

团体标准《乳与乳制品金黄色葡萄球菌定性检测 Petrifilm 测试片法》 编制说明

（征求意见稿）

一、工作简况

1、任务来源

本文件由中国出入境检验检疫协会提出并归口，中国海关科学技术研究中心作为本文件组织协调单位。根据中国出入境检验检疫协会团体标准化工作委员会 2022 年第一批团体标准制修订计划，由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）有限公司等单位共同参与起草，计划于 2024 年 11 月底前完成该标准的制定工作。

2、主要工作过程与工作计划

2024 年 3-4 月：提出制定标准项目，并进行了标准立项征求意见和论证工作；

2024 年 5 月：中国出入境检验检疫协会公布计划项目；

2024 年 6-8 月：进行前期调研、存在问题分析和相关资料收集整理等准备工作，拟定了标准“编制说明”编写大纲，并起草了“标准草案”；

2024 年 8 月：召开标准启动会，围绕标准草案进行讨论

2024 年 9 月：按照启动会专家意见和建议修改标准草案，形成标准“征求意见稿”；

2024 年 9-10 月：公开征求意见，对征求到的意见进行分类采纳处理，形成“标准送审稿”；

2024 年 10 月：召开标准审定会，根据与会专家的意见，对标准送审稿进行修改完善，形成标准报批稿，将标准报批稿和标准说明一并上报中国出入境检验检疫协会审批；

2024 年 11 月：标准发布。

3、主要参加单位和工作组成员及其所做的工作等

项目责任单位：纽勤生物科技（上海）有限公司。

项目参与单位：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。

本标准主要起草人：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。

二、标准编制原则和主要研究内容

1、编制原则

全国人大常委会在 2017 年 11 月 4 日审议通过新修订的《标准化法》，该法第二条规定：“标准包括国家标准、行业标准、地方标准和团体标准、企业标准。”从法律上进一步明确了团体标准地位。我国现行的法规体系中，国家标准、行业标准、地方标准属于政府标准，由政府主导制定；团体标准和企业标准属于市场标准，由市场自主制定。政府标准与市场标准协同发展、协调配套。市场标准除了快速反应市场需求外，其承载的一个重要功能就是创新。

本标准立足国内食品安全发展实际，在符合国家食品安全相关法律法规、标准要求的前提下，引入国际上最新的微生物检测方法，完成本土吸收转化后，制定出具有较大行业影响力的、规范严谨、可行性强的标准检验方法文件。同时，标准制定工作还遵循“面向市场、服务产业、自主制定、适时推出”的原则，将标准制定、试验验证、应用推广相结合，统筹推进。标准的编写结构和内容编排等方面依据 GB/T 1.1《标准化工作导则》、GB/T 20000《标准化工作指南》等系列标准的要求，重点对标准适用范围、检验步骤等关键要素进行了明确，以突出标准的科学性、可靠性和合理性的特点。

根据我国食品安全国家标准 GB 29921-2021 预包装食品中致病菌限量，对于巴氏杀菌乳、调制乳、发酵乳、加糖炼乳（甜炼乳）、调制加糖炼乳要求采用比较严格的二级采样方案，金黄色葡萄球菌的限量为： $n=5$ ， $c=2$ ， $m=0/25\text{g (mL)}$ 。检验方法按 GB4789.10 第一法金黄色葡萄球菌定性检验执行。基于国家标准的要求，本标准在制定的过程中，结合相关使用单位的生产现状，综合研究了金黄色葡萄球菌定性检验的各类快速检验方法，其中 Petrifilm®测试片法以其良好的灵敏度、特异性、排他性等技术优势在各乳制品生产企业具有广泛的应用，可以帮助企业提高检测效率、缩短检测时间、加快产品放行，同时操作更为简便、更加节省空间，从而减少误差和降低能耗。此外，Petrifilm 测试片法作为国内外广泛应用的检验方法，已经被 AOAC 定为官方方法，同时也纳入了我国出入境检验检疫行业标准，但是均为定量检验方法。因此金黄色葡萄球菌 Petrifilm 测试片法定性检验标准的提出和制定，填补了方法空白，同时有利于协调统一该标准在技术上的先进性、经济上的合理性以及应用中的适用性。

