



# 中华人民共和国国家标准

GB 4789.10—2010

---

## 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

National food safety standard

Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus*

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

---

中华人民共和国卫生部 发布

## 前 言

本标准代替 GB/T 4789.10-2008《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》和 GB/T 4789.37-2008《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌计数》。

本标准与 GB/T 4789.10-2008 和 GB/T 4789.37-2008 相比，主要修改如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 修改了范围；
- 规范了样品制备过程；
- 增加了计算公式中系数 1.1 的解释；
- 修改了附录 A 中胰酪胨大豆肉汤的名称，规范为 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤；
- 增加了第二法金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板计数和第三法金黄色葡萄球菌 MPN 计数。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 是规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 4789.10-84、GB 4789.10-1994、GB/T 4789.10-2003、GB/T 4789.10-2008。
- GB/T 4789.37-2008。

# 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

### 1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的检验方法。

本标准第一法适用于食品中金黄色葡萄球菌的定性检验;第二法适用于金黄色葡萄球菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数;第三法适用于金黄色葡萄球菌含量较低而杂菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数。

### 2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 恒温培养箱:  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.2 冰箱:  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.3 恒温水浴箱:  $37\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.4 天平: 感量  $0.1\text{ g}$ 。
- 2.5 均质器。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管:  $1\text{ mL}$  (具  $0.01\text{ mL}$  刻度)、 $10\text{ mL}$  (具  $0.1\text{ mL}$  刻度) 或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌锥形瓶: 容量  $100\text{ mL}$ 、 $500\text{ mL}$ 。
- 2.9 无菌培养皿: 直径  $90\text{ mm}$ 。
- 2.10 注射器:  $0.5\text{ mL}$ 。
- 2.11 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

### 3 培养基和试剂

- 3.1 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤: 见附录 A 中 A.1。
- 3.2 7.5%氯化钠肉汤: 见附录 A 中 A.2。
- 3.3 血琼脂平板: 见附录 A 中 A.3。
- 3.4 Baird-Parker 琼脂平板: 见附录 A 中 A.4。

- 3.5 脑心浸出液肉汤(BHI)：见附录 A 中 A.5。
- 3.6 兔血浆：见附录 A 中 A.6。
- 3.7 稀释液：磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.7。
- 3.8 营养琼脂小斜面：见附录 A 中 A.8。
- 3.9 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.9。
- 3.10 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.10。

