

金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒用国家参考品的研制

陈 驰[#], 梁 丽[#], 王春娥, 石继春, 龙新星, 刘茹凤, 黄 洋, 李 康,
徐 潇, 李江姣, 徐颖华^{*}, 叶 强^{*}

(中国食品药品检定研究院, 中国医学细菌保藏管理中心, 卫生部生物技术产品检定方法及其
标准化重点实验室, 北京 102629)

摘 要: **目的** 研制金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒用国家参考品。**方法** 将10株金黄色葡萄球菌和10株阴性对照代表性菌株分别在适宜条件下复苏培养, 制备合适浓度的菌悬液, 并加热灭活和分装。随机抽样不同候选参考品样品10支进行均匀性分析, 并将样品分别置于2~8、25、37℃条件下保藏以及反复冻融, 评价标准物质的稳定性。同时对候选参考品的准确性、特异性、重复性、最低检出限进行分析, 并组织8家实验室进行协作标定。**结果** 制备了由阳性、阴性、重复性和最低检出限样品组成的金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒用候选参考品。不同候选参考品不同样品间的Ct值的变异系数在1.23%~3.86%之间, 表明制备候选参考品均匀性良好。同时证实P1~10阳性和最低检出限候选参考品样品在反复冻融及加速破坏条件下稳定性良好。应用3个不同厂家生产试剂盒进行重复性验证实验显示, 样品的Ct值均小于5.0%, 表明候选参考品的重复性良好。除P6阳性候选参考品样品不能被部分试剂盒检出, 其余阳性参考品样品均能成功检测、最低检出限为 1.0×10^3 个/mL。协作标定结果进一步表明阳性、阴性、重复性和最低检出限候选参考品均符合国家参考品的各项要求。**结论** 研制的金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒用国家参考品已获得批准, 可用于金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒的质量控制和评价。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 核酸; 国家参考品; 均匀性; 稳定性

Development of national reference for *Staphylococcus aureus* nucleic acid detection kit

CHEN Chi[#], LIANG Li[#], WANG Chun-E, SHI Ji-Chun, LONG Xin-Xing, LIU Ru-Feng, HUANG Yang,
LI Kang, XU Xiao, LI Jiang-Jiao, XU Ying-Hua^{*}, YE Qiang^{*}

(National Institute for Food and Drug Control, National Center for Medical Culture Collections, Key Laboratory of the
Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China)

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603900)、国家科技重大专项(2018ZX10102-001)、国家科技基础条件平台项目(NMRC-2021-2)、国家病原微生物资源库项目(国家病原微生物资源库-NPRC-32)

Fund: Supported by the National Key Research and development Program of China (2018YFC1603900), the National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10102-001), the National Research and development Infrastructure and Facility Development Program of China (NMRC-2021-2), and the National Pathogen Resource Center (National Pathogen Resource Center-NPRC-32)

[#]陈驰、梁丽为共同第一作者。

[#]CHEN Chi and LIANG Li are co-first authors.

***通信作者:** 徐颖华, 博士, 研究员, 主要研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究。E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

叶强, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为医学微生物菌种资源的管理及呼吸道细菌疫苗的质量控制。E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn

***Corresponding author:** XU Ying-Hua, Ph.D, Professor, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China. E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

YE Qiang, Master, Chief Technician, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China. E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn

