ICS 07.100.99

B 41

|  |
| --- |
|  |

DB15

内蒙古自治区地方标准

DB 15/T XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

动物垫料中β-溶血性链球菌检测方法

Method of detection for β-Streptococcus hemolyticus in animal bedding

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

内蒙古自治区市场监督管理局   发布

前  言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国呼和浩特海关提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国呼和浩特海关。

本标准主要起草人：王海艳、赵治国、靳木子、郝广福、敖威华、云华、崔强、陈林军、延涵、陈宇飞、郭文秀。

动物垫料中β-溶血性链球菌检测方法

1. 范围

本标准规定了动物垫料中β-溶血性链球菌的分离鉴定定性检测法。

本标准适用于动物垫料中β-溶血性链球菌定性检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 33682 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分：实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分：培养基性能测试实用指南

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

动物垫料 animal bedding

用于吸收动物排泄物，使动物保持舒适生活环境的铺垫物。包括动物笼内非直接与动物机体接触的铺垫物。

4 设备和材料

4.1 冰箱：2 ℃～5 ℃。

4.2 恒温培养箱：36 ℃±1 ℃。

4.3 均质器。

4.4 漩涡振荡器。

4.5 电子天平：感量0.1 g。

4.6 全自动微生物生化鉴定系统。

4.7 飞行时间质谱仪。

4.8 二级生物安全柜。

4.9 厌氧培养装置。

4.10 显微镜：10 ～100 倍。

4.11 水浴装置：36 ℃±1 ℃。

4.12 pH 计。

4.13 无菌锥形瓶：容量500 mL，250 mL。

4.14 无菌吸管：1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)或微量移液器及吸头。

4.15 无菌培养皿：15 mm×90 mm。

4.16 无菌试管：18 mm×180 mm。

4.17 无菌棉签。

4.18 无菌镊子。

4.19 无菌剪刀。

4.20 无菌勺。

4.21 无菌玻片。

4.22 无菌接种环。

4.23 无菌规格板（5 cm🞨5 cm）。

5 培养基和试剂

5.1 实验用水：符合GB/T 6682的要求。

5.2 改良胰蛋白胨大豆肉汤（Modified tryptone soybean broth, mTSB）：见附录 A 中 A.2。

5.3 哥伦比亚 CNA 血琼脂(Columbia CNA blood agar)：见附录 A 中 A.3。

5.4 哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar)：见附录 A 中 A.4。

5.5 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.5。

5.6 胰蛋白胨大豆肉汤（Tryptone soybean broth, TSB）：见附录 A 中 A.6。

5.7 0.25 %氯化钙(CaCl2 )溶液：见附录 A 中 A.7。

5.8 3 %过氧化氢(H 2O 2 )溶液：见附录 A 中 A.8。

5.9 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.9。

5.10 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。

5.11 飞行质谱仪靶板。

5.12 β-溶血性链球菌ATCC 10389或等效菌株。

6 检验程序

β-溶血性链球菌检验程序见图1。

样品制备

检样25 g或25 cm2样液+225 mL mTSB增菌

划线接种哥伦比亚 CNA 血琼脂平板

挑取可疑菌落，接种哥伦比亚血琼脂平板和 TSB

革兰氏染色镜检/触酶试验

确定鉴定

36 ℃±1 ℃，18 h～24 h

36 ℃±1 ℃，18 h～24 h,厌氧培养

36 ℃±1 ℃，18 h～24 h

生化鉴定和/或全自动检测设备鉴定

报 告

1. β-溶血性链球菌检验程序

7 操作步骤

7.1 采样和增菌

7.1.1 采样原则

样品采集应遵循随机性、代表性的原则。采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能的外来污染。

7.1.2 颗粒状或粉末样品

对送检样品包装内不同部位样品进行随机多点取样至少250 g，充分混匀后称取25 g颗粒状或粉末状垫料样品，加入225 mL mTSB，充分振摇或均质1 min～2 min，置36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h，进行增菌。

7.1.3 平面样品

无菌操作将灭菌规格板（5 cm🞨5 cm）放在平面垫料表面，用浸有无菌稀释液（无菌0.85 %生理盐水）的棉拭子，在规格板内来回均匀涂抹整个方格 3 次，并随之转动棉拭子，然后用灭菌剪刀剪去棉拭子与手接触的部分，将棉拭子头置入装有 25 mL无菌稀释液（无菌0.85 %生理盐水）的无菌锥形瓶中，根据样品面积大小重复取样1～4个规格板面积，相应地将棉拭子头置入25 mL～100 mL的无菌稀释液（无菌0.85 %生理盐水）中，充分振摇制成样品原液（1 mL原液对应的样品面积为1 cm2）。取25 mL样品原液加入225 mL mTSB，充分振摇或均质1 min～2 min，置36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h进行增菌。

