

论著

食源性致病菌药敏性检测用参考菌株的研制

秦明倩¹, 杨静², 赵红阳³, 卢行安³, 周巍⁴, 崔生辉⁵, 杨保伟¹

(1. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 杨凌质量技术监督检测检验所, 陕西 杨凌 712100; 3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025; 4. 河北省食品检验研究院, 河北 石家庄 050000; 5. 中国食品药品检定研究院, 北京 100500)

摘要:目的 鉴于当前食源性致病菌药敏性测定用质控菌对常用抗生素较敏感, 而我国分离的大部分菌株对常用抗生素较耐受, 药敏性测定时需选择的抗生素浓度范围非常大, 导致抗生素浪费, 测试结果不准确。方法 本研究研制了5种抗生素最小抑菌浓度(MIC)赋值明确、可用于食源性致病菌(乌普萨拉沙门氏菌、苏卜拉沙门氏菌、汤普森沙门氏菌、印第安纳沙门氏菌、肠炎沙门氏菌)对常见抗生素(链霉素、庆大霉素、氯霉素、头孢西丁、氨苄西林等)药敏性检测用的菌株标准样品。采用琼脂稀释法和微量肉汤稀释法测定菌株的药敏性, 使用真空冷冻干燥方法制备参考菌株标准样品。结果 分别研制得到链霉素、庆大霉素、氯霉素、头孢西丁、氨苄西林 MICs 赋值明确的参考菌株, 菌株药敏性遗传稳定、均匀性和贮存稳定性良好。分别在 37 ℃、4 ℃ 和 -80 ℃ 条件下贮存 13、90、360 d 后, 活菌量基本维持在 10⁵ CFU/瓶以上, 确定的耐药表型均可检出, 抗生素 MICs 值未出现较大波动或漂移。结论 符合我国食源性致病菌耐药特性、抗生素 MICs 赋值明确菌株标准样品的研制, 将有助于丰富我国参考菌株种类, 可以进一步加强耐药菌监测, 确保食品安全。

关键词: 参考菌株; 抗生素药敏性; 均匀性; 储存稳定性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)06-0666-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.06.005

Preparation of qualitative reference strains for antibiotic susceptibility determination of foodborne pathogens

QIN Mingqian¹, YANG Jing², ZHAO Hongyang³, LU Xingan³, ZHOU Wei⁴,
CUI Shenghui⁵, YANG Baowei¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100, China; 2. Yangling Quality and Technical Inspection Institute, Shaanxi Yangling 712100, China; 3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China; 4. Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Hebei Shijiazhuang 050000, China; 5. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100500, China)

Abstract: Objective Based on the fact that the quality control bacteria used for bacterial drug sensitivity determination are commonly sensitive to antibiotics, while most foodborne pathogens isolated in China are relatively tolerant to these antibiotics, the concentration range of antibiotics used for antimicrobial sensitivity test is very wide, which resulting in antibiotic wastes and inaccurate test result. **Methods** In this study, five standard samples with clear minimum inhibitory concentration (MIC) were successfully developed for sensitivity test of common antibiotics (streptomycin, gentamicin, chloramphenicol, cefoxitin and ampicillin). Agar dilution and microbroth dilution method were respectively used to determine the susceptibility of isolates to the antibiotics, the reference strains were developed *via* vacuum freeze-drying. **Results** The reference strains with clear MICs assignment of streptomycin, gentamicin, chloramphenicol, cefoxitin and ampicillin were developed respectively. The antibiotic susceptibility of the reference strains was genetically stable, and the uniform and storage stability of them were good. When stored at 37 ℃ for 13 d, 4 ℃ for 90 d and -80 ℃ for 360 d,

收稿日期: 2021-10-29

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2017YFC1601400)

作者简介: 秦明倩 女 硕士生 研究方向为食品安全与食源性致病菌防控 E-mail: 18733022526@163.com

通信作者: 杨保伟 男 教授 研究方向为食品安全与食源性致病菌防控 E-mail: ybwsheng@nwfafu.edu.cn

崔生辉 男 研究员 研究方向为微生物检测技术 E-mail: cuishenghui@aliyun.com

respectively, the viable bacteria number basically remained above 10^5 CFU/vial. All confirmed antibiotic resistance phenotypes could be detected, and the MICs value of the certain antibiotics did not show apparent fluctuation or drift.

