

中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.10—2003
代替 GB/T 4789.10—1994

食品卫生微生物学检验

金黄色葡萄球菌检验

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of *Staphylococcus aureus*

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准对 GB/T 4789.10—1994《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》进行修订。

本标准与 GB/T 4789.10—1994 相比主要修改如下：

——按照 GB/T 1.1—2000 对标准文本的格式和文字进行修改。

——修改并规范原标准中的“设备和材料”。

——附录 A 中 A.2.15 试剂浓度由 0.008 mol/L 修改为 0.2 mol/L。

本标准自实施之日起,GB/T 4789.10—1994 同时废止。

本标准的附录 A 是规范性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位:北京市卫生防疫站、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人:刘以贤、冉陆、付萍、姚景会。

本标准于 1984 年首次发布,1994 年第一次修订,本次为第二次修订。

食品卫生微生物学检验

金黄色葡萄球菌检验

1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌的检验方法。

本标准适用于各类食品和食物中毒样品中金黄色葡萄球菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 设备和材料

- 3.1 冰箱:0℃~4℃。
- 3.2 恒温培养箱:36℃±1℃。
- 3.3 显微镜:10×~100×。
- 3.4 均质器或灭菌乳钵。
- 3.5 架盘药物天平:0 g~500 g,精确至 0.5 g。
- 3.6 灭菌试管:10 mm×100 mm、16 mm×160 mm。
- 3.7 灭菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 3.8 灭菌锥形瓶:500 mL、100 mL。
- 3.9 灭菌培养皿:直径 90 mm。
- 3.10 注射器:0.5 mL。
- 3.11 灭菌 L 型涂布棒。
- 3.12 灭菌刀、剪子、镊子等。

4 培养基和试剂

- 4.1 胰酪胨大豆肉汤:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.59 规定。
- 4.2 7.5%氯化钠肉汤:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.61 规定。
- 4.3 血琼脂平板:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.6 规定。
- 4.4 Baird-Parker 琼脂平板:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.60 规定。
- 4.5 肉浸液肉汤:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.1 规定。
- 4.6 0.85%灭菌生理盐水。
- 4.7 兔血浆:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.63 规定。