ABSTRACT: Objective To develop national reference for *Staphylococcus aureus* nucleic acid detection kit. **Methods** The selected 10 strains of *S. aureus* and 10 strains of non-*S. aureus* were cultured in the suitable media, respectively, the bacterial suspensions with a suitable concentration were prepared, of which were inactivated by heating and distributed. Ten different candidate reference samples were randomly selected for homogeneity analysis, and the samples were stored at 2-8, 25 and 37 °C as well as repeatedly freeze-thaw to evaluate the stability of the standard materials. Furthermore, the accuracy, specificity, repeatability, and lowest detection limit of candidate reference samples were analyzed, and 8 laboratories were organized to conduct collaborative calibration. **Results** The national references for *S. aureus* nucleic acid detection kit were successfully developed, which comprised of positive, negative samples, minimum detection limit and precision components. The coefficients of variation of the Ct values between different candidate reference samples were between 1.23% and 3.86%, indicating that the uniformity of prepared candidate reference samples was good. Furthermore, it was confirmed that the P1-10 positive and lowest detection limit candidate reference samples had good stabilities under repeated freezing and thawing and accelerated destruction conditions. Ct values of the samples determined by using kits produced by 3 different manufacturers were all less than 5.0%, suggesting that the candidate reference products had good reproducibility. Except for the P6 positive candidate reference sample that could not be detected by some kits, the rest of positive reference samples could be successfully detected, the minimum detection limit was 1.0×10^3 CFU/mL. The collaboration results further indicated that the positive, negative samples, minimum detection limit and precision components in candidate references conformed to the requirements of national reference product. **Conclusion** The national reference for *S. aureus* nucleic acid detection kit developed has been approved, which can be used for the quality control and evaluation of *S. aureus* nucleic acid detection kits.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; nucleic acid; national reference; uniformity; stability

0 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是革兰氏阳性球菌,在人和动物的皮肤、鼻腔、咽喉等部位以及自然界广泛存在^[1-2]。超过 50%以上的金黄色葡萄球菌能够产生肠毒素,引起食物中毒^[3]。统计发现,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒占食源性微生物食物中毒事件的 25%左右,金黄色葡萄球菌成为最重要食源性微生物致病菌之一^[2,4]。

在我国 GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》中,金黄色葡萄球菌为食品安全微生物检验常规检测项目之一,推荐的检测方法为传统细菌培养法,尽管其作为检测方法的“金标准”,准确度高,但耗时长、灵敏度较低。随着分子生物学技术的发展,普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[5]、荧光定量 PCR^[6-7]、环介导等温扩增^[8-10]以及重组酶等温扩增^[11]等检测方法被用于金黄色葡萄球菌的快速检测,但目前尚无统一的金黄色葡萄球菌相关国家参考品用于检测试剂盒的质量控制和评价,导致不同企业的金黄色葡萄球菌快速定性类检测产品缺乏统一的标准衡量,不利于行业水平的整体提升。因此,为了加强金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒的质量控制,本研究选择了 10 株不同来源代表性金黄色葡萄球菌和 10 株非金黄色葡萄球菌细

菌制备成一套金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒用候选国家参考品,并进行系统的验证研究,以确保检测试剂盒的质量提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究选用食源性、院内感染、产肠毒素、抗生素耐药等 10 株不同来源和不同特性的代表性金黄色葡萄球菌作为阳性参考品菌株包括:CMCC(B)26001、26002、26068、26071、26072、26074、26075、26203、26305、26592;制备阴性参考品的菌株:肺炎链球菌 CMCC(B)31001、脑膜炎奈瑟菌 CMCC(B)29052、表皮葡萄球菌 CMCC(B)26069、溶血葡萄球菌 CMCC(B)26608、头状葡萄球菌 CMCC(B)26609、肺炎克雷伯菌 CMCC(B)46117、铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104、伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50071、大肠埃希菌 CMCC(B)44113 和痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51572,阳性和阴性参考品菌株均来源于中国食品药品检定研究院中国医学细菌保藏管理中心。

普通营养琼脂培养基(北京三药公司科技开发公司);金黄色葡萄球菌核酸测定试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司、上海之江生物科技股份有限公司和江苏硕世生物科技股份有限公司,分别编号为厂家 1~3);DNA 提取试

剂盒(德国 Qiagen 公司);中国细菌浊度标准国家标准品(批号: 230021-201960, 中国食品药品检定研究院)。

1.2 仪器与设备

250A 细菌培养箱(北京中仪国科科技有限公司);ABI-7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);VITEK 全自动微生物生化鉴定仪[梅里埃诊断产品(上海)有限公司];microTyper MS 飞行时间质谱系统(江苏天瑞仪器股份有限公司)。