## 第一法 金黄色葡萄球菌定性检验

### 4 检验程序

金黄色葡萄球菌定性检验程序见图1。

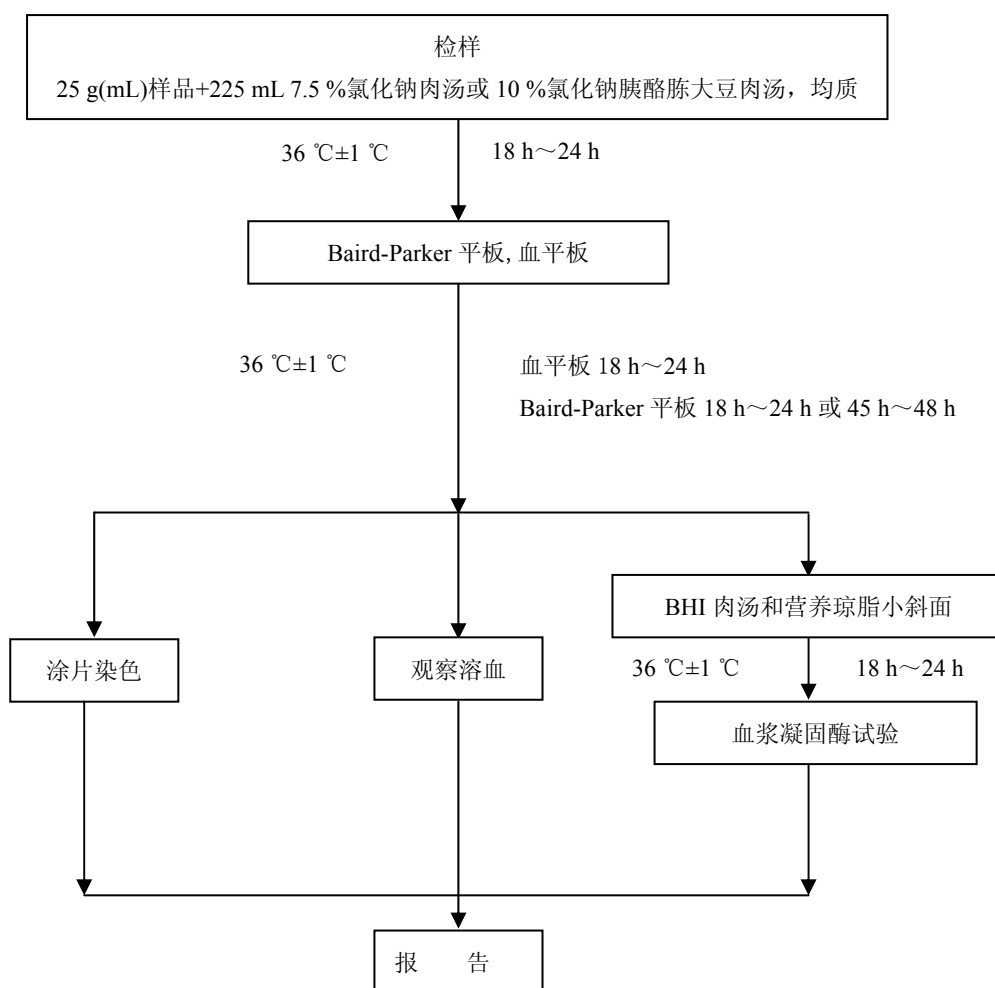


图1 金黄色葡萄球菌检验程序

### 5 操作步骤

#### 5.1 样品的处理

称取 25 g 样品至盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆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 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中，振荡混匀。

#### 5.2 增菌和分离培养

5.2.1 将上述样品匀液于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  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，污染严重时可在 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤内呈混浊生长。

5.2.2 将上述培养物，分别划线接种到 Baird-Parker 平板和血平板，血平板  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h。Baird-Parker 平板  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h 或 45 h~48 h。

5.2.3 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上，菌落直径为 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。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度，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。在血平板上，形成菌落较大，圆形、光滑凸起、湿润、金黄色（有时为白色），菌落周围可见完全透明溶血圈。挑取上述菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

### 5.3 鉴定

5.3.1 **染色镜检：**金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌，排列呈葡萄球状，无芽胞，无荚膜，直径约为  $0.5\text{ }\mu\text{m}\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ 。

5.3.2 **血浆凝固酶试验：**挑取 Baird-Parker 平板或血平板上可疑菌落 1 个或以上，分别接种到 5 mL BHI 和营养琼脂小斜面， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h。

取新鲜配置兔血浆 0.5 mL，放入小试管中，再加入 BHI 培养物 0.2 mL~0.3 mL，振荡摇匀，置  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  温箱或水浴箱内，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）或凝固体积大于原体积的一半，被判定为阳性结果。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株的肉汤培养物作为对照。也可用商品化的试剂，按说明书操作，进行血浆凝固酶试验。

结果如可疑，挑取营养琼脂小斜面的菌落到 5 mL BHI， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~48 h，重复试验。