5 检验程序

金黄色葡萄球菌检验程序见图 1。

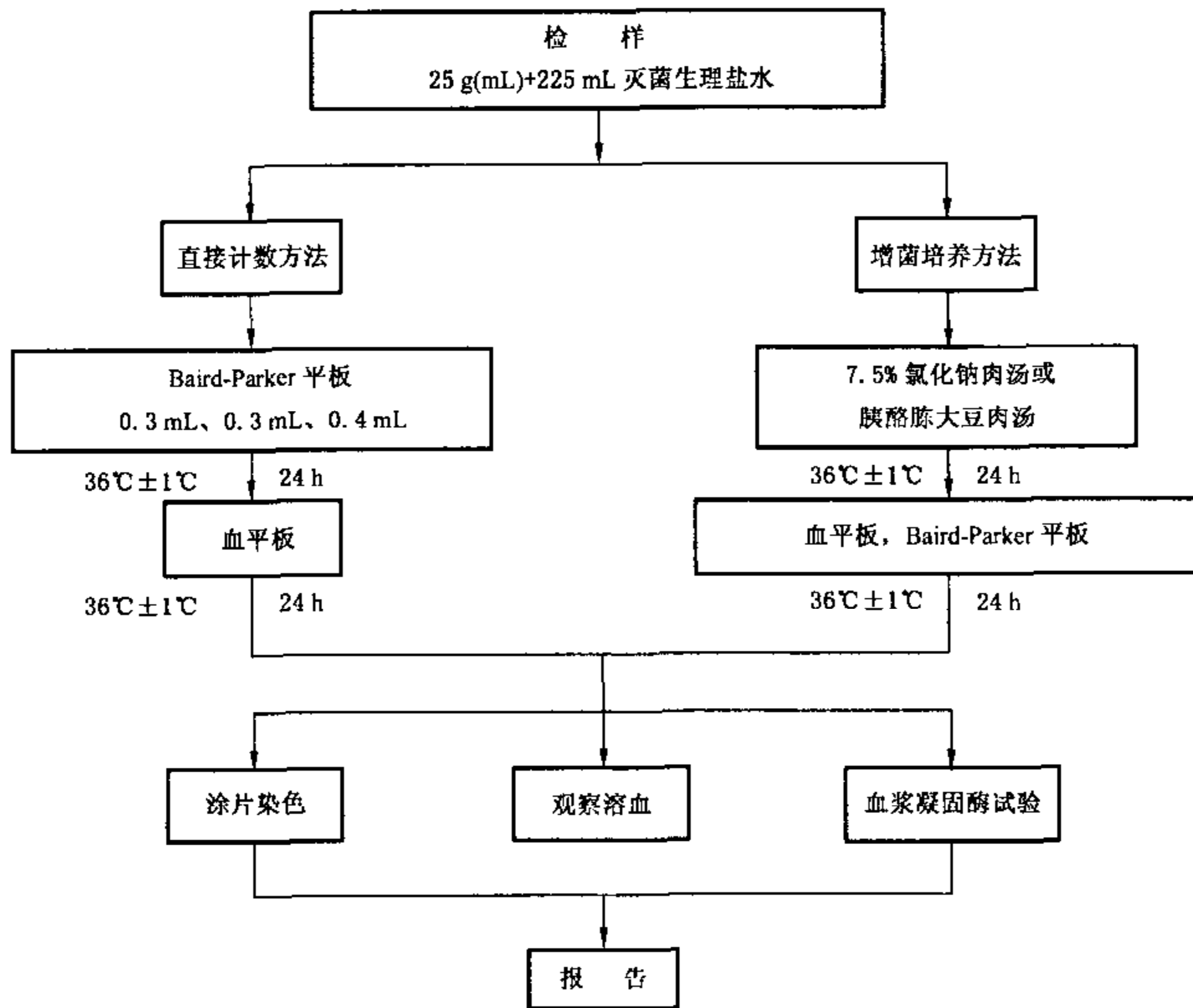


图 1

6 操作步骤

6.1 增菌培养法

6.1.1 检样处理:按无菌操作取检样 25 g(mL),加入 225 mL 灭菌生理盐水,固体样品研磨或置均质器中制成混悬液。

6.1.2 增菌及分离培养:吸取 5 mL 上述混悬液,接种于 7.5%氯化钠肉汤或胰酪胨大豆肉汤 50 mL 培养基内,36°C ± 1°C 培养 24 h,转种血平板和 Baird-Parker 平板,36°C ± 1°C 培养 24 h,挑取血平板上金黄色(有时为白色)菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

6.1.3 形态:本菌为革兰氏阳性球菌,排列呈葡萄球状,无芽胞,无荚膜,致病性葡萄球菌菌体较小,直径约为 0.5 μm~1 μm。

6.1.4 在肉汤中呈混浊生长,在胰酪胨大豆肉汤内有时液体澄清,菌量多时呈混浊生长,血平板上菌落呈金黄色,有时也为白色,大而突起、圆形、不透明、表面光滑,周围有溶血圈。在 Baird-Parker 平板上为圆形、光滑凸起、湿润、直径为 2 mm~3 mm,颜色呈灰色到黑色,边缘为淡色,周围为一混浊带,在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落似有奶油树胶的硬度,偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落;但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些,外观可能粗糙并干燥。

6.1.5 血浆凝固酶试验:吸取 1:4 新鲜兔血浆 0.5 mL,放入小试管中,再加入培养 24 h 的金黄色葡萄球菌肉浸液肉汤培养物 0.5 mL,振荡摇匀,置 36°C ± 1°C 温箱或水浴内,每半小时观察一次,观察 6 h,如呈现凝固,即将试管倾斜或倒置时,呈现凝块者,被认为阳性结果。同时以已知阳性和阴性葡萄球菌株及肉汤作为对照。