Conclusion The development of reference strains that in line with the characteristics of drug resistance of foodborne pathogens in China with clear MICs assignment to certain antibiotics would help to enrich the types of reference strains in China, and further strengthen the monitoring of drug-resistant bacteria to ensure food safety and public health.

Key words: Reference strain; antibiotic susceptibility; uniformity; storage stability

随着经济的高速发展,食品种类日益丰富,食品成分复杂多样,安全问题也逐渐凸显^[1]。虽然我国为确保食品安全做出了巨大努力,但每年仍会发生各种因微生物引起的食源性疾病和食品召回事件^[2]。抗生素的使用有效降低了食源性疾病的发生率和致死率,在食源性疾病治疗中发挥了不可替代的作用^[3]。然而,由于抗生素在多领域长期使用乃至滥用,导致了多重耐药和泛耐药菌的产生,使抗生素药物疗效显著下降,大大加剧了食源性致病菌给食品安全和人类健康带来的巨大威胁^[4-5]。

对食源性致病菌药敏性的准确检测有利于更好地保证食品安全^[6]。传统的药敏性检测方法主要有琼脂稀释法、纸片扩散法和微量肉汤稀释法等^[7-8],也有 E-test 和全自动药敏测定仪等现代方法^[9-10]。这些方法均可用于检测食源性致病菌对抗生素的敏感性,但仍存在不同方法所得结果具有误差、结果间可比性不强的问题。目前,国内外药敏性测定一般遵循美国临床和实验室标准协会(Clinical Laboratory Standard Institute, CLSI)制定的方法^[11],使用 ATCC25922、ATCC29212、ATCC35218 和 ATCC25923 等作为质控菌株,但这些参考菌株对常用抗生素比较敏感,而我国大部分食源性致病菌分离株对常用抗生素较耐受,抗生素的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)值一般较高。因此,药敏性测定过程需要准备十几种不同浓度的抗生素平板或肉汤,造成严重浪费,极大增加了试验成本。另

外,低浓度抗生素需要使用较高浓度的抗生素贮存液稀释,过度稀释也会导致检测结果不准确。因此,使用抗生素 MIC 值相对较高且赋值明确的参考菌株作为我国食源性致病菌药敏性测定用标准菌株具有实际意义和价值。然而,国内外目前并无此类参考菌株。本研究筛选使用耐药水平较高、抗生素 MIC 赋值明确、药敏性遗传稳定的沙门氏菌,研制适于我国食源性致病菌药敏性特点、可用于药敏性测定的参考菌株,旨在实现对致病菌药敏性检测的标准化,丰富和完善我国细菌菌体标准物质的种类,为逐步摆脱食品检验对进口菌株参考物质高度依赖问题提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

5 株供试菌由实验室前期分别于 2008、2010、2011、2012 和 2013 年采集自广东、北京、福建、上海、陕西、河南和四川等地分离的 2 983 株沙门氏菌中筛选得到,保存于 -80 °C 超低温冰箱。供试菌已获得中国医学细菌保藏中心(National Center for Medical Culture Collections, CMCC)保藏号(表 1)。沙门氏菌标准菌株鼠伤寒沙门氏菌 LT2(*Salmonella* Typhimurium LT2),药敏性测定用质控菌株大肠杆菌 ATCC25922(*Escherichia coli* ATCC25922)、大肠杆菌 ATCC35218(*Escherichia coli* ATCC35218)和粪肠球菌 ATCC29212(*Enterococcus faecalis* ATCC29212)由中国食品药品检定研究院惠赠。

表 1 5 株用于制备参考菌株的沙门氏菌信息

Table 1 Information of 5 *Salmonella* strains for reference strain preparation

菌株编号	血清型	菌株 16S rDNA NCBI 登录号	CMCC 保藏号
RM_AST_SM 102	乌普萨拉沙门氏菌	MK809204	CMCC 47526
RM_AST_SM 121	苏卜拉沙门氏菌	MK809212	CMCC 47559
RM_AST_SM 122	汤普森沙门氏菌	MK809213	CMCC 47558
RM_AST_SM 126	印第安娜沙门氏菌	MK809214	CMCC 47531
RM_AST_SM 160	肠炎沙门氏菌	MK809224	CMCC 47551

1.2 主要仪器与试剂

-80 °C 超低温冰箱(日本 SANYO, MDF-3286S), 4 °C 冰箱(青岛海尔股份有限公司, BCD-205TA), 生物安全柜(美国 Nuair, NU-425-400E), 隔水式恒温培养箱(上海精宏实验室设备有限公