### 5.4 葡萄球菌肠毒素的检验

可疑食物中毒样品或产生葡萄球菌肠毒素的金黄色葡萄球菌菌株的鉴定，应按附录 B 检测葡萄球菌肠毒素。

## 6 结果与报告

6.1 **结果判定：**符合 5.2.3、5.3，可判定为金黄色葡萄球菌。

6.2 **结果报告：**在 25 g (mL) 样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

## 第二法 金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板计数

### 7 检验程序

金黄色葡萄球菌平板计数程序见图2。

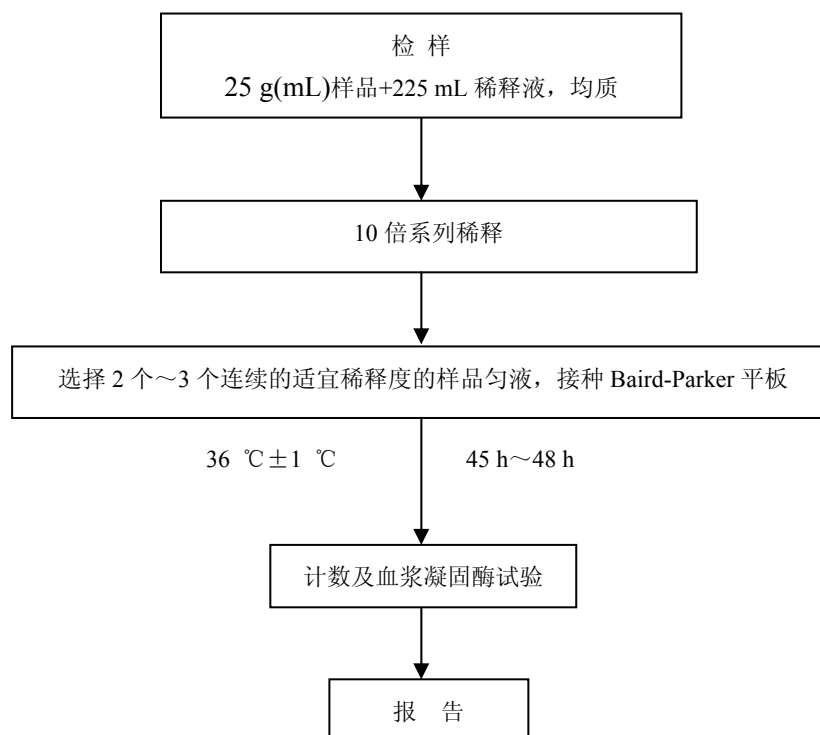


图 2 金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板法检验程序

### 8 操作步骤

#### 8.1 样品的稀释

8.1.1 固体和半固体样品：称取25 g样品置盛有225 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min均质1 min~2 min，或置盛有225 mL稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1 min~2 min，制成1:10的样品匀液。

8.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取25 mL样品置盛有225 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中，充分混匀，制成1:10的样品匀液。

8.1.3 用1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取1:10 样品匀液1 mL，沿管壁缓慢注于盛有9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用1支1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成1:100 的样品匀液。

8.1.4 按8.1.3 操作程序，制备10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用1次1 mL 无菌吸管或吸头。

#### 8.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计，选择2个~3个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行10 倍递增稀释时，每个稀释度分别吸取1 mL 样品匀液以0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别加

入三块 Baird-Parker 平板,然后用无菌 L 棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。使用前,如 Baird-Parker 平板表面有水珠,可放在 25℃~50℃的培养箱里干燥,直到平板表面的水珠消失。

### 8.3 培养

8.3.1.1 在通常情况下,涂布后,将平板静置 10 min,如样液不易吸收,可将平板放在培养箱 36℃±1℃培养 1 h;等样品匀液吸收后翻转平皿,倒置于培养箱,36℃±1℃培养,45 h~48 h。

### 8.4 典型菌落计数和确认

8.4.1 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上,菌落直径为 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。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度,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。

8.4.2 选择有典型的金黄色葡萄球菌菌落的平板,且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20 CFU~200 CFU 之间的平板,计数典型菌落数。如果:

a) 如果只有一个稀释度平板的菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间且有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落;

b) 最低稀释度平板的菌落数小于 20 CFU 且有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落;

c) 某一稀释度平板的菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落,但下一稀释度平板上没有典型菌落,应计数该稀释度平板上的典型菌落;

d) 某一稀释度平板的菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落,且下一稀释度平板上有典型菌落,但其平板上的菌落数不在 20 CFU~200 CFU 之间,应计数该稀释度平板上的典型菌落;

以上按公式(1)计算。

e) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间,按公式(2)计算。

8.4.3 从典型菌落中任选 5 个菌落(小于 5 个全选),分别按 5.3.2 做血浆凝固酶试验。

### 9 结果计算:

公式(1):