6.2 直接计数方法

6.2.1 吸取上述 1:10 混悬液,进行 10 倍递次稀释,根据样品污染情况,选择不同浓度的稀释液

1 mL,分别加入三块 Baird-Parker 平板,每个平板接种量分别为 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL,然后用灭菌 L 棒涂布整个平板。如水分多不易吸收,可将平板放在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 1 h,等水分蒸发后反转平皿置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养。

6.2.2 在三个平板上点数周围有混浊带的黑色菌落,并从中任选五个菌落,分别接种血平板, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 24 h 培养后进行染色镜检、血浆凝固酶试验,步骤同增菌培养法。

6.2.3 菌落计数:将三个平板中疑似金黄色葡萄球菌黑色菌落数相加,乘以血浆凝固酶阳性数,除以 5,再乘以稀释倍数,即可求出每克样品中金黄色葡萄球菌数。

附录 A
(规范性附录)
葡萄球菌肠毒素检验

A.1 设备和材料

- A.1.1 冰箱:0℃~4℃。
- A.1.2 恒温培养箱:36℃±1℃。
- A.1.3 振荡培养箱或普通培养箱:36℃±1℃。
- A.1.4 酶标仪。
- A.1.5 离心机:8 000 r/min。
- A.1.6 均质器或灭菌乳钵。
- A.1.7 层析柱:40 mm×(20 mm~25 mm)。
- A.1.8 微量加样器:200 μL、50 μL。
- A.1.9 细滴管。
- A.1.10 分液漏斗。
- A.1.11 透析袋。
- A.1.12 洗瓶。
- A.1.13 灭菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- A.1.14 灭菌培养皿:直径 150 mm(或带盖搪瓷盘)。
- A.1.15 灭菌锥形瓶:250 mL。
- A.1.16 有机玻璃模板。
- A.1.17 打孔器:直径 2.5 mm。
- A.1.18 载玻片、橡皮圈。
- A.1.19 灭菌玻璃纸、三角棒、镊子等

A.2 培养基和试剂

- A.2.1 肠毒素产毒培养基:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.86 规定。
- A.2.2 营养琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中规定。
- A.2.3 1%琼脂糖(0.9%生理盐水配制)溶液。
- A.2.4 0.2 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液。
- A.2.5 三氯甲烷。
- A.2.6 6 mol/L 盐酸溶液。
- A.2.7 5 mol/L 氢氧化钠。
- A.2.8 0.85%生理盐水。
- A.2.9 1%乙酸溶液。

- A.2.10 0.1% 噻嗪红 R 或氨基黑 B。
 A.2.11 硅胶或凡士林。
 A.2.12 A、B、C、D 型葡萄球菌肠毒素和抗血清。
 A.2.13 羧甲基纤维素(CM22 或 CM11 Whatman)。
 A.2.14 0.2 mol/L pH6.8 磷酸盐缓冲液。
 A.2.15 酶标记 A、B、C、D 肠毒素抗血清或酶联免疫试剂盒。
 A.2.16 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液。
 A.2.17 0.05% 0.02 mol/L pH7.2 吐温-20 缓冲液。
 A.2.18 邻苯二胺酶底物。
 A.2.19 2 mol/L 硫酸。