司, GNP-9080), 微量移液枪(德国 Eppendorf, SB4200DT), 立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械公司, LDZX-50KBS), 超纯水机(德国 Millipore, Milli-QSynthesis), 百分之一天平(瑞士 METTLER TOLEDO, XS204), 真空冷冻干燥机(美国 Virtis, SP

SCIENTIFIC wizard 2.0)。

Luria-Bertani (LB) 琼脂培养基、Mueller-Hinton Agar (MHA) 培养基、LB 肉汤、MH 肉汤均购于北京陆桥技术股份有限公司;头孢西丁 (Cefoxitin, CFX)、氨苄西林 (Ampicillin, AMP)、氯霉素 (Chloramphenicol, CHL)、庆大霉素 (Gentamicin, GEN)、链霉素 (Streptomycin, STR) 购自 Sigma 公司,分析纯海藻糖和谷氨酸钠购自广东光华科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化

用无菌接种环蘸取少量保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存管中

的菌液,划线接种于 LB 琼脂培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h,备用。

1.3.2 药敏性遗传稳定性检验

对 5 株代表菌进行传代培养,随机选取每株菌第 1、3、6、9、12、15 代菌株,检测其对表 2 所示抗生素敏感性的遗传稳定性。药敏性检测参考 CLSI 推荐的琼脂稀释法和微量肉汤稀释法同时进行^[12],按照 CLSI 标准判读药敏结果并确定药敏表型。

药敏性测定用抗生素的种类、缩写、使用范围和敏感性判断标准如表 2 所示。

表 2 抗生素种类、使用范围和药敏性判断标准

Table 2 The category, concentration range and susceptibility standard of the antibiotic used for susceptibility test

抗生素	抗生素缩写	抗生素使用范围 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	敏感 /($\mu\text{g}/\text{mL}$) (S)	中介耐药 /($\mu\text{g}/\text{mL}$) (I)	耐药 /($\mu\text{g}/\text{mL}$) (R)
头孢西丁 (Cefoxitin)	CFX	0.5 ~ 64	≤ 8	16	≥ 32
庆大霉素 (Gentamicin)	GEN	0.5 ~ 32	≤ 4	8	≥ 16
氯霉素 (Chloramphenicol)	CHL	8 ~ 128	≤ 8	16	≥ 32
链霉素 (Streptomycin) ^a	STR	2 ~ 256	≤ 32	N/A	≥ 64
氨苄西林 (Ampicillin)	AMP	1 ~ 64	≤ 8	16	≥ 32

注:^a CLSI 未规定链霉素的耐药折点,判定依据为美国国家抗生素耐药监测体系 (<https://www.cdc.gov/narms/antibiotics-tested.html>) 中使用的链霉素耐药折点浓度

1.3.3 参考菌株制备

参考菌株制备在中国检验检疫科学研究院进行。挑取活化后的单菌落,划线于 LB 琼脂斜面, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 20–24 h。取少量菌体,均匀分散在装有无菌冻干保护剂的试管中,混匀。使用磁力搅拌器将制备好的菌悬液轻度旋转 3–5 min,混匀,菌液浓度约为 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL。使用连续分液器分装 1 mL 预制备样品到每个无菌西林瓶中,轻放瓶盖,便于瓶内空气排出形成真空。将西林瓶放入真空冷冻干燥机,设定程序进行冻干。整个冻干过程约需 25–35 h,取出样品后,压盖密封、编号,放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱短期保存。

5 株供试菌各制备 500 瓶参考菌株,样品活菌数约为 $10^6 \sim 10^8$ CFU/瓶,真空西林瓶包装,内盖为橡胶塞,外层覆有铝箔盖。

1.3.4 参考菌株均匀性检验

分别从 500 瓶参考菌株中随机抽取 12 瓶样品,每瓶样品用 60 mL 无菌水于室温下再水化,充分溶解,震荡混匀后梯度稀释。吸取 100 μL 待测样品稀释液,滴加到制备好的 LB 琼脂培养基,涂布均匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h,计数,每个样品重复检测 3 次。按照 GB 4789.2—2016 完成定量检验^[13],对数据进行比较和方差分析 (F 检验),评价样品的均匀性。

