

## 适于 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制检测用参考菌株的研制

秦明倩<sup>1</sup>, 马嘉琦<sup>1</sup>, 黄巾凌<sup>1</sup>, 冯承谦<sup>2</sup>, 卢行安<sup>3</sup>, 赵红阳<sup>3</sup>,  
周巍<sup>4</sup>, 崔生辉<sup>5\*</sup>, 杨保伟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100

<sup>2</sup>汉中市汉台区市场监督管理局 过街楼蔬菜批发市场监管所 陕西汉中 723000

<sup>3</sup>中国检验检疫科学研究院 北京 100176

<sup>4</sup>河北省食品检验研究院 河北石家庄 050000

<sup>5</sup>中国食品药品检定研究院 北京 100050)

**摘要** 目的:为了满足系列食品中食源性致病菌携带的  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制快速检测需求,开展了携带此类抗生素耐药性编码基因沙门氏菌参考菌株定性标准样品的研制,以提供溯源性强、评价准确度高、易在各检测机构间开展耐药微生物检测的技术保障。方法:活化实验室-80℃保存的 3 株沙门氏菌,通过 PCR、DNA 测序和 BLAST 比对验证其所携带的  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因,同时检验目标基因的遗传稳定性。在真空冷冻干燥条件下制备活菌量为  $10^6\sim 10^7$  CFU/瓶的菌株标准样品。按照 GB/T 15000.3-2008 要求对参考菌株标准样品进行均匀性检验,使用方差分析法(F 检验)对结果进行统计分析、均匀性评价。分别于 37.4℃和-80℃模拟运输和贮藏条件,检验参考菌株的稳定性。委托具有检验资质的 7 家实验室对参考菌株进行联合定值。结果:3 株候选参考菌株中 1 株同时携带  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因 *bla*<sub>CTX-M-55</sub>/*bla*<sub>TEM-1</sub>, 1 株同时携带 *bla*<sub>TEM-1</sub>/*bla*<sub>OXA-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, 1 株携带 *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, 在 15 代内均可稳定遗传。制备的参考菌株均匀性良好。在 37℃贮藏 13 d, 4℃贮藏 90 d, -80℃贮藏 360 d, 活菌量基本稳定在  $\times 10^4$  CFU/瓶以上。7 家实验室联合定值结果表明,制备的参考菌株特性值与目标一致,可作为标准样品使用。结论:遵循标准样品制备标准和规范,研制了 3 株适于  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制检测用参考菌株,可用于食源性细菌  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制的快速检测。

**关键词** 参考菌株; 标准物质;  $\beta$ -内酰胺酶; 抗生素; 耐药机制

文章编号 1009-7848(2022)12-0313-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.12.031

在众多食品安全风险中,微生物污染已成为全球性公共安全威胁<sup>[1]</sup>。据 WHO 统计和发布,致病性微生物导致全世界 70% 食源性疾病的发生<sup>[2]</sup>,它们会在生产、加工和运输等各个阶段污染食品,造成食源性疾病爆发<sup>[3]</sup>。比较近些年来我国家庭中食源性致病菌引发的疾病暴发事件,了解到沙门氏菌占据食源性致病菌的首位<sup>[4-5]</sup>,使人们更加关注食品微生物风险防控<sup>[6]</sup>。抗生素药物使用是防控致病菌感染最直接、有效的手段<sup>[7-8]</sup>。 $\beta$ -内酰胺类药物抗菌谱广,杀菌能力强,低毒,治疗效果好<sup>[9]</sup>,然而,大量使用导致很多食源性致病菌对其产生耐药性。研究者揭示其耐药是由于致病菌产生的  $\beta$ -

内酰胺酶会与抗生素快速牢固结合,干扰抗生素进入靶位发生作用,或者水解抗生素<sup>[10-11]</sup>,使其抗菌活性丧失<sup>[12]</sup>,以及  $\beta$ -内酰胺酶相关编码基因通常会频繁地在不同细菌间转移<sup>[13]</sup>,导致此类抗生素耐药性传播范围扩大。据统计,目前已有肠炎沙门氏菌、动物源致病性大肠杆菌、泛耐药铜绿假单胞菌等对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的耐药率在逐年增加<sup>[14-17]</sup>。

标准物质兼具均匀性强、稳定性好,测量值精准等特点<sup>[18-19]</sup>,可避免含复杂成分检测背景的干扰。近年来,我国食源性细菌耐受  $\beta$ -内酰胺类抗生素非常普遍,迫切需求准确、快捷检测食源性致病菌携带耐药基因的方法,开展相关菌株的标准物质研制,利于更有效溯源和控制污染源的传播<sup>[20]</sup>。同时,微生物检测参考菌株的研究、验证和使用可以实现具有自主知识产权菌种在食品微生物标准样品领域的广泛应用,缩短抽检、监测机构标准样品采购周期,降低采购价格<sup>[21]</sup>。

收稿日期: 2021-12-19

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

第一作者: 秦明倩,女,硕士生

通信作者: 杨保伟 E-mail: ybwsheng@nwafu.edu.cn

崔生辉 E-mail: cuishenghui@aliyun.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 3株供试菌均为沙门氏菌(*Salmonella*),来源于农贸市场、超市零售食品和食源性疾病临床样本,保存于-80℃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。标准菌株鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* LT2)由中国食品药品检定研究院惠赠。

1.1.2 培养基 LB溶菌肉汤和LB琼脂培养基,北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.3 试剂 Taq DNA聚合酶、10×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free)、MgCl<sub>2</sub>、dNTP Mixture、DL2000 DNA Marker,宝生物工程有限公司(TaKaRa);海藻糖、谷氨酸钠等分析纯化学试剂,广东光华科技有限公司。

1.1.4 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)引物 *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>OXA</sub>和*bla*<sub>CTX-M</sub>扩增和测序用引物见表1。

表1 PCR扩增用引物序列和产物长度

Table 1 Primer sequence used for PCR amplification and the size of corresponding PCR product

