《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》（征求意见稿）编制说明

一、标准起草的基本情况

本标准于 2019 年立项（项目编号 spaq-2019-051），项目承担单位为国家食品安全风险评估中心、深圳海关食品检验检疫技术中心、河南省疾病预防控制中心、中国食品科学技术学会。2019 年 9 月 30 日正式启动，2019 年 11 月 14 日召开食品安全国家标准项目启动会，2021 年 6 月 1 日至 7 月 30 日在广泛调查研究和讨论的基础上，起草了本标准，并邀请 5 家以上专业技术机构进行方法标准实验室间验证工作，2021 年 8 月 26 日形成草案，2021 年 9 月 17 日至 9 月 24 日进行行业内征求意见，期间未收到重大分歧意见，2021 年 9 月 30 日形成《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验)》草稿。2021 年 11 月 29 日~30 日经第二届食品安全国家标准审评委员会微生物检验方法与规程专业委员会第七次会议审查通过。

二、标准的主要技术内容

本标准规定了食品中克罗诺杆菌（*Cronobacter spp.*）的检验方法。本标准适用于婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、乳和乳制品及其原料中克罗诺杆菌的测定。标准主要修订内容如下：

1、修改了标准名称《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检验》为《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》。

2、标准适用范围增加婴幼儿辅助食品。

3、删除了挑取黄色菌落和生化鉴定中的产黄色素项目

我国现行食品安全国家标准GB 4789.40-2016中规定了克罗诺杆菌属的检测方法，目前可疑菌落在TSA平板上产黄色素是现行国标中克罗诺杆菌鉴定的关键判断步骤，而文献报道和实际检测中发现部分克罗诺杆菌不产黄色素，因此在新版标准中计划将该步骤及生化鉴定中产黄色素项目删除，同时对应修改了TSA平板的培养温度和时间。

4、删除苦杏仁苷生化反应

目前GB 4789.40-2016中苦杏仁苷生化反应为阳性。使用两种按GB 4789.40-2016附录中配方生产的成品生化管对包括克罗诺杆菌7个种和3个亚种在内的9株标准株在内的100株克罗诺杆菌进行验证。结果显示30 ℃培养24 h后，一种生化管苦杏仁苷的结果均为阴性，另一种97.0%（97/100）为阴性。目前国际上已不再使用该生化反应用于克罗诺杆菌鉴定，而删除该反应也不影响该菌的判定，因此在本次修订中将苦杏仁苷删除。

5、修改了培养基和试剂pH值调节方法

目前GB 4789.40-2016中，各类培养基的pH值均在高压前进行调节，研究发现高压过程会对培养基的成分产生影响从而改变pH值，ISO 22964-2017等国际方法已将该值调整为高压灭菌后25 ℃时的pH值，GB 4789.28-2013中也要求pH值应为灭菌后测定。

5、增加了克罗诺杆菌属水平鉴定的PCR方法

增加PCR属鉴定方法作为选作项目可以减少工作量的同时，节省检测时间。包容性和排他性实验结果显示，ITS属鉴定引物对于克罗诺杆菌有很好的包容性，所有实验室PCR检出率均为100%。该方法包容性较好对于克罗诺杆菌不会发生漏检的情况，能够满足可疑菌落的高通量筛选的需求。

6、修改了选择性增菌肉汤的培养温度

我国现行食品安全国家标准GB 4789.40-2016中规定的克罗诺杆菌属检测方法，采用44 ℃的选择性增菌温度，该温度与ISO 22964-2006相同，目前国际普遍认为该温度可能抑制部分损伤的克罗诺杆菌生长，容易导致污染样品被漏检。而ISO 22964-2017已将选择性增菌温度44 ℃±0.5 ℃修改为41.5 ℃±1 ℃。本标准对乳清蛋白粉、婴配粉和老年奶粉样品的添加实验结果显示，乳清蛋白粉、婴配粉和老年奶粉等样品基质的灵敏度（LOD_{50}）在0.638 CFU/mL~1.867 CFU/mL之间，mLst-Vm肉汤经41.5 ℃培养后检测结果优于44 ℃。同时修改了BPW的预热温度至41 ℃，避免温度较高损伤细菌。