1.3 金黄色葡萄球菌参考菌株的培养和鉴定

将 10 株金黄色葡萄球菌复苏后分别接种至普通营养琼脂平板培养基中,观察菌落形态,使用 VITEK 全自动微生物生化鉴定仪进行生化鉴定。并选取琼脂平板上培养的第 2 代单菌落,进行飞行质谱鉴定。同时对上述菌种新鲜过夜培养物提取细菌全基因组 DNA,以其为模板,参考王珊珊等^[12]的方法,使用 16S rRNA 基因通用引物进行扩增,产物送北京中美泰和生物技术有限公司测序,最后将测序拼接结果提交美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中进行 Blast 比对分析。

1.4 灭活菌液的制备

刮取上述金黄色葡萄球菌复苏后新鲜培养物制备菌悬液,并使用细菌浊度国家标准品进行细菌计数,并以此确定菌悬液浓度。菌悬液经 80 °C 加热 120 min 灭活处理,并经平板涂布法确认无细菌生长后,稀释至适宜浓度;同时也将 10 株阴性参考品菌株接种于各自适宜生长的培养基上,放置 37 °C 培养箱中培养 18~24 h,采用上述方法制备灭活菌悬液,所有灭活菌悬液均保存于 -70 °C 保存备用。

1.5 候选参考品制备

1.5.1 阳性候选参考品

采用灭菌生理盐水,将上述制备的 10 株金黄色葡萄球菌灭活菌液稀释至 5.0×10^6 个/mL,按照 0.5 mL/管定量分装,并依次分别记为 P1~10,制备成阳性候选参考品。

1.5.2 阴性候选参考品

使用灭菌生理盐水将阴性候选参考品的脑膜炎奈瑟菌 CMCC(B)29052 菌悬液稀释至 1.0×10^6 个/mL;肺炎链球菌 CMCC(B)31001、肺炎克雷伯菌 CMCC(B)46117、大肠埃氏菌 CMCC(B)44113 稀释至 1.0×10^7 个/mL,其余 6 株阴性候选参考品菌悬液稀释至 5.0×10^6 个/mL,按 0.5 mL/管定量分装,并依次分别记为 N1~10。

1.5.3 重复性和最低检出限候选参考品

选取金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26203 灭活菌悬液制备重复性和最低检出限候选参考品,使用灭菌生理盐水将菌液稀释至 5.0×10^6 个菌/mL,并按照 0.8 mL/管进行定量

分装,分别标记为重复性和最低检出限候选参考品。

1.6 候选参考品验证分析

1.6.1 均匀性

分别随机抽取阳性(P1~10)、重复性和最低检出限候选参考品各 10 支,使用金黄色葡萄球菌核酸测定试剂盒进行检测,计算不同样品的循环阈值(cycle threshold, Ct)的变异系数,评价候选参考品的均匀性。

1.6.2 稳定性

为了评价候选参考品反复冻融后的稳定性,将放置 -20 °C 冰箱保存的阳性(P1~10)和最低检出限候选参考品取出,于室温(25 °C)左右放置 4 h 后,再放于 -20 °C 冰箱;重复此步骤 3 次和 5 次。用金黄色葡萄球菌核酸测定试剂盒进行检测,同时将 -20 °C 保存的各自候选参考品进行相同稀释度的平行测定。同时,将候选阳性(P1~10)、最低检出限候选参考品分别放置于 2~8、25、37 °C 条件 3、7 d,检测时按 1.5 方法稀释阳性和最低检出限候选参考品样品,然后与 20 °C 保存的对应样品进行平行测定,所有样品均平行测定 2 次。

1.6.3 准确性和特异性

将阳性参考品(P1~10)和阴性参考品(N1~10)分别用灭菌生理盐水 10 倍稀释,选用 3 种不同厂家的金黄色葡萄球菌试剂盒对每份样本平行检测 2 次,每个试剂盒进行 2 次独立实验检测分析,评价候选参考品的准确性和特异性。

1.6.4 重复性

将重复性参考品(10 支)分别用灭菌生理盐水 10 倍稀释,选用 3 种不同厂家的试剂盒对每份样本平行检测 2 次,重复检测 10 次,每个试剂盒进行 2 次独立实验检测分析,评价候选参考品的重复性。

1.6.5 最低检出限

取最低检出限参考品(5.0×10^6 个/mL),用灭菌生理盐水倍比系列稀释成 4 个稀释度 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 个/mL,选用 3 种不同厂家的试剂盒检测每个稀释度样本,每份样本平行检测 2 次,每个试剂盒进行 2 次独立实验,评价候选参考品的最低检出限。

