加工利用湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004; 2. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 3. 九江市农产品质量安全中心, 江西 九江 332000)

(1. Hunan Key Laboratory of Forestry Edible Sources Safety and Processing, Changsha, Hunan 410004, China; 2. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 3. Jiujiang Agricultural Products Quality and Safety Monitoring Center, Jiujiang, Jiangxi 332000, China)

摘要:目的:评价 5 株食源性大肠杆菌临床分离株对环丙沙星、庆大霉素和氨苄西林的抗生素耐药性。方法:基于细菌能量代谢过程中的电子传递理论,引入刃天青作为氧化还原探针,建立了一种基于刃天青介导的大肠杆菌耐药性快速鉴别的电化学方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)。结果:在 $1.69 \times 10^2 \sim 1.69 \times 10^8$ CFU/mL 范围内,大肠杆菌浓度与刃天青氧化峰电流(I)之间存在较好的线性关系,回归方程为 $Y = -0.156 0X - 2.965 5$, $R^2 = 0.977 5$;在进行大肠杆菌耐药性测定时,参考美国临床和实验室标准协会制定的药敏试验标准,以刃天青的氧化峰电流(I_0)和大肠杆菌直接与刃天青作用后得到的氧化峰电流(I_{-a})作为对照,测定大肠杆菌用抗生素处理后与刃天青作用得到氧化峰电流(I_{+a}),引入细菌活性值 V_{ETA} 作为电化学方波伏安法鉴别细菌耐药性的指标,建立了刃天青介导的大肠杆菌电化学快速药敏试验方法;运用建立的方法检测了 5 种食源

性大肠杆菌临床分离株对 3 种抗生素的耐药性,以 $V_{ETA} = 50$ 作为判断细菌敏感和耐药的临界值,均得到与纸片扩散法结果相符的药敏试验结果,而纸片扩散法报告结果需 18 h,该法仅需 2 h。结论:建立的基于刃天青介导的大肠杆菌耐药性快速鉴别的电化学方波伏安法能够准确且快速检测 5 株食源性大肠杆菌临床分离株对环丙沙星、庆大霉素和氨苄西林的抗生素耐药性。

关键词:大肠杆菌;耐药性;快速检测;刃天青;电子传递链;方波伏安法

Abstract: Objective: To evaluate the antibiotic resistance of five foodborne *Escherichia coli* clinical isolates to ciprofloxacin, gentamicin and ampicillin. Methods: Based on the theory of electron transfer during bacterial energy metabolism and the introduction of resazurin as a redox probe, an electrochemical square wave voltammetry (SWV) method based on bladed tensin-mediated rapid identification of *E. coli* drug resistance was established. Results: The electrochemical square wave voltammetry values of *E. coli* at different concentrations mediated by resazurin were determined, and there was a good linear relationship between the *E. coli* concentration and the oxidized peak current (I) of resazurin in the range of $1.69 \times 10^2 \sim 1.69 \times 10^8$ CFU/mL, with the regression equation of $Y = -0.156 0X - 2.965 5$, and $R^2 = 0.977 5$; When performing the determination of *E. coli* drug resistance, the drug sensitivity test standard was developed by Clinical and Laboratory Standards

基金项目:湖南省创新平台与人才计划项目(编号:2019TP1029, 2021RC4032);湖南省重点研发计划项目(编号:2022SK2100)

作者简介:戚楚楚,女,中南林业科技大学在读硕士研究生。

通信作者:卢礼生(1971—),男,九江市农产品质量安全中心高级农艺师。E-mail: jncpjcx@163.com

任佳丽(1977—),女,中南林业科技大学教授,博士生导师,博士。E-mail: T20091483@csuft.edu.cn

收稿日期:2024-01-25 **改回日期:**2024-03-18

Institute (CLSI). The oxidized peak current (I_0) of resazurin and the oxidized peak current (I_{-a}) obtained by *E. coli* after directly interacting with resazurin were used as the control, and the oxidized peak current (I_{+a}) obtained by *E. coli* after treating it with antibiotics and interacting with resazurin was determined. The value of bacterial activity V_{ETA} was introduced as V_{ETA} as an indicator for the identification of bacterial resistance by electrochemical square wave voltammetry, and established a rapid electrochemical drug sensitivity test method for *E. coli* mediated by resazurin. The established method was used to detect the resistance of five clinical isolates of foodborne *E. coli* to three antibiotics, and $V_{ETA} = 50$ was used as the critical value for determining bacterial sensitivity and resistance, and the results of the drug sensitivity tests were all in accordance with the results of the paper diffusion method. The $V_{ETA} = 50$ was used as the critical value for determining bacterial susceptibility and resistance, and all the results were consistent with the results of the paper diffusion method, and the paper diffusion method required 18 h to report the results, whereas this method required only 2 h. **Conclusion:** Our electrochemical square-wave voltammetry method based on the resazurin-mediated rapid discrimination of *E. coli* drug resistance is able to accurately and rapidly detect the antibiotics resistance of the five foodborne clinical isolates of *E. coli* to ciprofloxacin, gentamicin, and ampicillin.