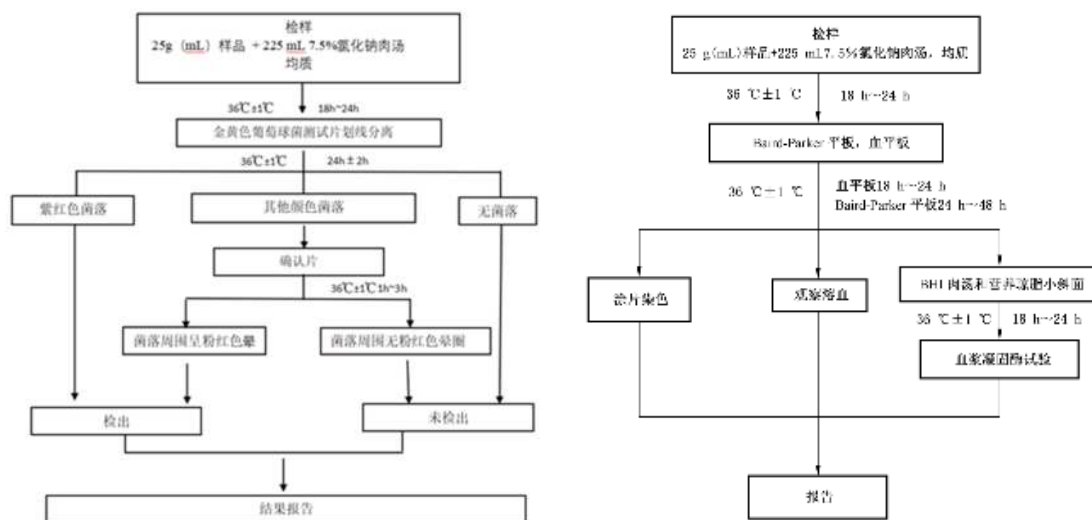
2、主要研究内容

Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试系统由测试片和确认片两部分组成，是基于预制的选择性培

培养基和阳性结果确认技术对金黄色葡萄球菌进行检测，其检测原理为：

Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片含改良 Baird-Parker 培养基，该培养基配方具有一定的选择性，可以抑制非目标菌的生长；同时测试片培养基配方含有特异性指示剂，金黄色葡萄球菌是唯一能将指示剂转化成紫红色色素的细菌，可区分目标菌金黄色葡萄球菌和非目标菌，当样品中背景菌较高时，测试片中的抑制成分不能完全抑制背景菌，可能会使菌落显示非紫红色（例如，菌落呈现黑色等），故需要用确认反应片进行确认。确认反应片含脱氧核糖核酸（DNA）和指示剂（甲苯胺蓝，蓝色染料），可以确认非紫红色菌落是否为金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌产生脱氧核糖核酸酶(DNase)，该酶会分解确认反应片中的 DNA，分解的 DNA 与确认反应片中的蓝色染料发生反应，产生粉红色晕圈。金黄色葡萄球菌确认反应片是可选的步骤，当出现紫红色以外的其他颜色的菌落时，需使用确认反应片。

本标准的研制根据 GB4789.45-2023《食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》，以 GB4789.10 第一法作为参考方法，对 Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片法的包容性、排他性、方法灵敏度等方面进行了研究。金黄色葡萄球菌定性检测 Petrifilm 测试片法与 GB4789.10 第一法相比，在检测时间上大约只需 45h，而 GB4789.10 第一法最少需要 77h 左右。金黄色葡萄球菌定性检测 Petrifilm 测试片法在检测时间上可以缩短 32h。两种方法的检测流程见图 1。两种方法在其他方面的比较见表 1。



A. Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片法检测流程

B. GB 4789.10-2016 第一法检测流程

图 1. 两种方法的检测流程

表 1 金黄色葡萄球菌定性检测 Petrifilm 测试片法与 GB 4789.10-2016 第一法的比较

	培养基和试剂种类	工作量	结果观察	G 染色
金黄色葡萄球菌定性检测 Petrifilm 测试片	2	小	简单	不需要
GB 4789.10-2016 第一法	4	大	复杂	需要

根据 GB 29921-2021 预包装食品致病菌限量中对于金黄色葡萄球菌的规定，本标准的制定旨在协助乳制品企业建立金黄色葡萄球菌的快速定性检测方法，因此本标准检验方法适用于巴氏杀菌乳、调制乳、发酵乳、加糖炼乳（甜炼乳）、调制加糖炼乳等乳制品中金黄色葡萄球菌的快速、定性检验。

三、主要试验（或验证）情况

根据《GB 4789.45-2023 食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》对于“定性方法”的验证，实验室内部验证指标（参见 GB 4789.45-2023 表 1）包括：灵敏度、包容性和排他性共计 3 个指标的验证，实验室间验证（参见 GB 4789.45-2023 表 1）进行方法灵敏度的验证。

首先确定两种检验方法是“配对还是非配对分析”。依据 GB 4789.45-2023 对“配对/非配对检验”的解释即“2 种定性方法同时检验某一样品时，若第一步增菌方法相同，可使用该样品的同一试样进行分析，该分析称为‘配对分析’，若第一步增菌方法不同，则使用该样品的不同试样分别进行分析，该分析称为‘非配对分析’”。本研究的 Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片方法与 GB 4789.10-2016 的第一法采用同一个“检样”，既使用同一个“25g（mL）”的样品，用同一种增菌液即“7.5%氯化钠肉汤”，从同一增菌液中取增菌液按照 GB 4789.10-2016 的第一法接种 BP（Baird-Parker）平板和血平板，Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片方法接种 Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片。因此，本方法验证属于“配对分析”。

1. 验证实验室的选择

选择具 CNAS 和 CMA 资质，菌株资源丰富，具有方法验证和制定标准经验的政府实验室或第三方实验室；验证实验室负责组建方法验证团队，验证团队应由 2-3 名成员组成，其中一人为本研究的负责人。本次验证实验室内验证选择“中国海关科学技术研究中心食品安全研究所”简称“食品安全所”。食品安全所具 CNAS 和 CMA 资质，长期从事微生物检测试剂盒评价工作，曾制定 20 余项“试剂盒”类检验检疫行业标准，在海关系统具有非常大的影响力。实验室间验证选择具 CNAS 和 CMA 资质的广州海关技术中心、杭州海关技术中心和中检科（北京）测试技术有限公司。

2. 验证依据

《食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》GB 4789.45-2023。

3. 参比方法

GB 4789.10-2016 的第一法

4. 验证参数

4.1 检测灵敏度验证

灵敏度研究是指参考方法或 Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片方法检出目标微生物的能力。

4.1.1 代表性食品的选择：

依据 GB 4789.45-2023 的 3.2 条款，即“适用范围少于 5 种食品种类，应全部选择。每种食品种类至少选择 1 种食品子类”，本团体标准适用于“乳及乳制品”，根据 GB 4789.45 的“表 A.1 食品种类和食品子类”，选择一个子类进行方法验证。室内验证选用“巴氏杀菌乳”样品进行方法验证。样品由伊利集团提供，为了验证的公平性掩盖了样品基本信息。

4.1.2 低水平阳性样本的添加

实验室内验证检测灵敏度：低水平菌体添加的量为：0.7 CFU/mL，结果阳性率为 60 %；将 1mL 低浓度添加水平菌液添加到 25mL 巴氏杀菌乳样品中，制备 20 个平行样品；阴性对照取 25mL 巴氏杀菌乳样品，加入 1mL 无菌生理盐水，制备 5 个阴性平行样品；阳性对照取 25mL 巴氏杀菌乳样品，加入 7 CFU/mL 浓度的阳性菌悬液 1mL，制备 5 个阳性平行样品；充分混匀。