1.7 候选参考品协作标定

将所有检测样品均进行编盲,组织 8 家诊断试剂生产企业实验室进行协作标定,分别使用各自生产的试剂盒进行准确性、特异性、重复性和最低检出限检测分析,并至少进行 2 次独立实验,最终将所有原始结果返还中国食品药品检定研究院统一分析。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 22 软件对稳定性实验数据进行 Kruskal-Wallis 非参数检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 金黄色葡萄球菌参考菌株的鉴定

10 株阳性候选参考品用金黄色葡萄球菌的菌落形态和生化鉴定结果均符合金黄色葡萄球菌的特征。质谱鉴定结果均为金黄色葡萄球菌, 分值在 2.13~2.55 之间, 表明结果鉴定准确度高。

16S rRNA 测序拼接结果经 NCBI 网站进行 Blast 分析, 发现 10 株菌株与 NCBI 数据库中收录的金黄色葡萄球菌模式菌株 DSM 20231 的 16S rRNA 序列相似度均大于 99.8%, 从分子基因水平进一步证实这些阳性菌株为金黄色葡萄球菌。

2.2 候选参考品的灭活效果分析

全部阳性和阴性候选参考品菌液经加热灭活处理后, 验证分析结果显示, 所有灭活菌液在各自适宜的平板培养基上均无细菌生长, 表明候选参考品菌液灭活合格。根据细菌比浊计数确定菌悬液浓度, 采用灭菌生理盐水将阳性、阴性、重复性及最低检出限候选参考品稀释至浓度为 5.0×10^6 个/mL, 并进行定量分装。

2.3 候选参考品的均匀性分析

候选参考品的均匀性结果见图 1, 阳性、最低检出限和重复性候选参考品不同样品间的 Ct 值的变异系数在 1.23%~3.86%之间, 均小于 5.0%, 表明候选参考品的分装均匀度良好。

2.4 候选参考品的稳定性分析

2.4.1 冻融稳定性分析

由图 2a 可知, 样品经反复冻融 3 次和 5 次处理后, 除 100 倍稀释最低检出限候选参考品(S2)样品反复冻融 5 次后未检出, 其他检测样品与-20 °C保存的各候选参考品检测结果相比, 样品 Ct 值的变异系数均在 10%以内, 差异无统计学意义(冻融 3 次 $P=0.415$ 、冻融 5 次 $P=0.618>0.05$)。

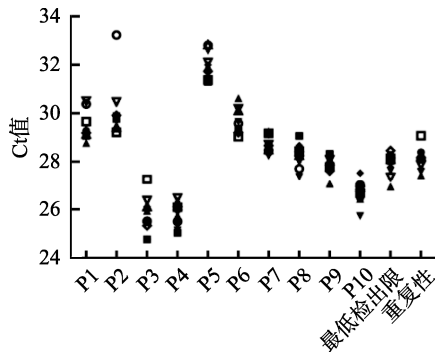
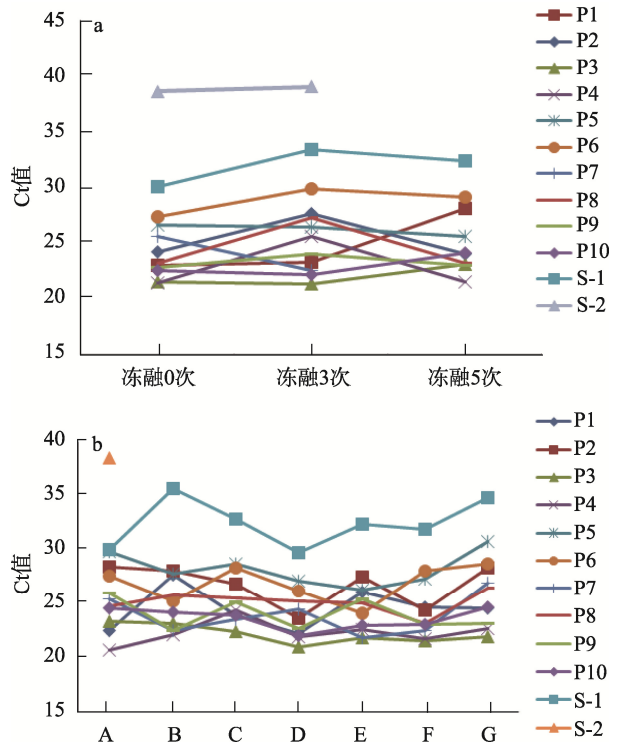