Keywords: *Escherichia coli*; drug resistance; rapid detection; resazurin; electron transport chain; square wave voltammetry

抗生素的不合理使用导致的细菌耐药性问题日趋严重,降低了抗生素治疗人类感染的有效性,并对公共健康构成了重大威胁^[1]。目前在欧洲和韩国的鸡肉中都检测到了对第三代头孢菌素耐药的大肠杆菌^[2-3]。2011年中国的鸡肉和猪肉样本中检出耐多黏菌素 E 的大肠杆菌比例为 5%,而这一比例逐年上升,2015—2016 年中国动物源性抗微生物药物耐药性监测 (China surveillance on antimicrobial resistance of animal origin, CSARAO) 数据库表明在猪肉中耐药菌比例已经高达 34.0%。随着耐药菌造成的安全问题愈发严重,中国政府于 2017 年 4 月 30 日正式禁止黏菌素作为动物生长促进剂。在 2017—2018 年这一比例开始得到控制,猪肉中耐药比例下降至 5.1%。然而更严重的是已经检测到感染耐多黏菌素大肠杆菌的人类患者,中国细菌耐药监测网 (China Antimicrobial Surveillance Network, CHINET) 发布从 2018—2019 年人类感染耐黏菌素的大肠杆菌患病率的数据中表明这一比例已经达到 1.3%^[4]。目前,多黏菌素 E 仍然是抵抗抗生素耐药革兰氏阴性菌的最后一道防线^[5]。快速检测出食源性细菌的耐药性,进而有效预防和控制病原菌感染和传播,是确保人类健康、经济免受损失的重要举措。

细菌耐药性的检测方法包括传统培养检测方法、全自动药敏分析系统、分子生物学方法。传统培养检测方法主要有稀释法、E 试验法和纸片法^[6-8],均是在培养的基础上测定抗生素对待测菌的最低抑菌浓度 (MIC),从而判断细菌耐药性,这类方法具有技术简单,试剂用量较低,不需要特殊设备,易于判读,可自由选择抗菌药物,并可进行药物之间的协同、无关和拮抗试验等优点,是美国临床和实验室标准协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 规定的标准药敏试验方法,也是细菌耐药性检测的金标准,但此法人工操作步骤较多,需预先增菌培养,完成药敏试验需 2 d 至数周,耗时费力,误差较大,等结果出来,疫情可能已经发生;全自动药敏分析系统包括 VITEK 药敏分析系统^[9]、MicroScan Walk Away 药敏分析系统^[10] 和 BACTEC™ FX 系统^[11],这些自动化仪器的显著优点是:测定准确度高,重复性好,快速省时,药敏试验多在 6~8 h 内完成。但由于该类仪器庞大,且依赖厂家提供检测试剂 (盒、卡等),导致购买成本和检测成本高,此外,仪器的售后维修服务麻烦,严重制约了发展中国家食源性耐药菌监测水平的提高。分子生物学方法包括 PCR 技术、基因芯片、基因测序^[12-14],多用于耐药基因的检测,但不能区分死菌活菌,且假阴、阳性率高。因此,准确、灵敏、快速而且价格便宜的食源性细菌耐药检测方法的研究迫在眉睫。

目前,电化学方法作为一种替代方法,已被广泛用于细菌抗生素耐药性检测^[15],不仅灵敏、快速,还能区分死菌和活菌。电化学方法的检测原理是外源氧化还原探针介导细菌的电子传递链,将细菌呼吸活动的变化转化为电流信号变化,达到检测细菌抗生素耐药性的目的^[16-17]。近年来,有研究将 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 系统^[18]、电化学微孔阵列^[19] 或铂盘电极^[20] 用于检测电子传递链活性。

刃天青 (resazurin) 是一种被广泛使用的生物指示剂,目前的药敏试验研究主要是利用其荧光特性和显色原理^[20-22],但介质本身的颜色和溶液的浊度都会影响试验结果的准确性。目前基于刃天青电化学特性设计的电化学传感器是通过修饰电极进行检测^[23-24],修饰电极存在稳定性差的缺点,建立的方法缺少在食源性大肠杆菌临床分离菌株上的可行性验证。研究拟引入刃天青为氧化还原探针,采用导电性好、化学稳定性高的非改性玻碳电极,建立一种刃天青介导的大肠杆菌耐药性的电化学检测方法,并将建立的方法用于评价 5 株食源性大肠杆菌临床分离株对环丙沙星、庆大霉素和氨苄西林的抗生素耐药性。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922): 湖南省疾病预防控制中心;

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* E1、E2、E4、E5、E6):
由中南大学湘雅三医院临床分离得到;

刃天青:美国 Sigma 公司;

庆大霉素硫酸盐、氨苄青霉素三水物、环丙沙星:
USP 级,上海源叶生物科技有限公司;