A.3 检验程序

A.3.1 从菌株中检测肠毒素

从菌株中检测肠毒素程序见图 A.1。

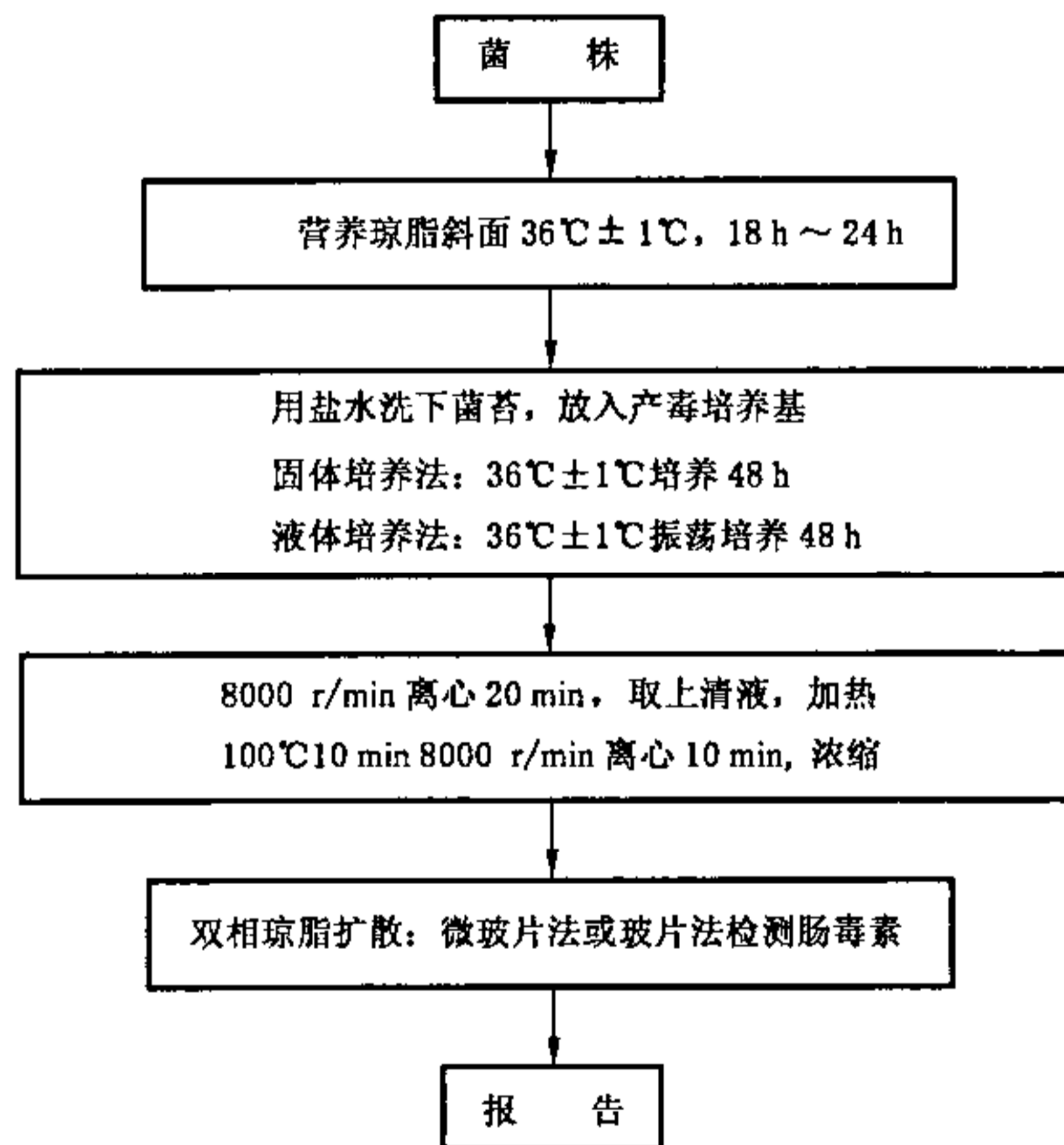


图 A.1

A.3.2 从食物检样中提取和检测肠毒素

A.3.2.1 微玻片法检测肠毒素(浓缩法和层析法)程序见图 A.2。

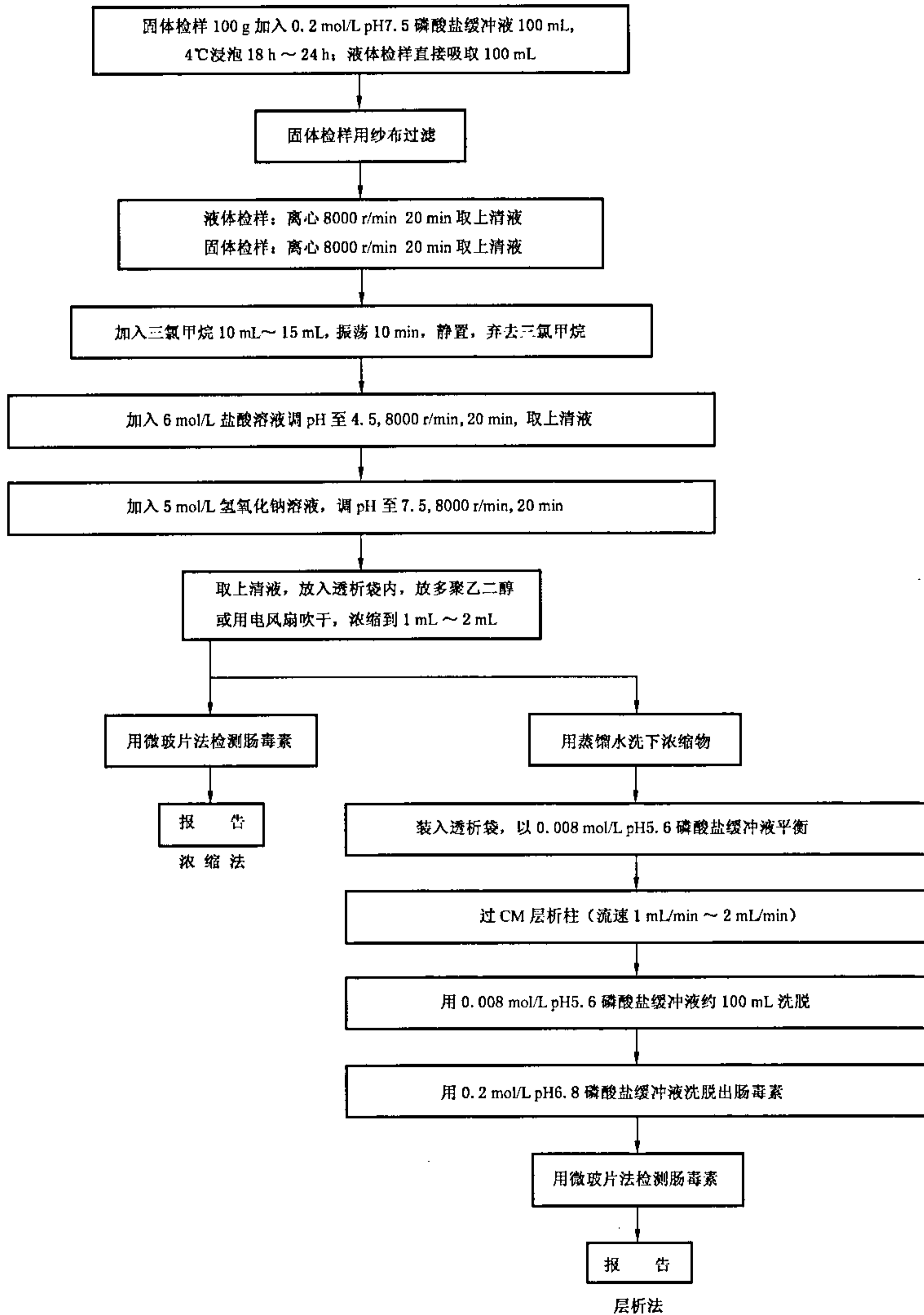


图 A.2