1.3.5 参考菌株稳定性检验

1.3.5.1 运输稳定性检验

使用 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 模拟不加冰室温运输条件,考察样品

的运输稳定性。将参考菌株保存于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,分别于第 1、3、5、7、9、11 和 13 d 取样,检测瓶内活菌数和菌株药敏性,每次抽检 3 瓶,每瓶重复检验 3 次。药敏性和活菌数检验方法同 1.3.2 和 1.3.4。

1.3.5.2 短期贮存稳定性检验

使用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 模拟加冰或冷藏运输条件。对保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的参考菌株分别于第 1、3、5、7、9、11、13、21、30、60、90 d 取样,检测瓶内活菌数和菌株药敏性。每次抽检 3 瓶,每瓶重复检验 3 次。检验方法同 1.3.2 和 1.3.4。

1.3.5.3 长期贮存稳定性检验

参考菌株的最适贮存温度是 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,使用 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 模拟长期贮存温度。对保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的参考菌株分别于第 30、60、180、210、300、360 d 取样,检测瓶内活菌数和菌株药敏性。每样每次抽检 3 瓶,每瓶重复检验 3 次。检验方法同 1.3.2 和 1.3.4。

1.4 数据统计分析

使用 Microsoft Office Excel 2019 对试验所得数据进行处理和作图,使用 IBM SPSS Statistics 20.0 Duncan 法进行多因素方差分析和多元回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 供试菌药敏性遗传稳定性

通过琼脂稀释法和微量肉汤稀释法协同测定,5 株对特定抗生素敏感性确定 (即抗生素 MIC 值确

定)的供试菌株(AMP的MIC值为64 μg/mL的菌株1株、STR的MIC值为256 μg/mL的菌株1株、CHL的MIC值为128 μg/mL的菌株1株、CFX的MIC值为64 μg/mL的菌株1株、GEN的MIC值为

32 μg/mL的菌株1株)抽检过程中没有出现相应抗生素MIC值波动较大的情况,表明其药敏性可以稳定遗传,符合制备药敏性检测用参考菌株的基本条件。

表3 供试抗生素对RM_AST_SM102的MIC值及其遗传稳定性

Table 3 MIC and genetic stability of the detected antibiotics to strain RM_AST_SM102

编号	血清型	代数(N)	抗生素 MIC 值/(μg/mL)				
			GEN	STR	CHL	CFX	AMP
RM_AST_SM102	乌普萨拉沙门氏菌	N1	32	256	128	64	64
		N3	32	256	128	64	64
		N6	32	256	128	64	64
		N9	32	256	128	64	64
		N12	32	256	128	64	64
		N15	32	256	128	64	64

2.2 参考菌株均匀性检验

均匀性检验结果表明,每种参考菌株随机抽取的12瓶样品菌落数均约10⁷ CFU/瓶,在95%置信

概率下,F值<F临界值(表4),说明随机抽取的每株菌制备的参考菌株活菌数在瓶间没有显著差异,均匀性满足标准样品要求。

表4 参考菌株均匀性检验方差分析结果

Table 4 Homogeneity analysis of variance of the reference strain

菌株		SS	df	MS	F 值	F 临界值	置信概率
RM_AST_SM 102	组间	0.270 8	11	0.115 5	1.478 8	2.717 3	0.95
	组内	0.036 0	12	0.003 0			
RM_AST_SM 121	组间	0.101 2	11	0.009 2	2.689 6	2.717 3	0.95
	组内	0.036 9	12	0.003 1			
RM_AST_SM 122	组间	0.818 8	11	0.347 2	1.040 1	2.717 3	0.95
	组内	0.034 7	12	0.002 9			
RM_AST_SM 126	组间	0.320 3	11	0.029 1	1.033 9	2.717 3	0.95
	组内	0.337 9	12	0.028 2			
RM_AST_SM 160	组间	2.717 3	11	0.028 3	1.384 0	2.717 3	0.95
	组内	0.027 5	12	0.002 3			

注:SS表示平方和,df表示自由度,MS表示均方差

2.3 参考菌株稳定性检验

2.3.1 37℃运输稳定性

参考菌株贮存于37℃条件下,分别于第1、3、5、7、9、11、13天抽样后菌落计数结果如图1所示。参考菌株瓶内活菌数在前3天内变化幅度明显,数量虽有减少,但活菌含量稳定在10⁴~10⁵ CFU/瓶,5~13 d内活菌数量基本维持不变,满足定性标准样品运输要求。

