

团 体 标 准

T / CIFST 024—2024

食品中金黄色葡萄球菌的快速检测 测试片法

Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food
—Handy Plate method

2024-08-20 发布

2024-08-20 实施

中国食品科学技术学会 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专利的责任。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：广东环凯生物科技有限公司、广东省科学院微生物研究所、黑龙江飞鹤乳业有限公司、无限极(中国)有限公司、郑州市食品药品检验所、安利(中国)日用品有限公司。

本文件主要起草人：蔡芷荷、吴清平、于畅游、周勇、王琪、谢颖君、刘英涛、陈博、滕昆仑、寇秀颖、甘少花、张菊梅、王红月。

食品中金黄色葡萄球菌的快速检测 测试片法

1 范围

本文件规定了金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的快速检测-测试片法。
本文件适用于食品及加工环境涂抹样品中金黄色葡萄球菌的快速检验和计数。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 4789.10 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
GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 设备和材料

- 3.1 电子天平:感量 0.1 g。
- 3.2 无菌均质袋。
- 3.3 无菌均质杯。
- 3.4 拍击式均质器。
- 3.5 振荡器。
- 3.6 涡旋混合器。
- 3.7 恒温培养箱:36 °C±1 °C。
- 3.8 无菌接种环(10 μL)。
- 3.9 无菌锥形瓶:容量 100 mL、容量 500 mL。
- 3.10 pH 计或精密 pH 试纸:精密度 0.1。
- 3.11 无菌吸管:1 mL(0.01 mL 刻度)、10 mL(0.1 mL 刻度)或移液器及吸头(0.1 mL~1 mL)。
- 3.12 无菌试管(18 mm×180 mm)。
- 3.13 高压蒸汽灭菌器。

4 培养基和试剂

- 4.1 Handy Plate[®]金黄色葡萄球菌测试片。
- 4.2 无菌磷酸盐缓冲液:见附录 A.1。
- 4.3 无菌生理盐水:见附录 A.2。
- 4.4 1 mol/L NaOH 溶液:见附录 A.3。
- 4.5 1 mol/L HCl 溶液:见附录 A.4。
- 4.6 Handy Plate[®]金黄色葡萄球菌确认反应片。