A.3.2.2 酶联免疫法检测肠毒素程序见图 A.3。

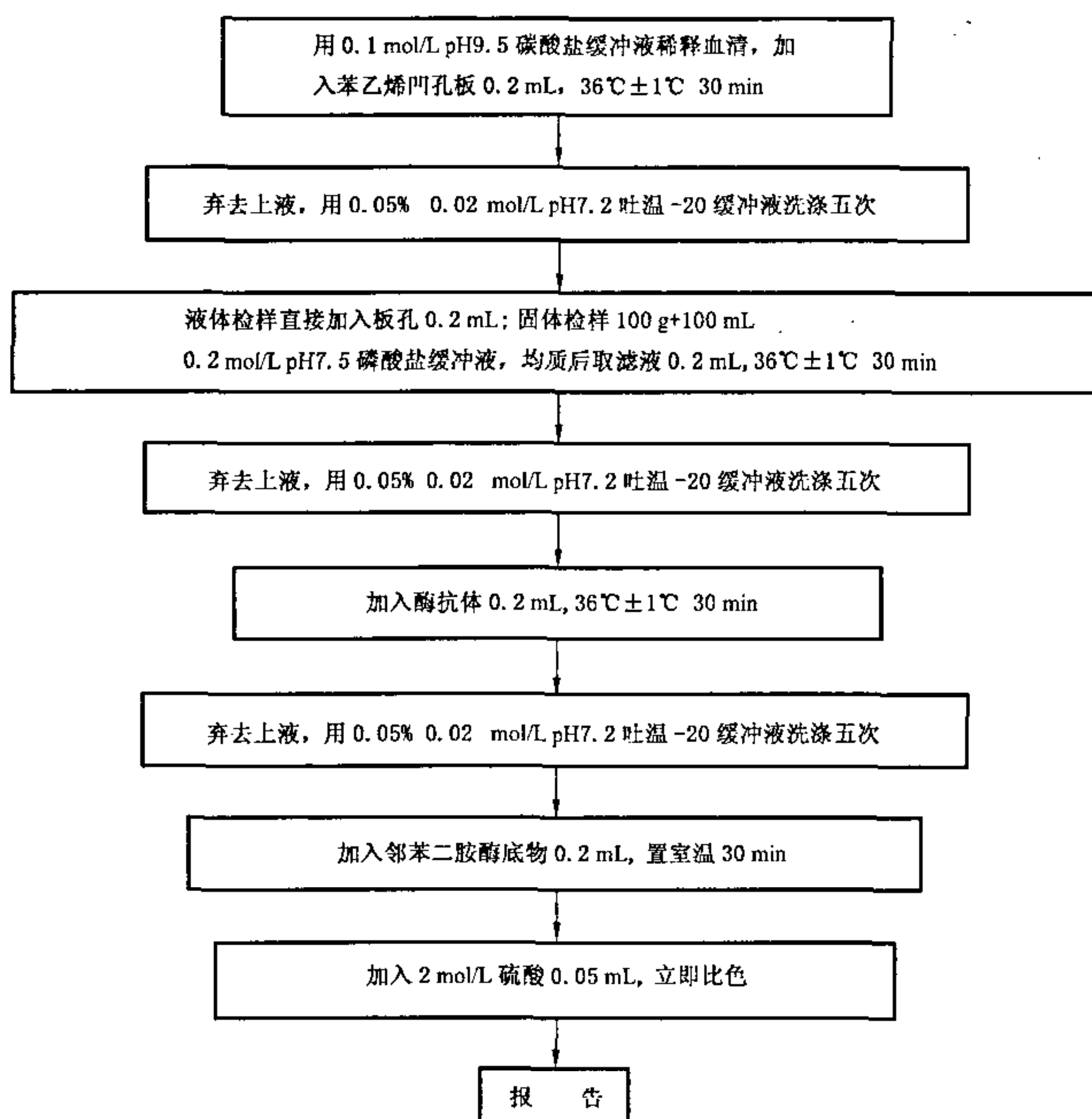


图 A.3

A.4 肠毒素检测

A.4.1 从菌株中提取肠毒素方法

A.4.1.1 液体透析培养法：用宽 2.5 cm、长 80 cm 的透析袋装入 60 mL 产毒培养基，两端扎紧，将透析袋装入 250 mL 锥形瓶内，加入 15 mL 灭菌生理盐水，透析袋两端留在瓶口，用棉塞塞好，121℃ 高压灭菌 30 min，待测菌株接种营养琼脂斜面（试管 18 mm×180 mm），37℃ 培养 24 h，用 5 mL 生理盐水洗下菌落，倾入上述培养瓶中，每个菌种一瓶，37℃ 振荡培养 48 h，振速为 100 次/min，吸出菌液离心，8 000 r/min 30 min，取上清液做双相琼脂扩散，如为阴性，再装入透析袋内，用电风扇吹，或用多聚乙二醇，浓缩至 1 mL~2 mL，再做琼脂扩散。