37℃贮存时,不同时间取样的参考菌株对特定供试抗生素药敏性非常稳定,未出现抗生素MIC值漂移现象(图2)。

2.3.2 短期稳定性

参考菌株于4℃贮存,分别于第1、3、5、7、9、11、13、21、30、60和90天抽样,检测所得活菌数结果如图3所示。检验期内,不同参考菌株瓶内活菌数基本呈现出随时间增加而不断降低的趋势(RM_AST_SM 102除外)。90 d时,瓶内活菌数保持在3.86×10⁵~2.28×10⁶ CFU/瓶,满足定性标准样品短期贮存要求。

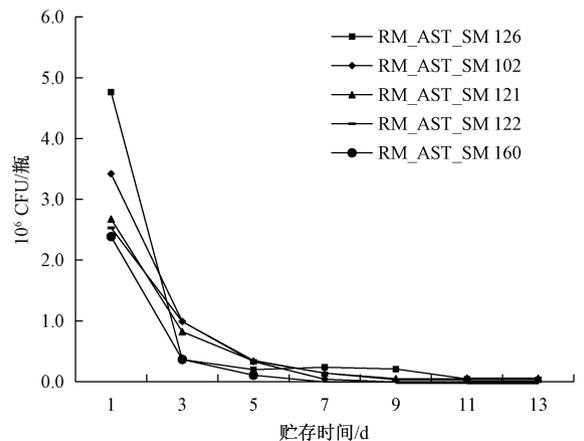
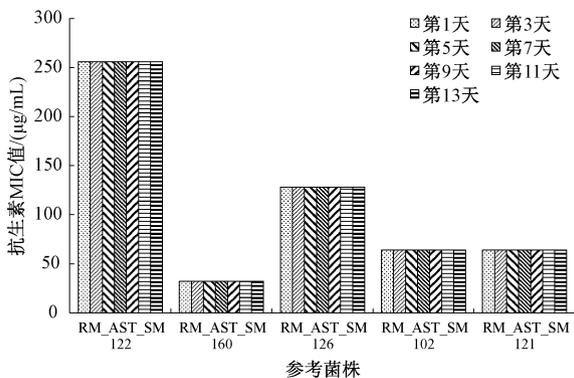


图1 参考菌株37℃贮存稳定性结果

Figure 1 Results of storage stability of reference strains at 37℃

4℃贮存时,不同时间取样的参考菌株对特定抗生素的敏感性非常稳定,未出现抗生素MIC值波动和漂移现象(图4)。参考菌株药敏性在短期贮藏期间稳定性良好。



注:取样后只测定链霉素对 RM_AST_SM 122 的 MIC 值,庆大霉素对 RM_AST_SM 160 的 MIC 值,氯霉素对 RM_AST_SM 126 的 MIC 值,头孢西丁对 RM_AST_SM 102 的 MIC 值,氨苄西林对 RM_AST_SM 121 的 MIC 值

图 2 37 °C 贮存时抗生素对参考菌株的 MIC 值

Figure 2 Results of MIC of the detected antibiotic to the reference strains stored at 37 °C

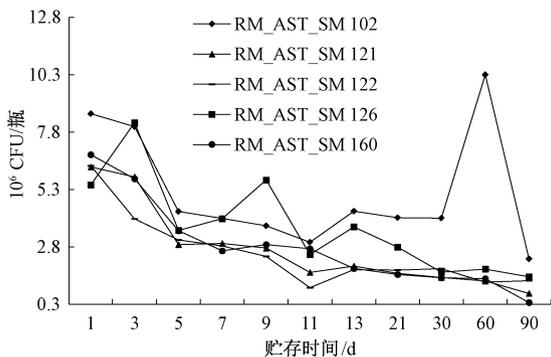
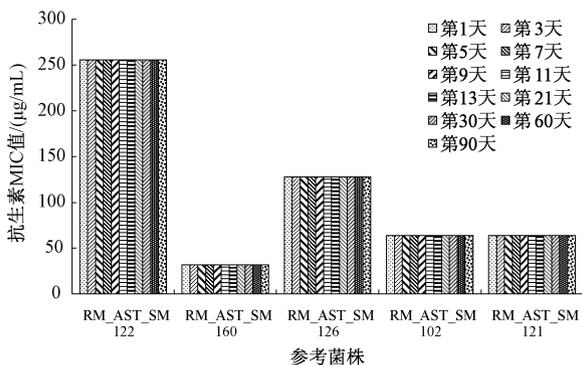