电化学工作站:CHI920D 型,上海辰华仪器有限公司;

玻碳电极:CHI104 型,上海辰华仪器有限公司;

Ag/AgCl 参比电极:CHI111 型,上海辰华仪器有限公司;

铂丝对电极:CHI115 型,上海辰华仪器有限公司;

电热恒温培养箱:DHP-500 型,北京市永光明医疗仪器有限公司;

超纯水机:ZWL 型,湖南中沃水务环保科技有限公司;

高速冷冻离心机:TG25KR 型,长沙东旺实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌培养 将大肠杆菌在 Luria Broth (LB) 培养基(含胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L)中过夜培养, 37 °C 下振荡(160 r/min)培养。4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体沉淀并重悬于磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)中。稀释至光密度($OD_{600\text{ nm}}$)为 0.9 来制备预培养物。

1.2.2 刃天青对大肠杆菌活性的影响 将 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.9 的大肠杆菌母液依次稀释为 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 梯度。将菌液与 0.02, 0.20, 2.00 mmol/L 刃天青溶液等体积混匀, 使刃天青的终浓度分别为 0.01, 0.10, 1.00 mmol/L。平板计数法检测刃天青对大肠杆菌的活性, 每组 3 次平行, 放入恒温培养箱中 37 °C 培养过夜, 第 2 天观察并计数。

1.2.3 电化学测试 采用三电极体系进行检测, 电化学方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)检测条件为电势范围 $-0.5 \sim 0$ V; 振幅: 0.025 V; 频率: 15 Hz; 工作电极: 玻碳电极; 参比电极: Ag/AgCl 电极; 辅助电极: 铂丝电极。试验重复 3 次。

1.2.4 不同大肠杆菌菌株与刃天青作用时间的确定 取 5 mL $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.9 的大肠杆菌菌液, 再加入同体积的 0.02 mmol/L 刃天青溶液混匀。将混匀的溶液分别在 37 °C 水浴中培养 15, 30, 45, 60 min, 在反应的最后 10 min 时匀速通入氮气除氧。反应结束后加入反应池中进行 SWV 法测定, 每个样品平行测定 3 次。

1.2.5 电化学方法检测食源大肠杆菌药物敏感性 分别配制 1 mg/mL 抗生素(氨苄西林、庆大霉素和环丙沙星)母液, 稀释后获得 1 000, 100, 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素溶液。取 4 支离心管, 标记为 1、2、3、4, 各管中加入 5 mL $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.9 的大肠杆菌菌液, 4 000 r/min 离心 15 min, 倒去上

清液后, 1、2、3 号管中分别加入 5 mL 1 000, 100, 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素溶液重悬, 4 号管加入 5 mL 无菌 BR 缓冲溶液重悬。37 °C 培养 1 h 后, 4 000 r/min 离心 15 min, 倒去上清液后用 5 mL 无菌 BR 缓冲溶液重悬, 再分别向 4 支试管中加入同体积的 0.02 mmol/L 刃天青溶液混匀。将混匀的溶液 37 °C 水浴培养 1 h, 最后 10 min 匀速通入氮气除氧。反应结束后加入反应池中, 用 SWV 法测定。

1.3 计算

1.3.1 刃天青变化量 刃天青与大肠杆菌作用前后的氧化峰电流变化用 ΔI 表示, 由式(1)计算得到。

$$\Delta I = |I_{p(0)} - I_{p(\text{cell})}|, \quad (1)$$

式中:

ΔI ——刃天青变化量, μA ;

$I_{p(0)}$ ——0.02 mmol/L 刃天青测试液的峰电流值, μA ;

$I_{p(\text{cell})}$ ——0.02 mmol/L 刃天青与细菌混合后的峰电流值, μA 。

1.3.2 电子传递链活性值 V_{ETA} 引入电子传递链活性值 V_{ETA} 作为电化学方法评价细菌耐药性的指标。 V_{ETA} 数值越高, 说明细菌呼吸活性越高, 抗生素对细菌几乎没有影响; V_{ETA} 数值越低, 说明细菌呼吸活性越低, 抗生素对细菌有明显杀灭作用。 V_{ETA} 值由式(2)计算得到。

$$V_{\text{ETA}} = \frac{|I_0 - I_{(+a)}|}{|I_0 - I_{(-a)}|} \times 100, \quad (2)$$

式中:

V_{ETA} ——电子传递链活性值;

I_0 ——0.02 mmol/L 刃天青测试液的峰电流值, μA ;

$I_{(-a)}$ ——不加抗生素测试液的峰电流值, μA ;