表1 不同面积平面类垫料样品采样量

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品面积  m2 | 采样量  cm2 | 规格板数 |
| 小于0.25（含） | 25 | 1 |
| 0.25～0.5（含） | 50 | 2 |
| 0.5～0.75（含） | 75 | 3 |
| 大于0.75 | 100 | 4 |

7.2 分离培养

将增菌液划线接种于哥伦比亚CNA血琼脂平板，36 ℃±1 ℃厌氧培养18 h～24 h，观察菌落形态。溶血性链球菌在哥伦比亚CNA血琼脂平板上的典型菌落形态为直径约2 mm～3 mm，灰白色、半透明、光滑、表面突起、圆形、边缘整齐，并产生 β型溶血。

7.3 鉴定

7.3.1 分纯培养

挑取5个（如小于5个则全选）可疑菌落分别接种哥伦比亚血琼脂平板和TSB增菌液，36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h。

7.3.2 革兰氏染色镜检

挑取可疑菌落染色镜检。β-溶血性链球菌为革兰氏染色阳性，球形或卵圆形，常排列成短链状。

7.3.3 触酶试验

挑取可疑菌落于洁净的载玻片上，滴加适量 3 %过氧化氢溶液，立即产生气泡者为阳性。β-溶血性链球菌触酶为阴性。

7.3.4 生化鉴定

挑取纯培养的菌落进行β-溶血性链球菌生化鉴定，具体操作依据β-溶血性链球菌生化鉴定试剂说明书进行。

7.3.5 辅助设备鉴定

可根据实验室情况，选用全自动微生物生化鉴定系统或飞行时间质谱仪等对典型或可疑菌落进行鉴定，具体操作依据设备操作规范和标准按照GB/T 33682进行。

8 结果与报告

8.1 经生化鉴定和/或全自动生化鉴定系统或飞行质谱仪鉴定为阳性的样品，报告每 25 g（cm2）动物垫料样品中检出β-溶血性链球菌。

8.2 经生化试验和/或全自动生化鉴定系统或飞行质谱仪鉴定为阴性的样品，报告每 25 g（cm2）动物垫料样品中未检出β-溶血性链球菌。

9 生物安全措施

为了保护实验室人员安全，应由具备资格的工作人员检测致病菌，所有培养物应小心处置，应按照GB 19489 的有关规定执行。

10 废弃物处理和防治污染的措施

检测过程中的废弃物需经121 ℃高压灭菌处理至少30 min后再弃置。

1. （规范性附录）  
   培养基和试剂

A.1 培养基制备及质量保证

按照SN/T 1538.1和SN/T 1538.2执行，并对制备好的培养基进行性能测试，如使用等效的脱水合成培养基，使用前对其进行验收并按其说明书使用。

A.2 改良胰蛋白胨大豆肉汤培养基（Modified tryptone soybean broth, mTSB）

A.2.1 基础培养基（胰蛋白胨大豆肉汤 TSB）

A.2.1.1 成分

胰蛋白胨 17.0 g

大豆蛋白胨 3.0 g

氯化钠 5.0 g

磷酸二氢钾（无水） 2.5 g

葡萄糖 2.5 g

蒸馏水 1000.0 mL

A.2.1.2 制法

将A.2.1.1中各成分溶于蒸馏水中，加热溶解，校正pH至7.3±0.2，121 ℃灭菌15 min，备用。

A.2.2 抗生素溶液

A.2.2.1 多黏菌素溶液

称取10 mg多黏菌素B于10 mL灭菌蒸馏水中，振摇混匀, 充分溶解后过滤除菌。

A.2.2.2 萘啶酮酸钠溶液

称取10 mg萘啶酮酸于10 mL 0.05 mol/L氢氧化钠溶液中，振摇混匀,充分溶解后过滤除菌。

A.2.3 完全培养基

A.2.3.1 成分

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) 1000.0 mL

多黏菌素溶液 10.0 mL

萘啶酮酸钠溶液 10.0 mL

A.2.3.2 制法

无菌条件下，将A.2.3.1中各成分进行混合，充分混匀，分装备用。

A.3 哥伦比亚CNA血琼脂(Columbia CNA blood agar)