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

*T*——样品中金黄色葡萄球菌菌落数;

*A*——某一稀释度典型菌落的总数;

*B*——某一稀释度血浆凝固酶阳性的菌落数;

*C*——某一稀释度用于血浆凝固酶试验的菌落数;

*d*——稀释因子。

公式(2):

$$T = \frac{A1B1/C1 + A2B2/C2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

*T*——样品中金黄色葡萄球菌菌落数;

*A1*——第一稀释度(低稀释倍数)典型菌落的总数;

*A2*——第二稀释度(高稀释倍数)典型菌落的总数;

*B1*——第一稀释度(低稀释倍数)血浆凝固酶阳性的菌落数;



*B*<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）血浆凝固酶阳性的菌落数；

*C*<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）用于血浆凝固酶试验的菌落数；

*C*<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）用于血浆凝固酶试验的菌落数；

1.1——计算系数；

*d*——稀释因子（第一稀释度）。

## 10 结果与报告

根据Baird-Parker平板上金黄色葡萄球菌的典型菌落数，按9中公式计算，报告每g（mL）样品中金黄色葡萄球菌数，以CFU/g(mL)表示；如T值为0，则以小于1乘以最低稀释倍数报告。

### 第三法 金黄色葡萄球菌MPN计数

#### 11 检验程序

金黄色葡萄球菌MPN计数程序见图3。

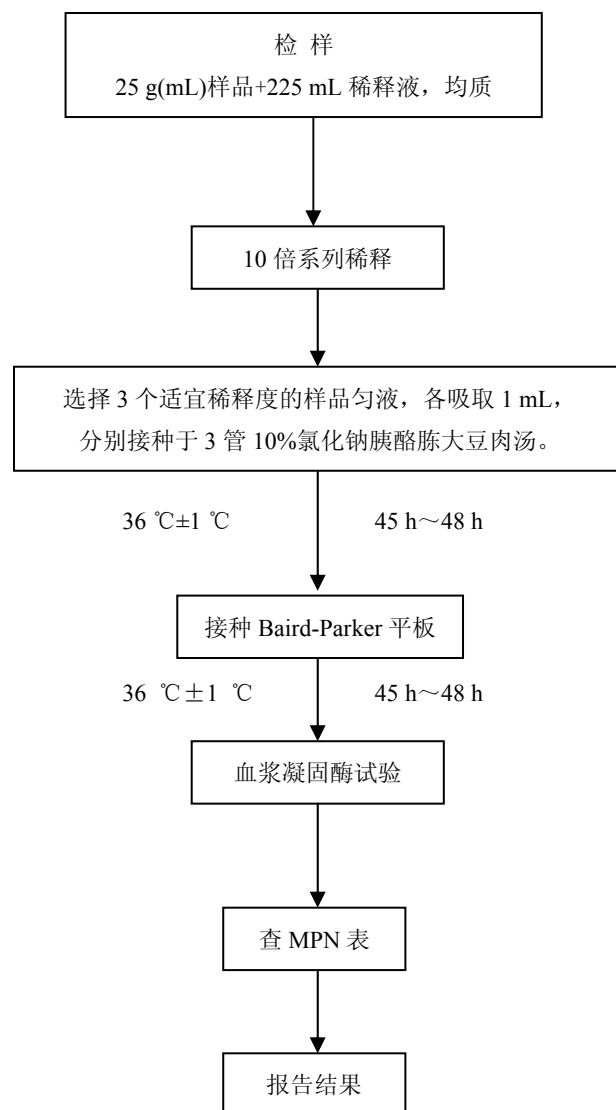


图3 金黄色葡萄球菌MPN法检验程序

#### 12 操作步骤

##### 12.1 样品的稀释

按8.1进行。

##### 12.2 接种和培养

12.2.1 根据对样品污染状况的估计, 选择 3 个适宜稀释度的样品匀液 (液体样品可包括原液), 在进行 10 倍递增稀释时, 每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液接种到 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤管, 每个稀释度接种 3 管, 将上述接种物于 36 °C ± 1 °C 培养 45 h ~ 48 h。