基因	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	产物长度/bp	参考文献
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-F</sub> :TTCTGCTATGTGGTGC GGTA	50	307	[22]
	<i>bla</i> <sub>TEM-R</sub> :TCGTTTG GTATGGCTTCATTC			
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-F</sub> :GCATCCACAAACGCTGAAAT	55	227	[22]
	<i>bla</i> <sub>OXA-R</sub> :TGCGAAACCCAAACAACAG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-F</sub> :AAGTAAAGCGAACC GAATCT	61	309	[22]
	<i>bla</i> <sub>CTX-M-R</sub> :ATTGCCCGAGGTGAAGTG			

### 1.2 仪器与设备

基因扩增仪(Mycircle),美国Bio-rad公司;凝胶成像系统(GELDOXR),美国Bio-rad公司;电泳仪(Hema9600),北京六一生物科学仪器有限公司;-80℃超低温冰箱(MDF-3286S),日本SANYO公司;4℃冰箱(BCD-205TA),青岛海尔股份有限公司;超净工作台(SW-CJ-1CU),苏州安泰空气技术有限公司;真空冷冻干燥机(SP SCIENTIFIC wizard 2.0),美国Virtis公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 参考菌株制备

1.3.1.1 菌种活化 首先将冷冻保藏的菌种恢复到室温状态,无菌划线接种菌液于LB琼脂培养基,37℃过夜培养。

1.3.1.2 参考菌株β-内酰胺类抗生素耐药性相关编码基因验证 用无菌牙签挑取适量活化好的单菌落,于100 μL无菌ddH<sub>2</sub>O的PCR管中分散均匀,裂解法制备菌株DNA模板<sup>[23]</sup>。使用PCR检测耐药性相关编码基因,引物见表1。设置PCR扩增条件:94℃预变性10 min;94℃变性1 min,退火1 min,72℃延伸2 min,35个循环;72℃延伸10

min。根据不同基因的引物序列设置退火温度。对PCR产物进行染色和电泳分析,于凝胶成像系统下拍摄扩增产物条带。阳性PCR产物低温送样测序,将结果与原始序列通过BLAST分析和比对,验证基因类型及是否突变。

1.3.1.3 目标基因遗传稳定性检验 对携带β-内酰胺类抗生素耐药性编码基因的3株沙门氏菌连续传代培养,选取每株菌的第1,3,6,9,12,15代检测目标基因的遗传稳定性(表2)。主要操作方法:接种冻存保藏的原代菌株,37℃培养18~24 h后获得第1代菌株;使用无菌接种环随机挑取第1代菌株中的单个菌落,划线、分离、培养;连续重复传代培养直至第15代。分别从各代取菌的同一菌落挑取第1,3,6,9,12,15代培养物,煮沸制备DNA模板,扩增目标基因。PCR扩增条件和序列分析如1.3.1.2节。根据扩增片段大小确定传代过程基因是否丢失。对测序扩增产物、原代菌株的基因序列比对,验证基因是否发生突变。

1.3.1.4 冷冻干燥制备参考菌株 挑取LB培养基活化培养的单菌落,划线至LB斜面,置37℃培养20~24 h。取少许菌体混散在含有无菌冻干保护

表 2 真空冷冻干燥制备的 3 株参考菌株信息

Table 2 Information of the 3 reference strains prepared by vacuum freeze drying

菌株编号	菌株类别	NCBI 号	CMCC 号	标准样品名称
RM_AST_SM 101	爱丁堡沙门氏菌	MK809203	47529	含耐药基因 $bla_{CTX-M-55}/bla_{TEM-1}$ 沙门氏菌定性标准样品
RM_AST_SM 129	印第安纳沙门氏菌	MK809215	50993	含耐药基因 $bla_{TEM-1}/bla_{OXA-1}/bla_{CTX-M-15}$ 沙门氏菌定性标准样品
RM_AST_SM 176	肠炎沙门氏菌	MK809226	50990	含耐药基因 $bla_{CTX-M-3}$ 沙门氏菌定性标准样品

剂的试管中制备菌悬液,然后,加入装有冻干保护剂和转子的锥形瓶中,轻度旋转 3~5 min,混匀,制得菌液浓度在  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL。分装 1 mL 预制备样品于无菌西林瓶中,轻放瓶盖,保证留有空隙,使瓶内空气排出,形成真空。将装好样品的西林瓶放入真空冷冻干燥机,设定程序并运行约 25~35 h。冷冻干燥完成后,将样品压盖密封、编号,于 4 °C 条件短期保存。制备过程及完成样品如图 1 所示。

试验中,3 株参考菌株分别制备 500 瓶,选用西林瓶真空包装,内盖用橡胶塞,外层用铝箔盖加强密封。

**1.3.2 参考菌株均匀性检验** 分别从 3 株菌制备的 500 瓶样品中随机抽取 12 瓶,各用 60 mL 无菌水室温下水化。样品经充分溶解、震荡混匀后,梯度稀释至检验所需浓度。吸取 100  $\mu$ L 待测样品稀释液,无菌均匀涂布培养基,37 °C 培养 18~24 h,每个样品做 3 个平行。按照 GB 4789.2-2016《食品微生物学检验》<sup>[29]</sup>完成菌落计数定量检验,对数据结果进行处理和方差分析,评估样品的均匀性。

### 1.3.3 参考菌株稳定性检验

**1.3.3.1 运输稳定性检验** 因参考菌株于 -80 °C 贮存,故不需要考虑极端低温下的运输稳定性。研究参考菌株在 37 °C 存放 13 d 的活菌数动态,模拟考察不加冰室温运输中活菌数的变化和目标基因的遗传稳定性。对保存在 37 °C 的参考菌株每样每次抽检 3 瓶,每瓶重复检验 3 次。分别从制备完成第 1,3,5,7,9,11,13 d 抽检,共抽检 7 次。活菌数和目标基因检验方法同 1.3.1.2 节和 1.3.2 节。

**1.3.3.2 短期贮存稳定性检验** 对保存在 4 °C 的参考菌株每样每次抽检 3 瓶,每瓶重复检验 3 次。从制备完成至第 1,3,5,7,9,11 d 和 13 d 每天抽检 1 次,之后,每月抽检 1 次,即 21,30,60,90 d,共抽检 11 次,监测活菌数是否变化,耐药基因是