4.7 7.5%氯化钠肉汤:见附录 A.5。

4.8 EHK[®] HK-N-PBS 一次性采样管。

5 检验程序

金黄色葡萄球菌测试片法计数检验程序见图 1。

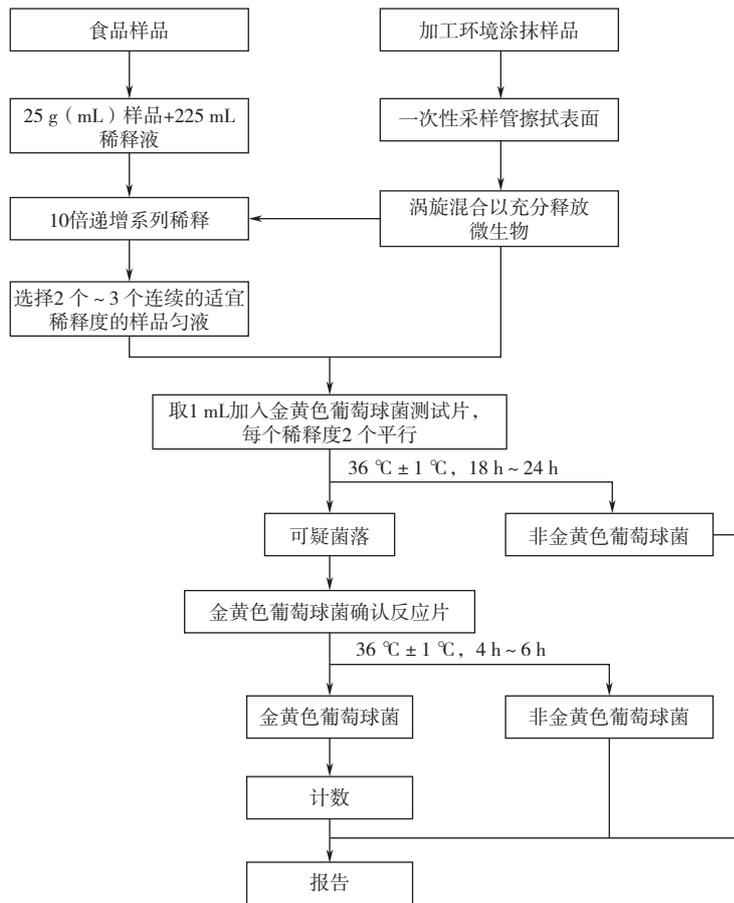


图 1 金黄色葡萄球菌测试片法计数检验程序

金黄色葡萄球菌测试片法定性检验程序见图 2。

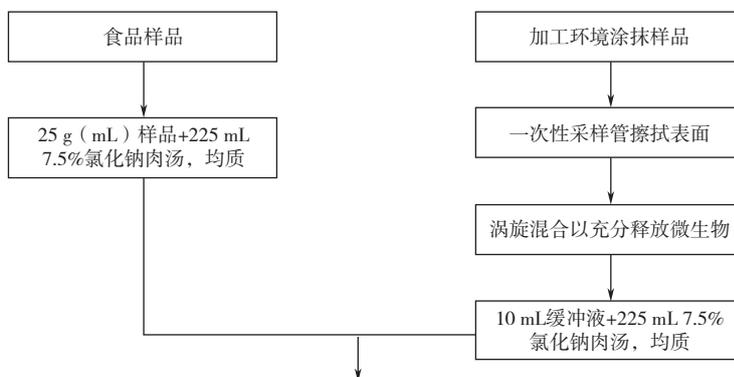


图 2 金黄色葡萄球菌测试片法定性检验程序

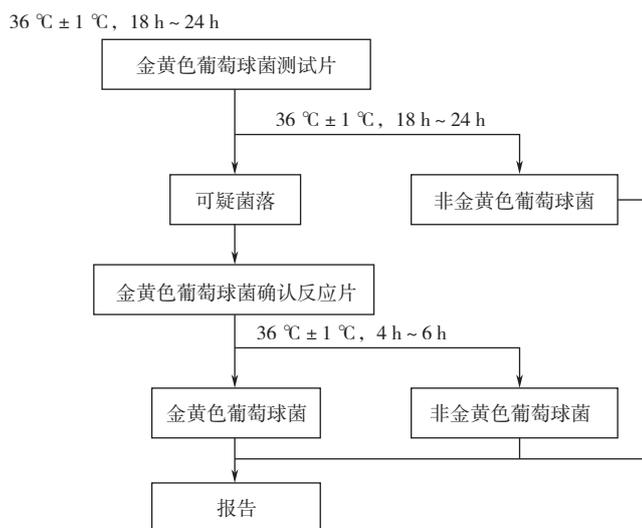


图 2 金黄色葡萄球菌测试片法定性检验程序(续)

6 计数操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 食品样品:取 25 g 样品,加入含有 225 mL 无菌稀释液(无菌生理盐水或磷酸盐缓冲液)的容量为 500 mL 的无菌锥形瓶中,盖好瓶塞,放置到振荡器中振荡 2 min;或放入无菌均质袋中,加入 225 mL 无菌稀释液,用拍击式均质器高速拍打 2 min,制成 1:10 样品匀液。若样品为液态,吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 无菌稀释液(无菌生理盐水或磷酸盐缓冲液)的容量为 500 mL 的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中,振荡混匀制成 1:10 样品匀液。样品匀液的 pH 应为 6.5~7.5,pH 过低或过高时可分别采用 1 mol/L NaOH 溶液或 1 mol/L HCl 溶液予以调节。含有较高活性酶(如面粉、香精香料)或较深颜色色素(如酱油、可乐等)的样品,可加大稀释液倍数(如 1:20)。