12.2.2 用接种环从有细菌生长的各管中,移取1环,分别接种 Baird-Parker 平板,36℃±1℃培养45h~48h。

### 12.3 典型菌落确认

12.3.1 见8.4.1。

12.3.2 从典型菌落中至少挑取1个菌落接种到BHI肉汤和营养琼脂斜面,36℃±1℃培养18h~24h。进行血浆凝固酶试验,见5.3.2。

## 13 结果与报告

计算血浆凝固酶试验阳性菌落对应的管数,查MPN检索表(见附录C),报告每g(mL)样品中金黄色葡萄球菌的最可能数,以MPN/g(mL)表示。

附录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

### A.1 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤

#### A.1.1 成分

胰酪胨（或胰蛋白胨）	17.0 g
植物蛋白胨（或大豆蛋白胨）	3.0 g
氯化钠	100.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
丙酮酸钠	10.0 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.3±0.2	

#### A.1.2 制法

将上述成分混合，加热，轻轻搅拌并溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

### A.2 7.5%氯化钠肉汤

#### A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	75 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4	

#### A.2.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

### A.3 血琼脂平板

#### A.3.1 成分

豆粉琼脂（pH7.4~7.6）	100 mL
脱纤维羊血（或兔血）	5 mL~10 mL

#### A.3.2 制法

加热溶化琼脂，冷却至 50 °C，以无菌操作加入脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。

### A.4 Baird—Parker 琼脂平板

#### A.4.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	1.0 g
丙酮酸钠	10.0 g
甘氨酸	12.0 g
氯化锂（LiCl·6H <sub>2</sub> O）	5.0 g

琼脂	20.0 g
蒸馏水	950 mL
pH 7.0±0.2	

#### A. 4.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与经过除菌过滤的 1%亚碲酸钾溶液 10 mL 混合，保存于冰箱内。

#### A. 4.3 制法

将各成分加到蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，调节 pH。分装每瓶 95 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂，冷至 50 °C，每 95 mL 加入预热至 50 °C 的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48 h。

### A. 5 脑心浸出液肉汤(BHI)

#### A. 5.1 成分

胰蛋白质胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠 (12H <sub>2</sub> O)	2.5 g
葡萄糖	2.0 g
牛心浸出液	500 mL
pH 7.4±0.2	

#### A. 5.2 制法

加热溶解，调节 pH，分装 16 mm×160 mm 试管，每管 5 mL 置 121 °C，15 min 灭菌。

### A. 6 兔血浆

取柠檬酸钠 3.8 g，加蒸馏水 100 mL，溶解后过滤，装瓶，121 °C 高压灭菌 15 min。

兔血浆制备：取 3.8%柠檬酸钠溶液一份，加兔全血四份，混好静置 (或以 3000 r/min 离心 30 min)，使血液细胞下降，即可得血浆。

### A. 7 磷酸盐缓冲液

#### A. 7.1 成分：

磷酸二氢钾 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH 7.2	

#### A. 7.2 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 至 7.2，用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

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 高压灭菌 15 min。

### A. 8 营养琼脂小斜面

#### A. 8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2~7.4	

## A. 8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入15%氢氧化钠溶液约2 mL调节pH至7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化，分装13 mm×130 mm管，121 °C高压灭菌15 min。

## A. 9 革兰氏染色液

## A. 9.1 结晶紫染色液

## A. 9.1.1 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. 9.1.2 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. 9.2 革兰氏碘液

## A. 9.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

## A. 9.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合，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. 9.3 沙黄复染液

## A. 9.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

## A. 9.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

## A. 9.4 染色法

- 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，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、待干、镜检。

