ICS XXX

A XXX

团 体 标 准

T/CIQAx-xxxx

乳与乳制品金黄色葡萄球菌定性检测Petrifilm测试片法

Qualitative detection of *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products Petrifilm Method

（征求意见稿-草案）

XXXX-XX-XX发布 XXXX-XX-XX实施

 中国出入境检验检疫协会 发布

**前 言**

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国出入境检验检疫协会进出口食品标准化技术委员会（CIQA/TC)提出并归口。

本文件起草单位：中国海关科学技术研究中心、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、北京三元食品股份有限公司、河北三元食品有限公司、新希望乳业股份有限公司、纽勤生物科技（上海）有限公司。

本文件主要起草人：赵晓娟、王易、李志君、孙英丽、逯刚、喻东威、张双、杨宇、赵珊、孙炜、夏忠悦、宋艳梅、王航、于宝军、张洪沂。

本文件知识产权归中国出入境检验检疫协会所有。任何单位或个人未经许可，不得以营利为目的，印制、出版、翻译、转发或复制全文或部分文字。

乳与乳制品金黄色葡萄球菌定性检测

Petrifilm测试片法

1. 范围

本文件规定了乳及乳制品中金黄色葡萄球菌定性检验方法。

本文件适用于乳及乳制品中金黄色葡萄球菌的定性检验。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB 4789.18 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳及乳制品检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

1. 技术要求
	1. 方法提要

金黄色葡萄球菌Petrifilm®测试片是用一种预先制备的含有指示剂及冷水可溶性凝胶的培养基系统进行微生物培养的方法，含有具有显色功能并经改良的Baird-Parke培养基，对金黄色葡萄球菌具有很强的选择性。金黄色葡萄球菌在测试片上呈现紫红色菌落，若出现除紫红色以外的其他颜色的菌落，则应使用含有显色剂和脱氧核糖核酸（DNA）的金黄色葡萄球菌确认片（Petrifilm Staph Express Disk），进行进一步确认。金黄色葡萄球菌会产生的脱氧核糖核酸酶（DNase），该酶与确认片中的DNA作用使金黄色葡萄球菌菌落呈现粉红色晕圈。

* 1. 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌和培养设备外，其他设备和材料如下：

* + 1. 恒温培养箱：36℃±1℃。
		2. 电子天平：感量0.1 g。
		3. pH计或精密pH 试纸。
		4. 均质器（拍击式）或等效的设备。
		5. 旋涡振荡器。
		6. 无菌移液管：1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)无菌移液管或移液器及吸头。
		7. 接种环：10 μL。
		8. 无菌均质袋：400 mL。
		9. 测试片压板。
	1. 培养基和试剂

实验用水应满足GB/T 6682 中三级水的要求

* + 1. 7.5%氯化钠肉汤：见附录Ａ的A.1，商品化培养基按使用说明进行配制。
		2. 无菌生理盐水：见A.2。
		3. 磷酸盐缓冲液：见A.3。
		4. Petrifilm金黄色葡萄球菌测试片(Petrifilm® Staph Express Count Plate)。
		5. Petrifilm金黄色葡萄球菌确认片（Petrifilm® Staph Express Disk）。
1. 检验程序

金黄色葡萄球菌定性检验程序见图1。

检样

25g（mL）样品 + 225 mL 7.5%氯化钠肉汤，

均质

36℃±1℃

18h～24h

-

 金黄色葡萄球菌测试片划线分离

 24h±2h

36℃±1℃

无菌落

紫红色菌落

其他颜色菌落

确认片

36℃±1℃1h～3h

菌落周围无粉红色晕圈

未检出

检出

菌落周围呈粉红色晕圈

结果报告

# 图1 金黄色葡萄球菌Petrifilm定性检验程序

1. 操作步骤
	1. 样品前处理

乳及乳制品的采样和检样处理参照GB 4789.18进行。

称取25 g样品至盛有225 mL7.5%氯化钠肉汤无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1 min～2 min。若样品为液态，可以在均质袋内预置适当数量的无菌玻璃珠，振荡混匀。样品匀液pH值应为6.5～7.5，样品匀液pH过低或过高时可采用1 mol/L NaOH或1 mol/LHCl进行调节。

* 1. 增菌培养

 将上述样品匀液于36℃±1℃培养18 h～24 h。金黄色葡萄球菌在7.5%氯化钠肉汤中呈混浊生长。

* 1. 分离

将6.2的增菌液充分混匀。取一张金黄色葡萄球菌测试片，揭开上层膜，用 10 μL的接种环取一环增菌液，划线接种于测试片培养基上，立刻取1 mL无菌生理盐水或磷酸盐缓冲液，垂直滴加到测试片培养基中央，将上层膜缓慢落下，避免气泡产生，将压板放置在上层膜中央轻轻压下，使样液均匀覆盖培养，切勿扭转或滑动压板，拿起压板，静置 1 min以使培养基凝固。

* 1. 分离培养

将测试片正置于培养箱内，堆叠片数不超过20片。36℃±1℃，培养 24 h±2 h。

金黄色葡萄球菌在测试片上的典型菌落为紫红色。

* 1. 非典型菌落的确认

如果测试片上出现非紫红色的菌落（例如：黑色或蓝绿色菌落）为非典型菌落，需要用确认片进行确认。将测试片上层膜掀起，将确认片置入测试片的培养基区域，再将上层膜放下覆盖在确认片上，将测试片与确认片压紧贴合，避免产生气泡。

置于36℃±1℃，培养1 h～3 h。

若非典型菌落周围出现粉红色晕圈，可以判断其为金黄色葡萄球菌菌落。

1. 结果与报告

根据6.4和6.5中的典型菌落报告结果。报告25 g(mL)样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

实验室生物安全应满足GB 19489 的要求。

附 录 A

培养基和试剂

A.1 7.5%氯化钠肉汤

A.1.1 成分

 蛋白胨 10.0 g

 牛肉膏 5.0 g

 氯化钠 75.0 g

 蒸馏水 1000.0 mL

A.1.2 制法

 将上述成分加热溶解,调节pH 至7.4±0.2,121℃高压灭菌15 min。

A.2 无菌生理盐水

A.2.1 成分

 氯化钠 8.5 g

 蒸馏水 1000.0 mL

A.2.2 制法

 称取8.5 g氯化钠溶于1000.0 mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15 min。

A.3 磷酸盐缓冲液

A.3.1 成分

磷酸二氢钾（KH2PO4） 34.0 g

蒸馏水 500 mL

pH 7.2

A.3.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH，用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱中。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至100 mL，分装于适宜容器中，121℃高压灭菌15 min。