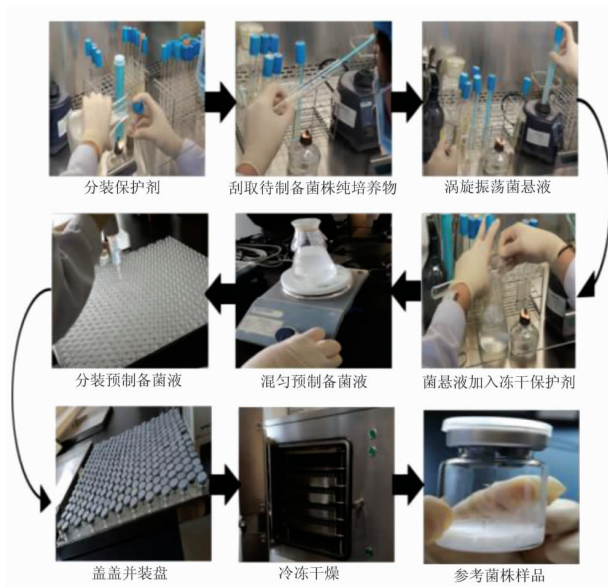


图 1 参考菌株标准样品制备流程图

Fig.1 Procedure of reference strain preparation

否稳定遗传,检验方法同 1.3.1.2 节和 1.3.2 节。

**1.3.3.3 长期贮存稳定性检验** 对保存在 -80 °C 的参考菌株每样每次抽检 3 瓶,每瓶重复检验 3 次。从制备完成至第 3 个月每月 1 次,即第 30,60,90 天。后期视情况而定,若稳定可 2~3 个月抽检 1 次,于第 150,210,300,360 天各抽检 1 次,共 7 次。监测活菌数是否变化,耐药基因是否稳定遗传,检验方法同 1.3.1.2 节和 1.3.2 节。

**1.3.4 参考菌株的联合定值** 为了保证参考菌株的特性值及研制过程的准确性,委托全国 7 家具有定值资质和能力的实验室对参考菌株 RM\_AST\_SM 176 的特性值进行联合定值。每个参与定值的实验室发放 3 个样品,每个样品 2 个平行。测试方法参考 GB 4789.4-2016 和 SN/T 1869-200T 进行<sup>[27-28]</sup>。

## 1.4 数据统计分析

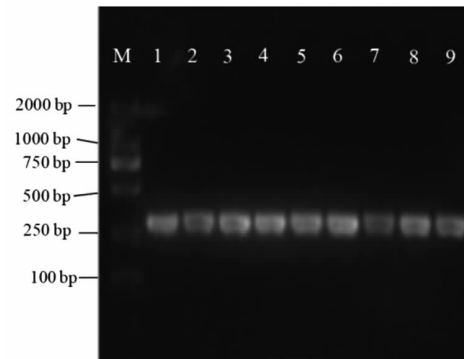
所得数据通过 Excel 2019、SPSS 20.0 统计软

件进行收集、统计学方差分析(Duncan法,  $P < 0.05$ )和作图, 每组试验数据均取得3次平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 供试菌中目标基因遗传稳定性

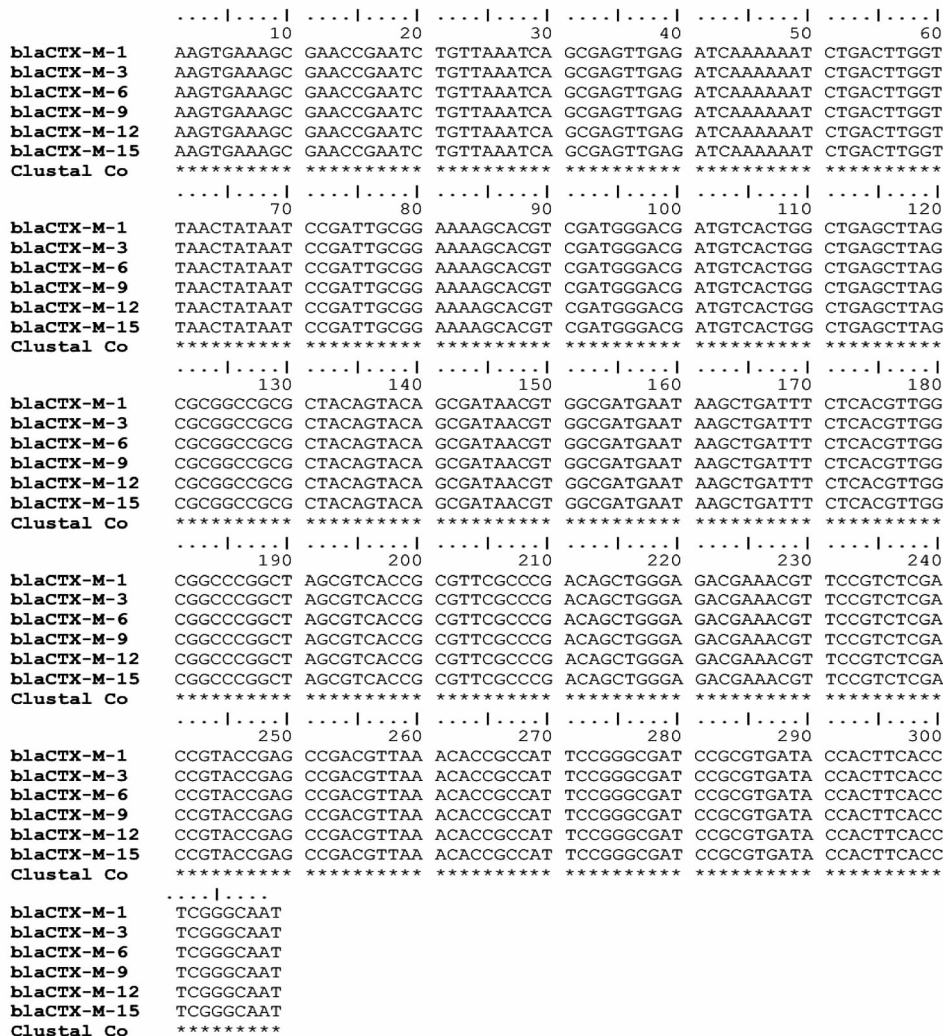
3株菌携带的 *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>OXA</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因扩增条带清晰单一、片段大小一致, 表明目标基因在15代传代中均可稳定遗传(图2: 以 *bla*<sub>CTX-M-3</sub> 为代表的电泳结果)。各代菌株目标基因测序结果与初代菌株无差异, 无基因突变(图3: 以 *bla*<sub>CTX-M-3</sub> 为代表的基因序列比对结果)。3株菌性质稳定, 满足制备β-内酰胺类抗生素耐药机制检测用参考菌株的预期要求。