## A. 10 无菌生理盐水

## A. 10.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

## A. 10.2 制法

称取8.5 g 氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 °C高压灭菌15 min。

附录 B  
(规范性附录)  
葡萄球菌肠毒素检验

### B.1 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,试验用水应符合GB/T 6682对一级水的规定。

B.1.1 A、B、C、D、E型金黄色葡萄球菌肠毒素分型ELISA检测试剂盒。

B.1.2 pH试纸,范围在3.5~8.0,精度0.1。

B.1.3 0.25 mol/L、pH8.0的Tris缓冲液:将121.1g的Tris溶解到800mL的去离子水中,待温度冷至室温后,加42 mL浓HCl,调pH值至8.0。

B.1.4 pH 7.4的磷酸盐缓冲液:称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.55g(或 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.62g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.85g(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.73g)、NaCl 8.7g溶于1 000 mL蒸馏水中,充分混匀即可。

B.1.5 庚烷。

B.1.6 10%次氯酸钠溶液。

B.1.7 肠毒素产毒培养基

B.1.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
胰消化酪蛋白	200 mg(氨基酸)
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
氯化钙	0.1 g
硫酸镁	0.2 g
菸酸	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.2~7.4	

B.1.7.2 制法

将所有成分混于水中,溶解后调节pH,121℃高压灭菌30min。

B.1.8 营养琼脂

B.1.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.1.8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入15%氢氧化钠溶液约2mL,校正pH至7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装烧瓶,121℃高压灭菌15min。

### B.2 仪器和设备

B.2.1 电子天平:感量0.01g。

- B.2.2 均质器。
- B.2.3 离心机：转速 3000 g~5000 g。
- B.2.4 离心管：50 mL。
- B.2.5 滤器：滤膜孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 。
- B.2.6 微量加样器：20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ ~1000  $\mu\text{L}$ 。
- B.2.7 微量多通道加样器：50  $\mu\text{L}$ ~300  $\mu\text{L}$ 。
- B.2.8 自动洗板机(可选择使用)。
- B.2.9 酶标仪：波长 450 nm。

### B.3 原理

本方法可用 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型酶联免疫吸附试剂盒完成。本方法测定的基础是酶联免疫吸附反应(ELISA)。96 孔酶标板的每一个微孔条的 A~E 孔分别包被了 A、B、C、D、E 型葡萄球菌肠毒素抗体，H 孔为阳性质控，已包被混合型葡萄球菌肠毒素抗体，F 和 G 孔为阴性质控，包被了非免疫动物的抗体。样品中如果有葡萄球菌肠毒素，游离的葡萄球菌肠毒素则与各微孔中包被的特定抗体结合，形成抗原抗体复合物，其余未结合的成分在洗板过程中被洗掉；抗原抗体复合物再与过氧化物酶标记物(二抗)结合，未结合上的酶标记物在洗板过程中被洗掉；加入酶底物和显色剂并孵育，酶标记物上的酶催化底物分解，使无色的显色剂变为蓝色；加入反应终止液可使颜色由蓝变黄，并终止了酶反应；以 450 nm 波长的酶标仪测量微孔溶液的吸光度值，样品中的葡萄球菌肠毒素与吸光度值成正比。

### B.4 检测步骤

#### B.4.1 从分离菌株培养物中检测葡萄球菌肠毒素方法

待测菌株接种营养琼脂斜面(试管 18 mm×180 mm) 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h，用 5 mL 生理盐水洗下菌落，倾入 60 mL 产毒培养基中，每个菌种一瓶，37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 48 h，振速为 100 次/min，吸出菌液离心，8000 r/min 20 min，加热 100  $^{\circ}\text{C}$ ，10 min，取上清液，取 100  $\mu\text{L}$  稀释后的样液进行试验。

#### B.4.2 从食品中提取和检测葡萄球菌肠毒素方法

##### B.4.2.1 乳和乳粉

将 25 g 乳粉溶解到 125 mL、0.25 M、pH8.0 的 Tris 缓冲液中，混匀后同液体乳一样按以下步骤制备。将乳于 15  $^{\circ}\text{C}$ ，3500 g 离心 10 min。将表面形成的一层脂肪层移走，变成脱脂乳。用蒸馏水对其进行稀释(1:20)。取 100  $\mu\text{L}$  稀释后的样液进行试验。