图 3 参考菌株 4 °C 短期贮存稳定性试验结果

Figure 3 Stability test results of reference strains stored at 4 °C



注:取样后只测定链霉素对 RM_AST_SM 122 的 MIC 值,庆大霉素对 RM_AST_SM 160 的 MIC 值,氯霉素对 RM_AST_SM 126 的 MIC 值,头孢西丁对 RM_AST_SM 102 的 MIC 值,氨苄西林对 RM_AST_SM 121 的 MIC 值

图 4 4 °C 贮存时抗生素对参考菌株的 MIC 值

Figure 4 Results of MIC of the detected antibiotic to the reference strains stored at 4 °C

2.3.3 长期稳定性

参考菌株贮存于-80 °C 条件下,分别于第 30、60、180、210、300、360 天抽样,检测所得活菌数结果

如图 5 所示。360 d 内,不同时间取出的样品活菌数均在一定范围内波动(受新型冠状病毒疫情影响,没有得到第 90 天和第 150 天的监测数据),瓶内活菌数始终维持在 10⁶ CFU/瓶水平及以上,满足定性标准样品长期贮存要求。

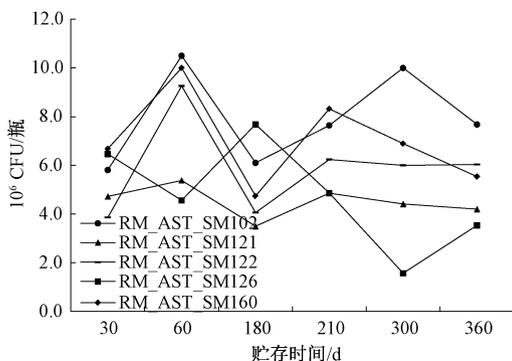
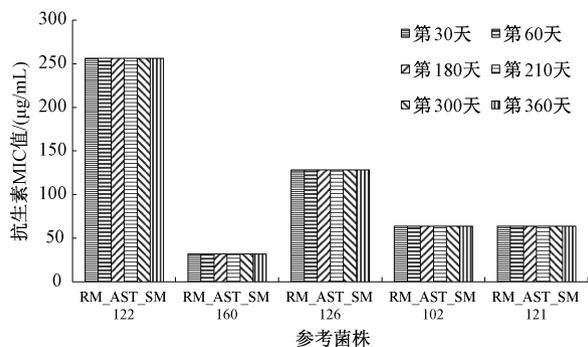


图 5 参考菌株-80 °C 贮存稳定性试验结果

Figure 5 Stability test results of reference strains stored at -80 °C

-80 °C 贮存时,从不同时间取样的参考菌株对特定抗生素的敏感性非常稳定,未出现抗生素 MIC 值波动和漂移现象(图 6)。参考菌株药敏性长期贮藏稳定性良好。



注:取样后只测定链霉素对 RM_AST_SM 122 的 MIC 值,庆大霉素对 RM_AST_SM 160 的 MIC 值,氯霉素对 RM_AST_SM 126 的 MIC 值,头孢西丁对 RM_AST_SM 102 的 MIC 值,氨苄西林对 RM_AST_SM 121 的 MIC 值

图 6 -80 °C 贮存时抗生素对参考菌株的 MIC 值

Figure 6 Results of MIC of the detected antibiotic to the reference strains stored at -80 °C

3 讨论

自我国首次颁发食品中致病菌限量标准以来,我国进一步加强对食品生产、加工、贮藏销售和消费全链条的致病菌风险监测^[14-15]。食源性致病菌通常流行于肉、蛋、乳制品及蔬菜等食物之中^[16],具有较高的发病率和致死率。食源性疾病发生后,临床治疗药物以抗生素为主,但抗生素长期并大量使用导致抗性菌株不断产生与富集,抗生素防治效