$I_{(+a)}$ ——抗生素处理过的测试液的峰电流值, μA 。

2 结果与分析

2.1 刃天青电化学特性

刃天青在发生还原反应时, 首先不可逆地被还原成中间产物试卤灵, 试卤灵进一步被还原为二氢试卤灵, 因此在进行 SWV 负扫时, 在 -0.1 V 出现的肩峰归属于中间产物试卤灵^[25-26]。使用 SWV 法对刃天青在 $-0.5 \sim 0.0$ V 进行 SWV 正扫(SWV⁺)和 SWV 负扫(SWV⁻), 结果如图 1 所示, 在 -0.24 V 出现氧化峰, 在 -0.196 V 出现还原峰, 可以看出氧化峰和还原峰是不对称的, 对于 1 mmol/L 刃天青, 氧化峰电流为 18.92 μA , 还原峰电流为 -14.2 μA , 说明刃天青在玻碳电极上进行不可逆的氧化还原反应。随着刃天青浓度的增加, 得到的电信号增大, 说明 SWV 法获得的电化学信号与刃天青浓度呈正相关。

2.2 刃天青对大肠杆菌 ATCC 25922 活性的影响

建立电化学方法检测微生物的耐药性时, 由于加入了氧化还原探针, 所以需要考虑氧化还原探针对待测细

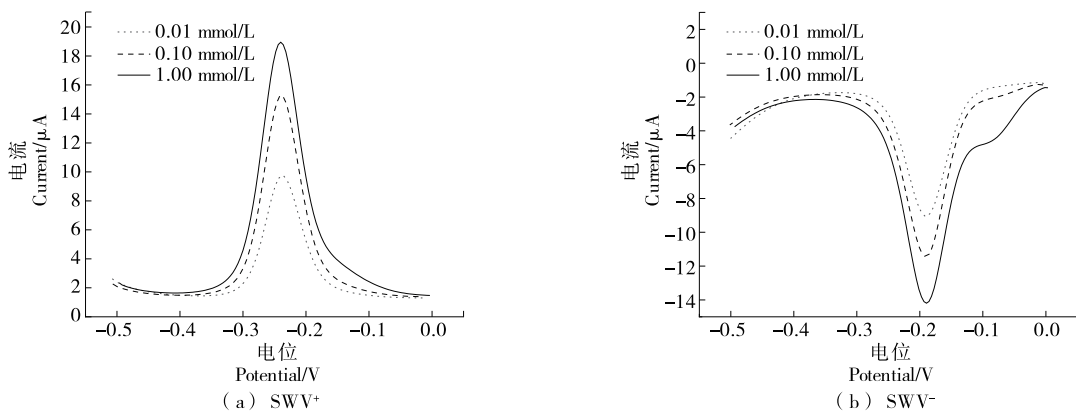


图 1 不同浓度刃天青的 SWV 曲线

Figure 1 The SWV curve of different concentrations of resazurin

菌活性的影响。图 2 为不同浓度刃天青对大肠杆菌 ATCC 25922 活菌数的影响,结果表明,大肠杆菌与不同浓度的刃天青平板培养 24 h 后,与未添加刃天青的平板菌落总数无显著差异,在刃天青终浓度为 0.01 mmol/L 时,每个稀释度平板中的菌落数基本与对照平板近似。说明刃天青对大肠杆菌的生长没有显著影响,并不会显著影响大肠杆菌的生长活性,后续试验中可以排除刃天青浓度对试验结果的影响。

2.3 刃天青在大肠杆菌 ATCC 25922 活体中的电化学信号

基于 SWV 法得到了大肠杆菌菌液浓度与刃天青电信号的相关关系,结果如图 3 所示,刃天青的氧化峰和还原峰电流与大肠杆菌 ATCC 25922 浓度成反比。对 SWV 氧化峰和还原峰电流与大肠杆菌 ATCC 25922 浓度进行线性拟合,建立的回归方程分别为 $Y = -0.156 0X - 2.965 5, R^2 = 0.977 5$ 和 $Y = 0.187 7X - 2.928 5, R^2 = 0.977 1$ 。推测引起这一现象的原因是在大肠杆菌生长代