质量控制：5 个阴性样品均为阴性、5 个阳性样品均为阳性，结果成立。检测灵敏度结果见表 2。实验室内验证图片见图 2。

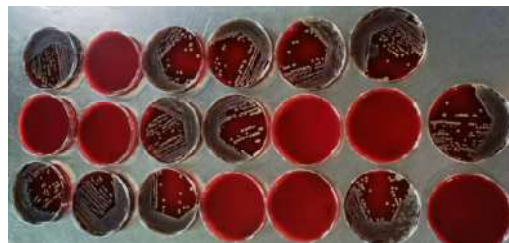
表 2 低水平阳性添加的（检测灵敏度）实验结果

序号	参比方法	测试片方法	备注
1	+	+	/
2	-	-	/
3	+	+	/
4	+	+	/
5	-	-	/
6	-	-	/
7	+	+	/
8	+	+	/

9	+	+	/
10	-	-	/
11	+	+	/
12	+	+	/
13	-	-	/
14	-	-	/
15	+	+	/
16	+	+	/
17	-	-	/
18	+	+	/
19	-	-	/
20	+	+	/
阴性样品 1	-	-	/
阴性样品 2	-	-	/
阴性样品 3	-	-	/
阴性样品 4	-	-	/
阴性样品 5	-	-	/
阳性样品 1	+	+	/
阳性样品 2	+	+	/
阳性样品 3	+	+	/
阳性样品 4	+	+	/
阳性样品 5	+	+	/
注：+：表示阳性结果；-：表示阴性结果			



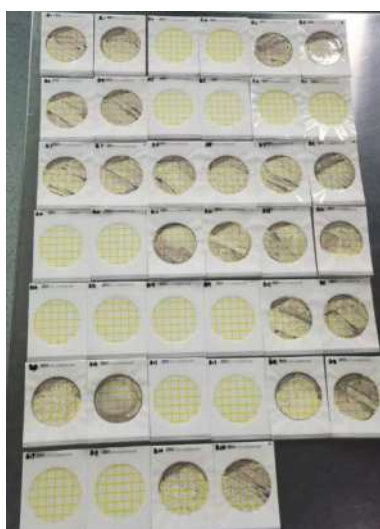
A 实验过程



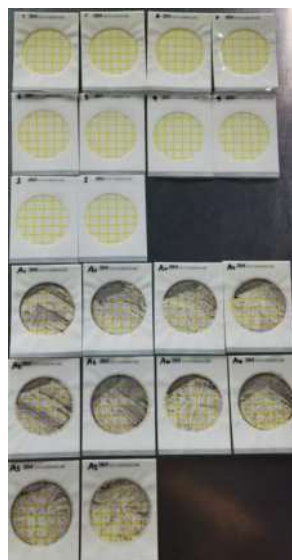
B. GB 4789.10 第一法血平板结果



C. GB 4789.10 第一法 BP 平板结果



D. Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片



E. 阴性和阳性对照

图 2. 实验室内验证检测灵敏度实验结果图

方法灵敏度 RLOD 的计算 (GB 4789.45 附录 B 的公式 B.2):

B.2 RLOD 的计算

根据式(B.2)计算 RLOD。

$$RLOD = \frac{\ln[n_{ref}/(n_{ref} - y_{ref})]}{\ln[n_{val}/(n_{val} - y_{val})]} \dots\dots\dots(B.2)$$

式中:

- n_{ref} ——参考方法的测试总数;
- y_{ref} ——参考方法的阳性结果数;
- n_{val} ——待验证方法的测试总数;
- y_{val} ——待验证方法的阳性结果数。

根据上述公式计算金黄色葡萄球菌 Petrifilm 测试片实验室内验证相对方法检出限 (RLOD) 为 1, 符合 GB 4789.45 中 4.1.2 中对配对检验检测灵敏度的要求。