6.1.2 加工环境涂抹样品:取 1 支 HK-N-PBS 一次性采样管,取出拭子在食品加工接触部位沿不锈钢采样板擦拭采样表面(100 cm²)从两个方向(从左到右,然后从上到下)覆盖整个区域。将拭子放回含缓冲液的采样管中,涡旋混合以充分释放微生物。

6.1.3 吸取 1 mL 1:10 样品稀释液注入含有 9 mL 无菌稀释液的试管中,用涡旋混合器混匀,即为 1:100 稀释液。

6.1.4 按 6.1.1.3 操作程序制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次,更换一次无菌吸管或移液器吸头。

6.2 接种培养

6.2.1 将测试片置于平坦表面处,揭开上膜。根据对样品污染状况的估计,选择 2 个~3 个连续适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液于金黄色葡萄球菌测试片内,每组 2 个平行。静置至少 1 min 以使培养基凝固。同时分别取 1 mL 无菌稀释液加入金黄色葡萄球菌测试片作为空白对照,每组 2 个平行。

6.2.2 将测试片正面朝上,堆叠不超过 20 张,放入培养箱中,于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。

6.2.3 测试片培养结束后直接观察,金黄色葡萄球菌可疑菌落为品红至紫红色菌落,其他菌为蓝绿色、无色菌落。将可疑菌落用记号笔标记。

6.2.4 揭开上膜,将确认反应片与培养基贴合,将上膜轻轻盖下,用手轻轻滑动,赶走培养基区域内的

气泡,使确认反应片与上膜和下层凝胶完全贴合,于 36 °C ± 1 °C 培养 4 h~6 h。

6.2.5 取出带确认反应片的测试片,观察标记菌落的颜色。若标记菌落变为蓝绿色、蓝紫色,则判为金黄色葡萄球菌。若不变色,则为非金黄色葡萄球菌。

6.2.6 实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照,定期对检验过程进行质量控制。宜选用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)FSCC(T)22301533 或等效标准菌株作为阳性对照菌株,表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)FSCC(T)22301925 和大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)FSCC(T)149034505 或等效标准菌株作为阴性对照菌株。

7 结果计算

7.1 选择金黄色葡萄球菌菌落数为 20 CFU~200 CFU 的测试片计数金黄色葡萄球菌菌落总数。每个稀释度取 2 个测试片的平均值,再乘以稀释倍数,作为样品中金黄色葡萄球菌总数的结果。

7.2 若有 2 个连续稀释度的测试片菌落数在合适范围内,按公式(1)计算:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N ——样品菌落数;

$\sum C$ ——两个连续稀释度的所有测试片菌落数之和;

n_1 ——低稀释倍数测试片个数;

n_2 ——高稀释倍数测试片个数;

d ——低稀释度稀释因子。

示例:

稀释度	1 : 100(低稀释度)	1 : 1 000(高稀释度)
菌落数/CFU	132/126	26/28

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{132 + 126 + 26 + 28}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{312}{0.022} = 14\ 181$$

数字修约后,表示为 1.4×10^4 。

7.3 若所有稀释度测试片上的菌落数均小于 20 CFU,则按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.4 若所有稀释度测试片上的菌落数均大于 200 CFU,则按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.5 若所有稀释度的测试片菌落数均不在 20 CFU~200 CFU,其中一部分小于 20 CFU 或大于 200 CFU,则以接近 20 CFU 或 200 CFU 的平均菌落数乘以相应稀释倍数计算。

7.6 若所有稀释度的测试片均无菌落生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

7.7 若所有稀释度的测试片菌落数多不可计,则需重复实验,选取更高稀释度的样品稀释液计数。

8 报告

根据计数结果报告每 g (mL) 样品中金黄色葡萄球菌数,以 CFU/g (mL) 表示。根据计数结果报告每 100 cm² 加工环境涂抹样品中金黄色葡萄球菌数,以 CFU/100 cm² 表示。