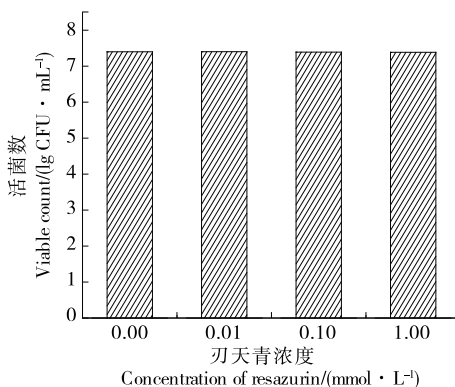


图 2 刃天青浓度对大肠杆菌活菌数的影响

Figure 2 Effects of resazurin concentration on the number of viable *E. coli*

谢过程中,刃天青可以作为大肠杆菌呼吸传递过程中的电子传递受体,使自身被还原,溶液中氧化态的刃天青浓度减少,引起了电流的下降。

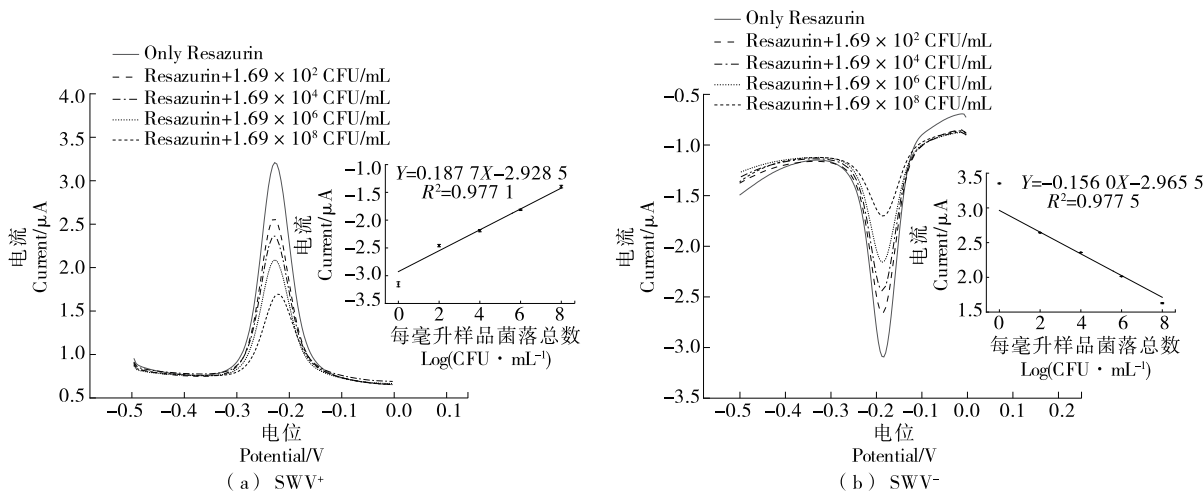


图 3 基于 SWV 法的大肠杆菌浓度与刃天青电信号关系图

Figure 3 The relationship between the concentration of *E. coli* and the electrical signal of resazurin based on the SWV method

2.4 食源大肠杆菌与刃天青作用时间和电信号的关系

在电化学方法的建立过程中,如果刃天青被过度还原,反应时间成为其中较大的不确定因素,研究对大肠杆菌和刃天青的反应时间进行了探究。不同大肠杆菌分离株与刃天青反应后,刃天青信号变化量(ΔI)由式(1)计算所得, ΔI 随时间变化图如图 4 所示。从图 4 可以看出,不同的大肠杆菌分离株与刃天青反应过程中,前 15 min 电流出现急剧下降,15~45 min,电流下降量随时间延长而减小,45 min 后,电流变化趋于平缓,且变化不大,所以选择 50 min 作为细菌与刃天青的作用时间。大肠杆菌还原刃天青是一个氧化还原酶参与的反应,不同菌株所含的氧化还原酶的种类、结构存在一定差异^[27-28],因此,其还原刃天青的速度、能力也不同,导致刃天青信号变化量(ΔI)随时间的变化趋势也存在差异,选择 50 min 作为刃天青与大肠杆菌的反应时间,正是因为此时几种大肠杆菌分离株与刃天青的反应均已经稳定。

2.5 SWV 测定大肠杆菌 ATCC 25922 和 E4 对氨苄西林的敏感性

为了探究电化学方法检测细菌药物敏感性的可行性,选择对氨苄西林敏感的大肠杆菌 ATCC 25922 作为敏感大肠菌株,经中南大学湘雅三医院检验科检验对氨苄西林耐药的 E4 作为耐药大肠菌株,用 SWV 法测定大肠杆菌 ATCC 25922 和 E4 分别与高浓度氨苄西林作用 1 h 后的电信号变化,结果如图 5 所示,未加氨苄西林时,大肠杆菌 ATCC 25922 和 E4 的电流与空白刃天青相比均明显降低,而加入了氨苄西林后,大肠杆菌 ATCC 25922 电流下降幅度很小,而 E4 的电流降低程度和未加抗生素时几乎一致。将细菌在含和不含氨苄西林的 LB 溶液中培养,其中未添加氨苄西林的细菌正常生长,细菌呼吸作用还原溶液中的刃天青导致电信号下降;添加氨苄西林后,对氨苄西林敏感的大肠杆菌 ATCC 25922 生长受到限制,呼吸活性变弱,还原刃天青的能力下降,电

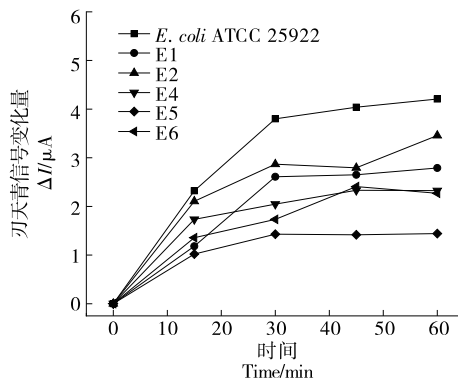


图 4 不同大肠杆菌菌株作用下刃天青信号变化量(ΔI)随时间变化图

Figure 4 The change of resazurin signal (ΔI) with time under the action of different *E. coli* strains