注: 泳道 M. 2000 bp DNA Marker; 泳道 1~8. *bla*<sub>CTX-M-3</sub> PCR 扩增结果; 泳道 9. 其阳性对照。

图2 耐药基因 PCR 扩增的电泳分析结果

Fig.2 PCR amplification results of antibiotic-resistance encoding genes analyzed by agarose gel electrophoresis



注: 图中从上到下依次表示第 1, 3, 6, 9, 12, 15 代菌株的序列。

图3 不同代菌株中 *bla*<sub>CTX-M-3</sub> 序列比对结果

Fig.3 Results of *bla*<sub>CTX-M-3</sub> sequence alignment in different generational strains

## 2.2 参考菌株均匀性检验结果

检测到由每株参考菌株随机抽取的 12 瓶样品菌落数均为  $\times 10^6$  CFU/瓶。由方差分析可知,随机

抽取的菌株样品活菌数间不存在显著差异( $F$  值  $< F$  临界值,置信概率为 95%,见表 3),表明均匀性满足标准样品要求。

表 3 参考菌株均匀性方差分析检验结果

Table 3 Results of homogeneity variance analysis for reference strains

菌株		SS	df	MS	$F$ 值	$F$ 临界值	置信概率/%
RM_AST_SM 101	组间	0.0533	11	0.0048	1.7414	2.2163	95
	组内	0.0668	12	0.0028			
RM_AST_SM 129	组间	0.2226	11	0.0202	1.3694	2.7173	95
	组内	0.1773	12	0.0148			
RM_AST_SM 176	组间	0.1889	10	0.0189	2.7086	2.7173	95
	组内	0.0767	11	0.0070			

注:表中 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结果

**2.3.1 运输稳定性** 参考菌株在 37 °C 存放 5 d 后,瓶内活菌数有微弱的降低趋势,13 d 时降低 10%~20%,而活菌数量均保持在  $10^4$ ~ $10^5$  CFU/瓶的水平,总体情况稳定,满足定性标准样品要求(图 4)。

贮存于 37 °C,不同时间取样的参考菌株的特征基因均可检出,出现的 PCR 扩增条带清晰单一、整齐明亮、片段大小均匀一致(图 5:以  $bla_{CTX-M-3}$  为代表的电泳结果)。参考菌株目标基因运输稳定性良好。

**2.3.2 短期稳定性** 参考菌株于 4 °C 贮存 90 d,不同时间的活菌数基本维持在  $8.53 \times 10^5$ ~ $5.57 \times 10^6$  CFU/瓶的水平,活菌数下降幅度在 27%左右,总体低于存放在 37 °C 时活菌数的变化率,表明参考菌株在 4 °C 短期储存稳定性良好。

4 °C 贮存时,不同时间取出的样品中目标基因均可检出,得到的 PCR 扩增条带清晰单一,整齐明亮,片段大小均匀一致(图 7:以  $bla_{CTX-M-3}$  为代表的基因扩增电泳结果),表明参考菌株在 4 °C 贮存 90 d 稳定性良好。

**2.3.3 长期稳定性** 参考菌株于 -80 °C 存放 360 d,等时间间隔不同时间点取出的样品中活菌数均落在合理范围浮动(因第 150 天和第 180 天受到新型冠状病毒疫情影响,监测数据无法得到),菌落计数结果维持在  $10^6$  CFU/瓶的水平及以上(图 8),表明参考菌株在 -80 °C 保存稳定性良好。

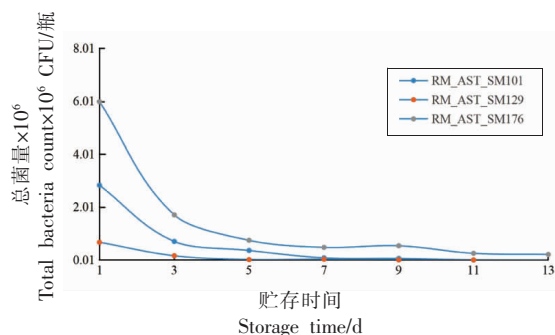
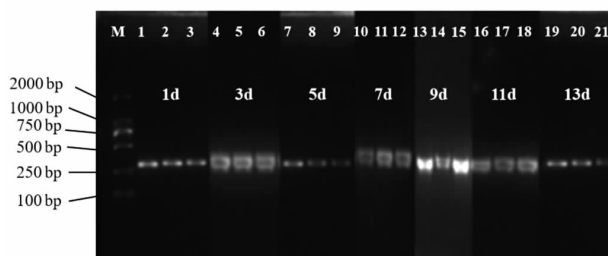


图 4 参考菌株 37 °C 条件下的贮存稳定性结果

Fig.4 Stability results of the reference strains stored at 37 °C



注:每次取 3 个平行样品做试验,从左至右依次为第 1,3,5,7,9,11,13 天的结果。泳道 M 为 2000 bp DNA Marker,1~21 为耐药基因  $bla_{CTX-M-3}$  PCR 扩增结果。

图 5 37 °C 保存参考菌株  $bla_{CTX-M-3}$  PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.5 Results of PCR amplification and agarose gel electrophoresis for  $bla_{CTX-M-3}$  in the reference strain stored at 37 °C