图 1 候选参考品的均匀性分析结果
Fig.1 Uniformity results of the candidate references

2.4.2 加速稳定性分析

由图 2b 可知, 将各候选参考品分别于 2~8、25 和 37 °C 放置 3、7 d 后, 发现稀释的最低检出限参考品(S2)样品未能检出, 而其他样品检测结果与-20 °C保存的候选参考品相比较, Ct 值无显著性差异($P=0.314\sim0.884$, 均大于 0.05), 样品 Ct 值的变异系数均在 10%以内, 表明候选参考品具有良好稳定性。



注: a: 冻融稳定性; b: 加速稳定性; S-1 和 S-2 分别为最低检出限参考品经稀释处理后浓度为 5.0×10^5 和 5.0×10^4 个/mL 的样品; b 图中的 A 为-20 °C保存, B、C 为 2~8 °C 放置 3 和 7 d, D、E 为 25 °C 放置 3 和 7 d, F、G 为 37 °C 放置 3 和 7 d。

图 2 候选参考品的稳定性分析结果
Fig.2 Stability analysis results of candidate references

2.5 候选参考品的准确性和特异性分析

分析结果显示, 厂家 2 试剂盒检测 P1~10 阳性候选参考品稀释样品均显示为阳性, 而另外 2 种试剂盒未能检出 P6 阳性参考品样品, 其余阳性参考品样品均检测为阳性。由于不同试剂盒厂家采用的检测靶基因不同, 导致可能部分阳性参考菌株结果不一致。此外, 3 种不同厂家生产试剂盒检测 N1~10 阴性候选参考品稀释样品均显示为阴性, 表明候选参考品具有良好的准确性和特异性。

2.6 候选参考品的重复性分析

3 个不同厂家生产试剂盒 2 次独立重复性验证实验分

析结果显示, 样本的 Ct 值之间的平均批内变异系数分别为 1.20%、2.99% 和 2.43%, 均小于 5.0%, 表明候选参考品的重复性良好。

2.7 候选参考品的最低检出限分析

厂家 1 和 3 试剂盒的最低检出限为 1.0×10^3 个/mL, 而厂家 2 试剂盒的最低检出限为 1.0×10^4 个/mL, 以上结果提示不同试剂盒具有不同检测灵敏度。

2.8 候选参考品协作标定

协作标定分析结果见表 1, 有 6 家实验室未能检测出 P6 阳性候选参考品样品, 其余样品均检测为阳性; 而另外 2 家实验室检测 P1~P10 阳性候选参考品均为阳性。所有实验室阴性候选参考品检测结果均符合要求; 各实验室重复性候选参考品样品检测 Ct 值的变异系数均在 5.0% 以内; 同时, 发现不同实验室最低检出限参考品结果不尽相同, 与不同试剂盒本身的检测灵敏度密切相关。其中有 1 家实验室结果为 5.0×10^2 个/mL, 而 5 号实验室未检测出 3 个不同稀释度最低检出限样品(表 2)。

3 结论与讨论

国家参考品是核酸类检测试剂盒的产品注册检验和上市审批的重要物质基础, 直接影响诊断类产品的质量^[13]。为了保证研制参考品的质量, 本研究选择与金黄色葡萄球菌感染部位相同或感染临床症状相似医源性和食源性病原体, 以及葡萄球菌属不同种的菌株作为阴性参

考品菌株^[14-15]。同时从中国医学细菌保藏管理中心保存的大量金黄色葡萄球菌标准菌株中选取了 10 株不同来源代表性菌株作为阳性菌株, 尽管以上菌株已有完整形态和生化鉴定记录, 在制备灭活菌液之前, 本研究仍对阳性菌株进行生化、质谱和 16S rRNA 基因序列鉴定。