信号下降程度小,而对氨苄西林耐药的 E4 不受药物抑制,细菌呼吸作用较强,电信号下降程度较多。说明刃天青可以作为氧化还原探针反映细菌活性,并通过细菌与抗生素作用后刃天青的电流变化程度来区分耐药菌和敏感菌。

2.6 电化学方法测定抗生素浓度对大肠杆菌的影响

为了探究电化学药敏试验的适宜抗生素作用浓度,运用 SWV 法研究 10,100,1 000 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄西林分别与大肠杆菌 ATCC 25922 和 E2 作用 1 h 后的变化,并引入 V_{ETA} 值来进行药敏性评估,根据式(2)计算得到图 6。低浓度到高浓度的氨苄西林与大肠杆菌 ATCC 25922 反应 1 h 后的 V_{ETA} 分别是 75.75 ± 3.25 , 59.07 ± 2.50 , 30.04 ± 1.77 ,与 E2 作用 1 h 后的 V_{ETA} 分别为 93.11 ± 1.56 , 83.30 ± 2.24 , 57.81 ± 1.20 。与传统微生物药敏试验进行对照可知,当氨苄西林质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,大肠杆菌 ATCC 25922 的 V_{ETA} 低于 50,表现为敏感;E2 的 V_{ETA} 高于 50,表现为耐药。当氨苄西林质量浓度低于 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,大肠杆菌 ATCC 25922 也表现为耐药,

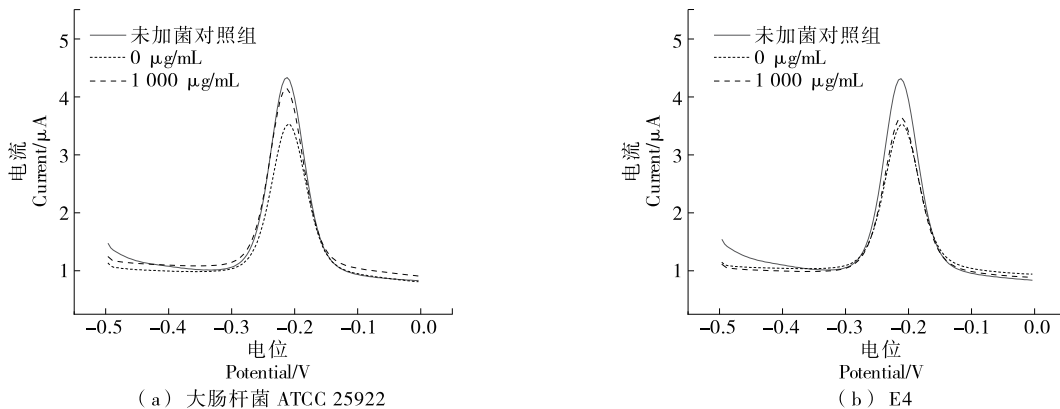


图 5 大肠杆菌 ATCC 25922 和 E4 与氨苄西林作用 1 h 后的 SWV 图

Figure 5 SWV of *E. coli* ATCC 25922 and E4 after 1 h incubating with ampicillin

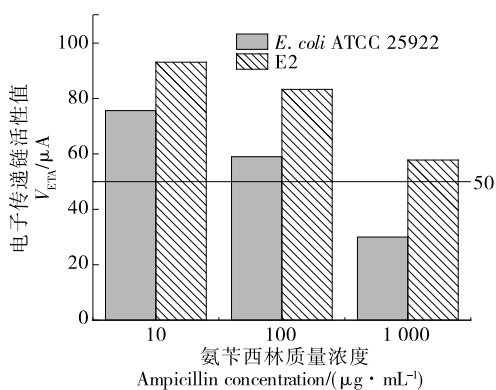


图 6 敏感菌株 *E. coli* ATCC 25922、耐药菌株 E2 与不同质量浓度氨苄西林作用 1 h 后的 V_{ETA} 图

Figure 6 The V_{ETA} diagram of *E. coli* ATCC 25922 and drug-resistant strain E2 exposed to ampicillin at different concentrations for 1 h

说明抗生素质量浓度至少为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，才能产生电化学方法可测量的效果，才能准确检测出敏感菌株和耐药菌株的差别，故在后期的试验中选用 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为氨苄西林的作用质量浓度。