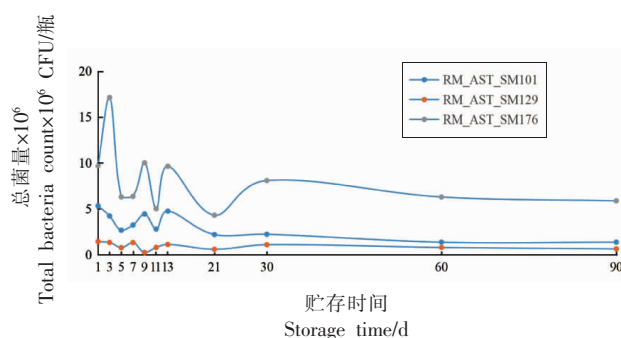
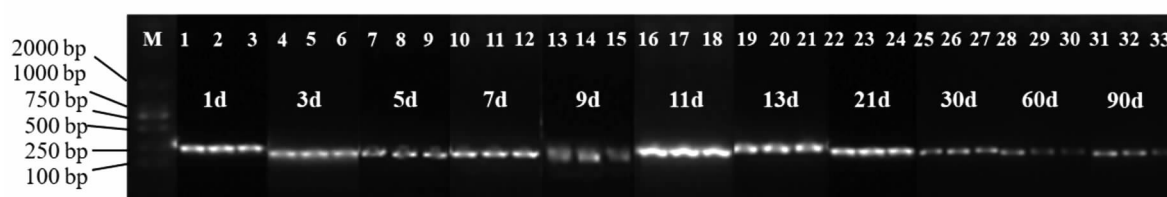


图6 参考菌株 4 °C条件下的贮存稳定性结果

Fig.6 Stability results of the reference strains stored at 4 °C



注:每次取3个样品做试验,从左至右依次为第1,3,5,7,9,11,13,21,30,60,90 d结果。泳道M为2000 bp DNA Marker,1~33为耐药基因  $bla_{CTX-M-3}$  PCR扩增结果。

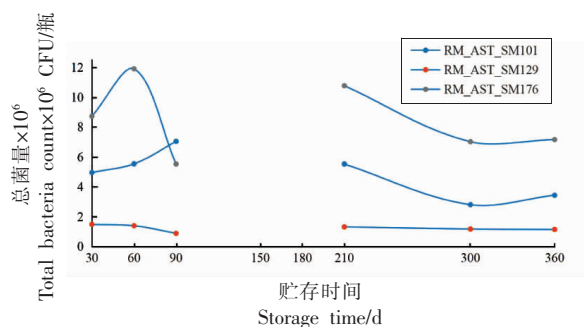
图7 4 °C保存参考菌株  $bla_{CTX-M-3}$  PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳检测结果Fig.7 Results of PCR amplification and agarose gel electrophoresis for  $bla_{CTX-M-3}$  in the reference strain stored at 4 °C

图8 参考菌株-80 °C条件下的贮存稳定性结果

Fig.8 Stability results of the reference strains stored at -80 °C

检测储存在-80 °C的参考菌株特征性基因,目标基因均可被检出,PCR产物电泳结果如图9所示。可扩增出清晰单一的条带,片段大小一致,表明参考菌株在-80 °C长期稳定性良好。

## 2.4 联合定值

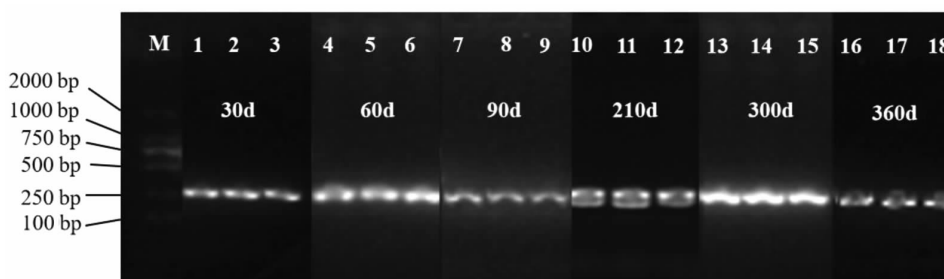
7家实验室的联合定值结果表明,携带 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药基因  $bla_{CTX-M-3}$  的参考菌株 RM\_AST\_SM 176 特性值与预期结果一致,符合

标准样品要求,能够满足预期用途。

## 3 讨论

沙门氏菌是非常普遍的食源性致病菌,在公共卫生安全领域占有主导地位,是公众健康研究的重点关注菌种<sup>[29]</sup>。其携带多种耐药性编码基因,是研制耐药基因和耐药机制检测用参考菌株的合适材料<sup>[30]</sup>。食品微生物检验有力地支撑和保障了我国的食物安全体系<sup>[31]</sup>。虽然全基因组测序可以全面、准确地捕获和检测食源性致病菌携带的耐药基因,有效地掌握其介导的耐药机制,但是耗时较长,专业性也很强,不易在基层推广使用,比较难以实现耐药机制和耐药基因的临检和快检<sup>[32]</sup>。PCR技术相对简单、快捷,利用PCR对检测食源性致病菌所用参考菌株很有必要,可切实保障检测结果的可靠性。

我国多个领域已初步研发出参考物质,并且建立用于研发技术交流、质量评价的国家参考物质资源共享平台<sup>[33]</sup>。然而,在该平台上乃至全球范围内都缺乏适用于食品微生物检验的参考物质,



注:每次取 3 个样品做试验,从左至右依次为第 30,60,90,210,300,360 天结果。泳道 M 为 2 000 bp DNA Marker,1~18 为耐药基因  $bla_{CTX-M-3}$  PCR 扩增结果。

图 9  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存参考菌株  $bla_{CTX-M-3}$  PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.9 Results of PCR amplification and agarose gel electrophoresis for  $bla_{CTX-M-3}$  in the reference strain stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