##### B.4.2.2 脂肪含量不超过 40%的食品

称取 10 g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15  $^{\circ}\text{C}$ ，3500g 离心 10 min。必要时，移去上面脂肪层。取上清液进行过滤除菌。取 100  $\mu\text{L}$  的滤出液进行试验。

##### B.4.2.3 脂肪含量超过 40%的食品

称取 10 g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15  $^{\circ}\text{C}$ ，3500 g 离心 10 min。吸取 5 mL 上层悬浮液，转移到另外一个离心管中，再加入 5 mL 的庚烷，充分混匀 5 min。于 15  $^{\circ}\text{C}$ ，3500 g 离心 5 min。将上部有机相(庚烷层)全部弃去，注意该过程中不要残留庚烷。将下部水相层进行过滤除菌。取 100  $\mu\text{L}$  的滤出液进行试验。

##### B.4.2.4 其它食品可酌情参考上述食品处理方法。

### B.4.3 检测

B.4.3.1 所有操作均应在室温(20  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$ )下进行，A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温方可使用。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头，用过的吸头以及废液要浸泡到 10%次氯酸钠溶液中过夜。



**B.4.3.2** 将所需数量的微孔条插入框架中（一个样品需要一个微孔条）。将样品液加入微孔条的 A~G 孔，每孔 100  $\mu\text{L}$ 。H 孔加 100  $\mu\text{L}$  的阳性对照，用手轻拍微孔板充分混匀，用粘胶纸封住微孔以防溶液挥发，置室温下孵育 1 h。

**B.4.3.3** 将孔中液体倾倒至含 10 %次氯酸钠溶液的容器中，并在吸水纸上拍打几次以确保孔内不残留液体。每孔用多通道加样器注入 250  $\mu\text{L}$  的洗液，再倾倒掉并在吸水纸上拍干。重复以上洗板操作 4 次。本步骤也可由自动洗板机完成。

**B.4.3.4** 每孔加入 100 $\mu\text{L}$  的酶标抗体，用手轻拍微孔板充分混匀，置室温下孵育 1 h。

**B.4.3.5** 重复 4.3.3 的洗板程序。

**B.4.3.6** 加 50 $\mu\text{L}$  的 TMB 底物和 50 $\mu\text{L}$  的发色剂至每个微孔中，轻拍混匀，室温黑暗避光处孵育 30 min。

**B.4.3.7** 加入 100 $\mu\text{L}$  的 2 mol/L 硫酸终止液，轻拍混匀，30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长条件下测量每个微孔溶液的 OD 值。

#### **B.4.4 结果的计算和表述**

##### **B.4.4.1 质量控制**

测试结果阳性质控的 OD 值要大于 0.5，阴性质控的 OD 值要小于 0.3，如果不能同时满足以上要求，测试的结果不被认可。对阳性结果要排除内源性过氧化物酶的干扰。

##### **B.4.4.2 临界值的计算**

每一个微孔条的 F 孔和 G 孔为阴性质控，两个阴性质控 OD 值的平均值加上 0.15 为临界值。

示例：阴性质控 1=0.08

阴性质控 2=0.10

平均值=0.09

临界值=0.09+0.15=0.24

##### **B.4.4.3 结果表述**

OD 值小于临界值的样品孔判为阴性，表述为样品中未检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素；OD 值大于或等于临界值的样品孔判为阳性，表述为样品中检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素。

#### **B.5 生物安全**

因样品中不排除有其它潜在的传染性物质存在，所以要严格按照 GB19489 对废弃物进行处理。

附录C  
(规范性附录)  
金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 检索表

C.1 金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 的检索见表

每g(mL)检样中金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 的检索见表C.1。

表C.1 金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注1: 本表采用3个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和0.001 g(mL)]、每个稀释度接种3管。  
注2: 表内所列检样量如改用1 g (mL)、0.1 g(mL)和0.01 g(mL)时, 表内数字应相应降低10倍; 如改用0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.0001 g(mL)时, 则表内数字应相应增高10倍, 其余类推。