2.7 电化学法检测食源大肠杆菌分离株的耐药性

根据之前试验确定的各项参数和条件，对 5 株食源大肠杆菌分离株进行电化学方法药敏试验，得到电化学药敏试验结果：氨苄西林与 5 种菌作用后的 V_{ETA} 依次为 84.11 ± 3.21 , 57.81 ± 1.20 , 78.74 ± 0.75 , 84.56 ± 1.31 , 41.10 ± 2.03 ；庆大霉素与 5 种菌作用后的 V_{ETA} 依次为 31.00 ± 1.60 , 21.89 ± 3.31 , 74.21 ± 1.96 , 52.11 ± 0.97 , 13.38 ± 0.98 ；环丙沙星与 5 种菌作用后的 V_{ETA} 依次为 59.90 ± 1.56 , 10.44 ± 4.06 , 92.21 ± 2.20 , 81.11 ± 0.71 , 27.99 ± 1.02 。5 株大肠杆菌分离株菌样均来源于中南大学湘雅三医院检验科，并委托该检验科通过纸片扩散法进行药物检测，将电化学方法测得的药敏试验结果与纸片扩散法得到的结果进行比较，如表 1 所示。从表 1 中可以清晰地看出，对 5 种菌进行 3 种抗生素的药敏试验中，对抗生素耐药的菌 V_{ETA} 值基本接近 100，而对抗生素敏感的菌 V_{ETA} 值都小于 50。参考临床和实验室标准协会 (CLSI) 制定的药敏试验标准，当电化学方法测得的 $V_{ETA} \leq 50$ 时，可以初步判定细菌对该抗生素敏感；当电化学方法测得的 $50 \leq V_{ETA} \leq 100$ 时，可以初步判定细菌对该抗生素耐药。

3 结论

研究提出了一种基于刃天青的电化学方波伏安法，用于快速鉴别大肠杆菌的耐药性。并将电化学方波伏安法与传统的耐药性检测方法得到的结果进行对比。结果表明，该方法简单、快速、可靠。与传统检测方法 (18 h) 相比，该法只需 2 h，显著地缩短了检测时间。随着微机械

表 1 电化学法和纸片扩散法药敏试验结果比较[†]

Table 1 Comparison of the results of AST by electrochemical method and paper diffusion method

大肠杆菌	抗生素	纸片扩散法结果	电化学 SWV 法	
			V_{ETA} 值	判别
E1	环丙沙星	R	59.90 ± 1.56	R
	庆大霉素	S	31.00 ± 1.60	S
	氨苄西林	R	84.11 ± 3.21	R
E2	环丙沙星	S	10.44 ± 4.06	S
	庆大霉素	S	21.89 ± 3.31	S
	氨苄西林	R	57.81 ± 1.20	R
E4	环丙沙星	R	92.21 ± 2.20	R
	庆大霉素	R	74.21 ± 1.96	R
	氨苄西林	R	78.74 ± 0.75	R
E5	环丙沙星	R	81.11 ± 0.71	R
	庆大霉素	R	52.11 ± 0.97	R
	氨苄西林	R	84.56 ± 1.31	R
E6	环丙沙星	S	27.99 ± 1.02	S
	庆大霉素	S	13.38 ± 0.98	S
	氨苄西林	S	41.10 ± 2.03	S