9 定性检验操作步骤

9.1 样品处理

9.1.1 食品样品：若样品为固态或半固态，无菌操作称取 25 g 样品至盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤的无菌均质杯内，8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min 或放入盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态，吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤的无菌锥形瓶（瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠）中，振荡混匀 1 min~2 min。样品匀液的 pH 应为 6.5~7.5，pH 过低或过高时可分别采用 1 mol/L NaOH 溶液或 1 mol/L HCl 溶液予以调节。

9.1.2 加工环境涂抹样品：取 1 支 HK-N-PBS 一次性采样管，取出拭子在食品加工接触部位沿不锈钢采样板擦拭采样表面（100 cm²）从两个方向（从左到右，然后从上到下）覆盖整个区域。将拭子放回含缓冲液的采样管中，涡旋混合以充分释放微生物。将采样管中的 10 mL 缓冲液置于盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤的无菌均质袋（或其他合适容器）中，用均质器均质 1 min~2 min，充分混匀。

9.2 增菌

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

9.3 接种培养

9.3.1 将测试片置于平坦表面处，揭开上膜。使用 10 μL 接种环取一环混匀后的增菌液在测试片上划线。用无菌吸管或移液器吸取 1 mL 无菌生理盐水于测试片内。静置至少 1 min 以使培养基凝固。

9.3.2 将测试片正面朝上，堆叠不超过 20 张，放入培养箱中，于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。

9.3.3 观察测试片上生长的菌落，金黄色葡萄球菌典型菌落为品红至紫红色菌落，其他的蓝绿色、无色、棕黑色等均为非金黄色葡萄球菌。将可疑菌落用记号笔标记。

9.3.4 揭开上膜，将确认反应片与培养基贴合，将上膜轻轻盖下，用手轻轻滑动，赶走培养基区域内的气泡，使确认反应片与上膜和下层凝胶完全贴合，于 36 °C ± 1 °C 培养 4 h~6 h。

9.3.5 取出带确认反应片的测试片，观察标记菌落的颜色。若标记菌落变为蓝绿色、蓝紫色，则判为金黄色葡萄球菌。若不变色，则判为非金黄色葡萄球菌。

9.3.6 同 6.2.6。

10 结果与报告

根据测试片、确认反应片的结果报告：在 25 g (mL) 样品、100 cm² 加工环境涂抹样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

11 废弃物处置

检测过程中产生的废弃物按照 GB 19489 的相关要求进行处置，含微生物的废弃物应 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min 后再按相关规定处置。

附录 A
(规范性)
培养基和试剂

A.1 无菌磷酸盐缓冲液

A.1.1 成分

A.1.1.1 磷酸二氢钾	34.0 g
A.1.1.2 蒸馏水	500 mL

A.1.2 制法

A.1.2.1 贮存液：称取 34.0 g 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 至 7.2 ± 0.1 ，用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

A.1.2.2 稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

A.2 无菌生理盐水

A.2.1 成分

A.2.1.1 氯化钠	8.5 g
A.2.1.2 蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠加入 1 000 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min，备用。

A.3 1 mol/L NaOH 溶液

A.3.1 成分

A.3.1.1 NaOH	40.0 g
A.3.1.2 无菌蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

称取 40.0 g NaOH 溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中。

A.4 1 mol/L HCl 溶液

A.4.1 成分

A.4.1.1 HCl	90 mL
A.4.1.2 无菌蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

移取浓盐酸 90 mL，用无菌蒸馏水稀释至 1 000 mL。

A.5 7.5% 氯化钠肉汤

A.5.1 成分

A.5.1.1 蛋白胨	10.0 g
-------------	--------

A. 5. 1. 2	牛肉膏粉	5. 0 g
A. 5. 1. 3	氯化钠	75. 0 g
A. 5. 1. 4	蒸馏水	1 000 mL

A. 5. 2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ，分装，每瓶（袋）225 mL，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min，备用。