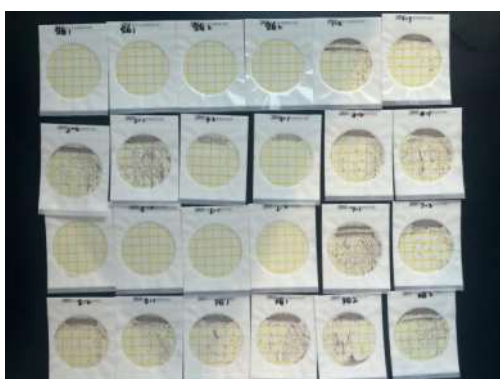
实验室间验证检测灵敏度: 低水平菌体添加的量为: 0.7 CFU/mL, 结果阳性率为 50-60 %; 将 1mL 低浓度添加水平菌液添加到 25 mL 巴氏杀菌乳样品中。每个实验室制备 8 个阳性添加平行样品; 阳性样品取 25mL 巴氏杀菌乳样品, 加入 7 CFU/mL 浓度的阳性菌悬液 1mL, 制备 2 个阳性平行样品; 阴性样品取 25mL 巴氏杀菌乳样品, 加入 1mL 无菌生理盐水, 制备 2 个阴性平行样品。充分混匀。

质量控制：2 个阴性样品均为阴性、2 个阳性样品均为阳性，结果成立。汇总 3 家协同验证实验室实验数据于表 3。实验室间验证图片见图 3、图 4。

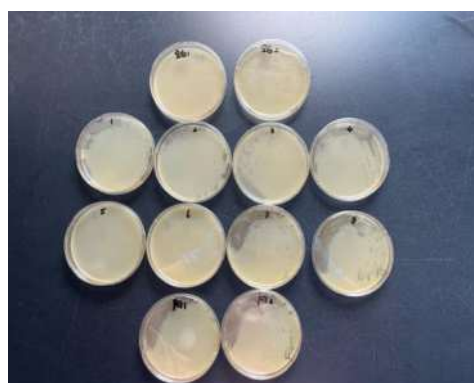
表 3 实验室间验证结果数据汇总

实验室	序号	参比方法结果	测试片方法结果	备注
中检科（北京）测试技术有限公司	1	+	+	/
	2	+	+	/
	3	+	+	/
	4	-	-	/
	5	+	+	/
	6	-	-	/
	7	+	+	/
	8	-	-	/
	阴性样品 1	-	-	/
	阴性样品 2	-	-	/
	阳性样品 1	+	+	/
	阳性样品 2	+	+	/
杭州海关技术中心	1	+	+	/
	2	+	+	/
	3	+	+	/
	4	+	+	/
	5	-	-	/
	6	-	-	/
	7	+	+	/
	8	+	+	/
	阴性样品 1	-	-	/
	阴性样品 2	-	-	/
	阳性样品 1	+	+	/
	阳性样品 2	+	+	/
广州海关技术中心	1	+	+	/

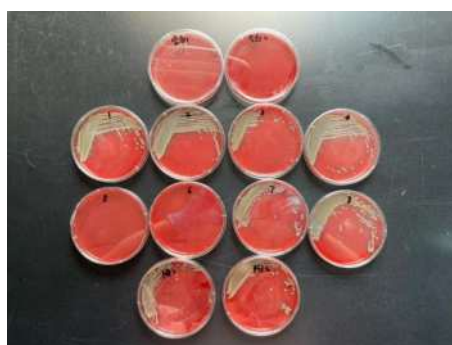
	2	+	+	/
	3	-	-	/
	4	+	+	/
	5	-	-	/
	6	+	+	/
	7	+	+	/
	8	-	-	/
	阴性样品 1	-	-	/
	阴性样品 2	-	-	/
	阳性样品 1	+	+	/
	阳性样品 2	+	+	/
注：+：表示阳性结果；-：表示阴性结果				



A. Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片

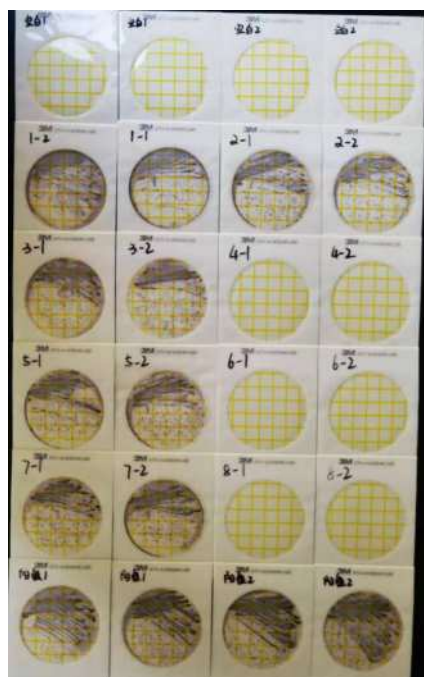


B. BP 平板结果



C. 血平板结果

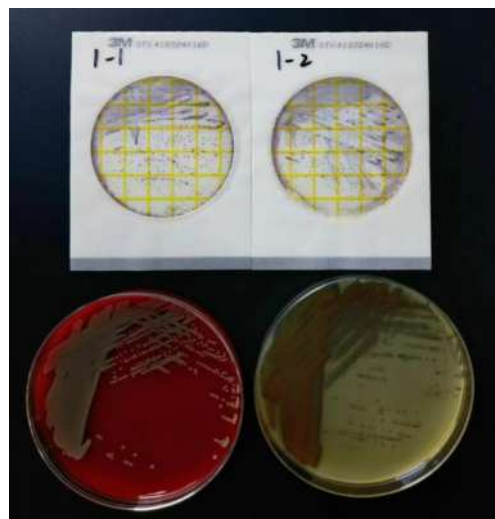
图 3. 杭州海关实验结果



A. Petrifilm 金黄色葡萄球菌测试片



B. 血平板结果



C. 阳性对照

图 4. 中检科（北京）测试技术有限公司

实验室间协同验证的 RLOD 值的计算：

根据 GB 4789.45 附录 B 的公式 B.2 计算 RLOD，实验室间协同验证的 RLOD=1。

4.1.3 检测灵敏度验证结论

综合实验室内验证和实验室间验证的 RLOD 为 1，说明金黄色葡萄球菌 Petrifilm 测试片法定

性检验乳及乳制品中的金黄色葡萄球菌的检测灵敏度与 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》的第一法的检测灵敏度相当。根据 GB 4789.45-2023 的“4.1.2 验证要求”，针对配对分析，RLOD 的可接受限为 1.5，RLOD 低于 1.5 是可以接受的。本次协同验证 RLOD 为 1，符合 GB4789.45-2023 对检测灵敏度的验证要求。

4.2 包容性验证

采用 30 株金黄色葡萄球菌分离株对金黄色葡萄球菌 Petrifilm 测试片进行包容性验证。结果记录于表 4。30 株金黄色葡萄球菌分离株，在金黄色葡萄球菌 Petrifilm 测试片上呈现典型的紫红色菌落，结果均为阳性。

表 4 包容性验证用金黄色葡萄球菌菌株列表和验证结果

序号	菌株编号	来源	验证结果
1	BJ-Sa-5	金章牌大孔芝士碎	+
2	BJ-Sa-10	安佳马苏里拉乳酪	+
3	BJ-Sa-12	航食	+
4	BJ-Sa-13	航食	+
5	BJ-Sa-14	奶酪	+
6	BJ-Sa-15	巨浪大切经典原味薯片	+
7	BJ-Sa-16	脱脂奶粉	+
8	BJ-Sa-17	安佳车达乳酪（红） 10.9.8-11.9.8	+
9	BJ-Sa-18	安佳车达乳酪（红） 10.10.6-11.10.6	+
10	BJ-Sa-19	速冻熟玉米	+
11	BJ-Sa-22	鱼子酱	+
12	BJ-Sa-23	冷冻薯格	+
13	BJ-Sa-33	贝塞斯冰淇淋	+
14	BJ-Sa-47	小小三鲜水饺	+
15	BJ-Sa-48	紫玉板栗玉汤圆	+
16	BJ-Sa-49	黑芝麻核桃汤圆	+
17	BJ-Sa-50	玫瑰花汤圆	+

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/958141040016007007>