[†] R: 耐药; S: 敏感。

技术的发展，其有潜力发展成为一种便携式的抗生素耐药性现场筛查设备。

参考文献

- [1] World Health Organization. What to do about resistant bacteria in the food chain? [J]. Bulletin of the World Health Organization, 2015, 93(4): 217-218.
- [2] SEO K W, KIM Y B, JEON H Y, et al. Comparative genetic characterization of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from chicken meat produced by integrated broiler operations in South Korea [J]. Poultry Science, 2018, 97(8): 2 871-2 879.
- [3] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016 [J]. EFSA Journal, 2018, 16 (2): e05182.
- [4] WANG Y, XU C, ZHANG R, et al. Changes in colistin resistance and MCR-1 abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: An epidemiological comparative study [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2020, 20(10): 1 161-1 171.
- [5] LIU Y Y, WANG Y, WALSH T R, 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]. The Lancet Infectious Diseases, 2016, 16(2): 161-168.
- [6] SKOCKOVA A, KOLACKOVA I, BOGDANOVICOVA K, et al. Characteristic and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from retail meats purchased in the czech republic[J]. Food Control, 2015, 47: 401-406.
- [7] 王振伟, 郑黎静. 线叶金雀花总黄酮提取工艺优化及对大肠杆菌的抑菌作用[J]. 食品与机械, 2022, 38(9): 139-145.
- WANG Z W, ZHENG L J. Optimization of extraction technology of total flavonoids from rooibos and the antibacterial effect on *Escherichia coli*[J]. Food & Machinery, 2022, 38(9): 139-145.
- [8] 夏飞, 郑雪, 吴静, 等. 陕西省常见食源性致病菌耐药性研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(7): 10-18.
- XIA F, ZHENG X, WU J, et al. Antimicrobial resistance of foodborne pathogenic bacteria in Shaanxi province[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(7): 10-18.
- [9] VARDANEGA J, MAGGACIS R, RUNNEGAR N, et al. Discrepancy between VITEK2 and Etest aminoglycoside susceptibility testing for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Pathology, 2021, 53(6): 805-808.
- [10] PÉREZ-LAZO G, MORALES-MORENO A, SOTO-FEBRES F, et al. First report of *Myroides phaeus* bacteraemia identified by Polymerase chain reaction and genetic sequencing[J]. IDCases, 2020, 19: e00695.
- [11] 石洁, 贾璐, 徐安琪. BD BACTEC™ FX 全自动细菌培养仪用于血液细菌检测室间质量评价分析[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(6): 436-439.
- SHI J, JIA L, XU A Q. External quality assessment of blood bacterial testing results by using BDBACTEC™ FX automatic bacterial culture instrument[J]. Clin Hematol (China), 2021, 34(6): 436-439.
- [12] XIONG L, SUN Y H, SHI L, et al. Characterization of antimicrobial resistance genes and class I integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China[J]. Food Control, 2019, 104: 240-246.
- [13] SHAIBU A O, OKOLOCHA E C, MAIKAI B V, et al. Isolation and antibiogram of *Salmonella* species from slaughtered cattle and the processing environment in Abuja abattoirs, Nigeria[J]. Food Control, 2021, 125: 107972.
- [14] 白龙, 邵毅, 黄柳娟, 等. 鸡源细菌中 5 种四环素耐药基因多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与机械, 2018, 34(10): 55-59, 90.
- BAI L, SHAO Y, HUANG L J, et al. Establishment of a multiplex PCR system for detection of five tetracycline resistance genes in poultry bacterial[J]. Food & Machinery, 2018, 34(10): 55-59, 90.
- [15] HANNAH S, DOBREA A, LASSERRE P, et al. Development of a rapid, antimicrobial susceptibility test for *E. coli* based on low-cost, screen-printed electrodes[J]. Biosensors (Basel), 2020, 10(11): 153.
- [16] BOLOTSKY A, MURALIDHARAN R, BUTLER D, et al. Organic redox-active crystalline layers for reagent-free electrochemical antibiotic susceptibility testing (ORACLE-AST) [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 172: 112615.
- [17] TIBBITS G, MOHAMED A, CALL D R, et al. Rapid differentiation of antibiotic-susceptible and-resistant bacteria through mediated extracellular electron transfer[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 197: 113754.
- [18] CHOTINANTAKUL K, SUGINTA W, SCHULTE A. Advanced amperometric respiration assay for antimicrobial susceptibility testing[J]. Anal Chem, 2014, 86(20): 10 315-10 322.
- [19] JALALI F, ELLETT F, IRIMIA D. Rapid antibiotic sensitivity testing in microwell arrays[J]. Technology, 2017, 5(2): 107-114.
- [20] 周英, 钱利安, 黄赤夫. 一种通过快速显色筛选植物提取物的抗菌活性的方法[J]. 食品科学, 2008(5): 140-141.
- ZHOU Y, QIAN L A, HUANG C F. et al. Identification of antibacterial activity of plant extract by A colormetric detection method[J]. Food Science, 2008(5): 140-141.
- [21] LI Z Y, LIU C Q, SARPONG V, et al. Multisegment nanowire/nanoparticle hybrid arrays as electrochemical biosensors for simultaneous detection of antibiotics [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 126: 632-639.
- [22] 吴兴龙, 赵翔文, 赵庆玲. 刃天青还原法在鲍曼不动杆菌及铜绿假单胞菌多黏菌素 B 体外药物敏感性快速检测中的应用[J]. 检验医学, 2019, 34(9): 812-814.
- WU X L, ZHAO X W, ZHAO Q L. Application of resazurin reduction-based assay for the rapid detection of polymyxin B drug susceptibility in vitro in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Laboratory Medicine, 2019, 34(9): 812-814.
- [23] 程鑫, 张珩, 马济美. 一种基于刃天青还原的荧光方法对 β -葡萄糖苷酶活性的检测[J]. 分析测试学报, 2019, 38(3): 360-363.
- CHENG X, ZHANG H, MA J M. Activity determination of β -glucosidase by a turn-on fluorescent method based on reduction of resazurin[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(3): 360-363.
- [24] REN Y J, JI J, SUN J D, et al. Rapid detection of antibiotic resistance in *Salmonella* with screen printed carbon electrodes[J]. Journal of Solid State Electrochemistry, 2020, 24(7): 1 539-1 549.
- [25] CRANE B, HUGHES J P, NEALE S, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing using resazurin bulk modified screen-printed electrochemical sensing platforms [J]. Analyst, 2021, 146(18): 5 574-5 583.
- [26] ZHANG H X, DU G H, ZHANG J T. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro [J]. Chinese Journal of Pharmacology, 2004, 25(3): 385-389.
- [27] ANAND P, AKHTER Y. A review on enzyme complexes of electron transport chain from *Mycobacterium tuberculosis* as promising drug targets [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 212: 474-494.
- [28] WEINER J H, LIM D, BERTERO M G, et al. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2003, 10(9): 681.