A.4.1.2 固体透析培养法：向直径 150 mm 的灭菌平皿或带盖搪瓷盘中倾入灭菌产毒培养基约 100 mL~120 mL，凝固后表面铺一灭菌玻璃纸，待测菌株接种在营养琼脂上，37℃ 培养 24 h，用约 3 mL 灭菌盐水洗下菌苔，倾在玻璃纸上，用灭菌三角棒涂满平皿，37℃ 培养 48 h，加入 10 mL~20 mL 灭菌生理盐水，用灭菌三角棒刮取菌苔，吸取菌液离心，以下步骤同液体透析培养法。

A.4.2 从食品中提取肠毒素方法

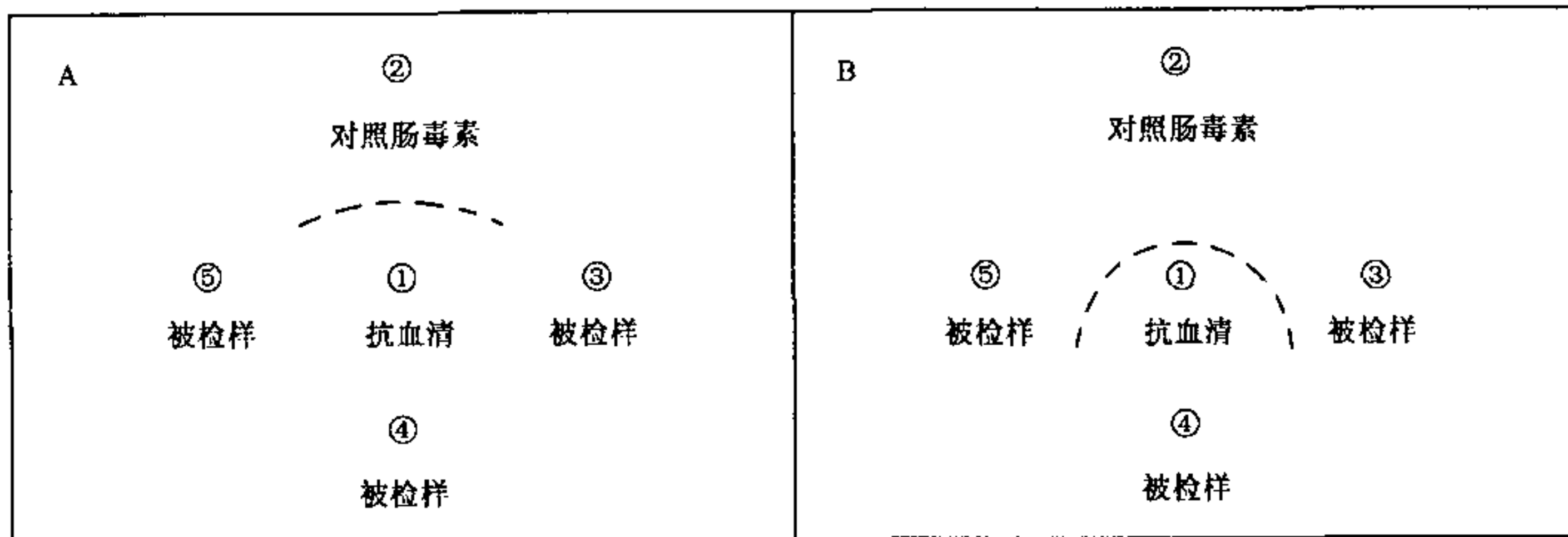
A.4.2.1 直接浓缩法：取食品样品 100 g，加入无菌 0.2 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液，均质成匀浆，置 4℃ 浸泡 18 h~24 h，用纱布过滤将滤液离心 8 000 r/min 20 min，取上清液，放入分液漏斗中，加入

10 mL三氯甲烷,振摇 10 min,静置,将底层三氯甲烷弃去(如不分层,可 8 000 r/min 离心 20 min)。加入 6 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 4.5,8 000 r/min 离心 20 min,取上清液,加 5 mol/L 氢氧化钠溶液,调 pH 至 7.5,离心取上清液,装入透析袋或玻璃纸,用电扇吹干,或放多聚乙二醇浓缩至 1 mL~2 mL,做微玻片双向琼脂扩散。