果越来越差。与此同时,多重耐药菌感染导致因之造成的死亡风险增加,给公共健康带来巨大威胁。开展食源性致病菌药敏性检测研究对食品安全保障具有重要意义。

要实现耐药食源性致病菌药敏性的精确检测,必须使用相应的参考菌株或阳性质控菌株^[17]。目前,国内外药敏性检测基本参考 CLSI 药敏性测定方法,阳性质控菌主要有 ATCC25922、ATCC29212、ATCC35218 和 ATCC25923 等^[18-20]。这些国际通用的阳性质控菌株对常用抗生素比较敏感,相对而言,我国大部分分离于食品、食品原料和生产环境、食源性疾病病例样本中的菌株对常用抗生素较耐受,按照 CLSI 标准规范进行实验时常会导致不同浓度抗生素以及肉汤的严重浪费,增加试验成本。例如,使用琼脂稀释法或微量肉汤稀释法测定革兰氏阴性肠杆菌对环丙沙星敏感性时,其对 ATCC25922 的 MIC 值可接受浓度范围为 0.004~0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对 ATCC29212 的 MIC 值可接受范围为 0.25~2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而环丙沙星对很多沙门氏菌的 MIC 已超过 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$,甚至达到 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[21]。因此不应使用 ATCC25922 或/和 ATCC29212 作为阳性质控菌株。因此,使用抗生素 MIC 值相对较高且赋值明确的参考菌株作为我国食源性致病菌药敏性测定的参考菌株十分必要。然而,国内目前尚无此类耐药水平不同的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等定性标准样品,不能满足检测过程质量控制一致性的需求。本研究从野生型菌株中筛选出耐药谱广、来源代表性强、抗生素对其 MIC 赋值明确的沙门氏菌作为供试菌制备的参考菌株,可满足我国食源性致病菌药敏检测准确化标准化要求,实现了细菌药敏性检测参考菌株的国产化,同时也丰富了我国标准物质种类,意义重大。

本研究根据 GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3)标准样品定值的一般原则和统计方法》^[22]的要求,从定性和定量 2 个方面对标准样品的均匀性及稳定性进行了检验。参考菌株在 37 $^{\circ}\text{C}$ 贮存 13 d 后,样品瓶内菌落数变化幅度较大,这可能是贮存温度较高引起了部分细胞死亡,瓶内活菌数从 10^7 CFU/瓶降至约 10^3 CFU/瓶。虽然活菌数下降,但供试抗生素对其 MIC 值和药敏性仍保持稳定。参考菌株和其他生物样本在运输过程一般需要采用冷链或加冰处理方式^[23],4 $^{\circ}\text{C}$ 短期贮存定量监测结果表明参考菌株的瓶内活菌数总体上在一定范围内波动,只有 RM_AST_SM 102 在贮存后期菌落数浮动显著,这可能是瓶间原始活菌数存在差异导致抽样瓶内活菌数较高。但在 90 d 的检验周

期内,瓶内活菌数基本稳定在 10^5 CFU/瓶,供试抗生素对其的 MIC 值和药敏性仍保持稳定,符合标准样品要求,可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 短期稳定贮存。-80 $^{\circ}\text{C}$ 贮存 360 d,活菌数含量始终稳定维持在 $10^6\sim 10^7$ CFU/瓶,检测期供试抗生素对参考菌株的 MIC 值保持不变。运用统计学方法对标准样品均匀性进行验证^[24],其均匀性良好,药敏表型可稳定遗传。因此,研究制备的参考菌株可用于食源性致病菌药敏性的准确检验,满足质控要求,也可为相关部门加强食源性致病菌耐药性监测工作和相关政府机构制定食品安全准则、法规提供支持,确保食品安全性和消费者健康。

参考文献

- [1] 钱佳婕,黄迪,徐颖华,等.食源性致病微生物检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(12):4775-4785.
- [2] SHENG L N, ZHU M J. Practical in-storage interventions to control foodborne pathogens on fresh produce[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(5): 4584-4611.
- [3] 赵勇,李欢,张昭寰,等.食源性致病菌耐药机制研究进展[J].生物加工过程,2018,16(2):1-10.
- [4] 陈美玲,逢波.副溶血弧菌耐药现状及耐药机制[J].疾病监测,2018,33(5):370-375.
- [5] 金帆,高艳梅,黄亚佳,等.铜绿假单胞菌感染治疗现状[J].集成技术,2021,10(4):50-66.
- [6] WENG X, ZHANG C, JIANG H. Advances in microfluidic nanobiosensors for the detection of foodborne pathogens[J]. LWT, 2021, 151: 112172.
- [7] ZHANG M M, LIU J F, SHEN Z Q, et al. A newly developed paper embedded microchip based on LAMP for rapid multiple detections of foodborne pathogens[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 1-13.
- [8] 王倩,赵俊桃,陈聪,等.CRISPR/Cas 系统在生物核酸检测中的应用进展[J/OL].生物加工过程,2021,1-12.
- [9] CAFARCHIA C, FIGUEREDO L A, IATTA R, et al. In vitro evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods[J]. Medical Mycology, 2012, 50(8): 795-801.
- [10] 王瑶,徐英春,谢秀丽,等.全自动微生物鉴定药敏分析仪对临床相关细菌药敏测定能力的评估[J].中华检验医学杂志,2007,30(9):1052-1055.
- [11] 刘玉庆,李璐璐,骆延波,等. EUCAST 欧盟药敏试验标准[J].中国标准导报,2016(5):60.
- [12] SADER H S, JONES R N. Impact of EUCAST, CLSI and USCAST ceftaroline breakpoint changes on the susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from US medical centres (2015-2018)[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2020, 26(5): 658-659.
- [13] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定:GB 4789.2—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会.《食品中致病菌限量》(GB