主要归因于微生物易变异,易发生污染,代谢机制复杂等,纯菌种也大多数由菌种保藏机构来提供。目前,我国市场上对标准物质的需求量和需求品种增长迅速,然而,我国微生物标准物质的研发基础和进度整体性不够。虽然骆海朋等<sup>[36]</sup>研制出阪崎克罗诺杆菌标准物质,夏丹丹等<sup>[37]</sup>制备了大肠杆菌 DNA 定性标准物质,王深垒<sup>[38]</sup>研制了沙门氏菌质粒 DNA 定性标准物质,含有食品基质的微生物参考物质在国内个别机构展开研究和推行,但是目前国内尚无用于介导  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制及耐药基因检测用定性标准样品。

通常将食源性致病菌携带的特定编码基因作为研究目标,方便于对菌株特性进行追踪和检测<sup>[39]</sup>。因此,要求标准菌株中携带特定的编码基因,在菌株的不同代、不同运输和贮藏环境中都可以稳定存在。本研究制备的  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制检测用参考菌株特性基因在 15 代内均可稳定遗传,无突变,可用作标准物质和参考菌株制备的供试菌。

真空冷冻干燥技术可以很好地维持和稳定生物材料在贮藏过程中数量和特性值随温度、时间的变化<sup>[40]</sup>。冷冻干燥操作时,会将微生物与保护剂混合,使微生物细胞形成玻璃化状态,尽可能地消除或减弱冰晶对微生物细胞的伤害,更好地保证微生物活性<sup>[42]</sup>。本研究经真空冷冻干燥技术制备的参考菌株标准物质均匀性良好。制备完成后,对参考菌株标准样品的稳定性检验主要集中在温度对其活性、存活率以及目标基因遗传稳定性的影

响。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存 13 d,前 5 d 菌落数的变化最明显,可能是由于瓶中原始活菌数多,气温较高导致微生物死亡,然而,目标基因稳定性保持良好。参考菌株标准样品最好采用冷链运输,若没有冷链条件则需要加冰处理,可在一定程度上减少微生物活菌数的减少。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存 90 d 后,参考菌株菌落数总体呈下降趋势,部分参考菌株标准样品的活菌数波动幅度较大,可能是由于瓶间原始活菌数存在差异。总体来看,使用过程中将参考菌株短期存放于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱,可使温度对活菌数的影响控制在一定范围内。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存 360 d,每瓶标准样品内的活菌数在贮藏过程随时间的延长虽有一定量的减少,但在一定范围内波动,属于正常情况,活菌数含量一直保持在  $\times 10^4$  CFU/瓶以上,参考菌株稳定性良好,符合标准样品要求。

为切实保证参考菌株特性值的准确性和可靠性,7 家具有食品安全检测资质的承检单位对其联合定值,研制参考菌株标准样品的特性值与联合定值结果是相吻合的,符合参考物质要求。

#### 4 结论

本研究研制出 3 株携带  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因的参考菌株,其均匀性、贮藏性和目的基因遗传稳定性皆良好,可直接用于食品、临床及环境领域  $\beta$ -内酰胺类抗生素相关基因介导的耐药机制的快检和临检,丰富了我国在耐药微生物及其耐药机制检测标准中的参考物质资源。

## 参 考 文 献

- [1] LI Y J, YANG Y F, ZHOU Y J, et al. Estimating the burden of foodborne gastroenteritis due to nontyphoidal *Salmonella enterica*, *Shigella* and *Vibrio parahaemolyticus* in China[J]. *PLoS One*, 2022, 17(11): e0277203–e0277203.
- [2] GROUNDWATER P W, TODD A, WORSLEY A J, et al. The technology and techniques used in the detection of pathogenic bacteria[J]. *Pharmaceutical Journal*, 2009, 283(7569): 281–282.
- [3] European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015[J]. *EFSA Journal*, 2016, 14(12): N/A.
- [4] 张晶, 李薇薇, 杨淑香, 等. 中国 2010–2016 年家庭食源性疾病暴发事件流行特征分析[J]. *中国公共卫生*, 2019, 35(10): 1379–1382.
- ZHANG J, LI W W, YANG S X, et al. Epidemic characteristics of household outbreaks of foodborne diseases in China, 2010–2016[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2019, 35(10): 1379–1382.
- [5] 马金晶, 李凤琴, 黄敏毅, 等. 鲜切果蔬中食源性致病菌污染研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(7): 2591–2599.
- MA J J, LI F Q, HUANG M Y, et al. Research progress of food-borne pathogens contamination in fresh-cut fruits and vegetables[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(7): 2591–2599.
- [6] 陈小敏, 杨华, 桂国弘, 等. 2008–2015 年全国食物中毒情况分析[J]. *食品安全导刊*, 2017, (25): 69–73.
- CHEN X M, YANG H, GUI G H, et al. Analysis of nationwide food poisonings from 2008 to 2015[J]. *China Food Safety Magazine*, 2017, (25): 69–73.
- [7] 刘建平, 袁清连, 李俊彦, 等. 2013–2016 年深圳市食源性疾病暴发流行病学分析[J]. *公共卫生与预防医学*, 2017, 28(2): 6–9.
- LIU J P, YUAN Q L, LI J Y, et al. Analysis on epidemiological characteristics of foodborne disease outbreaks in Shenzhen (2013–2016)[J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2017, 28(2): 6–9.
- [8] LI W W, BAI L, FU P, et al. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(8): 459–466.
- [9] MICHAEL G B, SCHWARZ S. Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend?[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(12): 968–974.
- [10] 吉尚雷, 刘欣, 刘立英. 肉鸡源沙门氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *现代畜牧兽医*, 2021, 50(6): 72–74.
- JI S L, LIU X, LIU L Y. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Salmonella* from broilers[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021, 50(6): 72–74.
- [11] 张庆贺, 张丹俊, 李槿年, 等. 沙门氏菌耐药性研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(17): 27–29.
- ZHANG Q H, ZHANG D J, LI J N, et al. Advances in *Salmonella* resistance[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(17): 27–29.
- [12] JACOBY G A, SUTTON L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991, 35(1): 164–169.
- [13] 许亚丰, 耿先龙, 王春新, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌  $\beta$ -内酰胺酶、膜孔蛋白及  $\beta$ -内酰胺类靶位编码基因研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(1): 58–64.
- XU Y F, GENG X L, WANG C X, et al. Study on genes of  $\beta$ -lactamases, outer membrane and  $\beta$ -lactams target proteins in a strain of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2014, 39(1): 58–64.
- [14] LYNNE A M, RHODES-CLARK B S, BLIVEN K, et al. Antimicrobial resistance genes associated with *Salmonella enterica* serovar Newport isolates from food animals[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(1): 353–356.
- [15] 盛焕精, 李怡澜, 王泽维. IncI1 和 IncN 质粒阳性沙门氏菌耐药及质粒接合转移特征[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 77–84.
- SHENG H J, LI Y L, WANG Z W. Characteristics of antibiotic resistance and plasmid conjugative transfer of IncI1 and IncN plasmid positive *Salmonella*[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 77–84.
- [16] 靳红武, 张赫, 张爽, 等. 北京市顺义区腹泻病例分离沙门氏菌耐药特征分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(3): 295–302.