A.3.1 成分

胰酪蛋白胨 12.0 g

动物组织蛋白消化液 5.0 g

酵母提取物 3.0 g

牛肉提取物 3.0 g

玉米淀粉 1.0 g

氯化钠 5.0 g

琼脂 13.5 g

多黏菌素 0.01 g

萘啶酸 0.01 g

蒸馏水 1000.0 mL

A.3.2 制法

将 A.3.1中各成分溶于蒸馏水中，加热溶解，校正pH至7.3±0.2，121 ℃灭菌12 min，待冷却至50 ℃左右时加50 mL无菌脱纤维绵羊血，摇匀后倒平板。

A.4 哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar)

A.4.1 基础培养基

A.4.1.1 成分

动物组织酶解物 23.0 g

淀粉 1.0 g

氯化钠 5.0 g

琼脂 8.0 g～18.0 g

蒸馏水 1000.0 mL

A.4.1.2 制法

将基础培养基成分溶解于蒸馏水中，加热促其溶解。121 ℃高压灭菌 15 min。

A.4.2 无菌脱纤维绵羊血

无菌操作条件下，将绵羊血加入到盛有灭菌玻璃珠的容器中，振摇约 10 min，静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

A.4.3 完全培养基

A.4.3.1 组分

基础培养基 1000.0 mL

无菌脱纤维绵羊血 50.0 mL

A.4.3.2 制法

当基础培养基的温度为 45 ℃左右时，无菌加入绵羊血，混匀。校正 pH 至 7.2±0.2。倾注 15 mL 于无菌平皿中，静置至培养基凝固。使用前需预先干燥平板。预先制备的平板未干燥时在室温放置不得超过4 h，或在 4 ℃冷藏不得超过 7 d。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液基础培养基

A.5.1.1 成分

结晶紫 1.0 g

95 %乙醇 20.0 mL

1 %草酸铵水溶液 80.0 mL

A.5.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘 1.0 g

碘化钾 2.0 g

蒸馏水 300.0 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄 0.25 g

95 ％乙醇 10.0 mL

蒸馏水 90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色操作步骤

将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染1 min，水洗；滴加革兰氏碘液，作用1 min，

水洗；滴加 95 %乙醇脱色，约15 s～30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗；滴加复染液，复染1 min，水洗后进行干燥，镜检。

A.6 胰蛋白胨大豆肉汤（Tryptone soybean broth, TSB）

A.6.1 成分

胰蛋白胨 17.0 g

大豆蛋白胨 3.0 g

氯化钠 5.0 g

磷酸二氢钾（无水） 2.5 g

葡萄糖 2.5 g

蒸馏水 1000.0 mL

A.6.2 制法

将A.6.1中各成分溶于蒸馏水中，加热溶解，校正pH至7.3±0.2，121 ℃灭菌15 min，分装备用。

A.7 0.25 %氯化钙(CaCl2 )溶液

A.7.1 成分

氯化钙（无水） 22.2 g

蒸馏水 1000.0 mL

A.7.2 制法

称取22.2 g 氯化钙（无水）溶于蒸馏水中，分装备用。

A.8 3 %过氧化氢(H2O2 )溶液

A.8.1 成分

30 %过氧化氢(H2O2)溶液 100.0 mL

蒸馏水 900.0 mL

A.8.2 制法

吸取100 mL 30%过氧化氢(H2O2 )溶液，溶于蒸馏水中，混匀，分装备用。

A.9 无菌生理盐水

A.9.1 成分

氯化钠 8.5 g

蒸馏水 1000 mL

A.9.2 制法

氯化钠加入1000 mL蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 ℃灭菌15 min，备用。

附 录 B

（资料性附录）  
β-溶血性链球菌常用培养基与试剂灭菌后保存期限

表B.1 β-溶血性链球菌常用培养基与试剂灭菌后保存期限

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名 称 | 保存期限 | 保存条件 |
| 改良胰蛋白胨大豆肉汤培养基（ mTSB） | 6 个月 | 5 ℃ |
| 胰蛋白胨大豆肉汤（TSB） | 6 个月 | 5 ℃ |
| 哥伦比亚CNA血琼脂 | 4 周 | 5 ℃，防干燥 |
| 哥伦比亚血琼脂 | 4 周 | 5 ℃，防干燥 |