A.4.2.2 层析法:如需提取较纯肠毒素,可将上述浓缩液用蒸馏水洗下,装入透析袋,以 0.008 mol/L pH5.6 磷酸盐缓冲液平衡,加入 CM 层析柱内,流速 1 mL/min~2 mL/min,用 0.008 mol/L pH5.6 磷酸盐缓冲液洗脱,再用 0.2 mol/L pH6.8 磷酸盐缓冲液洗脱出肠毒素。洗脱液装入透析袋内,用电扇或多聚乙二醇浓缩至 1 mL,做微玻片双向琼脂扩散,检测肠毒素。

A.4.3 双向琼脂扩散检测肠毒素

A.4.3.1 微玻片法:将在 95%乙醇中浸泡的载片用洁净纱布擦干,吸取溶化的 0.2%琼脂糖(蒸馏水配制)滴在载玻片上,使剩余的琼脂糖流下,放在无尘的环境中干燥,先将一层薄塑料板放在载玻片上,然后将带孔的有机玻璃模板边缘涂一层薄的硅胶或凡士林,放在塑料板上,两边用橡皮圈系紧固定,吸取 1%琼脂糖,立即从模板中间孔加入载玻片和模板之间,直至充满琼脂糖,凝固后再将孔中琼脂糖用注射器针头挑去,在中间孔滴加抗血清,四周滴加菌株产毒液或食品提取液,放入加有湿棉球的容器内,放 25℃~30℃、18 h~24 h 观察结果。可在灯光上,并对着暗的背景观察,在抗血清和提取液之间呈现明显沉淀线。如沉淀线只能微弱可见时,可进行染色。具体内容见图 A.4。



A——被检样无肠毒素,为阴性;
B——被检样 3、5 含肠毒素,为阳性;4 无肠毒素,为阴性。

图 A.4

A.4.3.2 玻片法:吸取溶化的 1%琼脂糖 2.5 mL,铺在洁净载玻片上,凝固后用直径 2.5 mm 的金属打孔器打成幅射型,孔距为 2.5 mm,中心孔加入肠毒素抗血清,周围六个孔加入菌株或食品的肠毒素提取液,放入有滴加 2/10000 三氯化钠湿棉球的容器内,以保持湿度。置 25℃~30℃、18 h~20 h,观察结果,在抗血清的提取物之间有明显沉淀线即为阳性。

A.4.3.3 染色法:用微玻片法取下胶带和有机玻璃模板,玻片法可直接将玻片放入蒸馏水中浸泡 4 h~8 h,中间换 2 次~3 次水,在下述各液中浸 10 min,10%乙酸中含 1%噻嗪红 R(或氨基黑);1%乙酸;1%乙酸含 1%甘油,如脱色不净,可继续浸泡。取出后盖一滤纸,吸去多余液体,在室温或 35℃烘干。阳性者沉淀被染上颜色,可长期保存。

A.4.4 酶联免疫法检测肠毒素(双抗体法)

A.4.4.1 包被抗体:用 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液稀释肠毒素抗血清使成 5 μg/mL,加入洗净的苯乙烯凹孔板内,每孔 0.2 mL,置 36℃±1℃ 30 min,弃去上液。

A.4.4.2 洗涤:用 0.05% 0.02 mol/L pH7.2 吐温-20 缓冲液洗涤五次。

A.4.4.3 加入检样:如为液体,可直接加入 0.2 mL,固体样品取 100 g,加入 0.2 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液 100 mL,均质后取过滤液 0.2 mL。

A.4.4.4 洗涤:同 A.4.4.2。

- A.4.4.5 每孔内加入酶抗体 0.2 mL,置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 30 min,同时做阳性和阴性对照。弃去上液。
 - A.4.4.6 洗涤:同 A.4.4.2。
 - A.4.4.7 每孔内加入邻苯二胺酶底物溶液 0.2 mL,室温放置 30 min。
 - A.4.4.8 每孔内加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL,立即放酶标仪比色。
 - A.4.4.9 结果判定:样品 OD 值比阴性对照,比值大于 2 为阳性,小于 2 为阴性。
-