值得注意的是, 本研究发现多个厂家生产金黄色葡萄球菌试剂盒未能检出阳性候选参考品 P6 样品。目前用于金黄色葡萄球菌检测分析靶基因包括 *Nuc*、*mecA* 和 *Thermonuclease* 等^[6,8,16], 在未能检出 P6 阳性候选参考品试剂盒中, 至少有 2 家也是采用 *Thermonuclease* 基因作为检测靶基因, 通过将 P6 菌株的全基因组序列与这 2 个厂家提供的靶基因序列进行比较, 发现 P6 菌株的 *Thermonuclease* 基因出现了多个碱基缺失, 这可能是导致未能检出主要原因。考虑到 P6 菌株的特殊性以及其它 2 家试剂盒能成功检出该样品的情况, 建议在实际应用中阳性候选参考品 P6 样品检测结果可为阳性或阴性。

标准物质均匀性和稳定性是评价参考品质量的关键参数^[17-18], 通过系统验证, 本研究参考品中所包括各种样品的均匀性良好, 协作标定重复性实验结果也进一步表明各种参考品样品分析结果重复良好、可比性强。按照《国家药品标准物质技术规范》要求, 生物检测相关国家标准物质应设置不同温度(例如 4、25 和 37℃)和不同时间进行加速破坏稳定性试验, 同时, 考虑到参考品在运输、分发、使用过程中, 存在反复冻融、保存温度变化等风险, 要求研制的参考品应具有良好的冻融稳定性^[19-20]。本研究结果

表 1 候选参考品协作标定结果
Table 1 Collaborative results of candidate references

不同实验室试剂盒	P1~10	N1~10	重复性/%		最低检测限/(个/mL)		
			第 1 次	第 2 次	5.0×10^4	5.0×10^3	5.0×10^2
1	+/+(9/10)	-/(10/10)	0.67	0.46	+	-	-
2	+/+(9/10)	-/(10/10)	0.81	1.23	+	-	-
3	+/+(9/10)	-/(10/10)	1.01	4.13	+	+	-
4	+/+(10/10)	-/(10/10)	0.99	1.49	+	+	-
5	+/+(9/10)	-/(10/10)	1.01	0.57	-	-	-
6	+/+(10/10)	-/(10/10)	1.28	1.31	+	+	+
7	+/+(9/10)	-/(10/10)	0.51	0.35	+	+	-
8	+/+(9/10)	-/(10/10)	0.24	0.66	+	-	-

注: +表示检出; -表示未检出。

证实 P1~10 阳性候选参考品在反复冻融及加速破坏条件下稳定性良好,而最低检出限候选参考品稀释 100 倍样品在反复冻融 5 次或在 2~8、25 和 37 °C 放置 3 d 以上,均未能检出,可能与稀释样品中含有较低目标阳性菌 DNA,在反复冻融和 0 度以上温度等不稳定因素影响下发生降解,致使目标菌 DNA 浓度低于最低检出限。尽管根据国际药品标准物质管理的惯例,相关国家药品标准物质不设“有效期”,但中国食品药品检定研究院为了确保参考品的质量,每年度仍将进行质量监测分析^[19-20]。最低检出限参考品是评价诊断类产品检测性能的最重要工具,为其检测下限评价提供依据^[17]。本研究发现不同试剂盒的最低检出量参考品略有不同,但总体远低于实际应用中阳性样品存在的菌体数量,都满足检测需求。

综上所述,本研究研制的一套金黄色葡萄球菌检测试剂国家参考品各项检测指标均符合规定,具有良好的均匀性和稳定性,已获得国家批准(参考品文号:210022-201901),可用于金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒的质量控制和评价。