- 29921—2013)国家标准出台[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3):5.
- [15] 郝鹏飞, 任静朝, 张光辉. 新乡市 2017—2018 年即食食品微生物污染状况调查分析[J]. 中国初级卫生保健, 2020, 34(10):99-101.
- [16] AKIRA AYAVA. Antibiotic Resistance: Food Microbiology[J]. Journal of Microbial & Biochemical Technology, 2021, 13(7):1-2.
- [17] 李少博, 贺稚非, 李洪军, 等. 食源性沙门氏菌耐药机制及药敏性检测方法研究现状. 食品与发酵工业, 2016, 42(9):257-262.
- [18] SCHWABER M J, RANEY P M, RASHEED J K, et al. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum β -lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(1):294-298.
- [19] 马越, 金少鸿. 细菌耐药性监测中质量控制的若干问题[J]. 中华检验医学杂志, 2004(11):5-7.
- [20] 石英. 耐甲氧西林葡萄球菌分布及耐药性分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2009, 30(13):1565-1566.
- [21] CHANG M X, ZHANG J F, SUN Y H, et al. Contribution of different mechanisms to ciprofloxacin resistance in *Salmonella* spp. [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 663731.
- [22] 国家标准化管理委员会. 标准样品工作导则: GB/T 15000.3—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [23] 罗超, 李妍, 赵珂珂, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌标准物质冻干保存方法[J]. 上海计量测试, 2019, 46(4):6-10.
- [24] 顾文佳, 张懿翔, 许超, 等. 运用统计学方法对能力验证定性样品的均匀性和稳定性进行评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(21):7138-7141.

· 公告 ·

关于印发《按照传统既是食品又是中药材的物质目录管理规定》的通知

国卫食品发〔2021〕36号

各省、自治区、直辖市及新疆生产建设兵团卫生健康委, 中国疾病预防控制中心、国家食品安全风险评估中心:

根据《中华人民共和国食品安全法》及其实施条例的规定, 经商市场监管总局同意, 我委制定了《按照传统既是食品又是中药材的物质目录管理规定》。现印发给你们, 请遵照执行。

国家卫生健康委

二〇二〇年十一月十日

(信息公开形式: 主动公开)

按照传统既是食品又是中药材的物质目录管理规定

第一条 根据《中华人民共和国食品安全法》及其实施条例, 为规范按照传统既是食品又是中药材的物质(以下简称食药物质)目录管理, 制定本规定。

第二条 以保障食品安全和维护公众健康为宗旨, 遵循依法、科学、公开的原则制定食药物质目录并适时更新。

第三条 食药物质是指传统作为食品, 且列入《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)的物质。

第四条 国家卫生健康委同市场监管总局制定、公布食药物质目录, 对目录实施动态管理。

第五条 纳入食药物质目录的物质应当符合下列要求:

- (一) 有传统上作为食品食用的习惯;
- (二) 已经列入《中国药典》;
- (三) 安全性评估未发现食品安全问题;
- (四) 符合中药材资源保护、野生动植物保护、生态保护等相关法律法规规定。

第六条 省级卫生健康行政部门结合本辖区情况, 向国家卫生健康委提出修订或增补食药物质目录的建议, 同时提供下列材料:

- (一) 物质的基本信息(中文名、拉丁学名、所属科名、食用部位等);
- (二) 传统作为食品的证明材料(证明已有30年以上作为食品食用的历史);
- (三) 加工和食用方法等资料;
- (四) 安全性评估资料;
- (五) 执行的质量规格和食品安全指标。

第七条 安全性评估资料应符合以下要求:

(下转第814页)