- JIN H W, ZHANG H, ZHANG S, et al. Drug resistance characteristics of *Salmonella* isolated from diarrheal patients in Shunyi, Beijing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(3): 295-302.
- [17] 许倩倩, 周佳, 杨跃飞, 等. 扬州周边地区临床送检动物源大肠杆菌的耐药性分析及 $\beta$ -内酰胺酶耐药基因检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, 64(3): 82-85, 90.
- XU Q Q, ZHOU J, YANG Y F, et al. Drug resistance analysis and beta-lactamase resistance gene determination of animal-derived *E. coli* in clinic[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 64(3): 82-85, 90.
- [18] 孙青菊, 梁冰. 铜绿假单胞菌对 $\beta$ -内酰胺类抗菌药物耐药及传播机制的研究进展[J]. 微生物与感染, 2013, 8(2): 110-114.
- SUN Q J, LIANG B. Research progresses on drug resistance and transmission mechanisms of *Pseudomonas aeruginosato*-lactam antibiotics[J]. Journal of Microbes and Infections, 2013, 8(2): 110-114.
- [19] 杨菁菁, 艾效曼, 胡云建, 等. 泛耐药铜绿假单胞菌对 $\beta$ 内酰胺类抗生素的耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(1): 14-18.
- YANG J J, AI X M, HU J Y, et al. Examination of the mechanism of  $\beta$ -lactam resistance in pan-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2013, 13(1): 14-18.
- [20] 刘思渊, 王梓权, 甄啸啸, 等. 用于培养基生长率评价的大肠杆菌标准物质研制[J]. 中国测试, 2020, 46(10): 48-53.
- LIU S Y, WANG Z Q, ZHEN X X, et al. Development of reference materials of *Escherichia coli* for productivity ratio evaluation of microbiological media [J]. China Measurement & Test, 2020, 46(10): 48-53.
- [21] 瞿洪仁, 骆海朋, 申静云, 等. 食品检测用单核细胞增生李斯特氏菌标准物质的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 73-78.
- QU H R, LUO H P, SHEN J Y, et al. Preparation of *Listeria monocytogenes* reference material for food analysis[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(1): 73-78.
- [22] 王巧云, 何欣, 王锐. 国内外标准物质发展现状[J]. 化学试剂, 2014, 36(4): 289-296.
- WANG Q Y, HE X, WANG R. Development of reference materials in China and abroad[J]. Chemical Reagents, 2014, 36(4): 289-296.
- [23] 薛蕾, 隋志伟, 张玲, 等. 金黄色葡萄球菌标准物质的研制[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 44-47.
- XUE L, SUI Z W, ZHANG L, et al. Preparation of *Staphylococcus aureus* reference material[J]. Food Science, 2015, 36(8): 44-47.
- [24] 曹正花, 谭艾娟, 吕世明, 等. 贵州省猪源沙门氏菌对 $\beta$ -内酰胺类药耐药性及耐药基因分析[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(7): 1737-1742.
- CAO Z H, TAN A J, LV S M, et al. Analysis of drug resistance and resistant genes of *Salmonella* to  $\beta$ -lactams antimicrobial agents isolated from pigs in guizhou province [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(7): 1737-1742.
- [25] JOSEPH S, DAVID W R. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 王恒梁, 周晓巍, 等译. 3版. 北京: 科学出版社, 2002: 36-42.
- JOSEPH S, DAVID W R. Guidelines for molecular cloning experiments[M]. Translated by HUANG P T, WANG H L, ZHOU X W, et al. 3rd edition. Beijing Science Press, 2002: 36-42.
- [26] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. 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, 2016.
- China Food and Drug Administration (CFDA), National Health and Family Planning Commission (NHFPC). National standard for food safety Food microbiology test, Colony count: GB 4789.2-2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [27] 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 沙门氏菌检验: GB 4789.4-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission (NHFPC), China Food and Drug Administration (CFDA). National standard for food safety Food microbiology test *Salmonella*: GB 4789.4-2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [28] 国家质量监督检验检疫总局. 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR法: SN/T 1869-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (AQSIQ). Rapid detection s for pathogens in foods-PCR: SN/T 1869-2007 [S].

- Beijing: China Standard Press, 2016.
- [29] 张庆贺, 张丹俊, 李槿年, 等. 沙门氏菌耐药性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(17): 27-29.  
ZHANG Q H, ZHANG D J, LI J N, et al. Advances in *Salmonella* resistance[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(17): 27-29.
- [30] 宋晟, 张海韵, 郭焜鹏, 等. 一株鸡源性沙门氏菌的基因组分析[J]. 生命科学研究, 2021, 25(3): 268-275.  
SONG S, ZHANG H Y, GUO K P, et al. Genome analysis of a chicken-derived *Salmonella*[J]. Life Science Research, 2021, 25(3): 268-275.
- [31] 邹达亮, 张佳, 糜志远. 克拉霉素制剂研究应用进展[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(24): 2222-2225.  
ZHOU D L, ZHANG J, MI Z Y. Progresses in research and application of clarithromycin preparations [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2016, 36(24): 2222-2225.
- [32] MU Z J, DU X L, WANG X Y. Identifying internal control genes by quantitative real-time PCR for accurate normalisation of gene expression in[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2021, 49(4): 305-324.
- [33] 钟舒红, 冯世文, 李军, 等. 广西畜禽产品中沙门氏菌血清型、耐药性及耐药基因调查[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 770-780.  
ZHONG S H, FENG S W, LI J, et al. Investigation on serotype, drug resistance and drug resistance gene of *Salmonella* in livestock and poultry products of Guangxi[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(3): 770-780.
- [34] 田颖. 食品中多种水溶性维生素的检测与标准物质的研制[D]. 北京: 北京化工大学, 2011.  
TIAN Y. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in food samples and development of relative reference materials[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2011.
- [35] 黄巾凌, 孟令缘, 盛焕精, 等. 适于制备参考菌株用沙门氏菌的鉴定和特性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 267-276.  
HUANG J L, MENG L Y, SHENG H J, et al. Identification and characteristic of *Salmonella* that could be potentially used for reference strain [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 267-276.
- [36] 骆海朋, 瞿洪仁, 申静云, 等. 阪崎克罗诺杆菌标准物质研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 54-59.  
LUO H P, QU H R, SHEN J Y, et al. Development of microbial reference materials for *Cronobacter sakazakii* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(1): 54-59.
- [37] 夏丹丹, 赵莹莹, 马盼盼, 等. 大肠杆菌 DNA 定性标准物质的制备及在枸杞子污染检测中的应用[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 267-274.  
XIA D D, ZHAO Y Y, MA P P, et al. Preparation of plasmid DNA reference material and its application in rapid detection of Goji berries (*Lycium barbarum*) contaminated with *Escherichia coli* [J]. Food Science, 2020, 41(18): 267-274.
- [38] 王深垒. 沙门氏菌质粒 DNA 定性标准物质的研制及在怀药检测中的应用[D]. 开封: 河南大学, 2020.  
WANG S L. Development of qualitative reference material for plasmid standard of *Salmonella* and its application in the detection of HuaiQing medicine [D]. KaiFeng: Henan University, 2020.
- [39] ZANKARI E, HASMAN H, COSENTINO S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(11): 2640-2644.
- [40] WU H, WANG Y, WU Y, et al. Emergence of  $\beta$ -lactamases and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ES-BLs) producing *Salmonella* in retail raw chicken in China [J]. Foodborne Pathog. Dis, 2015, 12(3): 228-34.
- [41] 杨鑫, 孙智敏, 曾杨, 等. 羊肚菌菌种冻干保藏方法的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(11): 48-50.  
YANG X, SUN Z M, ZENG Y, et al. Preservation method of freeze-dried *Morehella esculenta* mycelium [J]. Food Science and Technology, 2010, 35(11): 48-50.
- [42] 郑从义, 屈三甫, 陶天申. 嗜盐细菌冷冻干燥保护剂的正交法优化[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1994, 65(1): 109-114.  
ZHENG C Y, QU S F, TAO T S. Orthogonal optimization of protective agent for halophilic bacteria freeze drying[J]. Journal of Wuhan University(Natural Science Edition), 1994, 65(1): 109-114.

## Preparation of Reference Strain for $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistance Mechanism Detection

Qin Mingqian<sup>1</sup>, Ma Jiaqi<sup>1</sup>, Huang Jinling<sup>1</sup>, Feng Chengqian<sup>2</sup>, Lu Xingan<sup>3</sup>, Zhao Hongyang<sup>3</sup>,  
Zhou Wei<sup>4</sup>, Cui Shenghui<sup>5\*</sup>, Yang Baowei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi

<sup>2</sup>Market Supervision and Administration Bureau of Hantai District of Hanzhong, Hanzhong 723000, Shaanxi

<sup>3</sup>Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176

<sup>4</sup>Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050000

<sup>5</sup>National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050)

**Abstract** Objective: In order to quickly detect the mechanism of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance carried by food-borne pathogens in a series of foods, the qualitative standard samples of *Salmonella* reference strain carrying  $\beta$ -lactam antibiotic resistance coding genes were developed. It will provide the technical support of strong traceability, high evaluation accuracy and be conducive to widely carry out the detection of drug-resistant microorganisms among various testing institutions. Methods: *Salmonella* isolated previously and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  were subcultured on LB agar plate. 3 *Salmonella* representatives were selected and the encoding genes of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance carried by the 3 strains were verified via PCR amplification, DNA sequencing and BLAST. The genetic stability of the target genes was simultaneously identified. The standard samples of the reference strain with live bacteria amount of  $10^6\sim 10^7$  CFU/vial were prepared by vacuum freeze-drying technique. On the basis of GB/T 15000.3-2008, the three reference strains were tested for homogeneity, the results were statistically analyzed via F test to evaluate their uniformity. The prepared reference strains were stored at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  simulated, respectively, to test their transport stability and storage stability. Seven laboratories with checkout qualifications were commissioned to jointly evaluate the reference strains' characteristic values. Results: The  $\beta$ -lactam antibiotic resistance mechanism associated encoding genes of  $bla_{CTX-M-55}/bla_{TEM-1}$  in one *Salmonella*, of  $bla_{TEM-1}/bla_{OXA-1}/bla_{CTX-M-15}$  in one *Salmonella*, and of  $bla_{CTX-M-3}$  in one *Salmonella* can stably inherit in 15 generations. The homogeneity of the prepared reference strains meets the necessary requirements. When stored at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 13 d,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 90 d and  $-80$  for 360 d, the viable bacteria amount was basically stable and above  $\times 10^4$  CFU/ vial. The characteristic values of the reference strains were consistent with 7 laboratories' and indicated that the prepared strains could be used as the standard samples. Conclusions: In accordance with the standard sample preparation standards and specifications, three reference strains carrying  $\beta$ -lactam antibiotic resistance encoding genes were developed. They meet the requirements of standard samples and can be used for rapid detection of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance mechanism of food-borne bacterial.

**Keywords** reference strain; reference material;  $\beta$ -lactamase; antibiotic; resistance mechanism