五家实验室间的方法验证结果指标也均符合要求。因此，本方法灵敏度高、准确性好、精密度高，可满足日常检测的要求。

三、国内外相关法规标准情况

我国 GB 4789.40-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检验》适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中克罗诺杆菌属的检验。目前，该方法中选择性增菌肉汤改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）使用的的增菌温度为 44 ℃±0.5 ℃。

目前 ISO 22964-2017 食物链微生物学：克罗诺杆菌水平检测方法（Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.）已将上一版中 44 ℃±0.5 ℃修改为 41.5 ℃±1 ℃，同时产黄色素作为克罗诺杆菌判定条件被删除，以提高克罗诺杆菌的检出率，该方法也是欧盟各国使用的检测方法。美国食品与药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）公布的细菌分析手册（Bacteriological Analytical Manual，BAM）方法不涉及选择性增菌肉汤，该方法采用了 realtime-PCR 方法和选择性平板分离相结合的方案对样品中的克罗诺杆菌进行检测，该方法还包括采用生化方法对克罗诺杆菌的种进行鉴定。涉及到的国内外相关标准情况如表 1 所示。

表 1、国内外相关检验方法标准

<table>
<tr><td colspan="3">项目</td><td>GB 4789.40-2016</td><td>Bacteriological Analytical Manual (BAM)</td><td>ISO 22964-2017</td><td>SN/T 1632.2-2013</td><td>SN/T 1632.3-2013</td></tr>
<tr><td rowspan="5">DAY1
增菌</td><td colspan="2" rowspan="2">取样量</td><td>定性：100 g</td><td>定性：100 g</td><td rowspan="2">10 g (mL)</td><td rowspan="2">100 g</td><td rowspan="2">100 g、10 g、1 g</td></tr>
<tr><td>定量：100 g、10 g、1 g</td><td>定量：100 g、10 g、1 g</td></tr>
<tr><td rowspan="2">增菌液</td><td>基础培养</td><td>BPW</td><td>BPW</td><td>BPW</td><td>BHI</td><td>无菌蒸馏水</td></tr>
<tr><td>培养条件</td><td>36 ℃±1 ℃， 18 h ±2 h</td><td>36 ℃±1 ℃， 24 h ±2 h</td><td>34 ℃~38 ℃， 18 h ±2 h</td><td>36 ℃±1 ℃，水浴 4 h</td><td>36 ℃±1 ℃， 18 h~22 h</td></tr>
<tr><td rowspan="2">DAY2
初筛</td><td colspan="2">选择性培养基</td><td>mLST-Vm</td><td rowspan="2"></td><td>CSB</td><td>mLST-Vm</td><td>肠道增菌肉汤</td></tr>
<tr><td colspan="2">培养条件</td><td>44 ℃±0.5 ℃，24h ±2h</td><td>41.5 ℃±1 ℃，24 h ±2 h</td><td>44 ℃±1 ℃，22 h~24 h</td><td>36 ℃±1 ℃， 18 h~22 h</td></tr>
<tr><td>DAY3
分离</td><td colspan="2">选择性培养基</td><td>阪崎肠杆菌显色培养基</td><td>DFI 和 R&F 琼脂</td><td>CCI 琼脂</td><td>克罗诺杆菌显色平板</td><td>克罗诺杆菌显色平板</td></tr>
<tr><td>DAY4
确认</td><td colspan="2">菌株确认</td><td>生化实验、VITEK</td><td>VITEK 2.0 或 Rapid ID32E</td><td>生化实验</td><td>PCR</td><td>荧光定量 PCR</td></tr>
</table>

四、其他需要说明的事项

无。