参考文献

- [1] HENNEKINNE JA, DE BUYSER ML, DRAGACCI S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation [J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(4): 815–36.
- [2] GABRIL A, G VILLA T, BARROS-VELÁZQUEZ J, *et al.* *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis [J]. Toxins, 2020, 12(9): 537.
- [3] LIAO F, GU W, YANG Z, *et al.* Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from food surveillance in southwest China [J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 91.
- [4] HEO S, LEE JH, JEONG DW. Food-derived coagulase-negative *Staphylococcus* as starter cultures for fermented foods [J]. Food Sci Biotechnol, 2020, 29(8): 1023–1035.
- [5] 唐梦君, 周倩, 张小燕, 等. 三种分子生物学方法检测金黄色葡萄球菌的比较研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2247–2251.
- [6] TANG MJ, ZHOU Q, ZHANG XY, *et al.* Comparative study on 3 kinds of molecular amplification methods for rapid detection of *Staphylococcus aureus* [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(6): 2247–2251.
- [7] MEHROTRA M, WANG G, JOHNSON WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1032–1035.
- [8] CHEN C, ZHAO Q, GUO J, *et al.* Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using simultaneous detection of *mecA*, *nuc*, and *femB* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Curr Microbiol, 2017, 74(8): 965–971.
- [9] PANG B, YAO S, XU K, *et al.* A novel visual-mixed-dye for LAMP and its application in the detection of foodborne pathogens [J]. Anal Biochem, 2019, 574: 1–6.
- [10] XIONG J, HUANG B, XU JS, *et al.* A closed-tube loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2020, 191(1): 201–211.
- [11] 后来旺, 李达容, 邓波, 等. 金黄色葡萄球菌 RAA-LFD 快速检测方法的建立与应用[J/OL]. 食品科学: 1-12. [2021-10-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210315.1715.038.html>
- [12] 王珊珊, 石继春, 杜宗利, 等. 乳酶生生产用菌种的全基因组序列分析研究[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(6): 577–583.
- [13] 国家药品监督管理局. 体外诊断试剂注册管理办法[EB/OL]. [2014-07-30]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/fgwj/bmgzh/20140730170001489.html> [2020-06-20].
- [14] ISLAM MN, CHOI J, BAEK KH. Control of foodborne pathogenic bacteria by endophytic bacteria isolated from Ginkgo biloba [J]. Foodborne Pathog Dis, 2019, 16(10): 661–670.
- [15] ABEBE E, GUGSA G, AHMED M. Review on major foodborne zoonotic bacterial pathogens [J]. J Trop Med, 2020, 2020: 4674235.
- [16] WANG XR, WU LF, WANG Y, *et al.* Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 175(2): 882–91.
- [17] 国家标准物质管理委员会. 标准物质的研制、管理与应用[M]. 北京: 中国计量出版社, 2010.
- [18] National standard material management committee. The standard substance, management and application [M]. Beijing: Chinese Metrology

Press, 2010.

- [18] 陈亚飞, 肖新月, 何平, 等. 标准物质稳定性考察规范解读和有效期管理方式的研究[J]. 中国药事, 2018, 32(3): 317-322.

CHEN YF, XIAO XY, HE P, *et al.* Interpretation of reference material stability investigation requirements and study on expiry date management methods [J]. Chin Pharm Aff, 2018, 32(3): 317-322.

- [19] 马玲云, 宁保明, 陈国庆, 等. 国家药品标准物质研制技术要求的介绍[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1990-1992.

MA LY, NING BM, CHEN GQ, *et al.* Introduction of general guidance for the national pharmaceutical reference standards [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(10): 1990-1992.

- [20] 中国食品药品检定研究院. 国家药品标准物质技术规范[EB/OL]. [2011-09-28]. <http://www.nicpbp.org.cn/directory/web/WS02/images/1317189879614.doc> [2020-06-20].

National Institute for Food and Drug Control. Technical specifications for national drug reference materials [EB/OL]. [2011-09-28]. <http://www.nicpbp.org.cn/directory/web/WS02/images/1317189879614.doc> [2020-06-20].

(责任编辑: 郑 丽 于梦娇)

作者简介



陈 驰, 主管技师, 主要研究方向为医学微生物菌种资源的标准化研究及呼吸道细菌疫苗的质量控制。

E-mail: chenchiml@sina.com



梁 丽, 技师, 主要研究方向为医学微生物菌种资源标准化。

E-mail: 41808396@qq.com



徐颖华, 博士, 研究员, 主要研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究。

E-mail: xuyh@nifdc.org.cn



叶 强, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为医学微生物菌种资源的管理及呼吸道细菌疫苗的质量控制。

E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn